



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Importancia de las células mesenquimales estromales CD105 (+)/CD34 (-) en la evolución del cáncer de mama

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Química Biológica

Lic. María Belén Giorello

Directora de Tesis: Dra. Norma Alejandra Chasseing

Directora adjunta: Dra. Vivian Labovsky

Consejera de estudios: Dra. Edith Kordon

Lugar de trabajo: Laboratorio de Inmunohematología, Instituto de Biología y Medicina
Experimental

Fecha de defensa: 3/12/2024

2024



AGRADECIMIENTOS

A Ale, mi directora de tesis y guía incondicional: Gracias por tu confianza y apoyo. No solo fuiste mi gran referente académico, sino que también me acompañaste en este camino con inmenso cariño y dedicación, siempre buscando lo mejor para mí. Agradezco profundamente el tiempo que me brindaste desinteresadamente, y, sobre todo, por considerar nuestras realidades y obligaciones fuera del laboratorio. Tu apoyo incondicional, tu paciencia, escucha y comprensión hicieron que este trayecto fuera más llevadero.

A Fran, mi gran compañero y amigo en este complejo camino del doctorado: Sin vos, este trabajo de tesis no hubiese sido lo mismo. Fuiste mi apoyo, confidente y mi segunda mano en el laboratorio. Fue un verdadero regalo construir una relación de compañeros basada en la confianza, libre de envidia y competitivismo. Gracias por los mates, risas y momentos compartidos. Gracias a tu compañía, cada momento en el labo se hizo mucho más disfrutable.

A mis compañeras y amigas del IBYME, Mai, Pauli, Flavi y Flor: Gracias por todas las risas y ocurrencias que hicieron que el tiempo en el labo fuera mucho más amigable y llevadero. Compartir tan lindos momentos con ustedes fue una gran fortuna durante este trayecto.

Al resto de integrantes de mi labo, a todos los que forman y formaron parte del laboratorio de inmunohematología: Gracias a Vivi, mi directora asistente, que no solo fue un sostén al inicio del doctorado, sino también mi otra mentora, enseñándome los primeros protocolos cuando entré al laboratorio. A Ceci, Leo, Juli y Pablo, gracias por todas las charlas y el tiempo compartido. ¡Su apoyo y compañía fueron fundamentales en este recorrido!

Al resto del pasillo: Gracias, Judi y Vani, por los almuerzos, las charlas compartidas y por los equipos y reactivos prestados, jaja. A JC, Lucre, Paula, Isa, Luciano y Tiago, gracias por sus consejos y su ayuda incondicional. ¡Su compañía hizo la diferencia en este camino!



Al servicio de Anatomía Patológica del Hospital Italiano, y en especial a Alejandra, Florencia y Mery: Gracias por estar siempre dispuestas a trabajar con nosotros y por ser una parte fundamental e imprescindible de este proyecto. Su colaboración ha sido invaluable para lograr este trabajo.

A Edith, mi consejera de estudios y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por brindarme apoyo y el espacio para poder seguir formandome profesionalmente.

A Dario, mi gran amor y compañero de vida, por apoyarme en todo el proceso. Te amo.

A mi familia y amigos, por aguantarme y apoyarme todos estos años, ¡los quiero!

Simplemente, gracias a todos los que, de una u otra forma, hicieron esto posible.



TRABAJOS PUBLICADOS DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS

Publicaciones

- 1) Distinctive Features of Cancer-Associated Fibroblasts Expressing CD105, a Novel Biomarker for Bone Metastasis, in Early-Stage Invasive Ductal Breast Cancer. **Giorello MB**, Borzone FR, Sanmartin MC, Martinez LM, Sarkar M, Labovsky V, Wernicke A, Sarkar TR, Chasseing NA. *Clinical and Experimental Metastasis*. Enviado en Septiembre 2024. En revisión.
- 2) RANK in Cancer-Associated Fibroblasts: A Valuable Prognostic Determinant for Metastasis in Early-Stage Breast Cancer Patients. **Giorello MB**, Borzone FR, Mora MF, Padin MR, Wernicke A, Labovsky V, Chasseing NA. *Cancer Biomarkers*. 2024;41(2):115-132. doi: 10.3233/CBM-230523.
- 3) Post-surgery statin use contributes to favorable outcomes in patients with early breast cancer. **Giorello MB**, Marks MP, Osinalde TM, Padin MR, Wernicke A, Calvo JC, Chasseing NA, Vellón L. *Cancer Epidemiology* 30: 90, 102573. DOI: 10.1016/j.canep.2024.102573.
- 4) CD105 expression in cancer-associated fibroblasts: A biomarker for bone metastasis in early invasive ductal breast cancer patients. **Giorello MB**, Martinez LM, Borzone FR, Padin MR, Mora MF, Sevic I, Alaniz L, Calcagno ML, García-Rivello H, Wernicke A, Labovsky V, Chasseing NA. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 11: 1250869, 2023. DOI: 10.3389/fcell.2023.1250869.
- 5) Senescent mesenchymal stem/stromal cells in pre-metastatic bone marrow of untreated advanced breast cancer patients. Borzone FR, **Giorello MB**, Martinez LM, Sanmartin MC, Feldman L, Dimase F, Batagelj E, Yannarelli G, Chasseing NA. *Oncology Research* 31(3): 361-374, 2023. DOI: 10.32604/or.2023.028104.
- 6) Spontaneous Osteoclastogenesis, a risk factor for bone metastasis in advanced luminal A-type breast cancer patients. Fernández Vallone V, Borzone FR, Martinez LM, **Giorello MB**, Choi H, Dimase F, Feldman L, Bordenave RH, Chudzinski-Tavassi AM, Batagelj E, Chasseing NA. *Frontiers in Oncology* 13: 1073793, 2023. DOI: 10.3389/fonc.2023.1073793.



- 7) Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles as biological carriers for drug delivery in cancer therapy. Sanmartin MC, Borzone FR, **Giorello MB**, Yannarelli G, Chasseing NA. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 10: 882545, 2022. DOI: 10.3389/fbioe.2022.882545.
- 8) Mesenchymal Stem Cells and Cancer-Associated Fibroblasts as a Therapeutic Strategy for Breast Cancer. Borzone FR*, **Giorello MB***, Sanmartin MC, Yannarelli G, Martinez LM, Chasseing NA. *British Journal of Pharmacology* 181(2): 238-256, 2024. DOI: 10.1111/bph.15861. Epub 2022 May 17. *Comparten la primer autoría.
- 9) CD1a and CD83 positive dendritic cells as prognostic markers of metastasis development in early breast cancer patients. **Giorello MB**, Matas A, Marengo P, Davies KM, Borzone FR, Calcagno ML, García-Rivello H, Wernicke A, Martinez LM, Labovsky V, Chasseing NA. *Breast Cancer* 28(6): 1328-1339, 2021. DOI: 10.1007/s12282-021-01270-9.
- 10) Bone marrow/bone pre-metastatic niche for breast cancer cells colonization: the role of mesenchymal stromal cells. Sanmartin MC, Borzone FR, **Giorello MB**, Pacienza N, Yannarelli G, Chasseing NA. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 164: 103416, 2021. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2021.103416.
- 11) Cancer-associated fibroblasts in breast tumor microenvironment. **Giorello MB**, Borzone FR, Labovsky V, Piccioni FV, Chasseing NA. *J Mammary Gland Biology and Neoplasia*, aceptado Noviembre 2020. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 26(2): 135-155, 2021. DOI: 10.1007/s10911-020-09475-y.
- 12) Interleukin-6 receptor in spindle-shaped stromal cells, a prognostic determinant of early breast cancer. Labovsky V, Martinez LM, Calcagno ML, Davies KM, , Garcia Rivello H, Wernicke A, Feldman L, **Giorello MB**, Matas A, Borzone FR, Howard SC, Chasseing NA. *Tumor Biology* 37: 13377-13384, 2016. DOI: 10.1007/s13277-016-5268-7.
- 13) Prognostic significance of TRAIL-R3 and CCR-2 expression in tumor epithelial cells of patients with early breast cancer. Labovsky V, Martinez LM, Davies KM, de Luján Calcagno M, García-Rivello H, Wernicke A, Feldman L, Matas A, **Giorello MB**,



Borzzone FR, Choi H, Howard SC, Chasseing NA. *BMC Cancer* 17(1): 280, 2017. DOI: 10.1186/s12885-017-3259-8.

Comunicaciones

- 1) **Giorello MB**, Borzzone FR, Martinez LM, Mora MF, Padin MR, Wernicke A, Labovsky V, Chasseing NA. “Expresión de CD105 en fibroblastos asociados al tumor como biomarcador de ocurrencia de metástasis óseas en cáncer de mama.” Poster. XXV Congreso Argentino e Internacional de Oncología Clínica. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. Octubre **2021**. Resumen n° 50. Primer Premio de trabajos presentados en la categoría de Investigación Básica del XXV Congreso Argentino e Internacional de Oncología Clínica. Asociación Argentina de Oncología Clínica. 25 al 30 de octubre de 2021 en Modalidad Virtual.
- 2) **Giorello MB**, Borzzone FR, Martinez LM, Mora MF, Calcagno ML, Davies KM, Wernicke A, Labovsky V, Chasseing NA. “CD105 in spindle-shaped stromal cells, a prognostic determinant of early luminal breast cancer.” Poster y minioral. Reunión Conjunta de Sociedad de Biociencias (SAIC). CABA, Argentina. 10-14 Noviembre **2020**. Medicina (Bs.As.) 2020, vol 80.
- 3) **Giorello MB**, Municoy J, Borzzone FR, Martinez LM, Marengo P, Davies KM, García-Rivello H, Wernicke A, Calcagno ML, Labovsky V, Chasseing NA. “Rank receptor in spindle-shaped stromal cells, a prognostic determinant of early breast cancer.” Poster y minioral. Reunión Conjunta de Sociedad de Biociencias (SAIC, LXII Reunión Anual). CABA, Argentina. 13-17 Noviembre **2017**. Medicina (Bs.As.) 2017, vol 77 sup 1: abst 452, pg 201.
- 4) **Giorello MB**, Borzzone FR, Martinez LM, Matas A, Labovsky V, Chasseing NA, Davies KM, García-Rivello H, Wernicke A. Prognostic significance of TRAIL-R3 and CCR-2 expression in tumor epithelial cells of patients with early breast cancer. Reunión Anual Conjunta Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC, LXI Reunión Anual), la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI, LXIV Reunión Anual) y la



Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE, XLVIII Reunión Anual). Mar del Plata, Argentina. 16-19 Noviembre 2016. Medicina (Bs.As.) **2016**, vol 76 sup 1: abst 126, pg 129.

- 5) **Giorello MB**, Borzone FR, Martinez LM, Davies KM, de Luján Calcagno M, García-Rivello H, Wernicke A, Matas A, Labovsky V*, Chasseing NA*. “Significancia pronóstica de la expresión de TRAIL-R3 y CCR-2 en las células epiteliales tumorales mamarias de las pacientes con cáncer de mama temprana.” Simposio Internacional Programa RAICES “*Ganando la guerra contra el cáncer*”. - FCEyN, UBA - Argentina, CABA, **2016**. *Comparten última autoría.
- 6) **Giorello MB**, Borzone FR, Martinez LM, Davies KM, de Luján Calcagno M, García-Rivello H, Wernicke A, Matas A, Labovsky V*, Chasseing NA*. “Participación de las células del sistema inmune en la evolución tumoral.” Simposio Internacional Programa RAICES “*Ganando la guerra contra el cáncer*”. - FCEyN, UBA - Argentina, CABA, **2016**. *Comparten última autoría.

Premios y distinciones

Primer premio al trabajo “Expresión de CD105 en fibroblastos asociados al tumor como biomarcador de ocurrencia de metástasis óseas en cáncer de mama.” presentado en el XXV Congreso argentino e internacional de Oncología Clínica, 2021. **GIORELLO MB**, BORZONE FR, MARTINEZ LM, MORA MF, PADIN MR, WERNICKE A, LABOVSKY V, CHASSEING NA.



SOPORTE FINANCIERO

CONICET, PIP300 (2014, período **2015-2021**. 300.000 pesos. Tema: “Importancia de las células madre, mesenquimales y tumorales, en la evolución del cáncer de mama”. Investigadora Responsable: Dra. Chasseing NA.

Intituto Nacional del Cáncer (INC), período **2016-2018**. 500.000 pesos. Tema: Título: “Importancia del microambiente estromal, en particular de la célula madre mesenquimal, y de la célula tumoral en la evolución del cáncer de mama”. Subtítulo: Características fenotípicas y funcionales de las células estromales CD105(+)/CD34(-) del microambiente tumoral y las células madre mesenquimales de médula ósea, en la evolución del cáncer de mama. Investigador Responsable: Dra. Labovsky V.

Subsidio del FONCYT PICT2016-1093, período **2017-2022**. 810.000 pesos. Tema: “Estudio de la reserva medular de células madre mesenquimales en pacientes con cáncer de mama avanzado”. Subtítulo: Células madre mesenquimales y Metástasis ósea: un nuevo desafío. Investigadora Responsable: Dra. Chasseing NA.

Subsidio del FONCYT PICT2017-2501, período **2018-2023**. 1.008.000 pesos. Tema: “Importancia del microambiente estromal, en particular de la célula madre mesenquimal, y de la célula tumoral en la evolución del cáncer de mama”. SUBTÍTULO: Importancia de las células mesenquimales estromales CD105(+)/CD34(-) en la evolución del cáncer de mama. Investigadora Responsable: Dra. Chasseing NA.

Subsidio de la Fundación Roemmers, período **2019-2021**. 50.000 pesos. Tema: “Significancia pronóstica de RANK en fibroblastos asociados al tumor en pacientes con cáncer de mama temprano. Responsable: Lic. Giorello MB.



ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	12
ABSTRACT.....	15
RESUMEN.....	19
PALABRAS CLAVE.....	22
INTRODUCCIÓN.....	23
Generalidades del cáncer de mama	23
Importancia del microambiente estromal en la evolución del cáncer de mama.....	24
Caracterización de los fibroblastos asociados al tumor en cáncer de mama	27
Rol del fibroblasto asociado al tumor en la evolución del cáncer de mama.....	30
Diferentes orígenes de los fibroblastos asociados al cáncer	34
Diferentes orígenes de los fibroblastos asociados al cáncer: rol de las células madre mesenquimales de la médula ósea	35
Fibroblastos asociados al cáncer CD105(+) y su relación con la evolución tumoral, particularmente con la ocurrencia de metástasis óseas	38
HIPÓTESIS GENERAL DEL TRABAJO.....	41
OBJETIVO GENERAL.....	41
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
PARTE A.....	43
Selección de muestras.....	43
Características clínico-patológicas de las pacientes con cáncer de mama	44
Procesamiento de las muestras y análisis de la expresión de CD105 en las células estromales fusiformes CD34(-), no asociadas a la vasculatura	49
Análisis de las características estromales intratumorales	51
Análisis estadístico entre la expresión de CD105 en los fibroblastos asociados al cáncer con características clínico-patológicas de pacientes con cáncer de mama, así como con otras características estromales	52
Análisis de la relación de la expresión del mRNA de CD105 en células FSP (+), FAP (+) y CD34 (-) dentro del tumor de mama con los datos clínico patológicos de las pacientes, utilizando un enfoque bioinformático	53
Análisis de la expresión de la firma génica correspondiente a células fibroblásticas (FSP y FAP positivas) con características mesenquimales (CD90, CD73 y CD105 positivas) en el tejido mamario tumoral y normal	54



PARTE B	56
Selección muestras.....	56
Aislamiento y expansión de los fibroblastos asociados al cáncer a partir de tejido primario de cáncer de mama	58
Separación de fibroblastos CD105(+) /CD34(-) y CD105(-) /CD34(-).....	59
Estudio del fenotipo de las subpoblaciones fibroblásticas CD105(+)/CD34(-) y CD105(-) / CD34(-))	61
Cultivo de células tumorales mamarias humanas de las líneas MCF-7 y MDA-MB231, así como células mamarias normales humanas de la línea MCF-10A y obtención de los medios condicionados correspondientes	63
Diferenciación de las células madres mesenquimales de médula ósea de donantes sanos en fibroblastos asociados al cáncer mediante el uso de medios condicionados de células tumorales mamarias de las líneas MCF-7 y MDA-MB231	65
Estudio de la capacidad de clonado/auto-renovación de los fibroblastos de las subpoblaciones CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) para formación de unidades formadoras de colonias fibroblásticas y de la morfología de células estromales dentro de colonias.....	73
Evaluación de la viabilidad celular como una medida indirecta de la capacidad de proliferación	74
Estudio del ciclo celular	75
Estudio de expresión génica.....	75
Estudio de estrés oxidativo [especies oxigenadas reactivas mitocondriales (anión superóxido) y especies oxigenadas reactivas totales].....	77
Estudio de senescencia celular (β -galactosidasa).....	78
Estudio del secretoma	78
Efecto del pool de medio condicionado de las subpoblaciones de fibroblastos CD105(+) / CD34 (-) y CD105(-)/CD34(-) en células tumorales de mama humana de las líneas celulares MCF- 7 y MDA-MB231	80
Análisis Estadístico	82
RESULTADOS	83
PARTE A.....	83
Análisis de la expresión de la firma génica correspondiente a células fibroblásticas (FSP y FAP positivas) con características stemness (CD90, CD73 y CD105 positivas) en el tejido mamario tumoral y normal.....	83
Estudio de la expresión de CD105 en las células estromales fusiformes, no asociadas a vasculatura	84



Análisis de las asociaciones de los datos de expresión de CD105 en las células estromales fusiformes, no asociadas a vasculatura, con los datos de los parámetros de pronóstico clásicos del cáncer de mama, así como también con otros datos clínico-patológicos.....	87
Asociación entre marcadores pronósticos clásicos y la progresión del tumor	92
Análisis de la expresión de CD105 como factor pronóstico independiente de ocurrencia de metástasis, particularmente metástasis ósea y sobrevida post-cirugía.....	98
Análisis de las asociaciones entre la expresión de CD105 en las células estromales fusiformes, no asociadas a vasculatura y otros datos del estroma tumoral mamario	99
Análisis de las asociaciones entre la expresión de CD105 en las células estromales fusiformes, no asociadas a vasculatura y las microcalcificaciones anárquicas evidentes en las mamografías previas al diagnóstico del tumor, así como con la presencia de dolor óseo previo al desarrollo de metástasis	102
Relevancia pronóstica de la expresión de mRNA de CD105 en células FSP (+), FAP (+) y CD34 (-) dentro del tumor de mama utilizando un enfoque bioinformático.....	106
PARTE B.....	110
Estudio de las características fenotípicas de las células estromales fusiformes (<i>fibroblast-like</i>)	110
Diferenciación de las células madres mesenquimales de médula ósea de donantes sanos en fibroblastos asociados al cáncer mediante el uso de medios condicionados de células tumorales mamarias de las líneas MCF-7 y MDA-MB231.....	114
Estudio de la capacidad de auto-renovación de las subpoblaciones fibroblásticas CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) y de la morfología de las células estromales mediante el ensayo de unidades formadoras de colonias fibroblásticas	119
Viabilidad celular como una medida indirecta de la capacidad de proliferación y ciclo celular en las subpoblaciones fibroblásticas CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-).....	121
Estudio de la expresión de genes de <i>stemness</i> (auto-renovación y multipotencialidad, particularmente diferenciación osteoblástica), así como genes relacionados con la regulación de la osteoclastogénesis, capacidad de migración y evolución tumoral en las subpoblaciones fibroblásticas CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-)	122
Estudio del estrés oxidativo de las subpoblaciones fibroblásticas CD105(+)/CD34(-) y CD105 (-)/CD34(-).....	123
Estudio de la senescencia celular a través de la detección de SA-β-galactosidasa en las subpoblaciones fibroblásticas CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-).....	124
Estudio del secretoma en el medio condicionado de las subpoblaciones fibroblásticas CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) a través de un análisis proteómico masivo	125



Estudio del efecto del pool de medio condicionado de subpoblaciones fibroblásticas CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) en células tumorales de mama humana de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB231	132
DISCUSIÓN	136
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	161
<i>GRAPHICAL ABSTRACT</i>	163
CUADRO RESUMEN	164
AGRADECIMIENTOS	165
REFERENCIAS.....	167
ANEXOS.....	206
Comite de ética	206
Modelo de consentimiento informado	210



ABREVIATURAS

Acs anticuerpos

ATB/ATM solución de antibiótico-antimicótico

BMFS tiempo libre de metástasis óseas

BMP-2 proteína morfogénica ósea-2

BMP-6 proteína morfogenética ósea-6

BSA seroalbúmina bovino

CAFs fibroblastos asociados al cáncer

CAV1 calveolina-1

CCL-2 Ligando 2 de quimioquina motivo C-C (MCP-1)

CD105 endoglina

CD106 (VCAM-1) proteína de adhesión de células vasculares 1

CD146 (M-CAM) molécula de adhesión celular del melanoma

cDNA ácido desoxirribonucleico copia

CFU-F unidades formadoras de colonias fibroblásticas

CMN células mononucleares

COL3A1 cadena alfa 1 de colágeno tipo III

CSC células madre tumorales

CXCL quimioquina con motivo C-X-C

DAPI 4''',6-diamidino-2-fenilindol, dihidrocloruro

DO densidad óptica

DTCs células tumorales diseminadas

EDTA ácido etilendiaminotetraacético

EGF factor de crecimiento epidérmico

EMT transición epitelio-mesenquimal

ES error estándar

FAP proteína de activación de fibroblasto

FGF factor de crecimiento fibroblástico

FSP proteína de específica de fibroblasto



Gal3BP ligando de unión a galectina-3

GAPDH Gliceraldehido 3- fosfato

GFP proteína fluorescente verde

HER2/neu receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

HGF Factor de crecimiento hepático

ICAM-1 molécula de adhesión intercelular 1

IFM índice de fluorescencia media/relativa; índice de fluorescencia específica de la molécula en estudio/índice de fluorescencia del control de isotipo específico

IGF-1 factor de crecimiento similar a insulina de tipo I

IGF1R receptor del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I

IGFBP3 proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina de tipo III

IL interleuquina

MCo medio condicionado

M-CSF factor estimulante de colonias monocítico/macrófago

MDSC células mieloides supresoras

MEC componentes de matriz extracelular

MFS tiempo libre de metástasis

MMFS tiempo libre de metástasis mixtas

MMPs metaloproteinasas

MO médula ósea

mRNA ácido ribonucleico mensajero

MSCs células madre mesenquimales, también llamadas células madre estromales

MTS 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonfenil)-2H-tetrazolio

OCT4 Factor de transcripción 4 de unión a octámeros

OMS Organización Mundial de la Salud

OS sobrevida global

ON incubación toda la noche, “*over night*”

P4H β subunidad β de prolil 4-hidroxilasa

PBS *buffer* fosfato salino



PCM pacientes con cáncer de mama
 PDGF factor de crecimiento derivado de plaquetas
 PDGFR α receptor α del factor de crecimiento derivado de plaquetas
 RAGE receptor para los productos finales de glicación avanzada
 RANKL ligando del receptor del factor nuclear kappa-B
 RE receptor de estrógeno
 RFS tiempo libre de recidiva
 RNA ácido ribonucleico
 ROS especies oxigenadas reactivas
 RP receptor de progesterona
 RUNX2 factor de transcripción 2 de la familia RUNX
 S100A7 proteína de unión al calcio S100 A7
 SBF suero bovino fetal
 scRNA-seq secuenciación de RNA de célula única
 SDF-1 factor derivado de células estromales tipo 1
 SOX2 SRY (region determinate del sexo) caja-2
 SPARC osteonectina
 TA temperatura ambiente
 TGF- β factor de crecimiento transformante beta
 TNBC triple negativo
 TNC tenascina C
 TRAIL ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (factor de necrosis tumoral)
 VEGF factor de crecimiento endotelial vascular
 VMFS tiempo libre de metástasis viscerales
 VS voluntarios sanos
 α -MEM medio esencial mínimo α
 α -SMA actina de músculo liso α



Importance of CD105(+)/CD34(-) Stromal Mesenchymal Cells in Breast Cancer Progression

ABSTRACT

Currently, it is known that the evolution of breast cancer not only depends on the characteristics of the breast cancer cells but also on the composition of the tumor microenvironment, which plays a fundamental role in the growth of the primary tumor and its progression toward future metastasis. Within the breast tumor microenvironment, most stromal cells are fibroblasts, and 80% of them are activated, being referred to as cancer-associated fibroblasts (CAFs). CAFs are spindle-shaped mesenchymal stromal cells, negative for CD34, CD31, and cytokeratin, and positive for α -SMA, FSP, FAP, among other markers. However, the phenotypic characteristics of CAFs can vary depending on the subtype of breast cancer. Regarding their function, CAFs within the breast tumor microenvironment secrete various extracellular matrix (ECM) components (such as collagen I and hyaluronic acid), growth factors, cytokines, proteases, and hormones, all of which promote the initiation, growth, angiogenesis, invasion, and metastasis of breast cancer. The four main cellular populations that give rise to CAFs are: bone marrow (BM) mesenchymal stem cells (MSCs), fibroblasts from the breast stromal microenvironment (main source), tumor cells (via epithelial-mesenchymal transdifferentiation – EMT), and endothelial cells (via endothelial-mesenchymal transdifferentiation). Tumor cells release factors such as transforming growth factor β (TGF- β), stromal cell-derived factor 1 (SDF-1), interleukin (IL)-6, among others, which favor the differentiation process of the aforementioned cells, particularly MSCs, into CAFs, and their subsequent activation. It was observed that BM MSCs can migrate to the primary breast tumor in the early stages of the disease and promote tumor development as constituents of its microenvironment, either as such or differentiated into CAFs. In relation, 90-95% of human BM-MSCs are characterized by presenting CD105 (endoglin), and 50% of CAFs express CD105 in the tumor stroma of patients with breast cancer (BCP). The CD105 antigen is the co-receptor of TGF- β , with TGF- β being the response modulator, regulating cell proliferation, migration, differentiation, and apoptosis. Additionally, it is known that CD105 plays an important role both in maintaining



stemness properties and in the homing of BM-MSCs to the primary breast tumor through the TGF- β signal. Within the tumor microenvironment, TGF- β promotes the differentiation of MSCs into CAFs, stimulates the proliferation and activation of CAFs, and increases their antitumor activity by inducing the release of ECM components, among other factors. In previous studies, we found: **1)** that tumor cells present in primary tumors of BCP women with invasive ductal carcinoma, stage I and II, treatment-free) produce chemotactic substances for BM-MSCs such as IL-6, SDF-1, and chemokine motif C-C ligand 2 (CCL-2); and there is a significant association between the expression of these ligands in tumor cells and the expression of their receptors IL-6R, CXCR-4, and CCR-2, respectively, present in spindle-shaped intra-tumor stromal cells (fibroblast-like), not associated with the vasculature; **2)** expression of α -smooth muscle actin (α -SMA), fibroblast-specific protein (FSP), melanoma cell adhesion molecule (CD146), and CD105 in spindle-shaped stromal cells not associated with the vasculature, CD34(-), of early invasive ductal BCP (clinical-pathological stage I and II, n=56); **3)** differential expression of CD105 between breast tumor tissue and non-neoplastic tissue, with such expression being null within the non-neoplastic tissue; and **4)** that high expression of CD105 in these stromal cells is a new marker for the identification of early BCP (n=56) with a high risk of developing metastasis in a shorter time and lower overall survival. Considering these findings, in the current thesis work, we found it essential to continue studying, in a larger cohort of BCP (n=350), whether the expression of CD105 in these spindle-shaped stromal cells, not associated with the vasculature CD34(-), constitutes an independent prognostic biomarker for the occurrence of site-specific metastasis, particularly bone. Moreover, we were interested in knowing the phenotypic, molecular, and functional characteristics of CD105(+)/CD34(-) stromal cells that might partly explain their origin and role in tumor evolution. In the present work, we found that: **1)** the expression of CD105 in spindle-shaped stromal cells, not associated with the vasculature CD34(-), was associated with the age of the BCP and the size of the primary tumor. The 42.22% of patients under 50 years old had high CD105 expression, while 28.85% of patients aged 50 or older had high CD105 expression. Additionally, 43.65% of BCP with a tumor size >2 cm had high CD105 expression, while 25.89% of BCP with a tumor size $\leq$ 2 cm also had high expression of



this marker; **2)** the expression of CD105 was associated with the occurrence of metastasis, particularly bone. Additionally, the expression of this marker was associated with the size of the bone metastatic focus, the number of bone metastatic foci, the presence of anarchic microcalcifications prior to the diagnosis of breast cancer, and bone pain prior to bone metastasis. BCP with high expression of CD105 in spindle-shaped stromal cells, fibroblast-like, had multiple metastatic foci within said tissue. Additionally, these BCP had anarchic microcalcifications in the breast stroma prior to the diagnosis of breast cancer. Furthermore, BCP with high CD105 expression experienced bone pain prior to the diagnosis of bone metastases; and **3)** the expression of CD105 in spindle-shaped stromal cells, fibroblast-like, not associated with the vasculature, is an independent prognostic biomarker for metastasis-free time, particularly bone metastasis.

On the other hand, through the prospective study, we found that the subpopulation of CD105(+)/CD34(-) spindle-shaped stromal cells, compared to CD105(-)/CD34(-) cells, had: **1)** higher expression of CD146, vascular cell adhesion protein 1 (CD106), platelet derived growth factor receptor alpha (CD140 α or PDGFR α), desmin, and the beta subunit of prolyl 4-hydroxylase enzyme (P4H β); **2)** similar self-renewal/cloning capacity to give an equivalent number of fibroblastic colony-forming units (CFU-F)/ 100 cultured cells, but the CFU-F of CD105(+)/CD34(-) spindle-shaped stromal cells were larger, i.e., had a greater number of cells, with a smaller area/cell as well; **3)** higher cell proliferation rate, which coincided with a higher percentage of cells in the cell duplication phase (S phase); **4)** higher levels of mitochondrial and total ROS; **5)** higher gene expression of MCAM (CD146), runt-related transcription factor 2 (RUNX2), receptor activator of nuclear factor kappa- β ligand (RANKL), VCAM (CD106), and tenascin C (TNC); **6)** greater ability to induce the migration of MCF-7 human breast cancer cells and greater ability to induce the proliferation of MDA-MB231 human breast cancer cells; **7)** greater ability to induce the expression of genes associated with stemness and osteogenic differentiation, especially those that confer tumor cells characteristics of stem cells with osteoblastic properties, in the MCF-7 and MDA-MB231 tumor cell lines. Therefore, all these results indicate that there are differential characteristics between both subpopulations, and it is necessary and interesting to conduct



future research to gain a deeper understanding of the molecular mechanisms by which they influence the evolution of breast cancer.

Finally, from all the above, it emerges that the presence of CD105(+)/CD34(-) CAFs has a significant impact on the prognosis of BCP. These CAFs can serve as biomarkers in the clinical diagnosis, therapy, and prognosis of this type of cancer. Therefore, studying them would allow us to timely identify patients at high risk of developing bone metastases, as well as define diagnostic and therapeutic strategies in the early stages of the disease.



RESUMEN

Actualmente se sabe que la evolución del cáncer de mama no sólo depende de las características de las células tumorales mamarias, sino también de la composición del microambiente tumoral, el cual juega un papel fundamental en el crecimiento del tumor primario y su progresión hacia una futura metástasis. Dentro del microambiente tumoral mamario, la mayoría de las células estromales son fibroblastos, y el 80% de los mismos están activados, denominándose fibroblastos asociados al cáncer (**CAFs**). Los CAFs son células estromales mesenquimales fusiformes, negativas para CD34, CD31 y citoqueratina, y positivas para α -SMA, FSP, FAP, entre otros marcadores. Sin embargo, las características fenotípicas de los CAFs pueden modificarse dependiendo del subtipo de cáncer de mama. En cuanto a su función, los CAFs dentro del microambiente tumoral mamario secretan varios componentes de la matriz extracelular (**MEC**) (como colágeno I y ácido hialurónico), factores de crecimiento, citoquinas, proteasas y hormonas, todos ellos componentes que promueven la iniciación, crecimiento, angiogénesis, invasión y metástasis del cáncer de mama. Entre las cuatro poblaciones celulares más importantes que dan origen a los CAFs están: las células madre mesenquimales (**MSCs**) de médula ósea (**MO**), los fibroblastos del microambiente estromal mamario (principal fuente), las células tumorales (por su transición epitelio-mesenquimal – **EMT**) y las células endoteliales (por su transdiferenciación endotelio-mesenquimal). Las células tumorales liberan factores como el factor de crecimiento transformador β (**TGF- β**), factor derivado de células estromales tipo 1 (**SDF-1** o **CXCL-12**), interleuquina (**IL**) -6, entre otros, que favorecen el proceso de diferenciación de las células anteriormente mencionadas, en particular las MSCs, a CAFs, y su posterior activación. Se observó que las MSCs de MO pueden migrar al tumor primario de mama en los estadios tempranos de la enfermedad y favorecer el desarrollo tumoral como constituyentes de su microambiente, ya sea como tales o diferenciadas a CAFs.

En relación, el 90-95% de las MSCs de MO humana se caracterizan por presentar CD105 (endoglina), y el 50% de los CAFs expresan CD105 en el estroma tumoral de las pacientes con cáncer de mama (**PCM**). El antígeno CD105 es el co-receptor de TGF- β , siendo el TGF- β el modulador de la respuesta, regulando la proliferación, migración, diferenciación y



apoptosis celular. Además, se sabe que CD105 juega un rol importante tanto en el mantenimiento de propiedades *stemness* como en el *homing* de las MSCs de MO hacia el tumor primario mamario a través de la señal de TGF- β . Dentro del microambiente tumoral, el TGF- β favorece la diferenciación de las MSCs a CAFs, estimula la proliferación y activación de los CAFs, así como aumenta su actividad antitumoral al inducir la liberación de MEC, entre otros factores. En estudios anteriores encontramos: **1)** que las células tumorales presentes en los tumores primarios de PCM (mujeres con carcinoma ductal infiltrante, estadio I y II, libres de tratamiento) producen sustancias quimiotácticas de MSCs de MO como IL-6, SDF-1 y ligando 2 de quimioquina motivo C-C (**CCL-2**); y existe una asociación significativa entre la expresión de estos ligandos en las células tumorales y la expresión de sus receptores IL-6R, CXCR-4 y CCR-2, respectivamente, presentes en las células estromales intra-tumor de morfología fusiforme, *fibroblast-like*, no asociada a la vasculatura; **2)** expresión de actina de músculo liso α (**α -SMA**), proteína de específica de fibroblasto (**FSP**), molécula de adhesión celular del melanoma (**CD146**) y CD105 en las células estromales fusiformes no asociadas a la vasculatura, CD34(-), de las PCM ductal infiltrante temprano (estadio clínico-patológico I y II, n=56); **3)** expresión diferencial de CD105 entre el tejido tumoral mamario y el tejido no neoplásico, siendo dicha expresión nula dentro del tejido no neoplásico; y **4)** que la alta expresión de CD105 en estas células estromales es un nuevo marcador para la identificación de PCM temprano (n=56) que presentan alto riesgo de desarrollar metástasis en menor tiempo y menor sobrevida global (**OS**). Teniendo en cuenta estos últimos antecedentes, en este trabajo de tesis doctoral nos pareció esencial continuar estudiando, en una cohorte más grande de PCM (n=350), si la expresión de CD105 en estas células estromales fusiformes, no asociadas a la vasculatura CD34(-), constituye un biomarcador pronóstico independiente de ocurrencia de metástasis sitio específico, particularmente óseas. Más aún, nos interesó conocer las características fenotípicas, moleculares y funcionales de las células estromales CD105(+)/CD34(-) que puedan explicar, en parte, su origen y rol en la evolución tumoral.

En el presente trabajo encontramos que: **1)** la expresión de CD105 en células estromales fusiformes CD105(+), no asociadas con la vasculatura CD34(-), se asoció con la edad de la



PCM y el tamaño del tumor primario. El 42,22% de las pacientes menores de 50 años presentaban una alta expresión de CD105, mientras que el 28,85% de las pacientes de 50 años o más tenían una alta expresión de CD105. Además, el 43,65% de las PCM con un tamaño de tumor >2 cm presentaban una alta expresión de CD105, mientras que el 25,89% de las PCM con un tamaño de tumor ≤ 2 cm también tenían una alta expresión de este marcador; **2)** la expresión de CD105 se asoció con la ocurrencia de metástasis, particularmente óseas. Además, la expresión de este marcador se asoció con el tamaño del foco metastásico óseo, el número de focos metastásicos óseos, con la presencia de microcalcificaciones anárquicas previas al diagnóstico del cáncer de mama y con el dolor óseo previo a la metástasis ósea. Las PCM que presentaron alta expresión de CD105 en células estromales fusiformes, *fibroblast-like*, presentaron múltiples focos metastásicos dentro de dicho tejido. Además, estas PCM presentaron microcalcificaciones anárquicas en el estroma mamario previo al diagnóstico del cáncer de mama. Más aún, las PCM con elevada expresión de CD105 experimentaron dolor óseo previo al diagnóstico de las metástasis óseas.; y **3)** la expresión de CD105 en las células estromales fusiformes, *fibroblast-like*, no asociadas a la vasculatura, es un biomarcador pronóstico independiente del tiempo libre de metástasis (**MFS**), particularmente metástasis óseas (**BMFS**).

Por otro lado, a través del estudio prospectivo encontramos que la subpoblación de células estromales fusiformes CD105(+)/CD34(-), respecto a las células CD105(-)/CD34(-), tenía: **1)** mayor expresión de CD146, proteína de adhesión de células vasculares 1 (**CD106**), receptor α del factor de crecimiento derivado de plaquetas (CD140 α o PDGFR α), desmina y subunidad beta de la enzima prolil 4-hidroxilasa (**P4H β**); **2)** semejante capacidad de auto-renovación/clonado para dar un número equivalente de unidades formadoras de colonias fibroblásticas (**CFU-F**)/ 100 células cultivadas, pero las CFU-F de las células estromales fusiformes CD105(+)/CD34(-) presentaron mayor tamaño, es decir, tenían mayor número de células, con un área/célula menor; **3)** mayor tasa de proliferación celular, lo cual coincidió con un mayor porcentaje de células en fase de duplicación celular (fase S); **4)** mayores niveles de especies oxigenadas reactivas (**ROS**) mitocondriales y totales; **5)** mayor expresión génica de MCAM (CD146), factor de transcripción 2 de la Familia RUNX (**RUNX2**),



ligando del receptor del factor nuclear kappa- β (**RANKL**), VCAM (CD106) y tenascina C (**TNC**); **6**) mayor capacidad para inducir la migración de las células tumorales mamarias humana MCF-7 y mayor capacidad para inducir la proliferación de las células tumorales mamarias humana MDA-MB231; y **7**) mayor capacidad para inducir la expresión de genes asociados con la *stemness* y la diferenciación osteogénica, especialmente aquellos que confieren a las células tumorales características de células madre con propiedades osteoblásticas, en las líneas celulares tumorales MCF-7 y MDA-MB231. Por lo tanto, todos estos resultados nos indican que existen características diferenciales entre ambas subpoblaciones, y es necesario e interesante realizar futuras investigaciones para conocer en mayor profundidad los mecanismos moleculares por los cuales influyen en la evolución del cáncer de mama.

Finalmente, de todo lo expuesto, surge que la presencia de CAFs CD105(+)/CD34(-) tiene un impacto significativo en el pronóstico de las PCM. Estos CAFs pueden servir como biomarcadores en el diagnóstico clínico, terapia y pronóstico de este tipo de cáncer. Por lo tanto, estudiarlos nos permitiría identificar de forma oportuna a las pacientes con alto riesgo de desarrollar metástasis óseas, así como definir estrategias diagnósticas y terapéuticas en las etapas más tempranas de la enfermedad.

PALABRAS CLAVE

Fibroblastos asociados al cáncer, CD105, cáncer de mama, células madre mesenquimales/estromales, metástasis óseas, evolución tumoral.



INTRODUCCIÓN

Generalidades del cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad que tiene un impacto significativo en la salud pública a nivel mundial, siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad entre las mujeres. Estadísticas recientes estiman que el cáncer de mama representa aproximadamente el 25% de todos los casos de cáncer diagnosticados en mujeres a nivel global [1]. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (**OMS**), aproximadamente 2,3 millones de nuevos casos de cáncer de mama son diagnosticados cada año en todo el mundo [2]. Particularmente en Argentina, la incidencia de este tipo de cáncer en 2020 fue de 22.024 casos anuales, representando el 32,1% de todos los tumores malignos en mujeres [3]. Estas cifras reflejan la magnitud del desafío que enfrenta la población femenina en relación con esta enfermedad. Además de su alta incidencia, el cáncer de mama se caracteriza por su elevada tasa de mortalidad. A pesar de la existencia de tratamientos, muchos de ellos no logran prevenir la aparición de metástasis, un evento que a menudo resulta fatal para el paciente. Según la OMS, alrededor de 685.000 mujeres mueren cada año en todo el mundo debido a esta enfermedad. En Argentina, la mortalidad por cáncer de mama en mujeres es del 15,8% [4]. Estas estadísticas subrayan la urgencia de abordar de manera efectiva y global este problema de salud, implementando estrategias de prevención, detección temprana, diagnóstico y tratamiento más efectivos y accesibles. El cáncer de mama se clasifica en varios subtipos moleculares según características específicas de las células tumorales, Luminal A [receptor de estrógeno (**RE**) y/o progesterona (**RP**) positivos, receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (**HER2/neu**) negativo y bajo Ki-67], Luminal B (RE y/o RP positivos, HER2/neu negativo o positivo y alto Ki-67), sobreexpresión de HER2/neu (RE y RP negativos y HER2/neu positivo) y triple negativo (**TNBC**, RE, RP y HER2/neu negativos) que conducen a diferencias en los patrones de respuesta a diversas modalidades de tratamiento y resultados clínicos [5–7]. La detección precoz del tipo de cáncer de mama y el acceso a tratamientos adecuados son elementos



cruciales para mejorar los resultados en las PCM. Sin embargo, a pesar de los avances en el diagnóstico temprano, entre el 20% y el 30% de las PCM en una etapa clínica temprana sufren una recaída y fallecen como resultado de las complicaciones generadas por la propagación de las células tumorales mamarias desde el tumor primario hacia tejidos distantes, proceso conocido como metástasis [8, 9]. Por lo tanto, surge un desafío importante: la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos y biomarcadores que puedan contribuir al desarrollo de medicamentos capaces de prevenir la progresión del cáncer de mama hacia la metástasis y, en última instancia, evitar la muerte del paciente. Es imperativo continuar investigando en este campo para mejorar la eficacia de los tratamientos y la calidad de vida de las personas afectadas por esta enfermedad. Es evidente que pesar de los avances significativos en el tratamiento del cáncer de mama, el manejo de esta enfermedad sigue siendo un desafío considerable.

Importancia del microambiente estromal en la evolución del cáncer de mama

Actualmente se sabe que el desarrollo del cáncer de mama no depende exclusivamente de las características intrínsecas de las células epiteliales tumorales, sino también juega un rol importante el microambiente tumoral [10–13]. Por lo tanto, es importante estudiar no solo las características de las células cancerosas, sino también los componentes del microambiente tumoral para encontrar biomarcadores de la evolución del tumor [14–24]. Dado el papel crítico del microambiente tumoral en la iniciación, progresión y metástasis del cáncer de mama, los investigadores han estado interesados en identificar nuevos marcadores pronósticos que puedan predecir los resultados de las pacientes y orientar las decisiones de tratamiento [25, 26]. Varios estudios han demostrado que los marcadores estromales, como la densidad de fibroblastos, la deposición de colágeno y la infiltración linfocítica, pueden predecir los resultados de las pacientes con cáncer de mama [27].

Existen varios estudios experimentales que revelan una interacción dinámica entre las células tumorales y las células estromales, así como con otros componentes del



microambiente tumoral, eventos cruciales que impulsan el crecimiento del tumor primario y su eventual progresión hacia la metástasis [11, 12, 28–35]. En la última década, investigaciones han destacado cómo el microambiente estromal puede crear un ambiente protector que permite a las células cancerosas evadir los tratamientos convencionales, contribuyendo al fracaso terapéutico. El microambiente estromal es esencial para el mantenimiento de los tejidos epiteliales. Cuando el epitelio cambia, el estroma inevitablemente también cambia. Este es el caso durante el desarrollo del cáncer, cambios sutiles en un compartimento pueden tener efectos significativos en todo el sistema [36]. Por ejemplo, alteraciones genéticas que originan células tumorales mamarias durante la iniciación del tumor pueden influir en el ambiente estromal, creando un microambiente propicio para el crecimiento tumoral [37]. Durante las etapas tempranas del desarrollo del tumor, la membrana basal puede comenzar a degradarse evolucionando a un tumor invasivo y el estroma activado, que incluye fibroblastos, infiltrados inflamatorios y capilares recién formados, entra en contacto directo con las células tumorales (**Figura 1**). Liotta et al. describieron este fenómeno como la creación de un “campo de invasión hetero-típico”, del cual emergen y se diseminan las células metastásicas [38]. Además, estudios en animales han demostrado que tanto el estroma lesionado como el estroma activado proporcionan señales oncogénicas que facilitan la tumorigénesis [39, 40]. En conjunto, estos hallazgos resaltan la importancia de los componentes del microambiente tumoral en la evolución del cáncer de mama y subrayan la necesidad de investigaciones que aborden esta compleja interacción para mejorar las estrategias terapéuticas y la comprensión de la enfermedad.

El microambiente tumoral del cáncer de mama está compuesto por varios tipos de células, incluidos fibroblastos, células endoteliales, células inmunes, MSCs, pericitos, adipocitos, células madre hematopoyéticas y progenitores, así como factores solubles y MEC, tales como citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, metaloproteinasas (**MMPs**), ácido hialurónico, laminina, fibronectina y colágeno tipo I, entre otros [41] (**Figura 1**). Sin embargo, en los tumores sólidos como el cáncer de mama, los fibroblastos son las células estromales más predominantes [42], y aproximadamente el 80% de ellos se



encuentran activados, conocidos como CAFs [43]. Por lo tanto, los CAFs han emergido como mediadores cruciales de las interacciones entre el tumor de mama y el estroma [41–47].

MICROAMBIENTE TUMORAL MAMARIO

Descripción general de los cambios asociados al cáncer

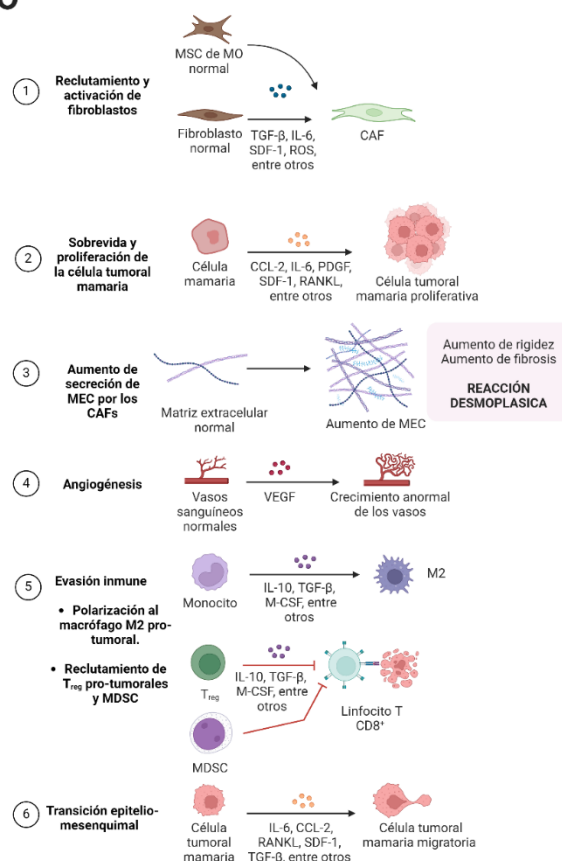
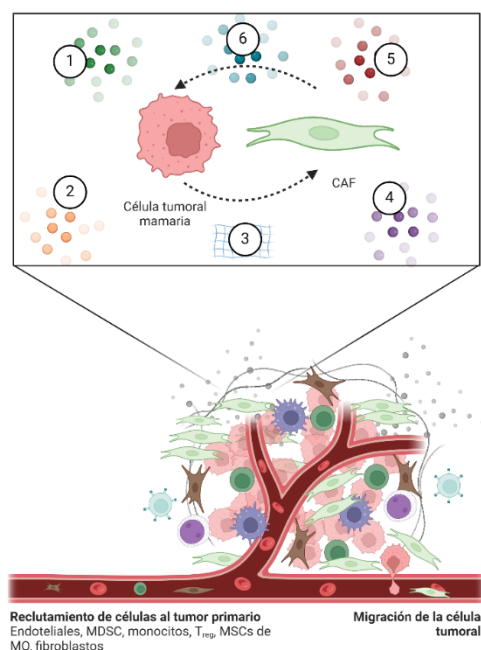


Figura 1 Representación gráfica de la composición típica del estroma tumoral mamario en compañía de las células tumorales mamarias. Descripción gráfica de los principales cambios en el microambiente tumoral mamario. CAFs: fibroblastos asociados al cáncer, MSCs: células madre mesenquimales/estromales, MEC: componentes de la matriz extracelular, MO: médula ósea, MDSC: células mieloides supresoras, Treg: linfocitos T regulatorios, TGF-β: factor de crecimiento transformante beta, SDF-1: factor derivado del estroma-1, CCL-: quimioquina ligando motivo C-C, ROS: especies oxigenadas reactivas, IL-: interleuquina, RANKL: ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-β, PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas, VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular, M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos.



Si bien el papel de los fibroblastos en la evolución del tumor de mama sigue siendo objeto de estudio, hay cada vez más evidencia de que los CAFs son importantes promotores del crecimiento y la progresión del tumor [42]. Actualmente, se sabe que los CAFs contribuyen a la iniciación, proliferación, invasión y posterior metástasis del tumor a través de la producción de citoquinas, factores de crecimiento, quimioquinas y enzimas degradadoras de la matriz, como las MMPs [42, 45, 46]. Además, los CAFs inducen mecanismos de reparación disfuncionales, aumentando la producción de una MEC fibrosa que contiene una gran cantidad de fibras de colágeno e inhibiendo la acción de las MMPs [46] (**Figura 1**). Estos MEC suprimen la polaridad de las células epiteliales y estimulan su proliferación, modificaciones que permiten la formación y el desarrollo del tumor. En particular, en el tumor de mama, el proceso de expansión del estroma tumoral caracterizado por la activación y proliferación de los fibroblastos y la consiguiente producción de MEC se conoce como una reacción desmoplásica [48]. Siendo este proceso una característica integral y necesaria para la invasión tumoral [49]. Estudios recientes han destacado la capacidad de los CAFs para inducir la resistencia a la terapia [50–52], lo que subraya aún más su importancia en la evolución del cáncer de mama y la necesidad de investigar estrategias terapéuticas dirigidas específicamente a este componente del microambiente tumoral. En este sentido, comprender el papel y la regulación de los CAFs en la evolución tumoral mamaria es crucial para el desarrollo de enfoques terapéuticos más efectivos y personalizados para las pacientes afectadas por esta enfermedad.

Caracterización de los fibroblastos asociados al tumor en cáncer de mama

Los CAFs tienen una morfología similar a un fibroblasto. Son células con una morfología fusiforme, con proyecciones citoplasmáticas alargadas [53]. Sin embargo, tienen algunas características distintivas y un tamaño diferente al fibroblasto normal. Su núcleo es delgado, pero ligeramente más grueso que el de los fibroblastos no activados, y presentan un mayor



tamaño tanto en su eje longitudinal como horizontal [54, 55]. Además, presentan un citoplasma abundante con retículo endoplasmático y aparato de Golgi complejo, abundancia de ribosomas libres y microfilamentos en la periferia [54]. Asimismo, la activación de los fibroblastos y la consiguiente formación de CAFs implican un cambio en la expresión de marcadores. Los CAFs pueden distinguirse de los fibroblastos normales de mama por la expresión diferencial de α -SMA, FAP, FSP y PDGFRs [44–46]. Mientras que los CAFs son negativos para los marcadores CD34, CD31 y citoqueratinas, un alto porcentaje de ellos además de ser positivos para α -SMA, FSP, FAP, PDGFR- α/β , lo son para desmina, TNC, P4HB, y tienen baja expresión de calveolina-1 (**CAV1**), entre otras proteínas [54, 56, 57].

Sin embargo, estas son características fenotípicas más típicas, pero pueden variar dado que existen una amplia heterogeneidad las poblaciones de CAFs mamarios. Al respecto, en un estudio reciente se caracterizó dicha la heterogeneidad en un modelo de alotrasplante de cáncer de mama TNBC en ratones [58]. Utilizando secuenciación de RNA de célula única (**scRNA-seq**), los autores identificaron tres subpoblaciones importantes de CAFs: **1**) CAFs miofibroblásticos (myoCAFs), enriquecidos con α -SMA y otras proteínas contráctiles como TNC, transgelina y cadena ligera de miosina 9; **2**) CAFs “inflamatorios” (iCAFs), con una expresión elevada de citoquinas inflamatorias como IL-6, IL-33, FSP, SDF-1 y CCL-7; y **3**) CAFs que expresan proteínas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II. Las dos últimas subpoblaciones de fibroblastos se encontraron en mayor número en el estroma mamario normal, mientras que el número de myoCAFs fue extremadamente bajo. Esta última observación sugiere que los myoCAFs surgen durante la tumorigénesis [58]. Además, estos myoCAFs tienen varios factores de crecimiento aumentados, incluyendo TGF- β 1/TGF- β 2, factor de crecimiento del tejido conectivo, factor de crecimiento placentario, factor de crecimiento endotelial vascular α (**VEGF- α**) y Wnt- α [58]. En otros estudios reportados, mediante la realización de *microarrays* en muestras de tejido tumoral mamario humano, se encontraron diferentes subtipos funcionales de CAFs basados en el antígeno de membrana que expresan, por ejemplo: FAP(+), que están activados o reactivados, y están asociados con la modulación de los MEC, invasión tumoral y función inmunomoduladora; FSP(+), que están asociados con colonización metastásica, infiltración de macrófagos y protección



contra carcinógenos; y PDGFR- α (+), que tienen una interrelación con la señalización paracrina que media el crecimiento tumoral y la angiogénesis, así como el reclutamiento de macrófagos [59, 60]. Además, Costa et al. [61], mediante una estrategia de clasificación, distinguieron cuatro subpoblaciones diferentes de CAFs en el cáncer de mama humano, según los niveles de expresión de CD29, FAP, α -SMA, PDGFR- β , FSP y CAV1. Estos autores encontraron una asociación significativa entre las subpoblaciones de CAFs y los subtipos de cáncer de mama. Las subpoblaciones se definieron como CAF-S1: CD29^{Media}, FAP^{Alta}, FSP^{Baja-Alta}, α -SMA^{Alta}, PDGFR- β ^{Media-Alta} y CAV1^{Baja}; CAF-S2: CD29^{Baja}, FAP^{Negativa}, FSP^{Negativa-Baja}, α -SMA^{Negativa}, PDGFR- β ^{Negativa} y CAV1^{Negativa}; CAF-S3: CD29^{Media}, FAP^{Negativa}, FSP^{Media-Alta}, α -SMA^{Negativa-Baja}, PDGFR- β ^{Media} y CAV1^{Negativa-Baja}; y CAF-S4: CD29^{Alta}, FAP^{Negativa}, FSP^{Baja-Media}, α -SMA^{Alta}, PDGFR- β ^{Baja-Media} y CAV1^{Negativa-Baja}. La población CAF-S1 fue predominante en el TNBC, mientras que la población CAF-S4 fue predominante en los cánceres de mama con sobreexpresión de HER2/neu. Estas diferencias fenotípicas entre las cuatro subpoblaciones reflejaron diferentes funcionalidades, en particular aquellas relacionadas con la inmunosupresión. Particularmente, en las muestras de TNBC encontraron que la subpoblación CAF-S1 juega un papel fundamental en la inmunosupresión, a diferencia de CAF-S4 que exhibe una baja señal inmunoreguladora. CAF-S1 favorece la atracción de linfocitos T, aumenta la supervivencia de los linfocitos T CD4(+)/CD25(+) y promueve su diferenciación en células reguladoras CD25(+)/FOXP3(+), que finalmente inhiben a los linfocitos T. En particular, los CAF-S1 expresan genes que pertenecen a diferentes procesos biológicos, incluida la señalización de quimioquinas (CCL-11, SDF-1, CXCL-13 y CXCL-14), la adhesión celular (JAM2) o funciones inmunorreguladoras (TNFSF4/OX40L, PDCD1LG2/PD-L2, DPP4, NT5E/CD73 y CD276/B7H3) [61]. Sin embargo, no encontraron que las subpoblaciones de CAFs fueran indicativas de la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama por sí mismas.

Todos estos estudios señalan la ausencia de un perfil de marcadores específicos que identifique a todos los CAFs presentes en cada tipo de cáncer de mama [57, 62]. Se sabe que las características fenotípicas de los CAFs pueden variar según el subtipo de cáncer [60], pero la clasificación precisa de las diversas subpoblaciones de CAFs en las diferentes etapas



de la progresión del tumor de mama sigue siendo objeto de investigación [57, 62]. De hecho, la falta de marcadores específicos constituye una limitación al estudiar los fibroblastos *in vivo* [42]. Por lo tanto, la heterogeneidad fenotípica de los CAFs puede ser un reflejo de la plasticidad celular de estas células y su capacidad para adaptarse a diversos microambientes tumorales. Estas variaciones pueden tener implicaciones significativas en la respuesta al tratamiento y la progresión del cáncer de mama.

Rol del fibroblasto asociado al tumor en la evolución del cáncer de mama

El papel de los CAFs en la progresión del cáncer de mama incluye una amplia gama de funciones que abarcan desde la remodelación de los MEC, la secreción de factores solubles, la regulación de la motilidad y características *stemness* de la célula tumoral, hasta la remodelación del metabolismo tumoral y el acondicionamiento de un nicho pre-metastásico. Este papel es dual, pudiendo inhibir o promover el crecimiento maligno. Posiblemente actúan como represores al principio de la progresión del tumor de mama, facilitando la formación de uniones “GAP” entre los CAFs y las células tumorales, estableciendo así una inhibición por contacto entre las células tumorales [63]. En etapas más avanzadas, un mayor número de fibroblastos se activan y se reclutan nuevos fibroblastos que se diferenciarán en CAFs a través de la acción de factores solubles secretados por el tumor [63]. En este contexto, la citoquina TGF- β juega un papel fundamental. Es una citoquina multifuncional, liberada por CAFs y células tumorales, y actúa como un potente impulsor de la progresión del cáncer de mama. Durante las primeras etapas del desarrollo del tumor este factor podría actuar como un potente estimulador de la conversión de fibroblastos normales en CAFs [64–67]. A medida que avanza el tumor, esta citoquina ejerce un efecto en la mediación de la EMT, la inducción de la angiogénesis y la inmunosupresión [66–69].

Los CAFs contribuyen a la progresión del tumor de mama mediante la secreción de factores de crecimiento como factor de crecimiento epidérmico (**EGF**), factor de crecimiento



fibroblástico (**FGF**)- β , PDGF, VEGF- α , factor de crecimiento similares a insulina de tipo I (**IGF-1**), factor de crecimiento hepático (**HGF**), factor de necrosis tumoral (**TNF**), SDF-1 y factor de crecimiento del tejido conectivo, así como un conjunto de citoquinas y quimioquinas que incluyen IL-4, IL-6, IL-17A, CXCL-14, CXCL-16 y CCL-5 [44, 45, 70–77]. Estos factores estimulan la proliferación e inhiben la apoptosis de las células tumorales de mama, así como de las células endoteliales vasculares y linfáticas. De esta manera, el crecimiento del tumor ocurre simultáneamente con el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos y linfáticos. Además, las proteínas de la matriz extracelular, como la TNC y la periostina, son expresadas por los CAFs y tienen efectos significativos en la proliferación, migración y metástasis de las células tumorales de mama [78]. En relación, Huang et al. demostraron *in vitro* que la TNC afecta la proliferación, migración y metástasis de la línea celular TNBC humano MDA-MB435 [79]. Un estudio reciente también mostró que el nivel de hipoxia induce la reprogramación epigenética de los fibroblastos mamarios humanos normales, resultando en un transcriptoma pro-glucolítico [80]. Los CAFs mamarios humanos tienen un metabolismo activado con una actividad glucolítica aumentada, que se estabiliza mediante cambios epigenéticos en genes clave, como HIF-1 α . Este cambio metabólico de los CAFs permite la nutrición de las células tumorales de mama y, consecuentemente, promueve el crecimiento del tumor [80]. En resumen, todos estos estudios sugieren que los CAFs mamarios son una fuente establecida de factores de crecimiento y citoquinas conocidas por tener roles críticos en la progresión del tumor de mama.

Los CAFs podrían facilitar la invasión de las células tumorales de mama de varias maneras. En primer lugar, como mencionamos anteriormente, los CAFs estimulan el crecimiento, la supervivencia y la invasión de las células tumorales, así como estimulan la angiogénesis mediante la liberación de factores de crecimiento como TGF- β , HGF, PDGF, IGF-2, VEGF, colágeno, fibronectina, MMPs, citoquinas y exosomas, entre otros [81–88]. Ciertas interleuquinas, como la IL-6, liberadas por los CAFs en el microambiente tumoral mamario, promueven la transición de un fenotipo pre-invasivo a un fenotipo invasivo [86, 89]. Además, la señalización de IL-6 entre las células de carcinoma ductal *in situ* y los CAFs mamarios humanos media el crecimiento y la migración de las células tumorales de mama



[86, 90]. Por ende, los CAFs contribuyen a la formación del nicho metastásico, permitiendo la supervivencia y extravasación de las células tumorales de mama [91].

En un trabajo reciente, encontramos que las células estromales intratumorales con morfología fusiforme que no están asociadas con la vasculatura producen moléculas como el ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (**TRAIL**), RANKL y CCL-2, que modifican la supervivencia, proliferación, migración y la adquisición de un fenotipo mesenquimal de las células tumorales de los tumores primarios de PCM, ductal infiltrante, en estadios tempranos. También, observamos que hay una asociación significativa entre la expresión de estos ligandos en estas células estromales y la expresión de TRAIL-R1, TRAIL-R4, RANK y CCR-2 en las células tumorales de mama, respectivamente [92, 93]. En resumen, estos hallazgos, junto con los descubrimientos realizados por otros investigadores, sugieren que estas células estromales, a través de las acciones especialmente de RANKL y CCL-2, tienen el potencial de influir en la proliferación, supervivencia, invasión, migración e intravasación de células tumorales mamarias durante las primeras etapas de este tipo de cáncer [94–98].

A través de la liberación de MMPs, los CAFs crean vías que permiten que las células tumorales de mama se propaguen a otros tejidos [99–103]. SDF-1 y TGF- β producidos por los CAFs favorecen la EMT [103]. Además, Orimo et al. demostraron en un modelo de xenoinjerto tumoral humano que SDF-1 liberado por los CAFs aumenta la proliferación de las células de cáncer de mama y la angiogénesis [73]. Mientras las células tumorales de mama están en circulación, los CAFs humanos podrían acompañarlas proporcionando señales de supervivencia y una ventaja de crecimiento temprano en el sitio pre-metastásico [104]. Es bien sabido que un nicho pre-metastásico puede formarse por los factores solubles secretados y las vesículas extracelulares liberadas por las células de cáncer de mama primario antes de su llegada al tejido diana [105–108]. Una vez en los órganos diana, los CAFs mamarios activados también son importantes para el desarrollo del nicho pre-maligno [91, 109]. En referencia a esto, un estudio interesante utilizando un modelo murino ortotópico de cáncer de mama mostró que los CAFs también promueven la colonización de células metastásicas mediante la regulación de la rigidez de la matriz extracelular a través



del entrecruzamiento de colágeno dependiente de LOX [110]. En relación, Malanchi et al. encontraron que los CAFs podrían contribuir al nicho pre-metastásico a través de la producción de periostina en un modelo murino de cáncer de mama [111]. Esta molécula aumenta la señalización de Wnt en las células de cáncer de mama infiltrante para promover el mantenimiento de sus propiedades de células madre. De todo lo expuesto surge que los CAFs desempeñan un papel fundamental en el desarrollo del nicho pre-metastásico favoreciendo la evolución de la cascada metastásica. Un resumen de las funciones de los CAFs dentro del microambiente tumoral mamario se presenta en la **Figura 2**.

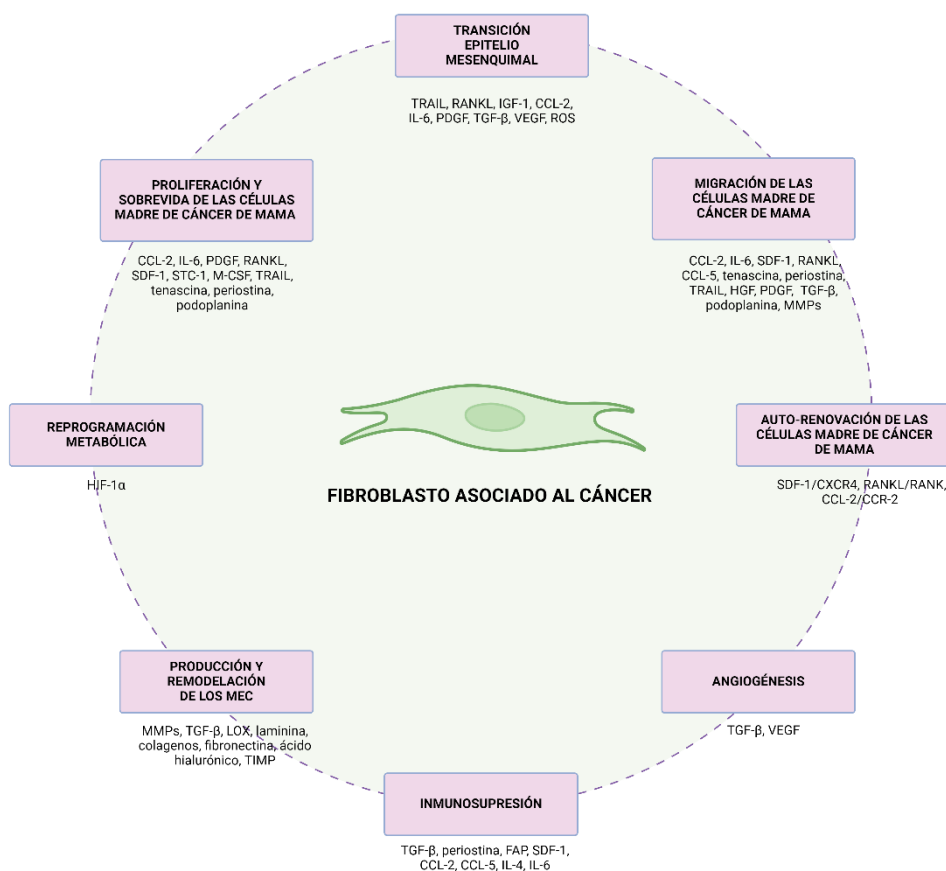


Figura 2. Las funciones principales de los fibroblastos asociados al cáncer que modulan el desarrollo y la metástasis del cáncer de mama. TRAIL: Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF, RANKL: Ligando del receptor activador del factor nuclear $\kappa\beta$, RANK: Receptor activador del factor nuclear $\kappa\beta$, SDF-1: Factor derivado de células estromales 1, CXCR4: Receptor de quimioquina C-X-C tipo 4, CCL-: Ligando de quimioquina CC, CCR-: Receptor de quimioquina CC, TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta, FAP: Proteína activadora de fibroblastos, IL-: Interleuquina, MMPs: Metaloproteinasas de matriz, LOX: Lisil oxidasa, TIMP: Inhibidor tisular de metaloproteinasas, HIF-1 α : Factor inducible por hipoxia 1-alfa, PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas, STC-1: Estaniocalcina-1, M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos, IGF-1: Factor de crecimiento similar a la insulina 1, ROS: Especies oxigenadas reactivas, VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular. Figura modificada del trabajo Cancer-Associated Fibroblasts in the Breast-Tumor Microenvironment, 2021, Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 10.1007/s10911-020-09475-y.



Diferentes orígenes de los fibroblastos asociados al cáncer

En la actualidad, el origen de los CAFs en el cáncer de mama sigue siendo objeto de estudio y no se comprende completamente. La heterogeneidad de los CAFs en términos de características y marcadores moleculares podría atribuirse a sus diversos orígenes celulares. Se ha planteado la posibilidad de que estas células se originen a partir de diferentes fuentes, como los fibroblastos del tejido mamario (principal fuente), las células epiteliales del tumor de mama (debido a su EMT), las células endoteliales (debido a su transdiferenciación endotelial-mesenquimal), los pericitos, las MSCs de la MO, y las de la misma mama, y del tejido adiposo (**Figura 3**) [19, 62, 112–118]. Además, existe un estudio que sugiere que las células madre tumorales (**CSC**) podrían ser una nueva fuente de CAFs en el nicho de células madre del tumor de mama [119].

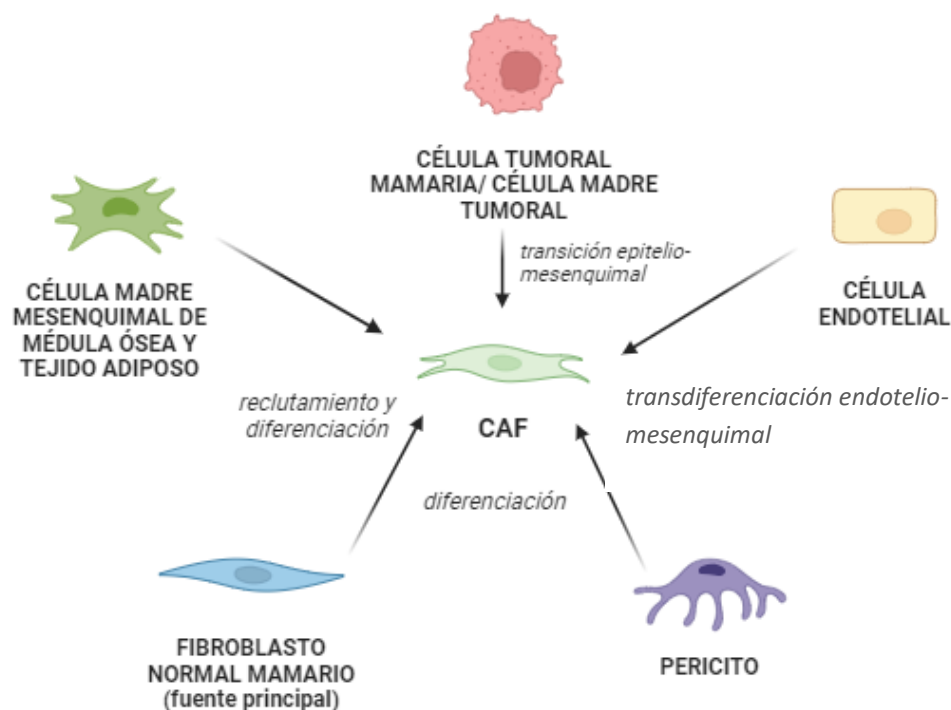


Figura 3. Posibles orígenes de los fibroblastos asociados al cáncer. Las fuentes de fibroblastos asociados al cáncer (CAF) incluyen los fibroblastos del tejido mamario, que es la principal fuente, las células tumorales mamarias, las células madre tumorales (CSC), las células endoteliales, las células madre mesenquimales de médula ósea (MSCs de MO), las células madre del tejido adiposo y los pericitos. Figura modificada del trabajo Cancer-Associated Fibroblasts in the Breast Tumor



Microenvironment, 2021, Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 10.1007/s10911-020-09475-y.

Diferentes orígenes de los fibroblastos asociados al cáncer: rol de las células madre mesenquimales de la médula ósea

Varios estudios han demostrado que diversas quimioquinas, tales como IL-6, CCL-2, CCL-5, SDF-1 y CXCL16, presentes en el microambiente tumoral de mama favorecen la atracción de las MSCs de MO [120–123]. Incluso el estado de hipoxia en el tumor, que estimula la secreción de IL-6 por las células tumorales, amplifica este fenómeno [120–123]. Asimismo, la rigidez de los MEC también podría contribuir al reclutamiento de las MSCs al microambiente tumoral. Las MSCs derivadas de la MO que son reclutadas por el tumor primario, influyen en el potencial metastásico de las células tumorales mamarias ya sea como tal o diferenciándose a CAFs (**Figura 3**) [124, 125]. Estas células estromales secretan una gran cantidad de citoquinas y factores de crecimiento que promueven el crecimiento tumoral, la inmunosupresión y la angiogénesis, incluyendo IL-6, IL-8, inhibidor tisular de MMP-2, CCL-2, SDF-1, FGF, VEGF, entre otros [41, 126].

Por otro lado, se ha evidenciado que las citoquinas secretadas por las células tumorales mamarias tienen un papel significativo en la transformación de MSCs a CAFs, incluyendo el EGF, SDF-1, PDGF, VEGF, FGF- β , IL-6, ROS, TGF- β 1, entre otros [54, 56, 127]. En un estudio anterior de nuestro laboratorio, se observó que las células epiteliales presentes en los tumores primarios de PCM, de tipo ductal infiltrante temprano, producen sustancias quimiotácticas para las MSCs de la MO, como IL-6, SDF-1 y CCL-2. En estas PCM se encontró una asociación significativa entre la expresión de estos ligandos en las células tumorales de mama y la expresión de IL-6R, CXCR-4 y CCR-2, presentes en las células fusiformes estromales intratumorales que no están asociadas a la vasculatura, como las MSCs o los CAFs [92].

Las MSCs adquieren progresivamente la capacidad de promover el crecimiento del tumor de mama y se convierten en MSCs asociadas al tumor, algunas de las cuales



eventualmente pierden su capacidad de auto-renovación y expresan altos niveles de α -SMA, vimentina y FSP, marcadores típicos de los CAFs [122]. Interesantemente, Weber et al. [115], a través de ensayos *in vitro* e *in vivo* con células de cáncer de mama humano, sugirieron que la osteopontina liberada por las mismas induce la transformación de MSCs a CAFs induciendo a su vez la producción de TGF- β en los CAFs. Este origen mesenquimal, fue demostrado por Raz et al. Este grupo a través de trasplantes de MO de ratones donantes, que expresaban la proteína fluorescente verde (**GFP**) de forma ubicua (β -actina-GFP), observaron que mientras se encontraban células GFP+ tanto en tejidos mamarios normales como tumorales (posiblemente debido a la infiltración de células inmunes derivadas de la MO), detectaron CAFs derivados de la MO (GFP+, α -SMA+) en los tumores de mama y no en el tejido mamario normal. A través de este experimento de trazado de linaje, este grupo demostró que las MSCs de MO (PDGFR- α -, CD45-, CD34-) son reclutadas en los tumores de mama primarios y se diferencian en CAFs (α -SMA+, PDGFR- α -, CD45-, CD34-) [125].

Reforzando la idea de que los CAFs mamarios pueden derivar de las MSCs de MO, Paunescu y colaboradores [128] identificaron que los CAFs aislados de tumores primarios de carcinoma ductal infiltrante de mama presentan características fenotípicas similares a las MSCs de MO de donantes sanos, tales como CD106+, CD73+, CD90+, así como CD14-, CD34-, CD45-, entre otros. Sin embargo, exhiben una mayor capacidad de liberar factores de crecimiento, así como factores inmunosupresores y pro-angiogénicos, en comparación con las MSCs normales de la MO. Asimismo, otros estudios han demostrado que las MSCs de la MO humana, expuestas a un medio condicionado (**MCo**) de la línea celular de cáncer de mama humana MDA-MB-231 durante un largo período de tiempo, adquieren un fenotipo de CAFs con una alta expresión de α -SMA, vimentina, FSP y SDF-1 [129]. Todos estos estudios refuerzan la idea de que una fuente importante de CAFs son las MSCs de MO (**Figura 4**). Finalmente, es oportuno mencionar que estos CAFs CD106+, CD90+ y CD73+ también podrían derivar de MSCs residentes en la propia mama. Dado que la proporción de estas células no está completamente establecida y se considera que es mínima, en nuestro trabajo partimos del supuesto de que la mayor contribución proviene de las MSCs de la MO [130–133]. Al respecto, un estudio demuestra que la mayoría de los CAFs que expresan FSP



y FAP se originaron en la médula ósea, mientras que la mayor parte del estroma vascular y perivascular fue reclutado de tejidos vecinos, principalmente del tejido adiposo [133].

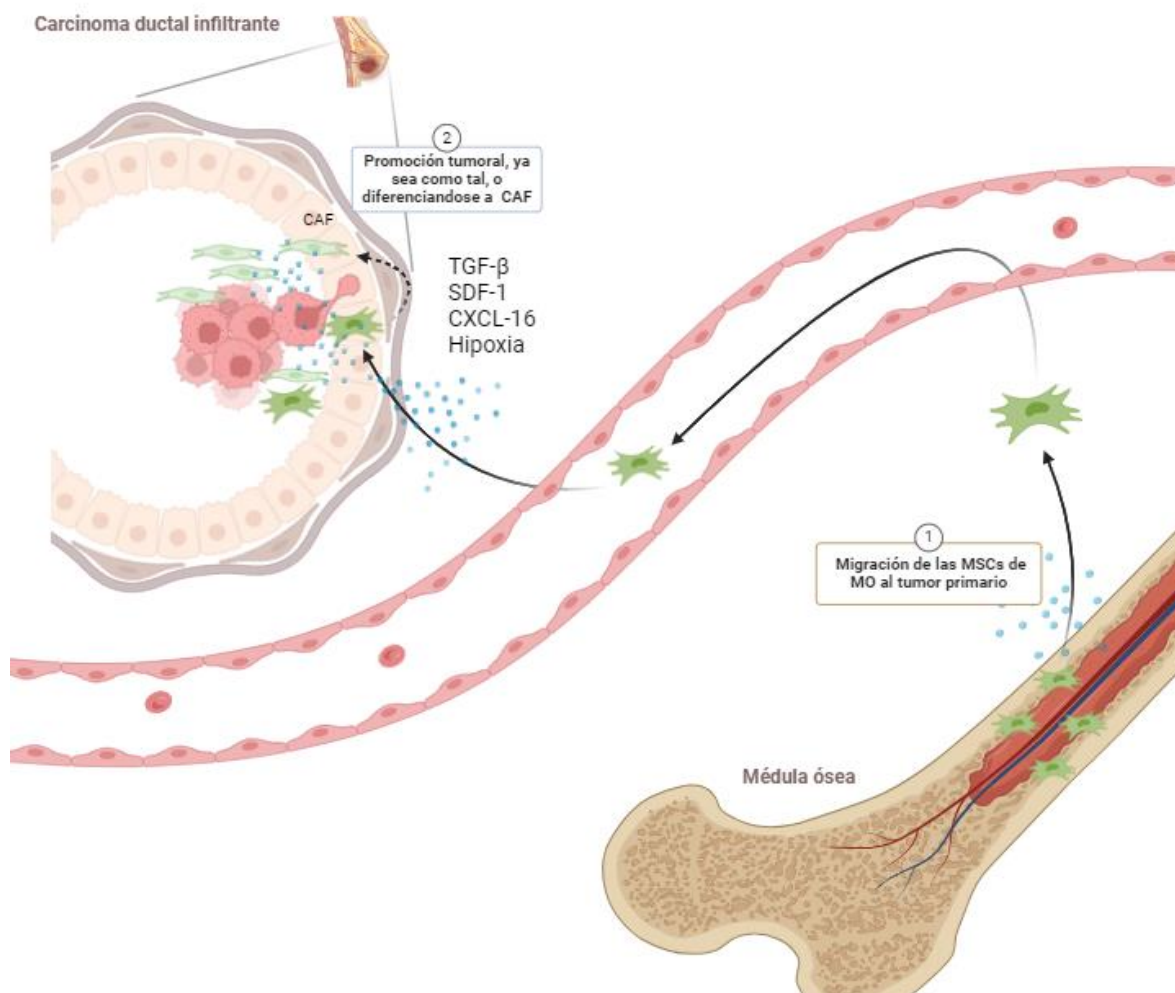


Figura 4. Representación de la migración de las células madre/estromales mesenquimales de médula ósea al sitio del tumor de mama primario. MSCs: células madre mesenquimales; CAFs: fibroblastos asociados al cáncer, MO: médula ósea. TGF- β : factor de crecimiento transformante beta, SDF-1: factor derivado de células estromales tipo 1, CXCL-16: quimioquina con motivo C-X-C 16.



Fibroblastos asociados al cáncer CD105(+) y su relación con la evolución tumoral, particularmente con la ocurrencia de metástasis óseas

Ahora bien, se sabe que el 90-95% de las MSCs de la MO además de presentar CD90 y CD73 se caracterizan por presentar CD105. Interesantemente, el 50% de los CAFs expresan CD105 en el estroma tumoral de PCM [134]. El antígeno CD105 juega un papel crucial como co-receptor para el factor de crecimiento TGF- β , que es fundamental en la regulación de la proliferación celular, la migración, la diferenciación y la apoptosis [135]. CD105 también desempeña un papel importante en el mantenimiento de las propiedades de multipotencialidad y en la migración de las MSCs de MO al tumor primario de mama, mediado por la señalización del TGF- β [135]. Dentro del microambiente tumoral, el TGF- β promueve la diferenciación de las MSCs en CAFs, estimula su proliferación y activación, y mejora su actividad pro-tumoral al inducir la liberación de MEC y otros factores [136]. Por lo tanto, la identificación de CAFs que presenten el marcador CD105 en el microambiente tumoral mamario, también refleja el posible origen MSCs de MO de estas células, resaltando la complejidad de las interacciones celulares en este contexto.

En trabajos previos de nuestro laboratorio, observamos que las células estromales fusiformes CD34 (–), no asociadas con la vasculatura, de PCM ductal infiltrante, en estadios temprano, expresaban CD105. Esta expresión fue diferencial entre tejido normal y neoplásico, no encontrándose expresión en el tejido normal [137]. Además, nuestra investigación reveló una correlación significativa entre la alta expresión de CD105 y el desarrollo de metástasis en PCM ductal infiltrante, en estadios tempranos (n = 56) [137]. Las pacientes con alta expresión de CD105 experimentaron un tiempo libre de metástasis (**MFS**, de sus siglas en inglés) y sobrevida global (**OS**, de sus siglas en inglés) más corto [137]. Dada la implicancia del marcador CD105 en la sobrevida de la PCM y teniendo en cuenta que es un marcador de MSCs de MO, resulta interesante estudiar si puede tener algún tipo de implicancia en el desarrollo de metástasis sitio específico, particularmente metástasis óseas, lugar de donde hipotéticamente podrían provenir. Estos CAFs podrían derivar de MSCs que migraron desde la MO al tumor y se diferenciaron en CAFs en la mama. Por lo



tanto, la comprensión de los mecanismos que regulan la diferenciación de las MSCs en CAFs, así como su papel en la progresión tumoral hacia las metástasis óseas podría abrir nuevas vías terapéuticas para el tratamiento del cáncer de mama.

Se sabe que los sitios más comunes a los que las células tumorales de mama tienden a metastatizar son el hueso, el hígado, los pulmones y el cerebro, siendo el primer sitio el más frecuente (aproximadamente un 70%) [138, 139]. El desarrollo de metástasis óseas es un proceso complejo e ineficiente que involucra varios pasos. Primero, ocurren cambios en el tumor primario, como la angiogénesis y la EMT, que permiten a las células cancerosas migrar e invadir el tejido circundante. Mediante la EMT, las células epiteliales del tumor adquieren un fenotipo mesenquimal, lo que aumenta su potencial metastásico [140]. Luego, las células tumorales entran en la circulación a través de los vasos sanguíneos o linfáticos. Una vez en el sistema circulatorio, las células tumorales diseminadas (**DTCs**) activan las plaquetas para protegerse de la velocidad del flujo sanguíneo y evitar ser eliminadas por el sistema inmunitario, facilitando su interacción con las células endoteliales [141, 142]. Los monocitos también juegan un papel clave en la supervivencia de las células tumorales en la circulación mediante contacto directo [143]. El último paso es la extravasación de las DTCs hacia la MO/hueso, donde algunas pueden sobrevivir en un estado de quiescencia. Este estado puede durar años y, eventualmente, las células pueden reactivarse y formar micro y/o macrometástasis [144]. Como resultado de todo lo mencionado anteriormente, se infiere que los CAFs juegan un papel importante como biomarcadores en el diagnóstico clínico, la terapia y el pronóstico de este tipo de cáncer [34, 116, 145].

Por lo tanto, considerando que la identificación de biomarcadores que permitan una evaluación precisa del comportamiento tumoral y la progresión de la enfermedad es fundamental, y basándonos en los antecedentes previamente mencionados de nuestro laboratorio:



1. Las células tumorales presentes en los tumores primarios de carcinoma ductal infiltrante en etapas tempranas, libres de tratamiento, producen sustancias quimiotácticas de MSCs de la MO, como IL-6, SDF-1 y CCL-2. Existe una asociación significativa entre la expresión de estos ligandos en las células tumorales y la expresión de sus receptores correspondientes (IL-6R, CXCR-4 y CCR-2) en las células estromales fusiformes intra-tumorales, no asociadas a la vasculatura.
2. Se ha observado la expresión de marcadores como α -SMA, FSP, CD146 y CD105 en las células estromales fusiformes CD34(-), presentes en los tumores primarios de carcinoma ductal infiltrante en etapas tempranas.
3. Las células estromales fusiformes CD34(-) de los tumores primarios de carcinoma ductal infiltrante muestran una expresión de CD105, a diferencia de los tejidos mamarios no malignos, que no expresan este marcador. Más aún, las PCM con alta expresión de CD105 en estas células estromales experimentaron ocurrencia de metástasis en un menor tiempo y menor sobrevida.

Surge que el estudio de los CAF CD105(+)/CD34(-) en el microambiente tumoral mamario constituye un área de investigación de gran interés, debido a su potencial implicancia en la progresión de esta enfermedad. Además, resulta crucial entender su posible origen, así como sus características fenotípicas y funcionales, especialmente en relación con sus roles pro-tumorales. Estos estudios pueden servir como base para el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos, ofreciendo así nuevas estrategias para el seguimiento y tratamiento de los carcinomas ductales infiltrantes tempranos.



HIPÓTESIS GENERAL DEL TRABAJO

La expresión de CD105(+) en las células estromales fusiformes CD34(-), no asociadas a la vasculatura, de tumores primarios de las PCM de tipo ductal infiltrante temprano constituye un biomarcador pronóstico de la ocurrencia de metástasis sitio específico (visceral y/u óseas), así como de sus respectivos tiempos, en estas pacientes. Además, constituye un nuevo marcador pronóstico independiente del tiempo hasta la aparición de metástasis visceral y/u óseas en estas pacientes. Más aun, las células estromales CD105(+)/CD34(-) de los tumores primarios de las PCM temprano presentan características fenotípicas, moleculares y funcionales que favorecen su comportamiento pro-tumoral.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar si la expresión de CD105 en las células estromales intratumor de morfología fusiforme, no asociada a la vasculatura, y CD34 (-) de tumores de mama primarios, constituye un biomarcador pronóstico independiente de evolución metastásica sitio específico en PCM de tipo ductal infiltrante que presentan estadios clínico-patológicos tempranos (I y II). Además, evaluar si estas células estromales CD105 (+)/CD34 (-) presentan diferentes características fenotípicas, moleculares y funcionales respecto a las células CD105 (-)/CD34 (-), las cuales puedan explicar, en parte, su origen y rol en la evolución tumoral.



OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para facilitar su entendimiento dividiremos el trabajo en dos partes.

Parte A: a nivel de cortes del taco en parafina de tumores primarios de PCM. Estudio retrospectivo.

- **Objetivo A:** Estudiar la relevancia pronóstica de la expresión de CD105 en las células estromales fusiformes CD34(-), no asociadas a la vasculatura.

Parte B: a nivel de células estromales aisladas de tumores primarios de las PCM, obtenidos en el momento de la cirugía. Estudio prospectivo.

- **Objetivo B:** Estudiar si las células estromales CD105(+)/CD34(-) presentan diferentes características fenotípicas, moleculares y funcionales, en particular pro-tumorales, respecto a las células CD105(-)/CD34(-).



MATERIALES Y MÉTODOS

PARTE A

Selección de muestras

Realizamos un estudio retrospectivo que incluyó a 350 pacientes, mujeres (muestras consecutivas) que recibieron tratamiento quirúrgico por cáncer de mama en el Hospital Italiano de Buenos Aires, Argentina. Los criterios de inclusión fueron mujeres que contaban con un diagnóstico histológico confirmado de carcinoma ductal infiltrante de mama en etapa temprana (estadio clínico-patológico I/II), según el sistema de clasificación TNM de la Unión Internacional Contra el Cáncer [146], y que se garantizara un período de seguimiento mínimo de 10 años después del procedimiento quirúrgico. Los criterios de exclusión comprendieron terapias neoadyuvantes, falta de muestras de tejido y/o desarrollo previo de otro tumor primario del mismo o distinto origen. Después de la cirugía, todas las pacientes recibieron el tratamiento apropiado, que incluyó una combinación de terapia hormonal, radioterapia y/o quimioterapia y/o inmunoterapia. El plan de tratamiento se determinó en función de las características clínicas e histopatológicas de cada paciente, así como de las pautas recomendadas por la Sociedad Europea de Oncología Médica [147, 148]. Este proyecto de tesis doctoral y el consentimiento informado correspondiente recibieron la aprobación del Comité de Ética de Protocolos de Investigación del Hospital Italiano de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina. El estudio se llevó a cabo de acuerdo con los principios establecidos en la Declaración de Helsinki. Para garantizar la privacidad de las pacientes, los registros médicos se hicieron en forma anónima mediante un código numérico.



Características clínico-patológicas de las pacientes con cáncer de mama

Los datos clínico-patológicos se recopilaban en colaboración con patólogos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Italiano. Estos patólogos tuvieron acceso completo a todos los registros clínicos de las pacientes, incluidos los estudios médicos, medicamentos y datos de seguimiento. Se reclutaron pacientes diagnosticadas con carcinoma ductal infiltrante de mama en etapas tempranas (I/II) entre 2007 y 2013. Es importante destacar que el seguimiento de las pacientes se actualizó de manera consistente hasta abril de 2024. Las características clínicas-patológicas de las pacientes, consideradas marcadores de pronósticos clásicos, se categorizaron según los valores de corte especificados en los protocolos del Hospital Italiano [149]. Estos incluyeron: **a)** edad (<50 o ≥ 50 años); **b)** tamaño del tumor (≤ 2 o > 2 cm); **c)** grado histológico basado en el sistema de gradación de Scarff-Bloom-Richardson [150], categorizado como diferenciado (G1), intermedio (G2) o pobremente diferenciado (G3); **d)** expresión de RE, RP y estado de HER2/neu, clasificado como negativo o positivo según Wernicke M et al. [149]; y **e)** presencia de ganglios linfáticos metastásicos regionales, registrados como negativos o positivos (incluyendo micro-metástasis). Además, los subtipos moleculares de cáncer de mama se identificaron de la siguiente manera: **a)** Luminal A: RE y/o RP positivos, HER2/neu negativo y bajo Ki-67 ($\leq 14\%$), **b)** Luminal B: RE y/o RP positivos, HER2/neu negativo o positivo y alto Ki-67 ($> 14\%$), **c)** sobreexpresión de HER2/neu: RE y RP negativos y HER2/neu positivo y **d)** TNBC: RE, RP y HER2/neu negativos.

Otros datos clínicos recolectados fueron si la paciente experimentó recidiva local, metástasis en general, metástasis óseas, metástasis viscerales, ocurrencia de metástasis mixtas (óseas y viscerales al simultáneo), tiempo libre de recidiva local (**RFS**, de sus siglas en inglés), **MFS**, tiempo libre de metástasis óseas (**BMFS**, de sus siglas en inglés), tiempo libre de metástasis viscerales (**VMFS**, de sus siglas en inglés), tiempo libre de metástasis mixtas (**MMFS**, de sus siglas en inglés) y **OS**. RFS, MFS, BMFS, VMFS y MMFS se definieron como el intervalo de tiempo desde la fecha de la cirugía hasta la primera observación de recurrencia tumoral (evento metastásico y/o recidiva local) o hasta el último seguimiento.



La OS se definió como el intervalo desde la fecha de la cirugía hasta la muerte o el último seguimiento [137]. Las pacientes incluidas en el grupo de metástasis mixtas fueron aquellas que, en el momento del seguimiento, presentaban tanto metástasis óseas como viscerales. No fue posible diferenciar qué evento ocurrió primero. Las pacientes con metástasis cerebral (n=5), cutánea (n=1) y pleura - ganglios supraclaviculares (n=4) se incluyeron en el grupo de metástasis viscerales, dado su bajo número.

Los métodos utilizados para diagnosticar metástasis incluyeron varias técnicas de imagen, como tomografía computarizada, centellografía y tomografía por emisión de positrones. Específicamente, la tomografía por emisión de positrones y centellografía se utilizaron para detectar metástasis óseas, mientras que la tomografía computarizada se utilizó para identificar metástasis viscerales. Los informes detallados obtenidos de estos estudios de imagen no solo revelaron la presencia de focos consistentes con metástasis óseas y/o viscerales, sino que también especificaron si estos focos eran únicos o múltiples dentro del mismo órgano. En los casos en que surgieron dudas sobre el diagnóstico de metástasis basado en las técnicas de imagen mencionadas anteriormente, los médicos tratantes de las pacientes realizaron biopsias para confirmar el diagnóstico histopatológico. Sin embargo, es importante destacar que la mayoría de las pacientes con ocurrencia de metástasis en nuestro estudio no requirieron biopsias para la confirmación.

Asimismo, también se registró a las pacientes que informaron experimentar dolor óseo frecuente y persistente antes del inicio de la metástasis. Para documentar la presencia o ausencia de dolor óseo no utilizamos ningún formulario de evaluación del dolor. Las pacientes mismas proporcionaron esta información en respuesta a la pregunta de su oncólogo sobre su presencia, y posteriormente fue ingresada en el portal del paciente por su oncólogo tratante. Es importante tener en cuenta que las pacientes que experimentaron dolor óseo antes del inicio de las metástasis óseas no estaban recibiendo tratamiento hormonal, quimioterapia y/o radioterapia que pudiera sesgar el origen del dolor óseo. Esta precaución se tomó para garantizar la precisión y relevancia de los datos sobre el dolor óseo en nuestra población de estudio.



Las características clínicas específicas de las pacientes y sus datos de resultado correspondientes incluidos en nuestro estudio se detallan en la **Tabla 1** y **Figura 5**. Los sitios de metástasis observados en nuestra cohorte de PCM se detallan en la **Tabla 2**.

Características clínico-patológicas		Pacientes n	%
Edad (años)	<50	90	25,71
	≥50	260	74,29
Tamaño tumoral (cm)	≤2	224	64,00
	>2	126	36,00
RE	Negativo	44	12,57
	Positivo	306	87,43
RP	Negativo	60	17,14
	Positivo	290	82,86
HER2/neu	Negativo	291	83,14
	Positivo	59	16,86
Grado histológico	G1	37	10,57
	G2	185	52,86
	G3	128	36,57
Metástasis en Ganglios linfáticos regionales	Negativo	240	68,57
	Positivo	110	31,43
Recidiva local	Negativo	310	88,57
	Positivo	40	11,43
Ocurrencia de metástasis	Negativo	272	77,71
	Positivo	78	22,29
Ocurrencia de metástasis ósea	Negativo	321	91,71
	Positivo	29	8,29
Ocurrencia de metástasis visceral	Negativo	309	88,29
	Positivo	41	11,71
Ocurrencia de metástasis mixta	Negativo	342	97,71
	Positivo	8	2,29

Tabla 1. Detalle de las características clínico-patológicas de las pacientes con cáncer de mama incluidos en el estudio retrospectivo. Pacientes evaluados: 350. RE: receptor de estrógeno, RP: receptor de progesterona, HER2/neu: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.



	Sitio de metástasis	Pacientes (%)
Metástasis óseas	Arcos costales	20,69
	Vertebra	44,83
	Cresta ilíaca-isquión	3,45
	Vertebra-cresta ilíaca-fémur	3,45
	Fémur	3,45
	Calota-fémur-húmero	3,45
	Fémur-esternón-vertebra	6,90
	Húmero-cresta ilíaca	3,45
	Esternón-vertebra-pelvis	10,34
Metástasis viscerales	Pulmón	35,00
	Pleura- ganglios supraclaviculares *	10,00
	Hígado	40,00
	Pulmón-hígado-cerebro	2,50
	Cerebro *	12,50
	Piel *	2,40
Metástasis mixtas	Vertebra-esternón-pulmón	37,50
	Vertebra-hígado-pulmón	12,50
	Vertebra-hígado	25,00
	Vertebra-pulmón	12,50
	Esternón-pulmón	12,50

Tabla 2. Detalle de los sitios metastásicos incluidos en el estudio. *A pesar de no ser estrictamente órganos “viscerales”, dada su baja incidencia en nuestra cohorte, se los incluye en este grupo.



Figura 5. Descripción de la cohorte de pacientes con cáncer de mama ductal infiltrante, estadios tempranos I-II, incluidos en el estudio. A. Detalle de las características clínico-patológicas del tumor (marcadores clásicos), tales como receptor de estrógenos (RE), receptor de progesterona (RP), factor de crecimiento epidérmico (HER2/neu), tamaño tumoral, edad, grado histológico (G1: bajo grado, tumor bien diferenciado; G2: grado intermedio, tumor moderadamente diferenciado, G3: grado alto, tumor indiferenciado) y presencia de micro/macro metástasis en ganglios regionales. **B.** Detalle de otros datos clínico-patológicos de las pacientes, tales como presencia/ausencia de recidiva local, metástasis, metástasis óseas, metástasis viscerales, metástasis mixtas (óseas y viscerales simultáneamente) y muerte. **C.** Detalle de los subtipos moleculares tumorales incluidos en el estudio, TNBC: cáncer de mama triple negativo.



Procesamiento de las muestras y análisis de la expresión de CD105 en las células estromales fusiformes CD34(-), no asociadas a la vasculatura

Trabajamos con muestras de cáncer de mama incluidas en parafina y fijadas en formalina neutra al 10%, obtenidas de los archivos quirúrgicos del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Italiano, Buenos Aires, Argentina. Las muestras se cortaron en secciones de 4 μm de grosor. Las secciones de tejido se desparafinaron y se hidrataron mediante pasajes en xileno y etanol al 100%, 96% y 70%. Posteriormente, se incubaron en buffer de citrato (citrato de sodio anhidro, #7171, Anedra) a 98°C durante 20 minutos (**min**). Para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena, los tejidos se trataron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 5 min. Luego, se realizó el bloqueo de proteínas utilizando albúmina sérica bovina (**BSA**) al 1% en solución salina tamponada de fosfato (**PBS**) durante 1 hora (**hr**). Las secciones de tejido se incubaron durante la noche (**ON**) a 4°C en un ambiente húmedo con el anticuerpo (**Ac**) primario humano anti-CD105 (ver detalles en **Tabla 3**). Se utilizó el Sistema LSAB+ HRP (K0690, Dako) y la 3,3'-diaminobencidina (DAB líquida + Sistema de cromógeno de sustrato; K3468, Dako) según las instrucciones del fabricante. Posteriormente, las secciones de tejido se incubaron durante la noche con el Ac anti-CD34 (**Tabla 3**), que luego se detectó utilizando IgG anti-ratón biotinilada (H+L, BA-2000, Vector Laboratories), el kit ABC-Alcalina Fosfatasa Vectastain (Ak-5000, Vector Laboratories) y el kit de sustrato rojo Vector (SK-5100; Vector Laboratories) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó hematoxilina (#121, Biopur) para la contratinción, seguido del montaje con bálsamo de Canadá (#141, Biopur). Se realizaron controles negativos incubando secciones de tejido sin Acs primarios, junto con IgG de cabra (AB-108-C, R&D Systems e IgG1 de ratón (MAB002; R&D Systems). Se realizaron ensayos duplicados para cada muestra. Se contaron las células con tinción membranosa, contra-coloración nuclear y morfología fibroblástica característica (forma fusiforme) dentro del estroma intratumoral, lejos de la vasculatura. A partir de este momento, nos referiremos a estas células fibroblásticas dentro del estroma tumoral mamario como CAFs. La enumeración se realizó en cinco áreas ópticas representativas por sección de tejido a una magnificación de



400x. Para evaluar la marcación de CD105 en los CAFs, se asignó una puntuación cuantitativa basada en el porcentaje de células estromales fusiformes que presentaban tinción positiva [0% (puntuación 0); <10% (puntuación 1); 10-50% (puntuación 2); 51-80% (puntuación 3); o >80% (puntuación 4)] como se determinó previamente [137]. Además, se puntuó la intensidad de la tinción en células positivas [ausente (puntuación 0); baja (puntuación 1); moderada (puntuación 2); o intensa (puntuación 3) en comparación con un control interno]. La puntuación cuantitativa y la puntuación de intensidad se sumaron para obtener una puntuación total que oscilaba entre 0 y 7 (score final). La puntuación de intensidad de CD105 se determinó comparando la intensidad de tinción de las células estromales con la observada en las células endoteliales del tejido mamario (control positivo interno) [151–154]. La lectura se realizó de forma independiente por dos patólogos y luego chequeadas nuevamente por nosotros. Hubo un acuerdo del 87,50% en la evaluación inmunohistoquímica entre los dos observadores (valor Kappa = 0,840).

Controles y Ac anti-	Especificidad	Tipo de Ig	Fabricante y Catálogo
CD105	Humano	IgG, cabra	R&D Systems (AF1097)
CD34	Humano	IgG1, ratón	Dako (M7165)
Control de isotipo para Ac anti CD105	Cabra	IgG	R&D Systems (AB-108-C)
Control de isotipo para Ac anti-CD34	Ratón	IgG1	R&D Systems (MAB002)

Tabla 3 Detalle de los anticuerpos y controles usados en inmunohistoquímica. Se indican las características, y los números de catálogo y fabricante de cada uno de los anticuerpos (Acs) y controles usados. Ig= inmunoglobulina/s.



Análisis de las características estromales intratumorales

El estudio de las características histológicas del estroma tumoral, como la abundancia de estroma intratumor, la cantidad de fibroblastos, la deposición de colágeno, la infiltración linfocitaria, los cambios mixoides (Wernicke et al., 2003), la desmoplasia, la vascularización sanguínea y/o linfática, y la presencia de microcalcificaciones anárquicas, se determinaron mediante tinción con hematoxilina y eosina (de Kruijf et al., 2011). Es importante recordar que las calcificaciones que son irregulares en tamaño o forma y/o que están agrupadas firmemente son sospechosas, y se denominan calcificaciones anárquicas.

Específicamente, el estroma intratumoral se cuantificó como un porcentaje, categorizado como baja cantidad (<50%) o alta cantidad (≥50%). Además, los patólogos calificaron la presencia de fibroblastos, deposición de colágeno, infiltración linfocitaria, cambios mixoides, vascularización sanguínea y/o linfática, y microcalcificaciones utilizando una escala de ausente (0%, puntuación 0), escasa (<30%, puntuación 1), moderada (30-50%, puntuación 2) o abundante (≥50%, puntuación 3). Otra información fue el grado de desmoplasia, calificado como leve (0%-30%), moderado (30%-50%) o severo (≥50%). En este punto, nos resulta importante resaltar la diferencia entre cambios mixoides y desmoplasia. Los cambios mixoides son cambios estromales que consisten en una reacción estromal compuesta de un material vacuolado anfófilo o ligeramente basófilo y se encuentra entre las fibras de colágeno. El ácido hialurónico es uno de sus principales componentes. Los tejidos ricos en ácido hialurónico atrapan agua e hinchán, lo que lleva a cambios mixoides. Se sabe que la síntesis de ácido hialurónico es estimulada por la interacción entre las células tumorales y estromales [155]. Por otro lado, la desmoplasia, es una respuesta estromal, que en los carcinomas primarios de mama pueden variar desde ser predominantemente celulares (fibroblastos/*miofibroblastos*) con poco colágeno hasta ser un tejido denso y acelular [156].

Por otro lado, se registró la presencia o ausencia de microcalcificaciones anárquicas en las mamografías de las PCM estudiadas, con el propósito determinar si se desarrollaron previas al diagnóstico del tumor.



Análisis estadístico entre la expresión de CD105 en los fibroblastos asociados al cáncer con características clínico-patológicas de pacientes con cáncer de mama, así como con otras características estromales

Para evaluar la relación entre la expresión de CD105 en los CAFs, con otras características estromales intratumorales, así como con características clínico-patológicas de las PCM, empleamos un enfoque basado en valores de corte, que es una técnica común en el análisis de biomarcadores [137]. En el primer paso, determinamos los valores de corte para cada uno de los parámetros estudiados, incluida la expresión de CD105 y otros factores relacionados con el estroma intratumor, en función de los valores del primer cuartil (Q1), la mediana (M) y el tercer cuartil (Q3). Posteriormente, se realizaron análisis univariados, utilizando estos valores de corte, para examinar su asociación con la OS de las PCM. El análisis univariado nos permitió evaluar la relación entre cada parámetro y OS individualmente, sin considerar otras variables. El valor de corte con la mayor significancia (valor p más bajo) se consideró el valor de corte óptimo para esa característica específica. Un valor p más bajo indica una asociación más fuerte entre la característica y OS, lo que sugiere que la relación observada es menos probable que ocurra por casualidad. Los valores de corte óptimos para la expresión de CD105, así como para la cantidad de fibroblastos, deposición de colágeno, infiltración linfocitaria, cambios mixoides, microcalcificaciones anárquicas y vascularización sanguínea y/o linfática, fueron los siguientes: 3 (M), 1 (Q1), 2 (Q3), 0 (Q1), 2 (Q3), 1 (Q1) y 0 (Q1), respectivamente. De esta manera, la expresión de CD105, el porcentaje de fibroblastos, la deposición de colágeno, la infiltración linfocitaria, los cambios mixoides, la vascularización sanguínea y/o linfática, y la presencia de microcalcificaciones se categorizaron como ausentes/escasos o en grandes cantidades según el valor de corte óptimo seleccionado. El registro del grado de desmoplasia se recolectó de los informes anatomopatológicos del Hospital Italiano, donde los patólogos lo clasificaron como leve, moderado o severo, según los porcentajes que previamente detallamos.



Utilizamos la prueba exacta de Fisher para evaluar la asociación de CD105 en los fibroblastos asociados al cáncer, con marcadores pronósticos clásicos, así como con recidiva local, ocurrencia de metástasis, ocurrencia de metástasis óseas, ocurrencia de metástasis viscerales y ocurrencia de metástasis mixtas. Los análisis de supervivencia, incluidos RFS, MFS, BMFS, VMFS, MMFS y OS, se realizaron utilizando el método de Kaplan-Meier, y la prueba de log-rank (Mantel-Cox) [148] se utilizó para evaluar diferencias. El análisis de supervivencia multivariado se realizó utilizando el modelo de riesgos proporcionales de Cox (pasos reversos, razón de verosimilitud), considerando solo las variables significativas de los eventos (ocurrencia de recidiva local, metástasis general o sitio específico, muerte) así como sus respectivos tiempos identificados en el análisis univariado. Se estableció un nivel de significancia $< 0,05$ para todos los análisis. El análisis estadístico fue realizado por un estadístico experimentado utilizando el software SPSS (versión 18.00, Chicago, Illinois).

Análisis de la relación de la expresión del mRNA de CD105 en células FSP (+), FAP (+) y CD34 (-) dentro del tumor de mama con los datos clínico patológicos de las pacientes, utilizando un enfoque bioinformático

Se analizó la base de datos METABRIC disponible en la herramienta bioinformática cBioPortal (<http://www.cbioportal.org>) para validar nuestros hallazgos en otra cohorte de datos independiente [157]. El análisis incluyó datos de RNAseq (IlluminaHiSeq) de 105 muestras de PCM (mujeres con cáncer de mama ductal infiltrante, estadio clínico I/II, libres de tratamiento). Los datos se filtraron en base a la expresión del marcador CD34, seleccionando solo las muestras con puntuaciones z de expresión de RNAm de CD34 ≤ 0 $\log_2(\text{RPM}+1)$. Además, se seleccionaron muestras con puntuaciones z de expresión de RNAm de FSP ≥ 0 $\log_2(\text{RPM}+1)$ y puntuaciones z de expresión de RNAm de FAP ≥ 0 $\log_2(\text{RPM}+1)$ para asegurarnos que estemos trabajando con CAFs. Posteriormente, se utilizó la mediana ($-0.29 \log_2[\text{RPM}+1]$) como valor de corte para definir los grupos de baja



y alta expresión de CD105, lo que dio lugar a dos poblaciones de datos: expresión baja (n=51) y expresión alta (n=54), respectivamente.

Análisis de la expresión de la firma génica correspondiente a células fibroblásticas (FSP y FAP positivas) con características mesenquimales (CD90, CD73 y CD105 positivas) en el tejido mamario tumoral y normal

Se analizó la base de datos de *gene chip data* disponible en la herramienta bioinformática TNMplot (<http://tnmplot.com/>) [158]. Esta herramienta realiza una búsqueda en el repositorio NCBI Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) para identificar conjuntos de datos que contuvieran muestras de cáncer de mama. Se incluyeron 7.223 muestras de tejido tumoral mamario y 177 de pacientes “normales” (sin presencia de algún tipo de tumor). Es importante mencionar que la base de datos excluye conjuntos de datos que contienen estudios de líneas celulares, muestras agrupadas o experimentos de xenoinjerto, así como muestras tomadas después de la terapia neoadyuvante. Además, elimina muestras con descripción incompleta, datos brutos no disponibles y muestras publicadas repetidamente con identificadores distintos [158]. Para el análisis, el software TNMplot normaliza los datos utilizando el algoritmo MAS5 mediante la biblioteca de *Affy Bioconductor*. Finalmente, realiza una segunda normalización de escala para establecer la expresión media en cada matriz en 1.000.

Para nuestro análisis en particular, se seleccionaron los siguientes genes para estudiar la firma génica que podría corresponder a los fibroblastos dentro del tejido mamario que posiblemente deriven de MSCs: CD105 (ENG), CD90 (THY1), CD73 (NT5E), FAP (FAP) y FSP (S100A4). En particular, se analizó la diferencia en la expresión de esta firma génica entre tejido tumoral mamario y tejido normal. La plataforma bioinformática TNMplot realiza un cálculo de los promedios de expresión de los genes seleccionados en la firma génica para cada paciente de forma individual. Posteriormente, genera un gráfico de resumen que



muestra los promedios de expresión de la firma génica para cada paciente, utilizando datos basados en chip de genes [158].

Para el análisis de datos, el pipeline de TNM-plotter realiza una comparación de las muestras normales y tumorales mediante la prueba de U de Mann-Whitney, y compara las muestras emparejadas con tejidos adyacentes utilizando la prueba de Wilcoxon. Para la comparación de genes entre tejido normal y tumoral, se utiliza la prueba de Kruskal-Wallis. Se estableció un umbral de significancia estadística en $p < 0,01$ [158].



PARTE B

Selección muestras

El criterio de inclusión fue muestras de mujeres con carcinoma ductal infiltrante de mama en estadio clínico-patológico temprano (I/II). Los criterios de exclusión incluyeron recibir terapia neoadyuvante, la presencia de otro tumor o un tamaño de muestra insuficiente (<1 cm). Las muestras llegaron en forma consecutiva, y se trabajó con aquellas que cumplían los criterios de inclusión y exclusión. Por lo tanto, se realizó un estudio prospectivo utilizando fibroblastos (mayoría CAFs) obtenidos de tejido tumoral primario extraído durante la cirugía de 10 mujeres de 26 a 80 años con carcinoma ductal infiltrante de mama en etapa clínico-patológica temprana (I/II), subtipo molecular luminal. El detalle de las características clínico-patológicas de las PCM se muestra en la **Tabla 5**. El diagnóstico histológico del tumor se realizó según el sistema de clasificación de la Unión Internacional Contra el Cáncer [146]. La expresión de RE, RP y el estado de HER2/neu se clasificó como negativo o positivo según Wernicke M et al. [149], y la proliferación de Ki-67 se determinó mediante un procedimiento de inmunoperoxidasa utilizando un anticuerpo monoclonal, Ki-67, que reacciona con un antígeno nuclear en células en proliferación, según Crispino et al [159]. Las muestras de tumor fueron proporcionadas por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Italiano, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. Después de la cirugía, todas las pacientes recibieron tratamiento personalizado, que incluyó una combinación de terapia hormonal, radioterapia, quimioterapia y/o inmunoterapia. El plan de tratamiento se adaptó en función de las características clínicas e histopatológicas individuales, siguiendo las pautas recomendadas por la Sociedad Europea de Oncología Médica [147, 148]. Se obtuvo la aprobación ética para este estudio y su consentimiento informado por parte del Comité de Ética de Protocolos de Investigación del Hospital Italiano, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, y la investigación se adhirió a los principios establecidos en la Declaración de Helsinki. Para salvaguardar la privacidad de las pacientes, los registros médicos se anonimizaron utilizando un código numérico.



Características clínicopatológicas		Pacientes n	%
Edad (años)	<50	2	20%
	≥50	8	80%
Tamaño tumoral (cm)	≤2	5	50%
	>2	5	50%
RE	Negativo	0	0%
	Positivo	10	100%
RP	Negativo	0	0%
	Positivo	10	100%
HER2/neu	Negativo	9	90%
	Positivo	1	10%
Grado histológico	G1	0	0%
	G2	8	80%
	G3	2	20%
Metástasis en Ganglios linfáticos regionales	Negativo	9	90%
	Positivo	1	10%
Recidiva local	Negativo	10	100%
	Positivo	0	0%
Ocurrencia de metástasis	Negativo	10	100%
	Positivo	0	0%
Ocurrencia de metástasis ósea	Negativo	10	100%
	Positivo	0	0%
Ocurrencia de metástasis visceral	Negativo	10	100%
	Positivo	0	0%
Ocurrencia de metástasis mixta	Negativo	10	100%
	Positivo	0	0%
Subtipos moleculares del cáncer de mama			
Luminal A		2	20%
Luminal B		8	80%
TNBC		0	0%
Sobreexpresión de HER2/neu		0	0%

Tabla 4. Detalle de las características clínico-patológicas de las pacientes con cáncer de mama incluidos en el estudio prospectivo. Pacientes con cáncer de mama ductal infiltrante temprano, estadio I/II (PCM; n=10). Luminal A: este subtipo se caracteriza por la expresión positiva del receptor de estrógeno (RE) y/o del receptor de progesterona (RP), un índice de proliferación Ki-67 bajo (≤14%) y expresión negativa del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2/neu). Luminal B: este subtipo expresa RE y/o RP, pero generalmente tiene un índice de proliferación Ki-67 más alto (>14%) y expresión positiva/negativa de HER2/neu (+). Triple negativo (TNBC): este subtipo carece de expresión de RE, RP y HER2/neu. Sobreexpresión de HER2/neu: este subtipo es negativo para RE, RP y positivo para HER2/neu (++++).



Aislamiento y expansión de los fibroblastos asociados al cáncer a partir de tejido primario de cáncer de mama

Inmediatamente después de la cirugía, los tejidos tumorales se colocaron en DMEM-F12 (cat. 12500-062, Gibco). Posteriormente, se lavaron con el mismo medio suplementado con una solución de antibiótico-antimicótico (**ATB/ATM**) (cat.15240, Gibco), con una concentración final de 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 25 µg/ml de anfotericina B y 2 mM de L-glutamina añadidos al medio (en adelante referido como suplemento). El tejido fue cortado con un bisturí en una placa de cultivo y tratado con 0,1% de collagenasa tipo III/hialuronidasa (cat. 07912, StemCell) durante toda la noche a 37°C con una agitación suave. Después de este período, la muestra fue centrifugada a 40 g durante 2 min a temperatura ambiente (**TA**). El *pellet* resultante, rico en tejido no disociado, fue descartado. El sobrenadante obtenido fue transferido y centrifugado nuevamente a 100 g durante 2 min a TA. El *pellet* obtenido en este paso está enriquecido en células epiteliales, mientras que el sobrenadante está enriquecido en fibroblastos, la fracción celular de interés. Se realizó una centrifugación final del sobrenadante a 200 g durante 5 min, a TA. El *pellet* resultante, rico en fibroblastos (lo denominaremos CAFs para mayor simplicidad), fue resuspendido en medio α -mínimo esencial (**α -MEM**, cat. 11900024, Gibco) con la solución ATB/ATM, previamente descrita (**α -MEM-sup**). El recuento de células se realizó utilizando una solución de ácido acético al 3% en H₂O_d, y la viabilidad de los CAFs se determinó mediante el test de exclusión de azul de tripan (0,04% en PBS). Para los cultivos primarios, se incubaron 15.000 células/ cm² en frascos de 25 cm² (cat. 5510100, Orange Scientific) en 10 ml de α -MEM-sup con la adición de 20% de suero fetal bovino (**SBF**) (Natocor). Después de 24 hr, se eliminaron las células no adherentes y se renovó el medio para dejar solo las células adherentes. Las incubaciones se realizaron a 37°C, 5% CO₂ y humedad. El medio se renovó cada 7 días, y cuando el cultivo alcanzó una confluencia del 80%, las células adherentes se trataron con una solución 0,05% Tripsina- 0,02% ácido etilendiaminotetraacético (**EDTA**) en PBS (cat. 15400054, Gibco) a 37°C, 5% de CO₂ y humedad durante 5 min, para desprenderlas (tripsinización). Las células adherentes



obtenidas de este primer subcultivo son predominantemente células estromales diferenciadas (especialmente CAFs). Luego, para aumentar la densidad celular, estos CAFs fueron cultivados en dos frascos de 25 cm², que fueron incubados en medio α -MEM-sup con la adición de 20% SBF. El medio de cultivo se renovó cada 7 días hasta que los CAFs alcanzaron nuevamente una confluencia del 80%. En ese punto, los CAFs del segundo subcultivo fueron tratadas con solución de tripsina-EDTA (0,05%-0,02% en PBS, respectivamente) para posteriormente realizar la separación de las subpoblaciones de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-). Ver protocolo general en la **Figura 6**

Separación de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-)

Los CAFs del 2^{do} subcultivo se centrifugaron a 200 g durante 5 min. La concentración celular de partida fue 4,50 x10⁵ células /frasco de 25 cm². El *pellet* resultante se suspendió en una solución de PBS con 0,5% de BSA, y 2 mM de EDTA (0,1461 g/L, cat. 15400054, Gibco) a pH 7,2] más Ac anti-CD34-PE (1/10, cat. 130-096-140, Biotechnologies Inc Magnetic Separation Kit, MACS MiltenyiBiotec) y se incubó a 4°C en la oscuridad durante 10 min. Posteriormente, los CAFs fueron lavados y centrifugados a 200 g durante 10 min. El *pellet* se suspendió en el *buffer* previamente descrito con *microbeads* (cat. 130-091-271, Biotechnologies Inc Magnetic Separation Kit, MACS MiltenyiBiotec). Después de incubar a 4°C durante 15 min, los CAFs fueron lavados con el mismo *buffer* y centrifugados nuevamente a 200 g durante 10 min. El *pellet* se resuspendió con el *buffer* previamente descrito y se pasó por la columna de separación magnética. El eluido de la columna fue recogido, ya que contenía la población de células estromales CD34(-) de interés. Esta fracción celular se centrifugó nuevamente a 200 g durante 10 min, y el *pellet* se resuspendió con el *buffer* descrito, añadiendo Ac anti-CD105-PE (1/10, cat. 130-096-906, Biotechnologies Inc Magnetic Separation Kit, MACS MiltenyiBiotec). A continuación, se repitieron los mismos pasos descriptos anteriormente para el Ac anti-CD34-PE. Finalmente, las células se pasaron por la columna de separación magnética, donde se recogieron los



CAFs CD105(-)/CD34(-) que no se unieron a la columna. Luego, se retiró la columna del imán para recoger las células CD105(+)/CD34(-). Ambas fracciones celulares se centrifugaron a 200 g durante 10 min y se cultivaron en frascos de cultivo de 25 cm² (15.000 células/cm²), que se incubaron en medio α -MEM-sup con la adición de 20% de SBF. El medio se renovó cada 7 días, y cuando el cultivo alcanzó el 80% de confluencia, las células adherentes se trataron con una solución de tripsina-EDTA (0,05%-0,02%, respectivamente, en PBS). En este punto, los CAFs del 3^{er} subcultivo, después de pasar por la columna, se incubaron a una concentración de 240 células viables/cm² (4^{to} subcultivo). La baja densidad celular de plaqueo favorece el enriquecimiento del cultivo en MSCs con alto poder de auto-renovación/ “*self-renewal*” y multipotencialidad y, por lo tanto, de los fibroblastos derivados de ellas [160, 161]. Los CAFs del 4^{to} subcultivo se incubaron durante 12 días, con una renovación del medio al día 6. Después de este período podemos considerar que las células obtenidas eran fibroblastos derivados de MSCs. Para aumentar el rendimiento celular, los CAFs CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) se sembraron a 3.000 células viables/cm² y se mantuvieron cambiando el medio antes descripto cada 7 días hasta alcanzar el 80% de confluencia (5^{to} subcultivo). Con estas fracciones celulares, se llevaron a cabo el resto de los ensayos. Finalmente, los MCo se recogieron de las últimas 48 hr (medio libre de SBF) de este último subcultivo al 80% de confluencia. Para los estudios proteómicos y para investigar la acción de los MCo sobre las células tumorales mamarias humanas de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB231, se creó un pool de cada MCo proveniente de las 10 PCM. Ver protocolo general en la **Figura 6**.

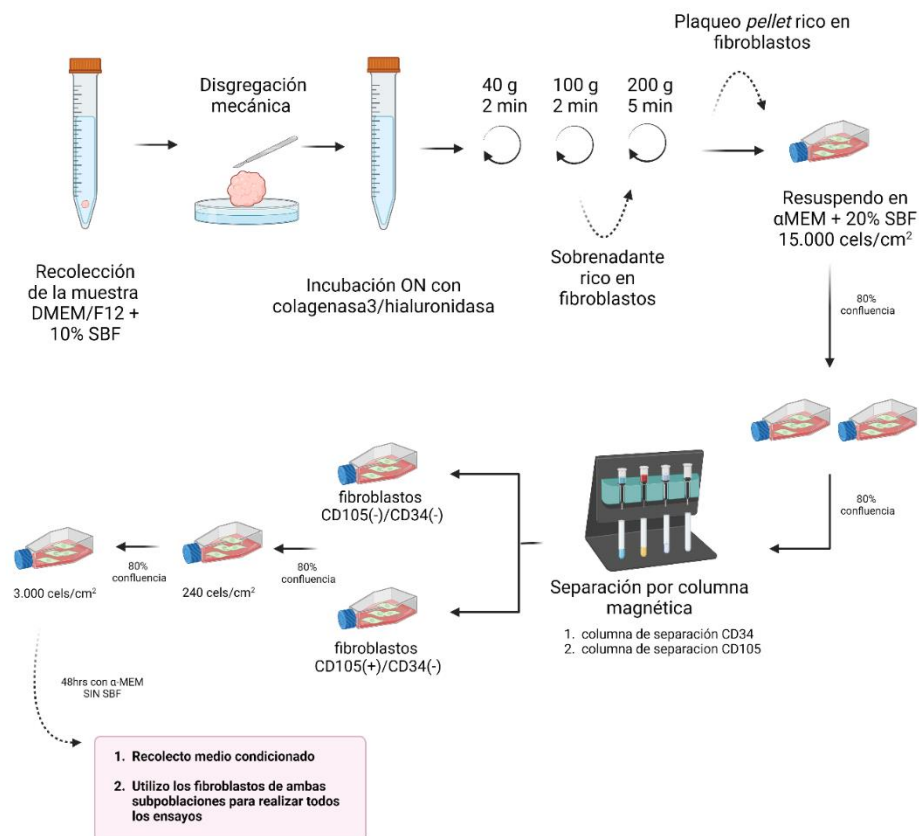


Figura 6. Diagrama del protocolo utilizado para la separación de las subpoblaciones fibroblásticas CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) y la obtención de los correspondientes medios condicionados. ON: toda la noche, SFB: suero bovino fetal.

Estudio del fenotipo de las subpoblaciones fibroblásticas CD105(+)/CD34(-) y

CD105(-)/CD34(-)

Se utilizó un total de 3×10^5 células de las subpoblaciones CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) por tubo de reacción, los cuales fueron centrifugados a 200 g durante 5 min. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en PBS con 1% de BSA. Luego, se incubaron con Acs monoclonales específicos conjugados con diferentes fluorocromos contra los siguientes antígenos humanos durante 30 min a TA: CD105, CD34, CD90, CD73, α -SMA, FAP, P4H β , Desmina, TNC, CD146, CD106, PDGFR α (CD140a), CD19, CD11b y CD14. Se realizaron los controles de isotipo correspondientes en paralelo con la misma



concentración de cada Ac. Para los Acs primarios no conjugados, se emplearon Acs secundarios conjugados con fluoróforos Cy™5 AffiniPure™ Goat Anti-Rabbit IgG y Alexa Fluor® 488 AffiniPure™ Donkey Anti-Goat IgG. Se utilizaron las concentraciones recomendadas por los fabricantes para cada Ac en el análisis de citometría de flujo (*Ver detalle de todos los Acs utilizados en la **Tabla 5***). Después de la incubación, las células de cada tubo se lavaron dos veces con 1% de PBS-BSA y se centrifugaron a 200 g durante 4 min en cada lavado. Finalmente, las células se resuspendieron en PBS y se evaluaron 10.000 eventos en cada caso mediante citometría de flujo (FACScalibur, BD Biosciences). Para los marcadores intracelulares, las células se fijaron en paraformaldehído al 4% (cat. 158127, Sigma) durante 20 min a 4°C. Después de un lavado con PBS, las células se incubaron con los anticuerpos y se suplementaron con 0,1% de saponina (S7900, Sigma) durante 45 min a TA. Se utilizó el software FlowJo para analizar los datos, empleando los controles isotipo para posicionar con precisión los cuadrantes de análisis y obtener índices de fluorescencia media/relativa (**IFM**: índice de fluorescencia específica de la molécula de superficie/índice de fluorescencia del control de isotipo específico). Los experimentos se realizaron en duplicado para cada marcador por subpoblación de fibroblastos obtenidos de 10 PCM.



Anticuerpo anti-	Especificidad	Tipo de Ig	Aplicación y dilución	Catálogo y fabricante
CD105-Alexa Fluor 405	Humano	Ratón, IgG1	CF, 1:100	FAB10971V, R&D Systems
CD90-Alexa Fluor 488	Humano	Ratón, IgG2A	CF, 1:200	FAB2067G, R&D Systems
CD73-APC	Humano	Ratón, IgG2B	CF, 1:100	FAB5795A, R&D Systems
CD34-PE	Humano	Ratón, IgG1	CF, 1:100	FAB7227P, R&D Systems
α -SMA-APC	Humano	Ratón, IgG2A	CF, 1:100	IC1420A, R&D Systems
FAP-PE	Humano	Ratón, IgG1	CF, 1:100	FAB3715P, R&D Systems
P4HB	Humano	Conejo, IgG	CF, 1:100	ab137110, Abcam
DESMIN	Humano	Conejo, IgG	CF, 1:70	ab32362, Abcam
TNC	Humano	Conejo, IgG	CF, 1:100	ab215369, Abcam
CD146	Humano	Cabra, IgG	CF, 1:100	AF932, R&D Systems
CD106	Humano	Cabra, IgG	CF, 1:200	BBA19, R&D Systems
PDGFR- α -PE	Humano	Ratón, IgG1	CF, 1:100	FAB1264P, R&D Systems
CD19-APC	Humano	Ratón, IgG1	CF, 1:200	FAB4867A, R&D System
CD11b-Alexa Fluor 405	Humano	Ratón, IgG1	CF, 1:200	FAB1699V, R&D Systems
CD14-PE	Humano	Ratón, IgG1	CF, 1:100	FAB3832P, R&D Systems
CD79a-Alexa Fluor 488	Humano	Ratón, IgG1	CF, 1:100	FAB69201G, R&D Systems
Control de Isotipo-Alexa Fluor 405	-	Ratón, IgG1	CF, 1:100	IC002V, R&D Systems
Control de Isotipo-Alexa Fluor 488	-	Ratón, IgG2A	CF, 1:200	IC003G, R&D Systems
Control de Isotipo-APC	-	Ratón, IgG2B	CF, 1:100	IC0041A, R&D Systems
Control de Isotipo-APC	-	Ratón, IgG1	CF, 1:200	IC002A, R&D Systems
Control de Isotipo-PE	-	Ratón, IgG1	CF, 1:100	IC002P, R&D Systems
Control de Isotipo-APC	-	Ratón, IgG2A	CF, 1:100	IC003A, R&D Systems
Ab secundario-Cy5	Conejo	Cabra, IgG	CF, IFI, 1:200	111-175-144, Jackson ImmunoResearch
Ab secundario-Alexa 488	Cabra	Mono, IgG	CF, IFI, 1:200	705-545-147, Jackson ImmunoResearch
Colágeno tipo II	Humano	Conejo, IgG1	IHQ, 1:50	SC7763, Santa Cruz
Isotipo		Conejo, IgG	IHQ, 1:50	X0936, Dako

Tabla 5. Detalle de los Anticuerpos utilizados en la caracterización fenotípica. Ac: anticuerpo, Ig: inmunoglobulina, CF: citometría de flujo e IFI: inmunofluorescencia indirecta, IHQ=inmunohistoquímica.

Cultivo de células tumorales mamarias humanas de las líneas MCF-7 y MDA-MB231, así como células mamarias normales humanas de la línea MCF-10A y obtención de los medios condicionados correspondientes

Utilizamos dos líneas celulares de cáncer de mama humano: MCF-7, MDA-MB231, obtenidas del *American Type Culture Collection* (EE. UU.) y una línea no neoplásica, MCF-10A. Estas células se cultivaron en medio DMEM/F12 suplementado con rojo fenol, que contenía 100 IU/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin, 25 μ g/ml de anfotericina B y 2 mM de L-glutamina (referido como DMEM/F12 suplementado). Además, las células MCF-7 se cultivaron con 2 μ g/ml de insulina porcina humanizada (Novorapid, Novo Nordisk A/S). Todos los cultivos celulares se mantuvieron en un ambiente con un 10% de SBF, con una densidad celular de 4×10^4 células viables/cm². El medio se renovó cada tres días. Las



células se incubaron a 37°C en un ambiente humidificado al 5% de CO₂ hasta alcanzar la confluencia. Las células adherentes se lavaron con PBS y se recogieron post-tratamiento utilizando una solución de tripsina-EDTA (0,05%-0,02%, respectivamente, en PBS). La viabilidad celular se evaluó mediante el test de exclusión con azul de tripán al 0,04% en PBS. Alícuotas de cada suspensión de líneas celulares se crio-preservaron en nitrógeno líquido hasta que se necesitaran para ensayos posteriores. Para experimentos que involucraron migración, proliferación y expresión génica se utilizaron células de las líneas MCF-7 y MDA-MB231 que se subcultivaron no más de cuatro veces

Características de las líneas celulares utilizadas:

MCF-7: Esta línea celular se originó a partir de células aisladas de una punción de líquido pleural de una paciente caucásica de 69 años. La paciente presentaba un adenocarcinoma de mama con metástasis en la pleura, clasificado como estadio clínico-patológico IV avanzado [162]. Las células MCF-7 expresan RE y RP, tienen una función normal de p53 y no expresan caspasa 3 [163]. Además, muestran expresión de GATA-3 y E-cadherina, lo que disminuye su capacidad invasiva. No presentan expresión de plasmina.

MDA-MB231: Esta línea celular se derivó de células aisladas de una punción de líquido pleural de una mujer caucásica de 51 años. La paciente tenía un adenocarcinoma de mama con metástasis en la pleura, clasificado como estadio clínico-patológico IV avanzado [164]. Las células MDA-MB231 no expresan receptores de estrógeno ni progesterona, pero sí expresan receptores para el EGF y el TGF- α . Presentan una leve expresión de HER2/neu y una mutación en p53. Estas células tienen una alta capacidad invasiva y metastásica y expresan plasmina, lo que les permite degradar la matriz extracelular, promoviendo la angiogénesis y la metástasis. No muestran expresión de GATA-3 ni E-cadherina.

Ambas líneas celulares se derivan de células metastásicas de pacientes con carcinoma mamario ductal infiltrante en estadio clínico-patológico avanzado. Son ampliamente utilizadas en investigaciones para comprender mejor la patología y explorar posibles tratamientos.



MCF-10A: Estas células se obtuvieron a partir de tejido mamario de una mujer premenopáusica de 36 años, quien tenía enfermedad fibroquística y se sometió a una mastectomía. Originalmente denominadas MCF-10M, estas células generaron espontáneamente dos sublíneas inmortales: MCF-10A (adherentes) y MCF-10F (no adherentes). Estudios han demostrado que las células epiteliales mamarias pertenecientes a estas líneas presentan características ductales mamarias y expresan marcadores como EMA, KA-4, K-14, AE1-AE3 y K-19. Además, no son tumorigénicas en ratones desnudos (*nude*) y pueden crecer en cultivos tridimensionales con colágeno. Su crecimiento en cultivo está controlado por hormonas y factores de crecimiento [165].

Diferenciación de las células madres mesenquimales de médula ósea de donantes sanos en fibroblastos asociados al cáncer mediante el uso de medios condicionados de células tumorales mamarias de las líneas MCF-7 y MDA-MB231

Recolección de las muestras de aspirados de médula ósea

Las voluntarias sanas (**VS**) fueron donantes para trasplante alogénico de MO que concurrieron al Servicio de Hematología y Transplante de Médula Ósea de la Fundación Favaloro, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, y no tenían ningún compromiso medular, inmuno-hematológico, ni óseo, es decir sin enfermedades que puedan alterar el metabolismo óseo. Se adjunta copia del modelo de consentimiento informado en la sección ANEXOS de este trabajo de tesis. El responsable del suministro de aspirados de MO de cresta ilíaca posterior fue el Dr. Feldman Leonardo, Jefe de Servicio de Trasplante de Médula Ósea de la Fundación Favaloro en ese momento, actualmente Hematólogo Consultor Emérito. Los aspirados de MO de las VS fueron extraídos bajo anestesia local por punción de la cresta ilíaca posterior y recogidos con heparina sódica sin conservantes como anticoagulante (25 UI/ml, cat. 15077-019, Gibco).



Aislamiento y preparación de células madre/ estromales mesenquimales de médula ósea

El aspirado de MO se diluyó (1:2) con *buffer* PBS y se sometió a una centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque ($\delta = 1,075 \text{ gr/cm}^3$, Sigma) (**Figura 7**). Después de ser centrifugado por 25 min a 250 g a TA, se aisló la interfase rica en células mononucleares (**CMN**), las mismas se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en α -MEM-sup. El recuento de CMN se realizó con una solución de ácido de acético al 3% en agua. La viabilidad celular se determinó por prueba de exclusión con azul de tripán al 0,04% en PBS frío.

Para obtener cultivos primarios de MSCs, se incubaron 10×10^6 CMN/frasco de 25 cm^2 en 10 ml de α -MEM-Sup a 37°C , 5% de CO_2 y humedad, luego de 24 hrs se cambió el medio dejando sólo las células adherentes. El medio fue renovado cada 7 días hasta alcanzar el 80 % de confluencia (*1^{er} subcultivo*). Posteriormente, las células fueron lavadas 2 veces con PBS y tratadas con una solución de tripsina-EDTA, en PBS a 37°C , 5% de CO_2 y humedad durante 5 min, con el objetivo de despegar las células adherentes (tripsinización). Posteriormente, la suspensión celular se saturó con 10% de SBF y se lavó finalmente en PBS, dos veces, a 135 g por 10 min. Las células viables así obtenidas se fraccionaron en dos frascos de cultivo de 25 cm^2 y se incubaron en α -MEM-sup con la adición de 20% de SBF, en las mismas condiciones antes descriptas, renovando el medio cada 7 días hasta alcanzar el 80 % de confluencia (*2^{do} subcultivo*). Luego las células fueron lavadas dos veces con PBS, tripsinizadas, y la suspensión celular resultante, incubada en frascos de 25 cm^2 a baja densidad ($240 \text{ células viables/cm}^2$), cultivándose las mismas en α -MEM-sup con la adición de 20% de SBF durante 12 días, renovando el medio cada 6 días. La baja densidad celular de plaqueo favorece el enriquecimiento del cultivo en MSCs con alto poder de auto-renovación/ "*self-renewal*" y multipotencialidad (*3^{er} subcultivo*) como fue descripto por Prockop et al. [160, 161]. Al finalizar este periodo del *3^{er} subcultivo*, estas células fueron lavadas dos veces con PBS, tripsinizadas y se cuantificaron, utilizándose luego para los diferentes ensayos de caracterización y diferenciación a CAFs (**Figura 7**).

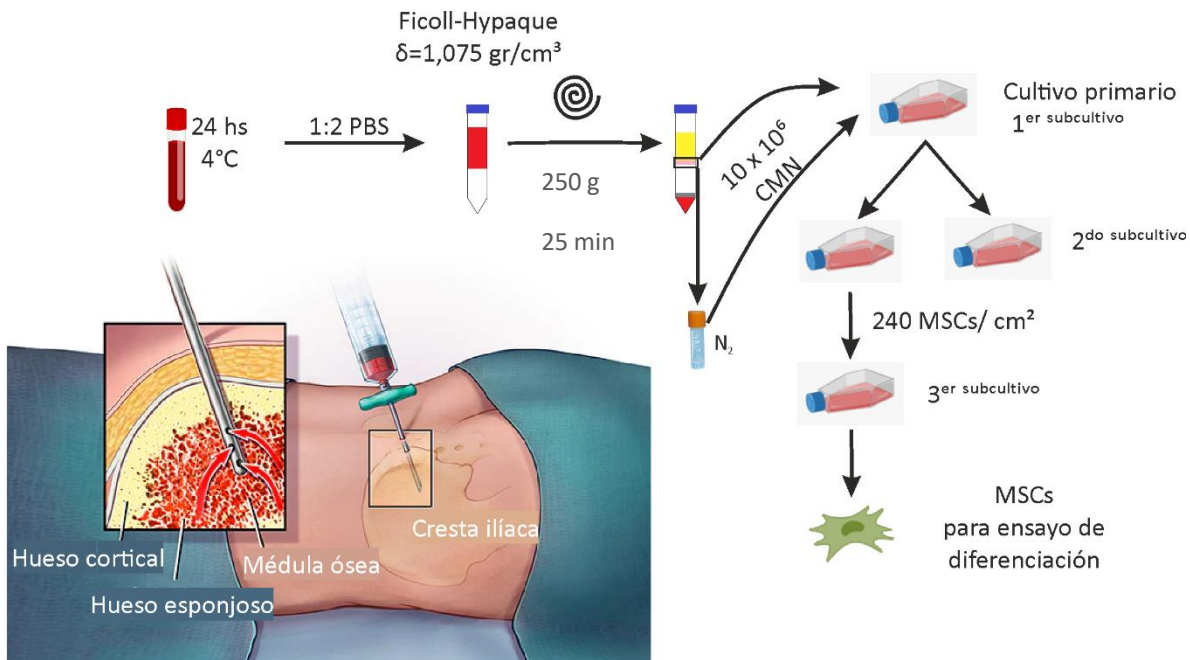


Figura 7. Esquema de aislamiento y cultivo de células madre/ estromales mesenquimales de aspirados de médula ósea de cresta ilíaca posterior. Células madre/ estromales mesenquimales (MSCs) y células mononucleares (CMN).

Caracterización de células madre/ mesenquimales estromales

Caracterización fenotípica

Se realizó un análisis de marcadores de superficie por citometría de flujo para confirmar que las MSCs del 3^{er} subcultivo cumplen con los criterios mínimos establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular [166]. Se realizaron marcaciones múltiples con Acs monoclonales conjugados con distintos fluorocromos contra los siguientes antígenos humanos: CD105, CD90, CD73, CD79a, CD11b, CD34 y los respectivos controles de isotipo (*ver **tabla 5***). En cada tubo se resuspendieron $2,5 \times 10^5$ MSCs en PBS con 1% de BSA, en presencia de los Acs y se procedió a incubar durante 30 min a TA. Se agregó a cada tubo 1 µg/ml de 4',6-diamidino-2-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI, cat. D9542, Sigma) o 1 µg/ml ioduro de propidio (cat. 81845, Sigma), según la combinación de fluoróforos, para



poder excluir del análisis las células muertas. Se analizaron un total de 10.000 eventos por tubo en el equipo FACScanto II (Becton Dickinson, Biosciences). Las diluciones de uso de cada Ac y controles de isotipo se resumen en la **Tabla 5**. Para el análisis de los datos se usó el software FlowJo (v. X). Los experimentos se hicieron por duplicado para cada muestra.

Ensayos de plasticidad

Diferenciación osteogénica

Las MSCs provenientes del 3^{er} subcultivo fueron sembradas, a una densidad de 3.000 células/cm² en placas de 24 pocillos (cat. 4430300, Orange Scientific) y cultivadas en α -MEM-sup y adicionado con 10% SBF y adicionado con factores osteogénicos [100 nM dexametasona (Sigma); 50 μ M α -ascorbato-2-fosfato (Sigma) y 10 mM β -glicerolfosfato (Sigma)] durante un total de 21 días, renovando el medio antes mencionado cada 3 días, a 37°C, 5% de CO₂ y humedad [161, 167]. Transcurrido este período, el cultivo fue lavado con PBS y fijado con una solución de paraformaldehído 4% en PBS durante 15 min a TA. Las muestras fijadas fueron teñidas con Alizarin Red 40 mM (pH=4,1; Sigma), quelante de calcio en la matriz de mineralización ósea. Como control se cultivaron las MSCs en α -MEM-sup y adicionado con 10% de SBF como describimos antes, pero sin agentes estimulantes de la diferenciación, por el mismo período de tiempo. Los cultivos se llevaron adelante por duplicado.

Diferenciación adipogénica

Las MSCs provenientes del 3^{er} subcultivo fueron incubadas a una densidad de 3.000 células/cm² en placas de 24 pocillos y cultivadas en α -MEM-sup con 10% SBF hasta alcanzar la confluencia. Se lavó con PBS y realizó la estimulación adipogénica con medio de inducción, 1 μ M dexametasona, 0,5 mM isobutilmetilxantina, 10 μ g/ml insulina y 100 μ M indometacina por 3 días y luego 24 hs en medio de mantenimiento (10 % SBF y 10 μ g/ml insulina), según describe Prockop et al. [161, 168]. Este ciclo de cultivo se repitió 5 veces, durante un total de 21 días, a 37°C, 5% de CO₂ y humedad. Transcurrido este periodo, el



cultivo fue lavado 2 veces con PBS y fijado con una solución de paraformaldehído 4% en PBS durante 15 min a TA. Finalmente, teñido con una solución fresca de Oil Red-O al 0,12% (Sigma). Se identificaron los adipocitos por la tinción con Oil Red-O, marcador de lípidos presentes en las vacuolas. Como control se cultivaron las MSCs con α -MEM-sup con 10% SBF. Los cultivos se llevaron adelante por duplicado durante 21 días.

Diferenciación condrogénica

Se partió de 250.000 MSCs del 3^{er} subcultivo, las cuales fueron incubadas en tubos de polipropileno de 15 ml y se sedimentaron en micro-masa por centrifugación a 250g durante 10 min. El cultivo en micro-masa se llevó a cabo durante 21 días en α -MEM-sup con 10% SBF y adicionado con factores condrogénicos (CAMBREX, cat. PT 3003: 500 ng/ml BMP-6, 25 mM glucosa, 10 ng/ml de TGF- β -3, 10^{-7} M dexametasona, 50 μ g/ml ascorbato-2-fosfato, 40 μ g/ml prolina, 100 μ g/ml piruvato y 50 mg/ml ITS+ Premix). El medio fue cambiado cada 3 días por un total de 21 días, a 37°C, 5% de CO₂ y humedad. Para el análisis microscópico, el cultivo en micro- masa fue embebido en parafina, y se lo cortó en 5 partes para ser teñido por inmunohistoquímica, mediante sistema Biotina-Estreptavidina-Peroxidasa/cromógeno DAB usando un Ac anti-colágeno tipo II humano (cat. SC18319, Santa Cruz). El colágeno II es una proteína de la matriz condrogénica. Las diluciones de uso del Ac primario y el control de isotipo se resumen en la **Tabla 5**. Como control de no diferenciación se cultivaron las MSCs en α -MEM-sup con 10% SBF. Los cultivos se llevaron adelante por duplicado.

Ensayo de unidad formadoras de colonias fibroblásticas a partir de células madre/estromales mesenquimales

El ensayo de unidad formadoras de colonias fibroblásticas (CFU-F) se llevó a cabo conforme al protocolo previamente desarrollado en nuestro laboratorio con adaptaciones [161]. Se sembraron MSCs provenientes del 3^{er} subcultivo a una densidad de 50 células/cm²



en frascos de 25 cm² que contenían 10 ml de α -MEM-sup y adicionado de 20% de SBF y se cultivó a 37 °C, 5% CO₂ y humedad durante 7 días, al cabo de este período, se renovó el medio y se cultivó por otros 7 días. Al finalizar este tiempo, las células fueron lavadas 2 veces con PBS, secadas a TA, fijadas con metanol (cat. 2000165508, Biopack) 100% durante 15 min y teñidas con Giemsa (cat. 48900, Sigma) puro durante 5 min a TA, luego se lavaron con agua y se dejaron secar. Las colonias se leyeron y fotografiaron con un microscopio invertido (cat. CKX41, Olympus) equipado con una cámara Olympus Q-Color 5. Las agrupaciones de más de 50 células fueron consideradas como una CFU-F. La frecuencia de CFU-F se expresa como eficiencia de formación de colonias definida como el número de CFU-F obtenido cada 1.250 células sembradas.

Cultivo de células tumorales mamarias de las líneas MCF-7, MDA-MB231 y MCF-10A y obtención de los medios condicionados correspondientes

Se sembraron células tumorales mamarias viables a una densidad de $1,8 \times 10^4$ células/cm² en sus respectivos medios de cultivo suplementados y adicionado con 10% de SBF, permitiendo su adherencia durante 24 hrs a 37°C, 5% de CO₂ y humedad. Posteriormente, se lavaron los cultivos con PBS 1X y se mantuvieron en condiciones de arresto durante 48 hrs en ausencia de SBF. Luego, se volvieron a lavar con PBS 1X y se estimularon con un 10% de SBF en sus respectivos medios de cultivo suplementados durante 48 hrs más, alcanzando un nivel de confluencia del 80%. Al finalizar este periodo, se recolectaron los MCo, se centrifugaron, alicuotaron y almacenaron a -20°C para su posterior uso. Simultáneamente, se incubaron los respectivos medios de cultivo suplementados y adicionados con 10% de SBF de cada línea durante 48 horas (sin células), manteniendo las mismas condiciones de incubación que los cultivos celulares respectivos, para su uso como controles en el ensayo de diferenciación de las MSCs a CAFs.



Ensayo de diferenciación de la célula madre mesenquimal de médula ósea a fibroblasto asociado al cáncer

Se diseñó siguiendo el protocolo de Mishra PJ y colaboradores [169]. Se cultivaron las MSCs aisladas de MO de 2 VS a una densidad de 3×10^3 células viables del 3^{er} subcultivo, realizado a baja densidad/cm² en α -MEM-sup y adicionado con un 20% de SBF en placas Lab-Teks (cat. 155411, ThermoScientific), renovando el medio cada 7 días hasta alcanzar un nivel de confluencia del 80%. Posteriormente, las MSCs se cultivaron durante 21 días, renovando el medio cada tres días. Se utilizaron las siguientes condiciones de cultivo: i) 50% del MCo obtenido de los cultivos de las líneas MCF-7, MDA-MB231 y MCF-10A (control con células mamarias no tumorales) + 50% de medio α suplementado y adicionado con 20% de SBF; ii) controles de no diferenciación: 100% de medio α suplementado y adicionado con un 10% de SBF y iii) control de diferenciación positiva: medio α suplementado y adicionado con un 10% de SBF + 10^{-7} M de hidrocortisona (cat. H0888, Sigma). Además, se realizaron controles con: 50% de los respectivos medios de cultivo suplementados y adicionados con 10% de SBF de cada línea celular mamaria incubados durante 48 horas (sin células) + 50% de medio α -sup y adicionado con 20% de SBF.

Estudio de la expresión de α -SMA, FAP, CD105 y CD146 en las células madre mesenquimales de médula ósea como tales y una vez diferenciadas en fibroblastos asociados al cáncer por efecto de los medios condicionados de los cultivos de las células epiteliales tumorales mamarias de las líneas MCF-7 y MDA-MB231

El estudio de la expresión de estos marcadores se realizó por la metodología de inmunocitoquímica, siguiendo el protocolo descrito por Martinez LM y colaboradores [170]. Las células en estudio se lavaron 2 veces con PBS, secaron a TA y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 min a TA. Se dejaron secar y posteriormente se hidrataron 5 min con PBS-Tween 20 al 0,1%. Luego se realizó un bloqueo de la actividad de peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% durante 5 min a TA. Se lavó 3 veces con PBS-Tween 20 y se procedió a un bloqueo proteico con PBS-Tween20-BSA (al 0,1 y 1%,



respectivamente) durante 1 hora. A continuación, se incubó con los Acs primarios correspondientes (α -SMA, FAP, CD105 y CD146; ver **Tabla 6**) durante toda una noche a 4°C. Se ensayaron los correspondientes controles de isotipo (**Tabla 6**). Los Acs se diluyeron e incubaron con la misma solución que la del bloqueo. Luego se procedió a los lavados y se reveló utilizando el sistema de Ac universales biotinilados anti- ratón y cabra/estreptoavidina-peroxidasa (LSAB+/HRP, K0690, Dako) y 3-3'-diaminobencidina (DAB) como cromógeno (Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, K3468, Dako) según recomendaciones del fabricante. Los núcleos se tiñeron con hematoxilina durante 2 min. Se lavaron con agua por última vez, se dejaron secar y se montaron con una solución de base acuosa (UltraMount, S1964, Dako). La lectura del porcentaje de células positivas se realizó en microscopio óptico y se contabilizó como cantidad de células con granulaciones marrones/200 células totales. El patrón de expresión/célula se estableció cualitativamente: negativo (nula) y positivo: leve (+), moderado (++), abundante (+++) respecto a CD146 (control positivo) cuyo patrón de expresión es abundante (+++) en las MSCs de MO normal.

Anticuerpos anti-	Tipo de Ig	Aplicación y concentración usada	Fabricante y catálogo
α-SMA	IgG, ratón	ICQ (1,25 ug/ml)	R&D Systems (MAB1420)
FAP	IgG, ratón	ICQ (2 ug/ml)	R&D Systems (FAB3715)
CD105	IgG, cabra	ICQ (5 ug/ml)	R&D Systems (AF1097)
CD146	IgG, cabra	ICQ (5 ug/ml)	R&D Systems (AF932)
Control de IgG de ratón	IgG, ratón	Control negativo para ICQ (concentración equivalente al primer Ac)	Dako, X0943
Control de IgG de cabra	IgG, cabra	Control negativo para ICQ (concentración equivalente al primer Ac)	R&D Systems, AB-108-C

Tabla 6. Detalle de los anticuerpos y controles usados en la diferenciación de la célula madre mesenquimal/estromal de médula ósea en fibroblasto asociado al cáncer. Ac: anticuerpo, ICQ= inmunocitoquímica, Ig= inmunoglobulina/s.



Estudio de la capacidad de clonado/auto-renovación de los fibroblastos de las subpoblaciones CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) para formación de unidades formadoras de colonias fibroblásticas y de la morfología de células estromales dentro de colonias

El ensayo de CFU-F se llevó a cabo conforme al protocolo previamente desarrollado en nuestro laboratorio con adaptaciones [171]. Un total de 2.500 células (*5^{to} subcultivo*) de las fracciones de subpoblaciones CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) fueron cultivadas por frasco de 25 cm² (100 células viables/cm²) en α -MEM-sup con 20% de SBF durante 7 días. Los fibroblastos adherentes fueron luego lavados con PBS e incubados nuevamente con medio fresco durante 7 días adicionales. Después de 14 días, los frascos fueron lavados con PBS, secados al aire y fijados con metanol al 100% durante 15 min a TA. Posteriormente, las CFU-F fueron teñidas con Giemsa puro (cat. 48900, Sigma) durante 5 min a TA, luego lavados con agua y secados al aire. Las colonias con al menos 50 células fueron contadas como CFU-F bajo un microscopio de luz invertida a 40X de magnificación total. La frecuencia de CFU-F está indicada por la eficiencia de formación de colonias, definida como el número de CFU-F obtenidos por cada 2.500 fibroblastos sembrados. Para la evaluación de la eficiencia, los ensayos de CFU-F se realizaron por duplicado para las 2 subpoblaciones de fibroblastos obtenidas de muestras de 10 PCM. Además, se determinó la densidad de células estromales por campo óptico de CFU-F. Para lograr esto, se capturaron diez imágenes de diferentes campos ópticos de cada cultivo de CFU-F. Además, se realizó una evaluación de cambios morfológicos en células estromales dentro de los cultivos de CFU-F. El análisis incluyó la medición del área, eje longitudinal y eje horizontal de la elipse utilizando tres imágenes obtenidas de tres regiones típicas (tres campos ópticos, imágenes a una magnificación de 200X) de cada cultivo de CFU-F, con 10 células por imagen. Estas mediciones fueron analizadas utilizando el software FIJI [172].



Evaluación de la viabilidad celular como una medida indirecta de la capacidad de proliferación

Un total de 1×10^4 células (5^{to} *subcultivo*) por pocillo de las fracciones de las subpoblaciones CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) fueron cultivadas en una placa de 96 pocillos (cat. JBF-CAP011096, Jetbiofil) durante 24 hr en medio α -MEM-sup sin rojo fenol (cat. 41061029, Gibco) y en presencia de un 20% de SBF. Después de este período de adherencia al plástico, las células fueron lavadas con PBS, y se indujo el arresto celular mediante un cultivo adicional de 48 hr en medio α -MEM-sup sin rojo fenol y sin SBF. Posteriormente, se realizó otro lavado con PBS y se llevó a cabo la etapa de estimulación, donde las células fueron cultivadas durante 48 hrs en medio α -MEM-sup sin rojo fenol con un 5% de SBF. Simultáneamente, se realizaron controles basales con medio α -MEM-sup sin rojo fenol y sin SBF. La proliferación celular fue evaluada utilizando el kit CellTiter 96® AQueous One Solution (cat. G5421, Promega). Este ensayo se basa en un método colorimétrico que determina el número de células viables que han proliferado mediante la reducción del compuesto tetrazolio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonfenil)-2H-tetrazolio, sal interna; **MTS**] a un producto coloreado llamado formazán. Esta conversión ocurre debido a la actividad de las enzimas deshidrogenasas en células metabólicamente activas, utilizando NADPH o NADH. Para los ensayos, el reactivo CellTiter 96® AQueous One Solution se añadió directamente a los pocillos de cultivo, se incubó durante 1-4 hr a 37°C, 5% de CO₂ y humedad controlada, y luego se registró la absorbancia a 490 nm utilizando un lector de placas de 96 pocillos. La cantidad de producto formazán generado es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo. El valor de densidad óptica (**DO**) de cada muestra en estudio se obtuvo restando la DO del control (medio α -MEM-sup sin rojo fenol y SBF) de su respectivo valor de muestra. Todos los experimentos se realizaron por triplicado para cada subpoblación de fibroblastos en estudio de las 10 muestras de las PCM.



Estudio del ciclo celular

Las células (5^{to} subcultivo) fueron re-suspendidas a una concentración de 2×10^6 células/ml de las fracciones de las subpoblaciones CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) en PBS y fijadas en metanol frío. Las células fijadas fueron centrifugadas a 250 g durante 10 min. Posteriormente, fueron incubadas con 200 mg de RNasa A en PBS (cat. GE101-01, Beijing TransGen Biotech Co) durante 20 min a 37 °C. Posteriormente, las células fueron centrifugadas nuevamente a 250 g durante 10 min e incubadas con 20 mg de yoduro de propidio (cat. 81845, Sigma) en PBS a TA en la oscuridad durante 30 min, invirtiendo el tubo cada 10 min. Finalmente, se realizó una centrifugación a 250 g durante 10 min y las células fueron resuspendidas en PBS. Las muestras fueron analizadas utilizando un FACScanto II (Becton Dickinson). El análisis del ciclo celular fue determinado utilizando FlowJo (v. X). Los experimentos fueron repetidos dos veces para cada subpoblación de fibroblastos en estudio de las 10 muestras de las PCM.

Estudio de expresión génica

Extracción de ácido ribonucleico y síntesis de ácido desoxirribonucleico copia

El ácido ribonucleico (RNA) total de las subpoblaciones CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) del 5^{to} subcultivo se aisló utilizando TRI Reagent® (TR 118 Molecular Research Center Inc) y se cuantificó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c (cat. ND-2000, ThermoScientific). A partir de 1 µg de RNA por muestra, se obtuvo ácido desoxirribonucleico copia (cDNA) utilizando el Kit de Transcripción Inversa de Alta Capacidad (cat. 4368814, Applied Biosystems) con primers aleatorios, siguiendo las recomendaciones del fabricante.



PCR cuantitativa en tiempo real

Las muestras se analizaron utilizando el kit maestro Fs Universal Sybr Green Master Rox (cat. 04913850001, Roche) en un sistema de PCR en Tiempo Real CFX96TM TOUCH (Bio-Rad, Hercules) bajo condiciones de amplificación estándar, seguido de un análisis de curva de fusión. Al finalizar cada corrida se analizó la presencia de un único producto de amplificación mediante análisis de curva de *melting* en condiciones estándar. El valor de umbral de Ct fue normalizado utilizando el gen de referencia (**GAPDH**, Gliceraldehído 3-fosfato). Los datos son presentados como veces más de expresión (*fold change*) entre las dos subpoblaciones de fibroblastos. Las secuencias de primers se muestran en la **Tabla 7**. Se estudió la expresión de genes de *stemness* (auto-renovación y multipotencialidad, particularmente diferenciación osteoblástica), así como genes relacionados con la regulación de la osteoclastogénesis, capacidad de migración y evolución tumoral (OCT4, SOX2, MCAM (CD146), VCAM, BMP-6, RUNX2, CCL-2, RANKL, IL-6, TNC). Los experimentos se realizaron por duplicado para cada muestra.

Gen	Secuencia <i>Forward</i> (5'→3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5'→3')
GADPH	CCACATCGCTCAGACACCAT	CATGGGTGGAATCATATTGGA
SOX2	AGCTACAGCATGATGCAGGA	GGTCATGGAGTTGTACTGCA
OCT-4	AGCGAACCAGTATCGAGAAC	TTACAGAACCACACTCGGAC
MCAM (CD146)	TGAGGAGGTCGCTACCTGTGT	GACTCCACAGTCTGGGACGA
VCAM1 (CD106)	GGGAAGATGGTCGTGATCCTT	TCTGGGGTGGTCTCGATTTTA
BMP2	TCCATGTGGACGCTCTTTCA	GGTCGACCTTTAGGAGACCG
BMP6	TTGTGAACCTGGTGGAGTACG	TCACCCTCAGGAATCTGGGAT
BMP7	GCTTCGTCAACCTCGTGGA	AACCGGAACCTCTCGATGGTG
FGF10	GTGCGGAGCTACAATCACCT	GCTGACCTTCCCGTTCTTCT
RUNX2	CACAAGTGCGGTGCAAACCTT	GGTAGTGACCTGCGGAGATT



CCL-2	GAAAGTCTCTGCCGCCCTT	GGCATTGATTGCATCTGGCTG
IL-6	TTCCAAAGATGTAGCCGCCC	CTGAGATGCCGTCGAGGATG
TNFSF11 (RANKL)	AAACAGGCCTTTCAAGGAGC	ACCATCGCTTTCTCTGCTCT
TNC	TCTTGAAGGCAGGCGCAAAC	CCAAATGCCCAGGTGTGGACCGAT

Tabla 7. Detalles de las secuencias de primers de ácido desoxirribonucleico utilizadas en el estudio.
 GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, SOX2: factor de transcripción SRY caja-2, OCT4: factor de transcripción 4 de unión a octámeros, MCAM (CD146): molécula de adhesión celular de melanoma, VCAM1 (CD106): molécula de adhesión celular vascular 1, BMP2: proteína morfogenética ósea 2, BMP6: proteína morfogenética ósea 6, BMP7: proteína morfogenética ósea 7, FGF10: factor de crecimiento de fibroblastos 10, RUNX-2: factor de transcripción 2 relacionado con runt, CCL-2: ligando quimioatrayente de monocitos 1, IL-6: interleuquina 6, TNFSF11 (RANKL): miembro 11 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral y TNC: tenascina C.

Estudio de estrés oxidativo [especies oxigenadas reactivas mitocondriales (anión superóxido) y especies oxigenadas reactivas totales]

Una suspensión celular con un total de 2×10^5 células (5^{to} subcultivo) de las subpoblaciones CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) fueron centrifugadas a 250 g durante 10 min a TA. Posteriormente, fueron resuspendidas en 200 μ l de PBS 1 y centrifugadas nuevamente a 250 g durante 10 min. Los niveles de ROS total y mitocondrial fueron detectados utilizando los colorantes fluorescentes *CellROX Oxidative Stress Reagents* (cat. C10444, Thermo Fisher) y *MitoSOXTM Red* (cat. M36008, Molecular Probes, InvitrogenTM), respectivamente. Las dos fracciones celulares fueron incubadas con 250 μ l de *CellROX* o 500 μ l de *MitoSOXTM* durante 30 min a 37°C en la oscuridad. Posteriormente, fueron centrifugadas a 250 g durante 10 min y re-suspendidas en 400 μ l de PBS. Las células fueron incubadas durante 5 min con 5 μ g/ml de DAPI a TA en la oscuridad. Finalmente, fueron centrifugadas a 250 g durante 10 min y re-suspendidas en 400 μ l de PBS. La intensidad fluorescente fue analizada por citometría de flujo (FACScanto II; Becton Dickinson), seleccionando la intensidad media de fluorescencia en células viables (negativas para DAPI) en el canal de fluorescencia correspondiente (FITC para *CellROX* y PE para *MitoSOXTM*). Por lo tanto, la intensidad fluorescente de la sonda *MitoSOX* (excitación λ : 510 nm; emisión λ : 580 nm) fue evaluada en el canal rojo, la de la sonda *CellROX* (excitación λ : 508 nm; emisión



λ : 527 nm) en el canal verde, solo en células viables, seleccionadas como células negativas para DAPI (excitación λ : 340 nm; emisión λ : 461 nm), en el canal azul. Los resultados fueron analizados utilizando el software FlowJo (v. X, Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA). Los experimentos se repitieron dos veces para cada muestra.

Estudio de senescencia celular (β -galactosidasa)

Una incubación de 1×10^4 células (5^{to} subcultivo) por pocillo, derivadas de las subpoblaciones CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-), se realizó en placas de 24 pocillos (4430300, Orange Scientific). Después de 24 hr, los cultivos fueron lavados con PBS y posteriormente incubados durante 72 hr en medio α -MEM-sup con la adición de un 20% de SBF. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con una solución que contenía 37% vol/vol de formaldehído (cat. 47608, Sigma), 25% vol/vol de glutaraldehído (cat. G7651, Sigma) y PBS durante 5 min a TA. Se realizaron lavados adicionales con PBS, y las células fueron incubadas durante 16 hr a 37°C sin CO₂ con una solución fresca de tinción SA- β -gal [1 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranosido (X-Gal; cat. 11680293001, Sigma) (150 mM de NaCl, 2 mM de MgCl₂, 40 mM de buffer ácido cítrico/fosfato de sodio (pH 6), 5 mM de ferrocianuro de potasio y 5 mM de ferricianuro de potasio, cat. 11680293001, Sigma)]. Las células teñidas fueron visualizadas y fotografiadas utilizando un microscopio invertido Olympus CKX41 (Olympus, Shinjuku-ku, Tokio, Japón) con un objetivo de 20X/0,4 y una cámara Olympus Q-Color 5. Los experimentos se repitieron dos veces para cada muestra.

Estudio del secretoma

Se utilizó un pool de 10 muestras de MCo recogidas a las 48 hr del 5^{to} subcultivo de ambas subpoblaciones fibroblásticas, en ausencia de SBF. Estos MCo fueron liofilizados para



concentrar los factores secretados por ambas fracciones celulares, siguiendo las instrucciones del fabricante (cat. Modulyod 115, Thermo, Thermo Fisher). Los liofilizados fueron resuspendidos en 4 ml de H₂O estéril (cat. 956-A, Rivero). La concentración proteica fue determinada por el método Bradford [173] utilizando BSA (cat. sc-2323, Santa Cruz) como estándar. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% de poro, en condiciones reductoras, con una carga de 30 µg de proteínas por calle. La corrida se realizó durante 60 min a un voltaje constante de 100 V hasta que el frente de corrida se posicionó a 1 cm por debajo del gel de *stacking*. Inmediatamente después de la corrida, los geles fueron incubados con un *buffer* fijador compuesto por 50% v/v de metanol y 2% v/v de ácido fosfórico (cat. 93752, Sigma) en H₂O_d, agitando durante 5 hr a TA. Posteriormente, se realizaron tres lavados con H₂O_d y los geles fueron incubados con un *buffer* de equilibrado compuesto por 33% v/v de metanol, 17% p/v de sulfato de amonio (cat. AX1385, Sigma) y 3% v/v de ácido fosfórico en H₂O_d, agitando durante 1 hr a TA. Finalmente, se añadió Coomassie Colloidal (cat. 1610803, BioRad) al mismo *buffer* de equilibrado a una concentración final de 0,066%, y los geles fueron incubados durante la noche con agitación a TA.

Para desteñir los geles, se realizaron tres lavados con H₂O_d y se cortaron las bandas de poliacrilamida (cada una conteniendo una banda de proteína correspondiente al secretoma de cada subpoblación de fibroblastos) usando un bisturí estéril. El estudio se realizó por triplicado. El análisis proteómico se llevó a cabo por el Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa (CEQUIBIEM) - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - UBA, a través del método proteómico LFQ (cuantificación de proteínas sin etiquetas). Los patrones se obtuvieron del análisis en un espectrómetro de masas *HESI-Orbitrap Q Extractive* (Thermo Fisher). Los espectros brutos obtenidos fueron analizados utilizando el *software Proteome Discoverer* (Thermo Scientific, v. 2.2) para la identificación de proteínas. Basándose en los datos brutos de espectrometría de masas, el servicio de espectrometría de masas proporcionó un informe por grupo indicando las proteínas identificadas para ese grupo y los péptidos utilizados para dicha identificación, utilizando la base de datos Uniprot. Se buscaron diferencias estadísticamente significativas en las



abundancias relativas entre los dos grupos analizados [fibroblastos CD105(+)/CD34(-) vs fibroblastos CD105(-)/CD34(-)] utilizando el *software Perseus* (v2.0.11, disponible en <https://maxquant.net/perseus/>). Las proteínas expresadas se organizaron en redes basadas en sus asociaciones utilizando el *software String* en línea (disponible en <https://string-db.org/>).

Efecto del pool de medio condicionado de las subpoblaciones de fibroblastos CD105(+) / CD34 (-) y CD105(-)/CD34(-) en células tumorales de mama humana de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB231

Migración de células tumorales de mama

Para evaluar la capacidad de migración celular, se empleó el ensayo de cicatrización de heridas, donde el cierre de la herida sirvió como indicador de motilidad celular según describieron Yang et al. [174]. Brevemente, las células tumorales se sembraron a una densidad de 6×10^4 células/pocillo y se cultivaron en medio DMEM/F12-sup y con rojo fenol, anteriormente descrito, en placas de 12 pocillos (cat. JBF-TCP011012, Jetbiofil) a 37 °C, 5 % de CO₂ y humedad hasta alcanzar la confluencia. Luego los cultivos se lavaron con PBS y se sometieron a un período arresto sin SBF durante 24 hrs. Esta técnica implicó crear múltiples “heridas” en monocapas celulares completamente confluentes de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB231. Después de crear la herida, el medio se reemplazó completamente para eliminar cualquier residuo celular. Para el ensayo, se utilizó un pool de 10 muestras de MCo recogidas a las 48 hr del cultivo de ambas subpoblaciones de fibroblastos del 5^{to} subcultivo sin SBF. Posteriormente, los cultivos fueron expuestas a los diferentes MCo de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-), así como a α -MEM-sup con 10% de SBF (control positivo) y α -MEM-sup solo (control basal, incubado durante 48 hr a 37°C, 5% CO₂ y humidificación). La cuantificación de la migración celular se realizó midiendo la variación en el ancho de la herida entre el tiempo 0 (T0) y 12 horas (T12). Las áreas de las imágenes se calcularon utilizando el *software ImageJ*, determinando el



porcentaje de área ocupada en relación con la herida original (T0). Cada ensayo se realizó por duplicado utilizando MCo puro, y el experimento se repitió 7 veces.

Viabilidad de las células tumorales de mama como una medida indirecta de la capacidad de proliferación

El mismo protocolo utilizado para los fibroblastos se aplicó a las células tumorales de mama. Se cultivaron 5×10^3 células tumorales de mama de las líneas celulares MCF-7 o MDA-MB231 en placas de 96 pocillos bajo condiciones adherentes durante 24 hr y condiciones de arresto durante 48 hr a 37°C, 5% CO₂ y humidificación. El medio de cultivo consistió en DMEM/F12-sup sin rojo fenol, con un 10% de SBF para las condiciones adherentes y sin SBF para las condiciones de arresto. Después de este período de incubación, las células fueron incubadas durante 48 hr adicionales con los siguientes tratamientos: i) 100% de MCo obtenido de los fibroblastos CD105(+)/CD34(-), ii) 100% de MCo obtenido fibroblastos CD105(-)/CD34(-), iii) α -MEM suplementado con 10% de SBF (control positivo) y iv) α -MEM suplementado solo (control basal, incubado durante 48 hr a 37°C, 5% CO₂ y humidificación). Los pasos subsiguientes se llevaron a cabo como se describió anteriormente. Finalmente, se obtuvo el valor de DO de cada muestra restando el valor de DO del control basal de su valor de muestra respectivo. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y el ensayo se repitió cuatro veces.

Expresión génica en células tumorales de mama

Se realizó el mismo procedimiento para la extracción de RNA y la posterior transcripción inversa a cDNA en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB231, seguido de PCR Cuantitativa en Tiempo Real. Antes de la extracción de RNA, las líneas celulares fueron tratadas durante 48 hr con el pool de MCo correspondiente a los fibroblastos CD105(+)/CD34(-), fibroblastos CD105(-)/CD34(-) y α -MEM suplementado solo (como control basal, incubado durante 48



hr a 37°C, 5% CO₂ y humidificación). Se estudió la expresión de genes de plasticidad, centrándose en auto-renovación y multipotencialidad, particularmente diferenciación osteoblástica [incluidos OCT-4, SOX2, BMP2, BMP-6, FGF10, RUNX-2 y TNFSF11 (RANKL); ver **Tabla 7**]. Los experimentos se realizaron por duplicado para cada muestra y el ensayo se repitió 7 veces.

Análisis Estadístico

El análisis se realizó consistentemente entre las dos subpoblaciones fibroblásticas: los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) y los fibroblastos CD105(-)/CD34(-). Los resultados se expresaron como la media $\pm$ error estándar (**ES**) cuando fue apropiado. La prueba de Shapiro-Wilk para la normalidad se utilizó para determinar si los datos estaban distribuidos normalmente y luego se analizaron con la prueba correspondiente. Para datos paramétricos, las diferencias entre grupos se evaluaron utilizando el test “t” de Student no apareado, con corrección de Welch cuando fue necesario. Se realizó un ANOVA de dos vías para comparaciones múltiples, seguido de comparaciones múltiples *post hoc* utilizando el método de Bonferroni.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 6 (versión 6.01, GraphPad Software, La Jolla CA, USA). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,0500$.



RESULTADOS

PARTE A

Análisis de la expresión de la firma génica correspondiente a células fibroblásticas (FSP y FAP positivas) con características stemness (CD90, CD73 y CD105 positivas) en el tejido mamario tumoral y normal

Para validar los resultados previos de nuestro laboratorio, se llevó a cabo un estudio de expresión génica de posibles CAFs en el microambiente tumoral mamario utilizando bases de datos obtenidas de chips de genes. Al realizar un análisis génico múltiple [FAP, THY1 (CD90), NT3E (CD73), S100A4 (FSP) y ENG (CD105)], encontramos que tanto el tejido mamario normal como el tumoral expresaban estos genes, lo que sugiere la presencia potencial de células que expresan CD90, CD73, CD105, FAP y FSP en ambos tipos de tejido. Aunque no podemos afirmarlo con certeza, esta similitud en el perfil de expresión se asemeja al fenotipo de las MSCs o CAFs derivadas de ellas. Sin embargo, como se muestra en la **Figura 8**, observamos una diferencia significativa en la expresión de estos genes entre el tejido no neoplásico y el tumoral mamario ($p=4,58^{-20}$). Se encontró que el tejido tumoral exhibe una expresión media más elevada en comparación con el tejido no neoplásico, con un porcentaje de incremento (*fold change*) de 1,52. En otras palabras, la expresión génica de los genes analizados es, en promedio, 1,52 veces mayor en el tejido tumoral mamario que en el tejido normal, lo que indica un aumento en la expresión génica asociado con la transformación tumoral (**Figura 8**).

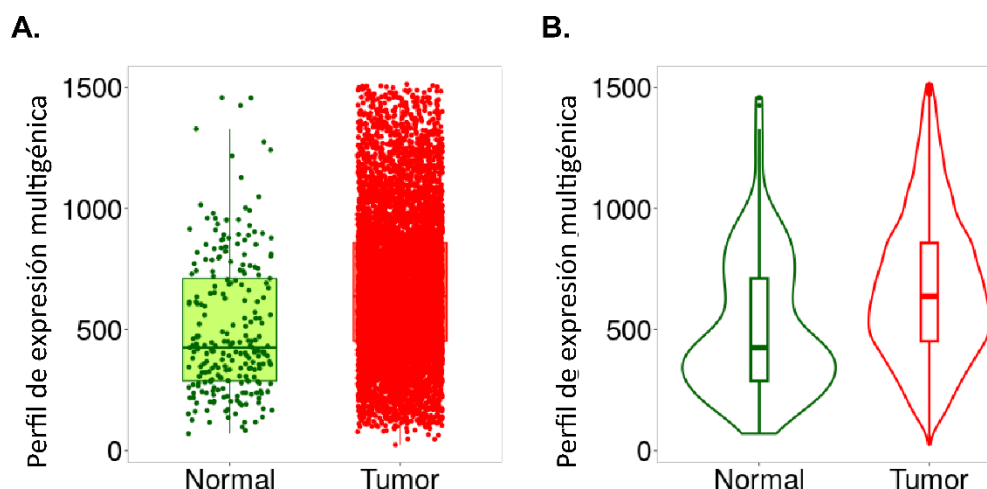


Figura 8. Boxplots (A) y violin plots (B) de las expresiones génicas de *ENG*, *THY1*, *NT5E*, *FAP* y *S100A4* en tejido normal (en verde) y en tumores mamarios (en rojo). La expresión génica se evaluó utilizando datos de arrays génicos obtenidos de la plataforma bioinformática TNMplot. *ENG*: gen que codifica para la proteína endoglin (CD105), *THY1*: gen que codifica para antígeno de diferenciación tímica 1 (CD90), *NT5E*: gen que codifica para ecto-5''-nucleotidasa (CD73), *FAP*: gen que codifica para proteína activadora de fibroblastos (FAP), *S100A4*: gen que codifica la proteína FSP1 (Proteína específica de fibroblasto-1).

Estudio de la expresión de CD105 en las células estromales fusiformes, no asociadas a vasculatura

Posteriormente, se realizó un análisis inmunohistoquímico de doble marcación CD105-CD34 para asegurar que las lecturas se obtuvieran específicamente de células estromales fusiformes no asociadas con la vasculatura (negativas para CD34) (CAFs). Este enfoque permitió descartar la posibilidad de falsos positivos al identificar erróneamente progenitores endoteliales. El análisis demostró que las células estromales fusiformes, no asociadas con la vasculatura, eran positivas para CD105 y no mostraban tinción de CD34 (Figura 9).

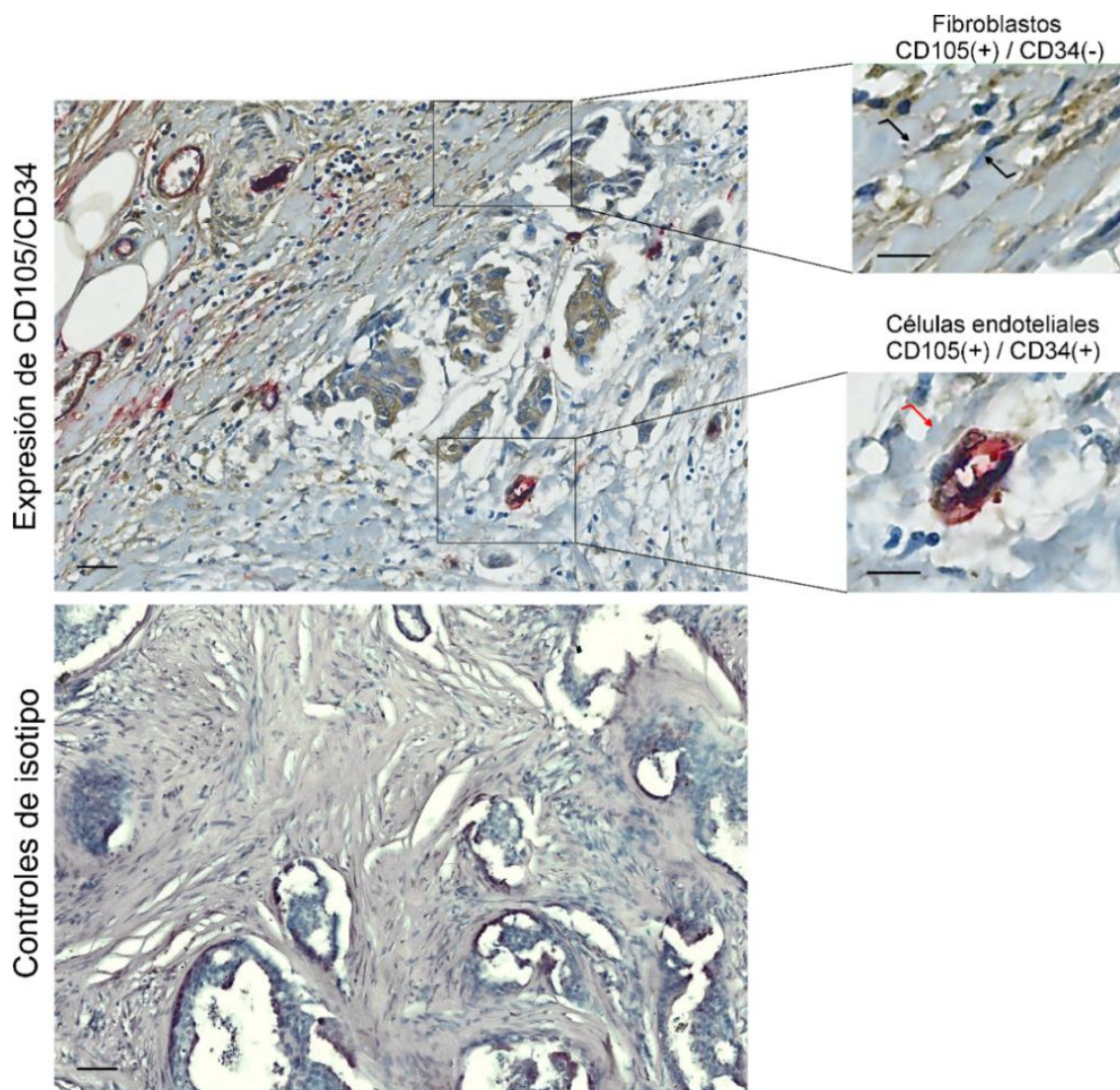


Figura 9. Expresión de CD105 y CD34 en células estromales del tumor primario de pacientes con cáncer de mama. Panel superior: Doble inmunohistoquímica para CD105 y CD34 (detectados por cromógeno marrón y rojo, respectivamente) muestra un ejemplo representativo de tinción conjunta de CD105 y CD34 en células endoteliales (●) y tinción exclusivamente positiva para CD105 en células estromales evaluadas (●) del tejido del tumor primario de una paciente con cáncer de mama. Panel inferior: Controles negativos de isotipo de la doble marcación (IgG de cabra y IgG de ratón). Los núcleos se tiñeron con hematoxilina (púrpura). Aumento original: $\times 200$. Las barras de escala representan $200\ \mu\text{m}$ y $100\ \mu\text{m}$ en el recuadro.



De un total de 350 PCM diagnosticadas con cáncer de mama ductal infiltrante (estadios I/II), se encontró que 113 muestras (32%) presentaban una alta expresión de CD105 (**Figura 10A**).

A.

	CD105		
	PCM con baja expresión n (%)	PCM con alta expresión n (%)	p
Todos los subtipos	237 (68%)	113 (32%)	-
Luminal A	145 (49%)	64 (31%)	0,4180
Luminal B	67 (66%)	34 (34%)	0,8010
TNBC	18 (72%)	7 (28%)	0,8250
Sobreexpresión HER2/neu	7 (47%)	8 (53%)	0,0920

B.

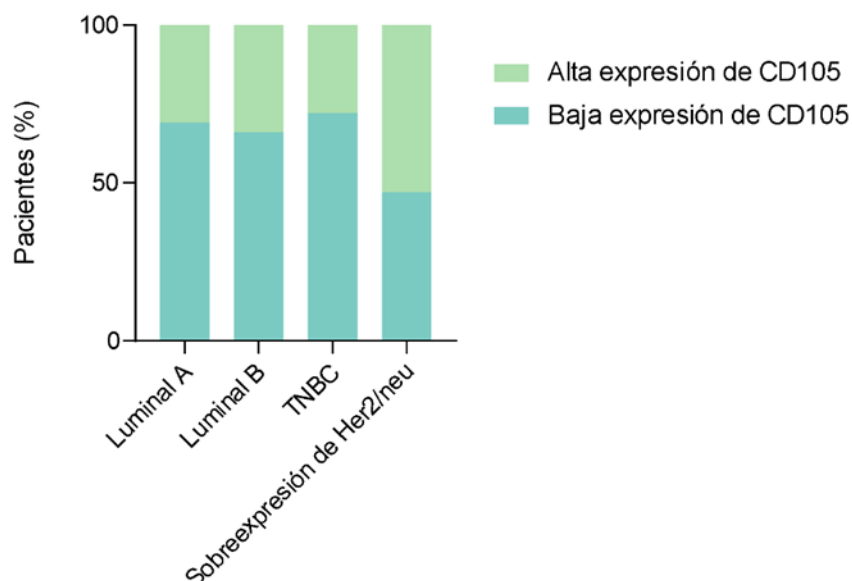


Figura 10. Expresión de CD105 en los fibroblastos asociados al tumor del cáncer de mama y sus diferentes subtipos moleculares. A. Tabla que muestra la expresión de CD105 en los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs) de nuestra cohorte de 350 pacientes, tanto en total como especificando en cada subtipo molecular del cáncer de mama. B. Asociación de la expresión de CD105 en CAFs con diferentes subtipos de cáncer de mama. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para evaluar la asociación entre variables, * valor de $p < 0,0500$. n: número de pacientes. Cohorte de 350 pacientes cáncer de mama. El histograma representa la asociación de la expresión de CD105 en estas células estromales con diferentes subtipos de cáncer de mama. PCM: pacientes con cáncer mama; TNBC: cáncer de mama triple negativo.



La presencia de CD105 no mostró una asociación significativa con un subtipo molecular particular de cáncer de mama (**Figura 10 A y B**). La distribución de la expresión de CD105 en todas las pacientes individualizadas se muestra a través de un *heatmap* (**Figura 11**), incluyendo las PCM con/sin ocurrencia de metástasis (ósea, visceral y mixta).

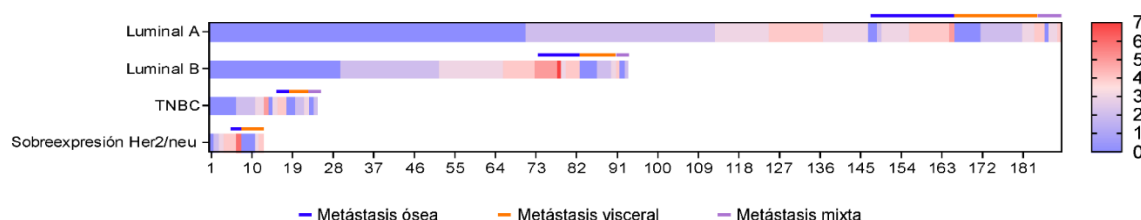


Figura 11. Expresión de CD105 en los fibroblastos asociados al cáncer de tumores de pacientes con cáncer de mama y sus diferentes subtipos moleculares. Mapa de calor que ilustra la distribución de la expresión de CD105 en los fibroblastos asociados al cáncer todas las muestras incluidas en el estudio, incluyendo casos con metástasis óseas (•), viscerales (•) y mixtas (•). TNBC: cáncer de mama triple negativo

Análisis de las asociaciones de los datos de expresión de CD105 en las células estromales fusiformes, no asociadas a vasculatura, con los datos de los parámetros de pronóstico clásicos del cáncer de mama, así como también con otros datos clínico-patológicos

Se encontró que la expresión de CD105 estaba significativamente asociada con la edad de la paciente ($p = 0,0260$; **Tabla 8**). El 42,22% de las pacientes menores de 50 años presentaban una alta expresión de CD105, mientras que el 28,85% de las pacientes de 50 años o más tenían una alta expresión de CD105 (**Tabla 8**). Además, se observó que la expresión de CD105 estaba significativamente asociada con el tamaño del tumor en nuestras PCM ($p = 0,0010$; **Tabla 8**). El 43,65 % de las PCM con un tamaño de tumor >2 cm presentaban una alta expresión de CD105, mientras que el 25,89% de las PCM con un tamaño de tumor ≤ 2 cm también tenían una alta expresión de este marcador (**Tabla 8**).



No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la asociación de la expresión de CD105 con otros parámetros clásicos como el estado de RE, RP, HER2/neu, el grado histológico y el estado de los ganglios linfáticos regionales (**Tabla 8**). Sin embargo, la alta expresión de CD105 se asoció significativamente con un mayor riesgo de desarrollar metástasis ($p = 0,0003$; **Tabla 8**). Las PCM con alta expresión de CD105 presentaron una tasa de ocurrencia metastásica del 35%, mientras que el grupo con baja expresión de CD105 tuvo solo un 16% de eventos metastásicos. Además, se observó que sólo el 27,21% de las PCM con una expresión elevada de CD105 no presentaron metástasis, en contraste con el 72,79% de las PCM que mostraron una baja expresión de CD105 ($p = 0,0003$; **Tabla 8**). Al analizar la expresión de CD105 considerando el sitio de metástasis, se encontró que el 89,66% de las PCM con metástasis ósea tenían una alta expresión de CD105 ($p = 0,0002$; **Tabla 8**). Dentro del grupo de PCM con alta expresión de CD105, el 23% tuvo metástasis óseas, mientras que en el grupo de PCM con baja expresión de CD105, solo el 1% experimentó este evento. No se encontró una asociación significativa entre la expresión de CD105 y otros sitios de metástasis, como viscerales y/o mixtas (ósea y visceral simultáneas), así como entre la expresión de CD105 y la recidiva local (**Tabla 8**).



Características clínico-patológicas		CD105				
		Baja		Alta		p
		n	%	n	%	
Edad (años)	<50	52	57,78	38	42,22	0,0260
	≥50	185	71,15	75	28,85	
Tamaño tumoral (cm)	≤2	166	74,11	58	25,89	0,0010
	>2	71	56,35	55	43,65	
RE	Negativo	25	56,82	19	43,18	0,1200
	Positivo	212	69,28	94	30,72	
RP	Negativo	39	65,00	21	35,00	0,6500
	Positivo	198	68,28	92	31,72	
HER2/neu	Negativo	203	69,76	88	30,24	0,0920
	Positivo	34	57,63	25	42,37	
Grado histológico	G1	29	78,38	8	21,62	0,3580
	G2	123	66,49	62	33,51	
	G3	85	66,41	43	33,59	
Metástasis en Ganglios linfáticos	Negativo	169	70,42	71	29,58	0,1390
	Positivo	68	61,82	42	38,18	
Recidiva local	Negativo	209	67,42	101	32,58	0,8580
	Positivo	28	70,00	12	30,00	
Ocurrencia de metástasis	Negativo	198	72,79	74	27,21	0,0003
	Positivo	39	50,00	39	50,00	
Ocurrencia de metástasis ósea	Negativo	234	72,90	87	27,10	0,0002
	Positivo	3	10,34	26	89,66	
Ocurrencia de metástasis visceral	Negativo	206	66,67	103	33,33	0,2890
	Positivo	31	75,61	10	24,39	
Ocurrencia de metástasis mixta	Negativo	232	67,84	110	32,16	0,7160
	Positivo	5	62,50	3	37,50	

Tabla 8. Asociación de la expresión de CD105 en los fibroblastos asociados al cáncer con las características clínico-patológicas (marcadores pronósticos clásicos), recidiva local, ocurrencia de metástasis, ocurrencia de metástasis ósea, ocurrencia de metástasis visceral y ocurrencia de metástasis mixta en 350 pacientes con cáncer de mama ductal infiltrante temprano. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para evaluar la asociación entre variables, * valor de $p < 0,0500$. n: número de pacientes. Cohorte de 350 pacientes cáncer de mama. RE: receptor de estrógeno, RP: receptor de progesterona, HER2/neu: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.



La expresión de CD105 también se asoció con el número de focos metastásicos por órgano, tanto en general como en hueso ($p = 0,0010$ y $p = 0,0007$; respectivamente) (**Tabla 9**). Se encontró que las PCM con alta expresión de CD105 presentaban múltiples focos dentro del mismo órgano (**Tabla 9**). Este mismo patrón también se observó al analizar el sitio metastásico óseo (**Tabla 9**).

Expresión de CD105	Características del foco metastásico					
	#PCM con 1		#PCM con ≥ 2	#PCM con 1		#PCM con ≥ 2
	<i>n</i>	foco <i>n</i> (%)	focos <i>n</i> (%)	<i>p</i>	foco óseo <i>n</i> (%)	focos óseos <i>n</i> (%)
Baja expresión	237	15 (6,32%)	24 (10,12%)	0,0010	0 (0,00%)	3 (1,26%)
Alta expresión	113	11 (9,73%)	28 (24,77%)		6 (5,30%)	20 (17,69%)
						0,0007

Tabla 9. Asociación de la expresión de CD105 en los fibroblastos asociados al cáncer con el número de focos metastásicos por órgano en general y el número de focos metastásicos óseos en 350 pacientes con cáncer de mama ductal infiltrante temprano. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para evaluar la asociación entre variables, * valor de $p < 0,0500$. *n*: número de pacientes. Cohorte de 350 pacientes cáncer de mama.

Al estudiar la expresión de CD105 en estos fibroblastos y relacionarla con la evolución de las PCM a lo largo del tiempo, se encontró que la expresión de CD105 se asoció significativamente con el MFS, particularmente con el BMFS y la OS ($p = 0,0001$, $p = 0,0002$ y $p = 0,0001$; respectivamente) (**Figura 12B, C y F**). Las PCM con alta expresión de CD105 presentaron un MFS más corto ($169,59 \pm 9,55$ meses), un BMFS más corto ($186,65 \pm 10,53$ meses) y una OS menor ($178,03 \pm 8,99$ meses) en comparación con el grupo de pacientes con baja expresión de CD105 ($203,16 \pm 5,60$; $261,37 \pm 1,50$ y $226,28 \pm 6,81$ meses, respectivamente) (**Tabla 10**).

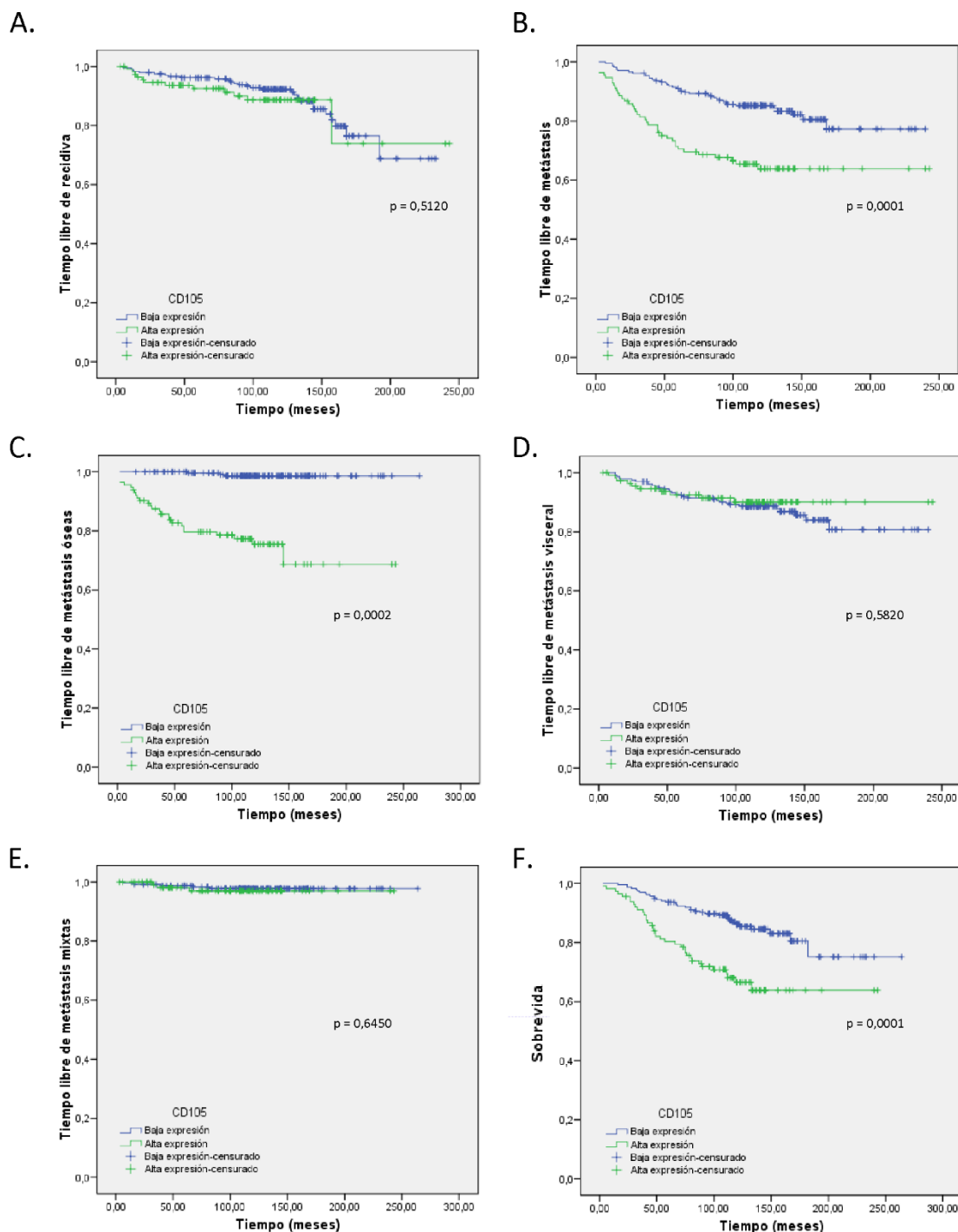


Figura 12. Asociación de la expresión de CD105 en los fibroblastos asociados al cáncer con el tiempo libre de recidiva local, tiempo libre de metástasis, tiempo libre de metástasis óseas, tiempo libre de metástasis viscerales, tiempo libre de metástasis mixtas y sobrevida global en pacientes con cáncer de mama ductal infiltrante temprano. Curvas de Kaplan-Meier (análisis univariado) marcadas en verde representan datos de muestras con alta expresión de CD105, mientras que las curvas azules representan muestras con expresión negativa/baja de CD105. Se utilizó la prueba de Log Rank (Mantel-Cox) para evaluar las curvas de Kaplan-Meier. * valor de $p < 0,0500$. Pacientes con cáncer de mama: 350



Tiempos	CD105		
	Baja expresión	Alta expresión	p
RFS (meses)	203,16 ± 5,60	207,85 ± 13,03	0,5120
MFS (meses)	205,40 ± 5,29	169,59 ± 9,55	0,0001
BMFS (meses)	261,37 ± 1,50	186,65 ± 10,53	0,0002
VMFS (meses)	211,66 ± 4,97	222,96 ± 6,04	0,5820
MMFS (meses)	259,12 ± 2,16	236,92 ± 3,45	0,6450
OS (meses)	226,28 ± 6,81	178,02 ± 8,99	0,0001

Tabla 10. Asociación de la expresión de CD105 en los fibroblastos asociados al cáncer con el tiempo libre de recidiva local, tiempo libre de metástasis, tiempo libre de metástasis óseas, tiempo libre de metástasis viscerales, tiempo libre de metástasis mixtas y sobrevida global en pacientes con cáncer de mama ductal infiltrante temprano. La tabla muestra detalles de tiempo libre de recidiva local (RFS), tiempo libre de metástasis (MFS), tiempo libre de metástasis óseas (BMFS), tiempo libre de metástasis viscerales (VMFS), tiempo libre de metástasis mixtas (mix MFS) y sobrevida global (OS) que corresponden a los grupos de baja y alta expresión de CD105. Valores expresados como media ± error estándar (X±ES). Se utilizó la prueba de Log Rank (Mantel-Cox) para evaluar las curvas de Kaplan-Meier. * valor de $p < 0,0500$. Pacientes con cáncer de mama: 350

Asociación entre marcadores pronósticos clásicos y la progresión del tumor

El análisis univariado de los marcadores pronósticos clásicos, junto con otros datos clínico-patológicos de las PCM, reveló asociaciones significativas con el pronóstico en nuestra cohorte. La ausencia de RE, de RP, tumores de tamaño superior a 2 cm, grado histológico alto (G3) y la presencia de micro/macrometástasis en los ganglios linfáticos regionales se asociaron de manera significativa con un peor pronóstico. El estado de RE negativos se asoció con la ocurrencia de metástasis, tanto óseas como viscerales (**Tabla 11**). Al respecto, las PCM con RE negativos mostraron una reducción significativa en los tiempos de MFS, BMFS, VMFS y OS (**Figura 13**). De manera similar, el estado del RP se asoció con la ocurrencia de metástasis, óseas y viscerales (**Tabla 11**). Aquellas PCM con tumores RP negativos presentaron una disminución en el tiempo de MFS, BMFS, VMFS, y una menor OS (**Figura 14**). Además, se observó que los tumores con un tamaño superior a 2 cm se relacionaron con la presencia de metástasis, indistintamente del sitio en que ocurrieran (**Tabla 11**). De esta forma, las PCM con tamaño tumoral grande (>2 cm) mostraron una reducción en el tiempo de MFS, BMFS, VMFS, mixMFS y OS (**Figura 15**). Por otro lado, los



tumores con grado histológico pobremente diferenciado (G3) también se asociaron tanto con la ocurrencia de metástasis óseas, viscerales y/o mixtas, así como con sus respectivos tiempos y OS. (Tabla 11 y Figura 16).

Respecto al estudio de la relación entre los marcadores pronósticos clásicos y las características del estroma tumoral, tales como el porcentaje de estroma, la abundancia de fibroblastos, deposición de colágeno, desmoplasia, cambios mixoides, infiltración linfocitaria, microcalcificaciones anárquicas y la vascularización sanguínea y/o linfática, no se encontraron asociaciones significativas (*Datos no mostrados*).

Características clínico-patológicas		Recidiva local		Ocurrencia de metástasis		Ocurrencia de metástasis ósea		Ocurrencia de metástasis visceral		Ocurrencia de metástasis mixta						
		Positivo	p	Positivo	p	Positivo	p	Positivo	p	Positivo	p					
n	%	n		%		n		%		n		%	n	%		
Edad (años)	<50	9	10,00	0,7041	22	24,44	0,5602	9	10,00	0,5081	10	11,11	1,000	3	3,33	0,4294
	≥50	31	11,92		56	21,54		20	7,69		31	11,92		5	1,92	
Tamaño tumoral (cm)	≤2	23	10,27	0,3844	29	12,95	0,0004	11	4,91	0,0040	16	7,14	0,0011	2	0,89	0,0287
	>2	17	13,49		49	38,89		18	14,29		25	19,84		6	4,76	
RE	Negativo	8	18,18	0,1342	21	47,73	0,0006	8	18,18	0,0180	11	25,00	0,0090	2	4,55	0,2653
	Positivo	32	10,46		57	18,63		21	6,86		30	9,80		6	1,96	
RP	Negativo	11	18,33	0,0750	24	40,00	0,0012	9	15,00	0,0462	13	21,67	0,0149	2	3,33	0,6290
	Positivo	29	10,00		54	18,62		20	6,90		28	9,66		6	2,07	
HER2/neu	Negativo	29	9,97	0,0712	62	21,31	0,3910	23	7,90	0,6043	31	10,65	0,1843	8	2,75	0,3611
	Positivo	11	18,64		16	27,12		6	10,17		10	16,95		0	0,00	
Grado histológico	G1	2	5,41	0,2517	3	8,11	0,0003	0	0,00	0,0150	3	8,11	0,0650	0	0,00	0,6712
	G2	19	10,27		32	17,30		12	6,49		16	8,65		4	2,16	
	G3	19	14,84		43	33,59		17	13,28		22	17,19		4	3,13	
Metástasis en ganglios linfáticos	Negativo	24	10,00	0,2770	46	19,17	0,0520	16	6,67	0,1428	26	10,83	0,4764	4	1,67	0,2666
	Positivo	16	14,55		32	29,09		13	11,82		15	13,64		4	3,64	

Tabla 11. Asociación de los marcadores pronósticos clásicos con datos clínico-patológicos de las pacientes con cáncer de mama. La tabla muestra los resultados de la asociación entre la edad de la paciente, tamaño tumoral, estado del receptor de estrógenos (RE), de progesterona (RP) y del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2/neu), el grado histológico (G1: diferenciado, G2: moderadamente diferenciado, G3: pobremente diferenciado) y metástasis en ganglios linfáticos regionales de la mama con la presencia de recidiva local, ocurrencia de metástasis, ocurrencia de metástasis ósea, ocurrencia de metástasis visceral y/o ocurrencia de metástasis mixta en 350 pacientes con cáncer de mama ductal infiltrante temprano. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para evaluar la asociación entre variables, * valor de $p < 0,0500$. n: número de pacientes. Cohorte de 350 pacientes cáncer de mama.

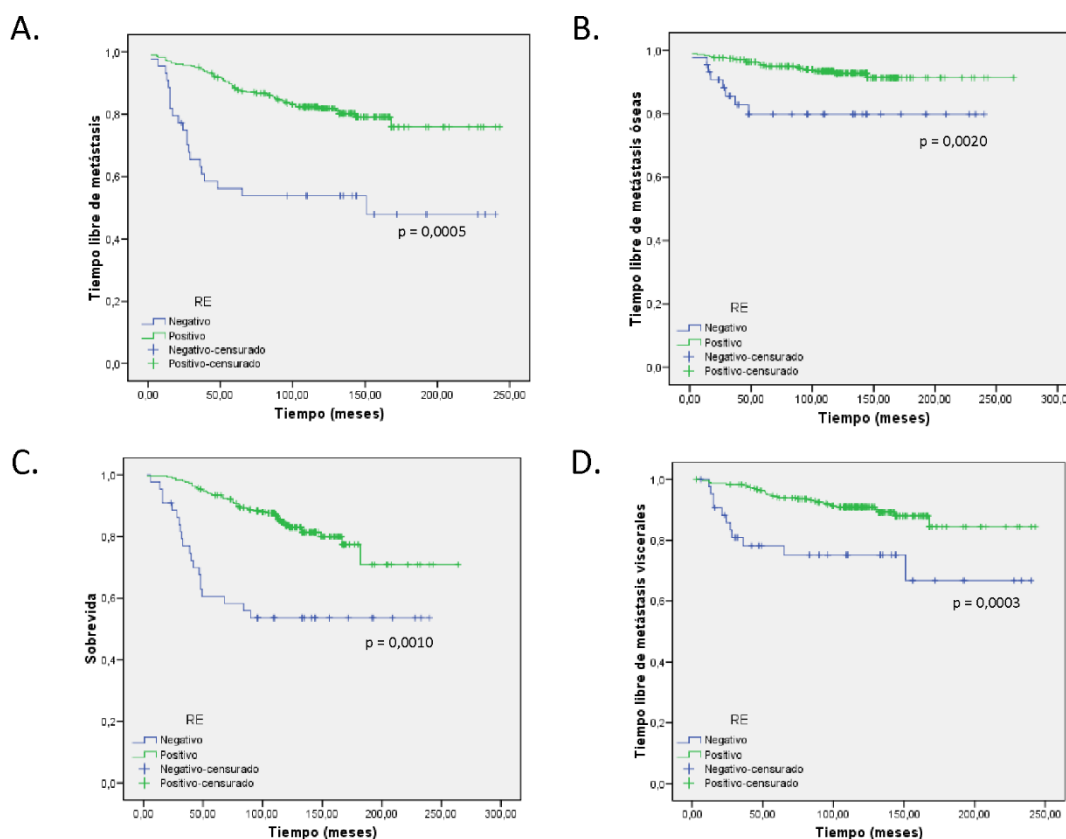


Figura 13. Asociación entre la presencia del receptor de estrógenos en el tumor mamario con el tiempo libre de metástasis, tiempo libre de metástasis óseas, tiempo libre de metástasis viscerales y sobrevida global en pacientes con cáncer de mama ductal infiltrante temprano. Curvas de Kaplan-Meier (análisis univariado) marcadas en verde representan datos de muestras con presencia del receptor de estrógenos (RE), mientras que las curvas azules representan muestras con ausencia del RE. Se utilizó la prueba de Log Rank (Mantel-Cox) para evaluar las curvas de Kaplan-Meier. * valor de $p < 0,0500$. Pacientes con cáncer de mama: 350

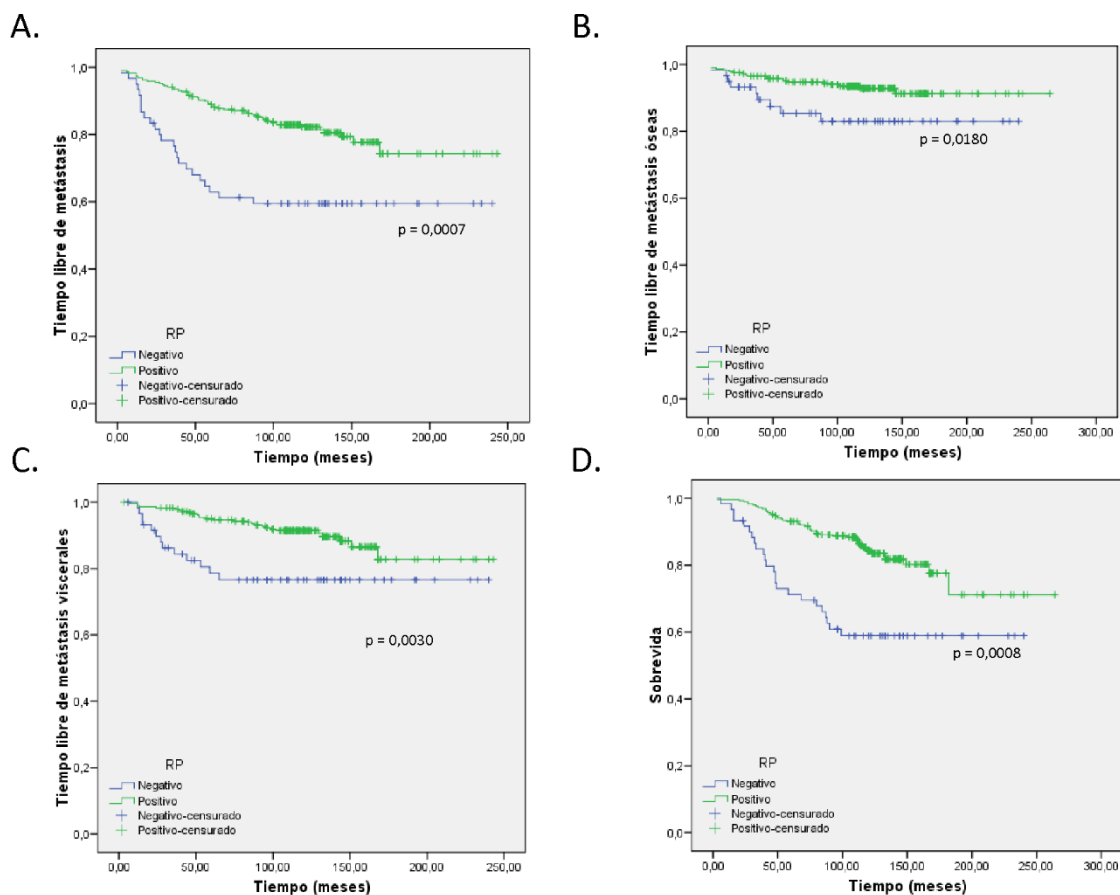


Figura 14. Asociación entre la presencia del receptor de progesterona en el tumor mamario con el tiempo libre de metástasis, tiempo libre de metástasis óseas, tiempo libre de metástasis viscerales y sobrevida global en pacientes con cáncer de mama ductal infiltrante temprano. Curvas de Kaplan-Meier (análisis univariado) marcadas en verde representan datos de muestras con presencia del receptor de progesterona (RP), mientras que las curvas azules representan muestras con ausencia del RP. Se utilizó la prueba de Log Rank (Mantel-Cox) para evaluar las curvas de Kaplan-Meier. * valor de $p < 0,0500$. Pacientes con cáncer de mama: 350

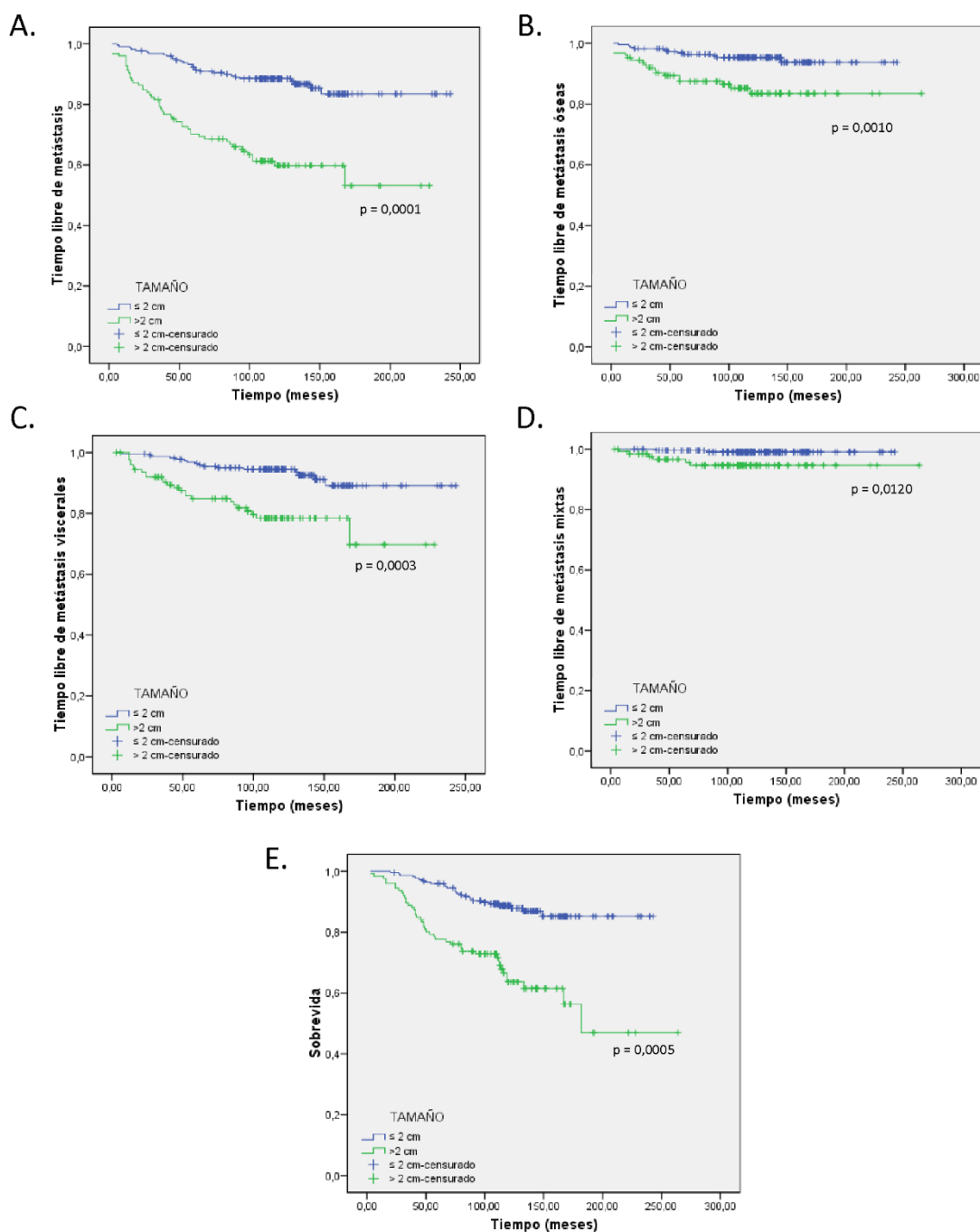


Figura 15. Asociación entre el tamaño tumoral con el tiempo libre de metástasis, tiempo libre de metástasis óseas, tiempo libre de metástasis viscerales, tiempo libre de metástasis mixtas y sobrevida global en pacientes con cáncer de mama ductal infiltrante temprano. Curvas de Kaplan-Meier (análisis univariado) marcadas en verde representan datos de muestras con tamaño tumoral ≤ 2 cm, mientras que las curvas azules representan muestras con tamaño tumoral > 2 cm. Se utilizó la prueba de Log Rank (Mantel-Cox) para evaluar las curvas de Kaplan-Meier. * valor de $p < 0,0500$. Pacientes con cáncer de mama: 350

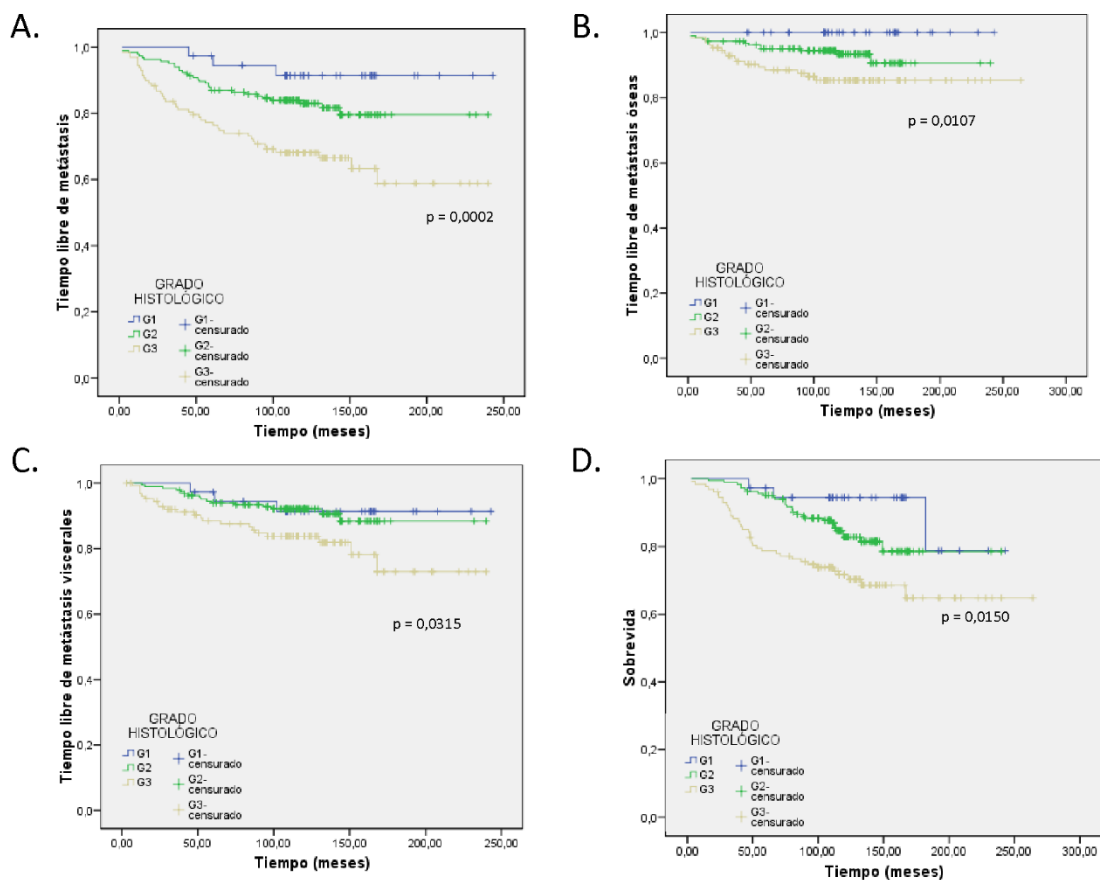


Figura 16. Asociación entre el grado histológico del tumor con el tiempo libre de metástasis, tiempo libre de metástasis óseas, tiempo libre de metástasis viscerales y sobrevida global en pacientes con cáncer de mama ductal infiltrante temprano. Curvas de Kaplan-Meier (análisis univariado) marcadas en azul representan datos de muestras con grado histológico (G) bajo (G1) (diferenciado), curvas en verde representan datos de muestras con G intermedio (G2) (moderadamente indiferenciado), mientras que las curvas grises representan muestras con G alto (G3) (pobrementemente diferenciado). Se utilizó la prueba de Log Rank (Mantel-Cox) para evaluar las curvas de Kaplan-Meier. * valor de $p < 0,0500$. Pacientes con cáncer de mama: 350



Análisis de la expresión de CD105 como factor pronóstico independiente de ocurrencia de metástasis, particularmente metástasis ósea y sobrevida post-cirugía

El análisis multivariado reveló que la expresión de CD105 fue un predictor independiente para los eventos de metástasis, particularmente ósea, y sus respectivos tiempos (MFS y BMFS), así como también de la OS en nuestras pacientes con carcinoma ductal infiltrante (**Figura 17**).

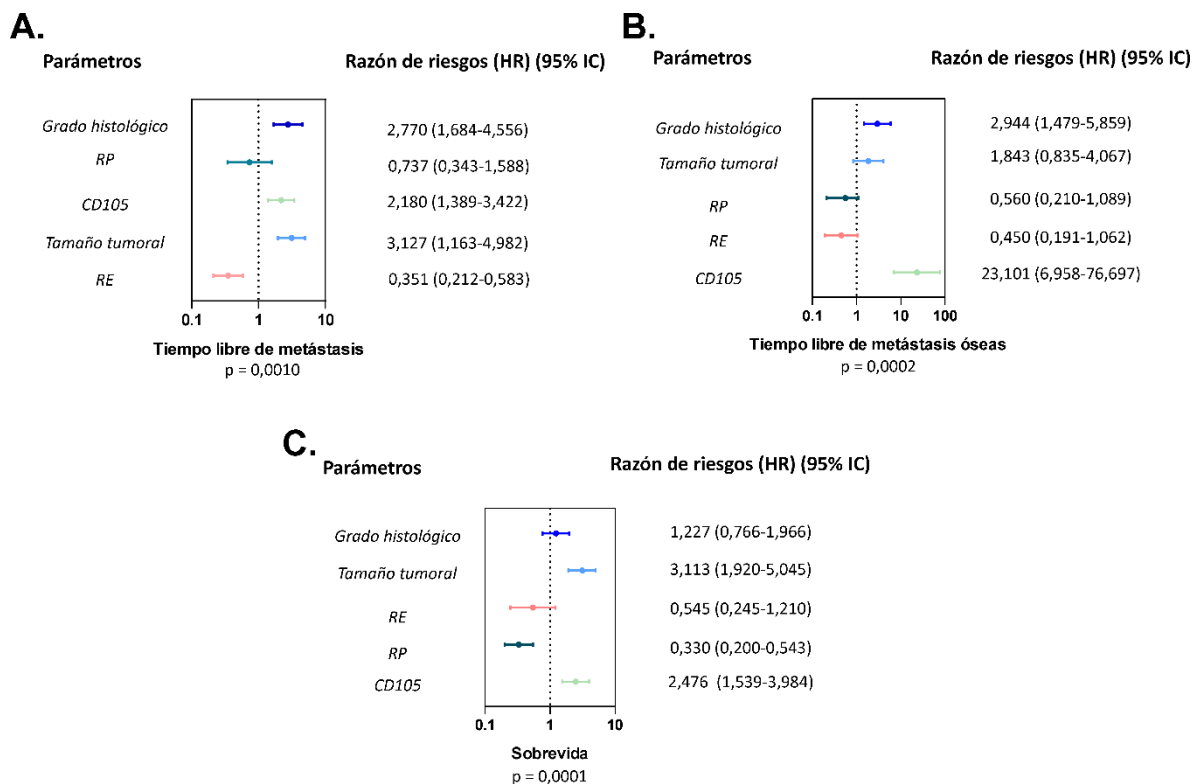


Figura 17. Análisis multivariado de los parámetros de pronóstico clásicos y no clásicos evaluados que estuvieron asociados significativamente con el tiempo libre de metástasis, tiempo libre de metástasis óseas y tiempo de sobrevida de las pacientes con cáncer de mama. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un análisis multivariado [Cox Proportional Hazards Model, Backward Stepwise (Likelihood Ratio)]. I.C.: Intervalo de confianza; HR: razón de riesgo. * p -value <0,0500. Pacientes con cáncer de mama: 350. RE: receptor de estrógenos, RP: receptor de progesterona.



Análisis de las asociaciones entre la expresión de CD105 en las células estromales fusiformes, no asociadas a vasculatura y otros datos del estroma tumoral mamario

En relación a las características estromales evaluadas en las muestras de nuestras PCM, la expresión de CD105 mostró asociaciones significativas con el porcentaje de estroma intratumoral, la presencia de fibroblastos y el grado de desmoplasia ($p = 0,0007$; $p = 0,0090$ y $p = 0,0280$; respectivamente, como se muestra en la **Tabla 12**). De las PCM con una alta expresión de CD105, el 63,72% mostró un alto porcentaje de estroma intratumor, mientras que solo el 32,91% de las pacientes con baja expresión presentó un alto porcentaje de estroma intratumor (**Tabla 12; Figura 18**). Respecto a la abundancia de fibroblastos, la alta expresión de CD105 se asoció con un mayor número de fibroblastos intratumorales. El 61,06% de las PCM con alta expresión de CD105 mostraron un mayor número de fibroblastos, mientras que solo el 46,41% de las pacientes con baja expresión de CD105 mostraron una abundancia alta de fibroblastos (**Tabla 12; Figura 18**). Además, la expresión de CD105 estuvo correlacionada con el grado de desmoplasia, con el 59,29% de las pacientes con alta expresión de CD105 presentando desmoplasia severa, en comparación con el 44,73% en el grupo de baja expresión de CD105 (**Tabla 12; Figura 18**). Finalmente, la expresión de CD105 se asoció con la abundancia de microcalcificaciones anárquicas en el estroma tumoral mamario (**Tabla 12; Figura 18**), donde el 50,44% de las PCM con alta expresión de CD105 presentaron abundantes microcalcificaciones anárquicas, mientras que solo el 26,58% de las PCM con baja expresión de CD105 las presentaron (**Tabla 12**).

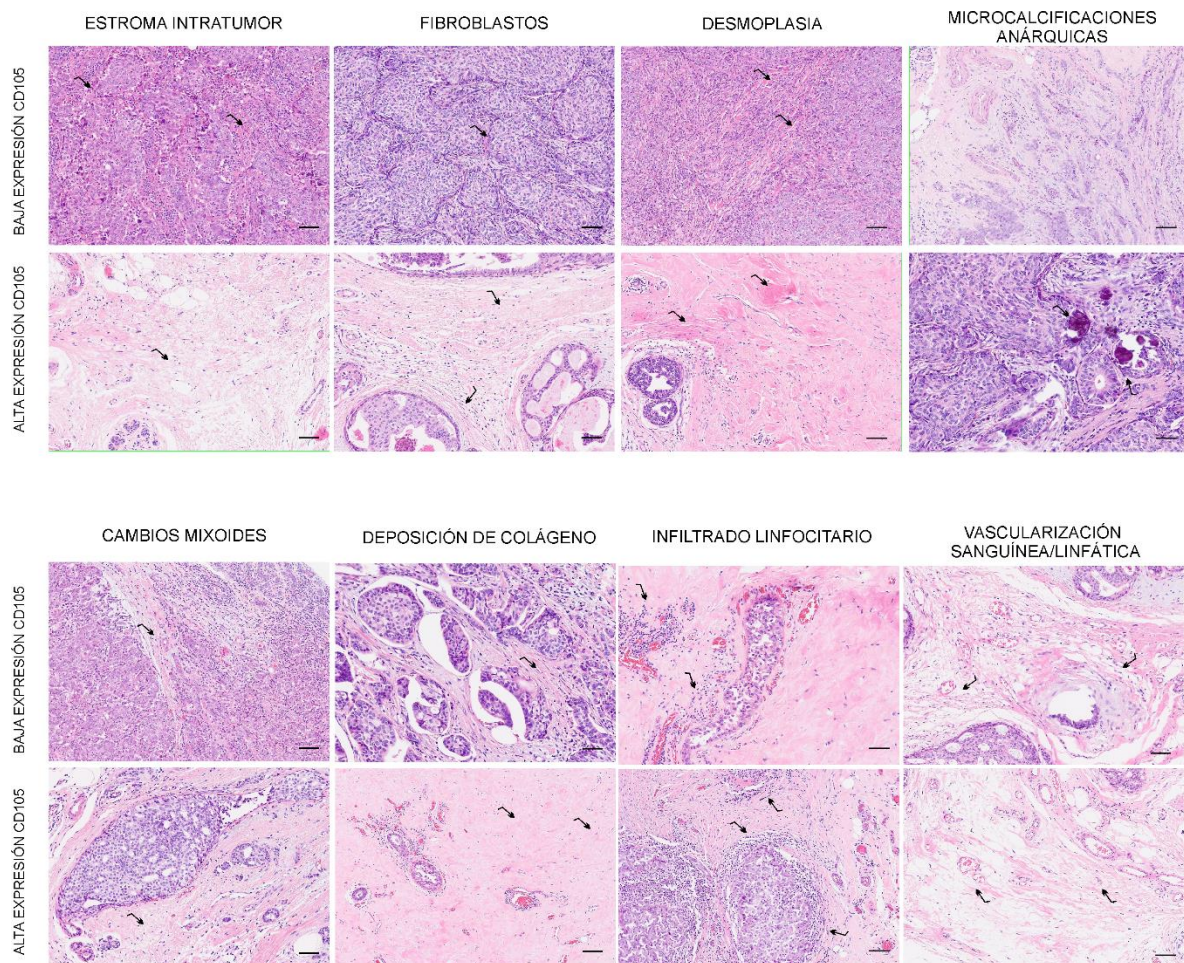


Figura 18. Imágenes representativas de la relación entre las características histológicas del tumor de mama y la expresión de CD105 en los fibroblastos asociados al cáncer. Se utilizó tinción con hematoxilina y eosina para evaluar las características histológicas del estroma en el tumor primario de mama. Esta figura ilustra con flechas las muestras que exhiben diferentes niveles de estroma intratumor, fibroblastos, desmoplasia, cambios mixoides, microcalcificaciones anárquicas, deposición de colágeno, infiltración linfocitaria y vascularización sanguínea y/o linfática en relación con la expresión de CD105. Las imágenes se capturaron a una magnificación original de 200X, y las barras de escala representan 200 μ m.



Características del estroma tumoral mamario		CD105			
		Baja expresión		Alta expresión	
		n	%	n	%
% estroma intratumor	> 50	78	32,91%	72	63,72%
	p		0,0007		
% Fibroblastos	Abundancia	110	46,41%	69	61,06%
	p		0,009		
Deposición de colágeno	Abundancia	67	28,27%	36	31,86%
	p		0,531		
Infiltrado linfocitario	Abundancia	111	46,84%	56	49,56%
	p		0,649		
Desmoplasia	Abundancia	106	44,73%	67	59,29%
	p		0,028		
Cambios mixoides	Abundancia	17	7,17%	10	8,85%
	p		0,669		
Vascularización sanguínea y/o linfática	Abundancia	64	27,00%	35	30,97%
	p		0,232		
Microcalcificaciones anárquicas	Abundancia	63	26,58%	57	50,44%
	p		0,0191		

Tabla 12. Asociación entre características histológicas del estroma del tumor primario y la expresión de CD105 en una cohorte de 350 pacientes cáncer de mama, en etapa temprana. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para evaluar la asociación entre variables, * valor de $p < 0,0500$. n: número de pacientes. Cohorte de 350 pacientes cáncer de mama.



Análisis de las asociaciones entre la expresión de CD105 en las células estromales fusiformes, no asociadas a vasculatura y las microcalcificaciones anárquicas evidentes en las mamografías previas al diagnóstico del tumor, así como con la presencia de dolor óseo previo al desarrollo de metástasis

La presencia de microcalcificaciones anárquicas se detectó antes de que el tumor se hiciera visible en la mamografía (BI-RADS 3). Esto significa que las microcalcificaciones anárquicas fueron identificadas durante estudios de mamografía de control rutinario. Posteriormente, estas pacientes fueron diagnosticadas con carcinoma ductal infiltrante (I/II). Una vez obtenido el taco de parafina del tumor, se confirmó la presencia de estas microcalcificaciones en el estroma tumoral mamario mediante tinción con hematoxilina y eosina tras la cirugía, tal como se describió anteriormente (**Figura 18, Tabla 12**). Por lo tanto, de manera similar al análisis de las microcalcificaciones anárquicas en el tumor en relación con la presencia de fibroblastos CD105(+), se observó que la expresión de CD105 en los fibroblastos del tumor primario estaba asociada con la presencia de microcalcificaciones anárquicas en la mama, detectadas antes del diagnóstico ($p = 0,0008$) (**Figura 19**). Entre las PCM con alta expresión de CD105, el 54,87% presentaba microcalcificaciones anárquicas previas al desarrollo del tumor, en comparación con el 25,32% de las pacientes con baja expresión de CD105 (**Figura 19**).

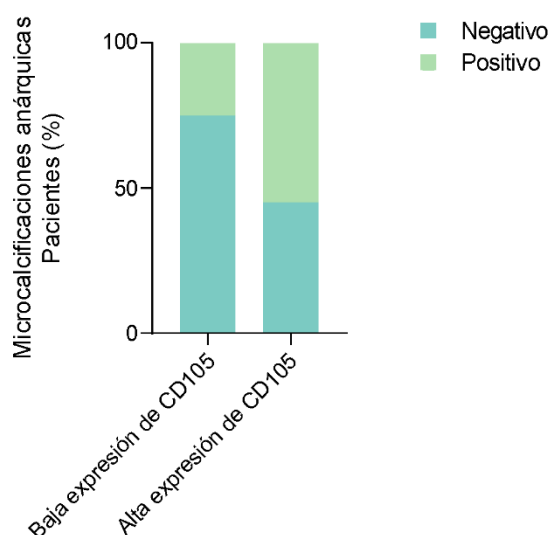
Resulta fundamental destacar que el 100% de las PCM que presentaron microcalcificaciones anárquicas detectadas en la mamografía mantuvieron la presencia de dichas microcalcificaciones en el tumor. De las 62 PCM con alta expresión de CD105 que mostraron microcalcificaciones anárquicas en la mamografía (**Figura 19A**), 57 (50,44%) resultaron tener una abundante cantidad de microcalcificaciones en el tumor (**Tabla 12**), mientras que solo 5 PCM (4,43%) presentaron escasas microcalcificaciones y 51 PCM (45,13%) no presentaron microcalcificaciones anárquicas (*Datos no mostrados*).



A.

Parámetros evaluados		CD105			
		Baja expresión		Alta expresión	
		n	%	n	%
Microcalcificaciones anárquicas en la mama previas al diagnóstico del tumor	Presencia	60	25,32%	62	54,87%
	p	0,0008			
Dolor óseo antes del evento metastásico óseo	Presencia	5	2,11%	26	23,01%
	p	0,0007			

B.



C.

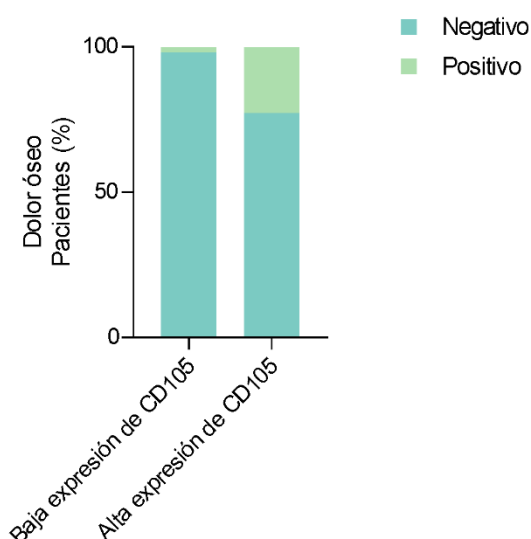


Figura 19. Expresión de CD105 en los fibroblastos asociados al cáncer y su relación con microcalcificaciones mamarias anárquicas previas al diagnóstico del tumor y con el dolor óseo. A. Asociación de la expresión de CD105 con la presencia de microcalcificaciones anárquicas en la mama previas al diagnóstico del tumor y dolor óseo previo a la metástasis ósea utilizando la prueba exacta de Fisher para evaluar la asociación entre variables. **B.** Representación gráfica de la asociación de la expresión de CD105 con la presencia de microcalcificaciones anárquicas en la mama, previas al diagnóstico del tumor. **C.** Representación gráfica de la asociación de la expresión de CD105 con el dolor óseo previo a la metástasis ósea. * valor de $p < 0,0500$. n: número de pacientes. Cohorte de 350 pacientes cáncer de mama.



Continuando con nuestros resultados, también se encontró una asociación significativa entre la presencia de microcalcificaciones anárquicas y la ocurrencia de metástasis óseas. Dentro de las pacientes que desarrollaron metástasis óseas (29 de un total de 350 pacientes), el 62,07% presentaba microcalcificaciones anárquicas en la mama antes del diagnóstico del tumor ($p=0,0002$) (**Tabla 14**). Esta asociación se mantuvo al analizar la presencia de microcalcificaciones anárquicas en el estroma tumoral mamario. De las 29 PCM que desarrollaron metástasis óseas, un 72,41% había presentado microcalcificaciones anárquicas en el estroma del tumor primario (**Tabla 15**).

Finalmente, nos interesó evaluar si existe asociación entre la expresión de CD105, la presencia de microcalcificaciones anárquicas previas y/o post-diagnóstico del tumor, y las metástasis óseas con la presencia de dolor óseo. En principio, encontramos que 31 PCM del total de 350 experimentaron dolor óseo. Este parámetro clínico se asoció con la ocurrencia de metástasis. De las PCM que desarrollaron metástasis óseas, el 75,86% experimentaron dolor óseo previo a la detección del evento metastásico, mientras que solo un 2,80% lo experimentaron en ausencia de metástasis ($p = 0,0006$; **Tabla 16**). Al estudiar la relación con la presencia de fibroblastos CD105(+)/CD34(-), encontramos que, dentro de las PCM con alta expresión de CD105, un 23,01% experimentó dolor óseo previo a la aparición del evento metastásico, mientras que solo un 2,11% del grupo de baja expresión de CD105 lo experimentó ($p=0,0007$; **Figura 19**). Por otro lado, se observó que la presencia de microcalcificaciones previas al desarrollo del tumor, así como su abundancia dentro del estroma tumoral mamario, se asociaron con el dolor óseo de las pacientes. De las PCM que experimentaron dolor óseo, un 61,29% tenía microcalcificaciones anárquicas en la mama antes del diagnóstico del tumor (**Tabla 14**). Al mismo tiempo, un 67,74% de las PCM que experimentaron dolor óseo tuvieron microcalcificaciones anárquicas en el estroma del tumor primario (**Tabla 15**).



Parámetros evaluados		Microcalcificaciones anárquicas en la mama previas al diagnóstico del tumor			
		Ausencia		Presencia	
		n	%	n	%
Dolor óseo antes del evento de metástasis ósea	Presencia	12	38,71	19	61,29
	p		0,0040		
Metástasis ósea	Presencia	11	37,93	18	62,07
	p		0,0002		

Tabla 14. Relación entre la presencia de microcalcificaciones anárquicas previas al desarrollo del tumor con la ocurrencia de metástasis óseas. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para evaluar la asociación entre variables, * valor de $p < 0,0500$. n: número de pacientes. Cohorte de 350 pacientes cáncer de mama.

Parámetros evaluados		Microcalcificaciones anárquicas en el estroma tumoral mamario			
		Ausencia/poca cantidad		Abundancia	
		n	%	n	%
Dolor óseo antes del evento de metástasis ósea	Presencia	10	32,26	21	67,74
	p		0,0024		
Metástasis ósea	Presencia	8	27,59	21	72,41
	p		0,0001		

Tabla 15. Relación entre la presencia de microcalcificaciones anárquicas en el estroma tumoral mamario con la ocurrencia de metástasis óseas. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para evaluar la asociación entre variables, * valor de $p < 0,0500$. n: número de pacientes. Cohorte de 350 pacientes cáncer de mama.

Parámetros evaluados		Dolor óseo antes del evento de metástasis ósea			
		Ausencia		Presencia	
		n	%	n	%
Metástasis ósea	Ausencia	312	97,20	9	2,80
	Presencia	7	24,14	22	75,86
	p		0,0006		

Tabla 16. Relación entre la presencia de dolor óseo previo a la aparición de metástasis ósea con la ocurrencia de metástasis óseas. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para evaluar la asociación entre variables, * valor de $p < 0,0500$. n: número de pacientes. Cohorte de 350 pacientes cáncer de mama.



Relevancia pronóstica de la expresión de mRNA de CD105 en células FSP (+), FAP (+) y CD34 (-) dentro del tumor de mama utilizando un enfoque bioinformático

Con el fin de validar nuestros resultados en otra cohorte de datos, se utilizó la base de datos de cáncer de mama METABRIC disponible en la herramienta bioinformática *cbioportal*. Encontramos que la expresión de mRNA de CD105 (ENG) estaba asociada con el estado de los RE y RP. Dentro de las PCM, estadios I y II, con expresión negativa de RE, el 75% mostró una alta expresión de CD105 ($p = 0,0002$) (**Tabla 17, Figura 20A**). Además, al analizar la población de las pacientes con expresión negativa de RP, encontramos que el 61,29% presentaba una expresión elevada de CD105 ($p = 0,0180$) (**Tabla 17, Figura 20B**). En relación con este resultado, observamos que el grupo de las pacientes con alta expresión de CD105 tenía una proporción menor de cáncer de mama subtipo luminal B en comparación con el grupo con baja expresión (29,63% vs. 52,94%, respectivamente, $p = 0,0090$) (**Tabla 17, Figura 20H**). Además, se encontró una proporción aumentada del subtipo sobreexpresión de HER2/neu en el grupo con alta expresión de CD105 en comparación con el grupo con baja expresión de este marcador (27,78% vs. 11,76%, respectivamente, $p = 0,0030$) (**Tabla 17, Figura 20H**). No encontramos ninguna asociación significativa entre la expresión de CD105 y la edad del paciente, el tamaño del tumor, el grado histológico o la presencia de micro/macrometástasis en los ganglios linfáticos regionales.



Características clinicopatológicas		CD105			
		n	Alta expresión		p
			n	%	
Edad (años)	<50	24	14	58,33	0,4920
	≥50	81	40	49,38	
Tamaño tumoral (cm)	≤2	47	24	51,06	1
	>2	58	30	51,72	
RE	Negativo	40	30	75,00	0,0002
	Positivo	65	24	36,92	
RP	Negativo	62	38	61,29	0,0180
	Positivo	43	16	37,21	
HER2/neu	Negativo	84	39	46,43	0,0520
	Positivo	21	15	71,43	
Grado histológico	G1	3	1	33,33	0,4320
	G2	34	15	44,12	
	G3	66	37	56,06	
Ganglios linfáticos regionales	Negativo	62	32	51,61	1
	Positivo	43	33	76,74	
Recidiva local	Negativo	61	30	49,18	0,6830
	Positivo	44	24	54,55	
Muerte	Negativo	46	20	43,48	0,1720
	Positivo	59	34	57,63	
Luminal A	Negativo	74	41	55,41	0,2850
	Positivo	31	13	41,94	
Luminal B	Negativo	75	45	60,00	0,0090
	Positivo	30	9	30,00	
TNBC	Negativo	82	39	47,56	0,1610
	Positivo	23	15	65,22	
Sobreexpresión HER2/neu	Negativo	84	37	44,05	0,0030
	Positivo	21	17	80,95	

Tabla 17. Expresión del mRNA de CD105 en células FSP (+), FAP (+) y CD34 (-) dentro del tumor de mama utilizando un enfoque bioinformático. Asociación de la expresión de CD105 en células estromales (tipo fibroblasto) con marcadores pronósticos clásicos, recidiva local, ocurrencia de metástasis, ocurrencia de metástasis óseas, ocurrencia de metástasis viscerales y ocurrencia de metástasis mixtas en 105 pacientes con cáncer de mama ductal infiltrante temprano del conjunto de datos de cáncer de mama METABRIC. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para evaluar la asociación entre variables, con un valor de $p < 0,0500$. RE: receptor de estrógeno, RP: receptor de progesterona, HER2/neu: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano. TNBC: cáncer de mama triple negativo.

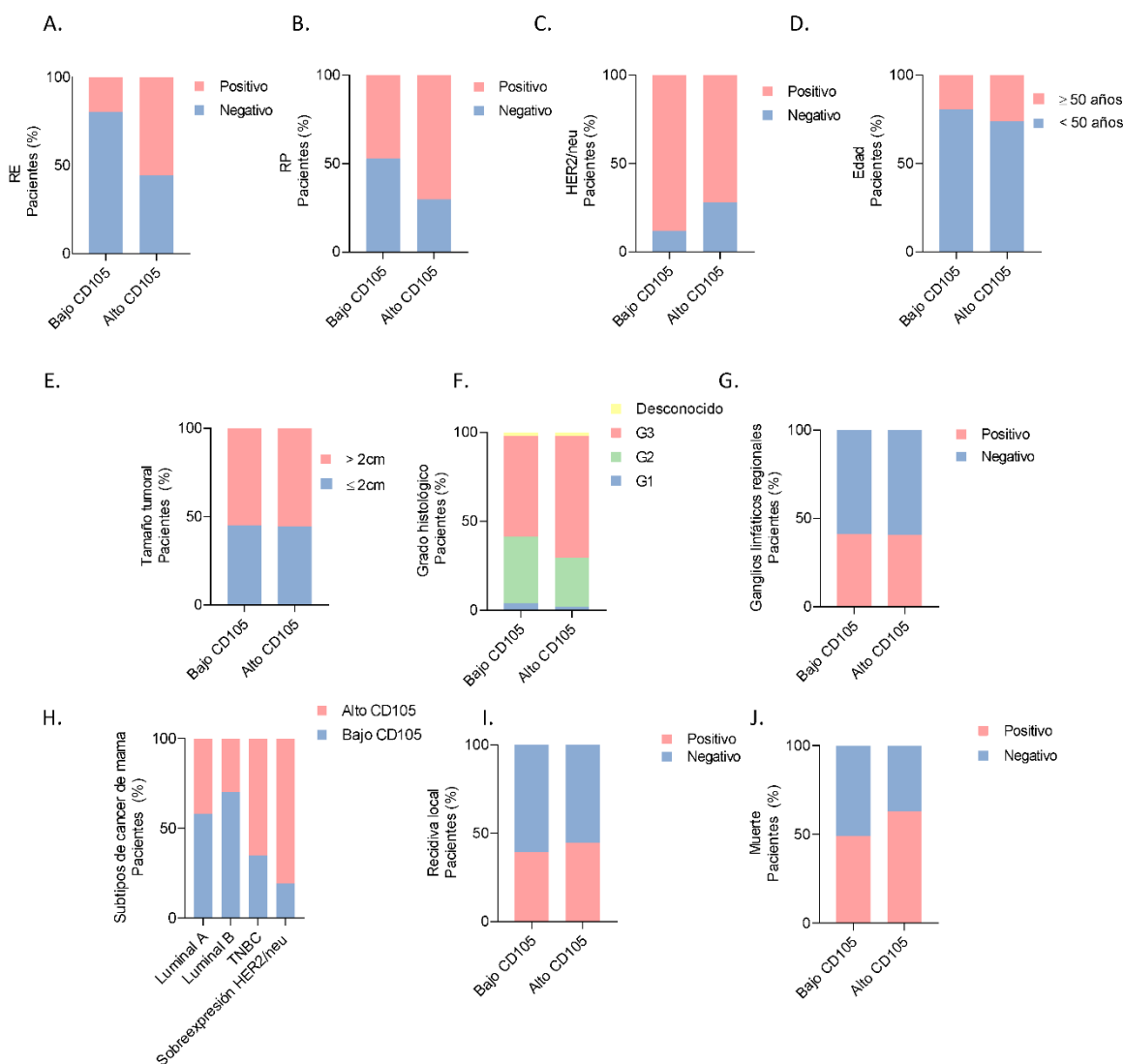


Figura 20. Expresión del mRNA de CD105 en células FSP (+), FAP (+) y CD34 (-) dentro del tumor de mama utilizando un enfoque bioinformático. Representación gráfica de las asociaciones entre la expresión de CD105 y factores pronósticos clásicos, así como otros datos clínico-patológicos, previamente mostrados (ver tabla 13). RE: receptor de estrógeno, RP: receptor de progesterona, Her2/neu: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano. TNBC: cáncer de mama triple negativo. Cohorte de 105 pacientes con cáncer de mama ductal infiltrante temprano del conjunto de datos de cáncer de mama METABRIC.



Finalmente, encontramos que la expresión de CD105 estaba asociada con la sobrevida global de las PCM (**Tabla 18, Figura 21B**). El grupo de pacientes con alta expresión de CD105 tenía una sobrevida más baja que el grupo con baja expresión ($p = 0,0150$) (**Tabla 18, Figura 21B**).

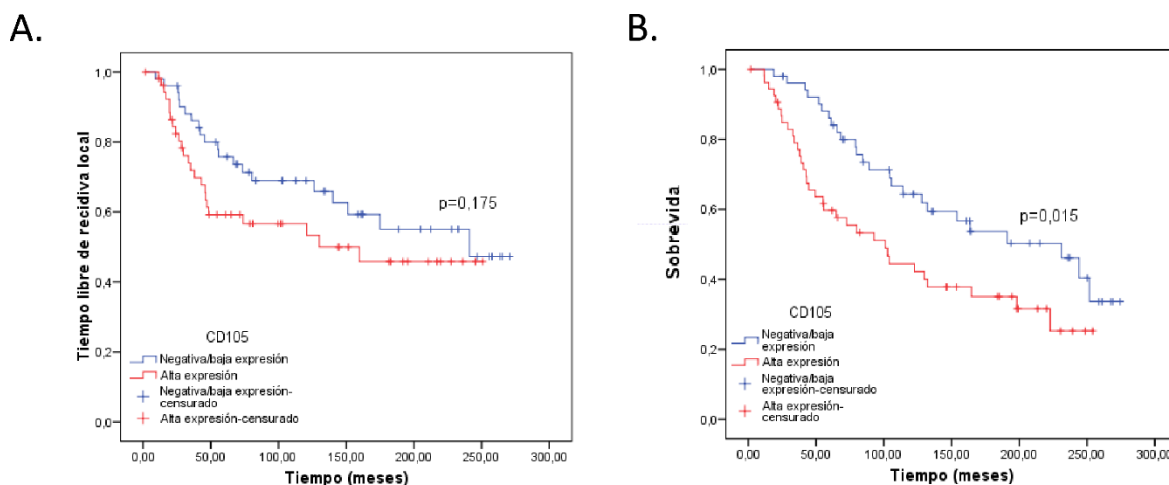


Figura 21. Asociación de la expresión del mRNA de CD105 (ENG) en células FSP (+), FAP (+) y CD34 (-) dentro del tumor de mama utilizando un enfoque bioinformático con el tiempo libre de recidiva local y sobrevida global. Curvas de Kaplan-Meier (análisis univariado) marcadas en rojo representan datos de muestras con alta expresión de CD105, mientras que las curvas azules representan muestras con expresión negativa/baja de CD105. Se empleó la prueba de Log Rank (Mantel-Cox) para evaluar las curvas de Kaplan-Meier, con un valor de $p * < 0,0500$. Tiempo libre de recidiva local (RFS) y sobrevida global (OS). Cohorte de 105 pacientes con cáncer de mama ductal infiltrante temprano del conjunto de datos de cáncer de mama METABRIC.

CD105	RFS		OS	
	Tiempo (meses)	p	Tiempo (meses)	p
Baja expresión RNA m	181,03 $\pm$ 15,42	0,1750	179,57 $\pm$ 13,77	0,0150
Alta expresión RNA m	143,91 $\pm$ 15,55		125,01 $\pm$ 13,43	

Tabla 18. Asociación de la expresión del mRNA de CD105 (ENG) en células FSP (+), FAP (+) y CD34 (-) dentro del tumor con el tiempo libre de recidiva local y sobrevida global en pacientes con cáncer de mama ductal infiltrante temprano utilizando un enfoque bioinformático. La tabla muestra detalles de tiempo libre de recidiva local (RFS) y sobrevida global (OS) que corresponden a los grupos de baja y alta expresión del mRNA de CD105. Valores expresados como media $\pm$ error estándar ($X \pm ES$). Se empleó la prueba de Log Rank (Mantel-Cox) para evaluar las curvas de Kaplan-Meier, con un valor de $p * < 0,0500$. Cohorte de 105 pacientes con cáncer de mama ductal infiltrante temprano del conjunto de datos de cáncer de mama METABRIC.



PARTE B

Estudio de las características fenotípicas de las células estromales fusiformes (*fibroblast-like*)

Antes de la separación en columna de las subpoblaciones de fibroblastos

Inicialmente, buscamos determinar el porcentaje de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) en las muestras de tejido fresco antes de los pasajes en columna magnética para evaluar la proporción inicial de estos fibroblastos. Para lograr esto, evaluamos el porcentaje de fibroblastos que expresaban CD105 y CD34 utilizando citometría de flujo. Nuestro estudio reveló que el porcentaje de fibroblastos que expresaban CD105 y CD34 era $28,80 \pm 4,52\%$ y $4,14 \pm 1,03\%$ ($X \pm SE$, $n=10$), respectivamente. Posteriormente, una vez que el bloque de parafina de cada paciente estuvo disponible, evaluamos la expresión de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) en el estroma del tumor mamario, no asociado a la vasculatura, utilizando la técnica de inmunohistoquímica. Observamos que el porcentaje de fibroblastos, no asociado a la vasculatura, que expresaban CD105 en las muestras de los 10 PCM incluidos fue de $19,70 \pm 3,95\%$. Por lo tanto, el haber analizado el porcentaje inicial de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) es importante porque confirma que estamos comenzando con muestras que contienen una proporción importante de estos fibroblastos, que luego serán aislados utilizando separación magnética en columna. Esto es particularmente relevante dado que cada paciente tiene una composición única en su estroma tumoral mamario.

Después del aislamiento de ambas subpoblaciones [CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-)]

Después de realizar la separación magnética y el enriquecimiento de ambas subpoblaciones de fibroblastos, CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-), era crucial comenzar caracterizándolas fenotípicamente utilizando citometría de flujo. Particularmente nos interesó estudiar los marcadores de MSCs, como CD105, CD90 y CD73, para comprender su posible origen mesenquimal. Partimos de la premisa de que nuestra fracción de fibroblastos



CD105(+)/CD34(-), al tener el marcador mesenquimal CD105, podría tener tal origen potencial. En este sentido, encontramos que el porcentaje de células que expresaban CD73 y CD90 era notablemente alto en ambos tipos de subpoblaciones de fibroblastos. No se observaron diferencias significativas entre estas dos subpoblaciones celulares (**Figura 22 y Tabla 19**). Los resultados indican que la subpoblación CD105(+) cumple con los criterios fenotípicos mínimos para ser MSC, lo que sugiere que esta subpoblación fibroblástica puede derivarse de MSCs de MO [32]. Sin embargo, no se puede descartar que la otra subpoblación haya perdido el marcador CD105 en algún momento durante la diferenciación y/o activación *in vivo*, manteniendo CD90 y CD73. Además, se identificó una expresión diferencial en el porcentaje de células que expresaban CD146, otro marcador de MSCs/osteoprogenitores (**Figura 22 y Tabla 19**). La subpoblación de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) mostró un mayor porcentaje de células que expresan este marcador de osteoprogenitor en comparación con los fibroblastos CD105(-)/CD34(-). En cuanto al porcentaje de células que expresaban marcadores negativos de MSCs, como CD34, CD11b y CD19, fue bajo como se esperaba, y no se encontraron diferencias significativas entre estas dos subpoblaciones. Por lo tanto, ambas subpoblaciones de fibroblastos se consideran negativas para estos marcadores.

Por otro lado, nos interesó determinar si estas dos subpoblaciones expresaban marcadores de CAFs, como FAP y α -SMA. Encontramos que tanto la subpoblación de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) como la de fibroblastos CD105(-)/CD34(-) expresaban α -SMA y FAP, sin diferencias significativas en el porcentaje de células que expresaban estos marcadores. Esto indica que ambas poblaciones estromales son fibroblastos activados en el microambiente tumoral mamario (**Figura 22 y Tabla 19**). Sin embargo, se observa que el porcentaje de células positivas para el marcador FAP tiende a ser mayor en comparación con α -SMA en ambas subpoblaciones (**Tabla 19**).

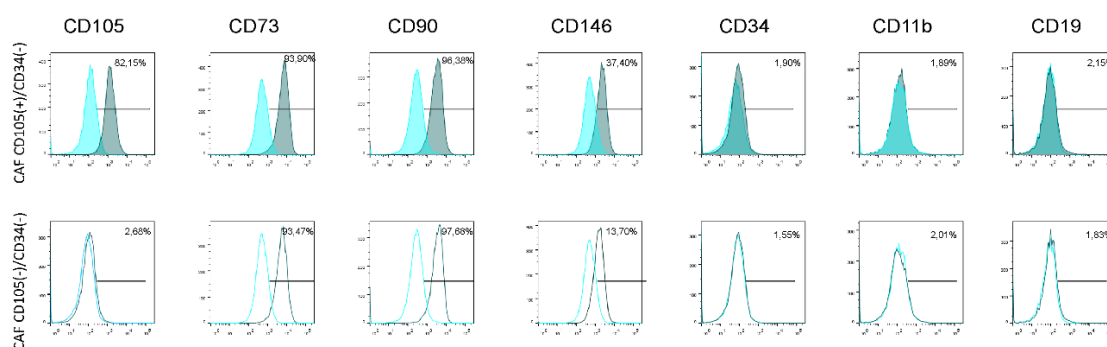
También nos resultó importante examinar el perfil de expresión de otros marcadores asociados con funciones pro-tumorales, como migración, invasión y resistencia a la terapia, entre otros, incluyendo CD106, desmina, TNC, P4H β y PDGFR α . Observamos diferencias en el porcentaje de células que expresaban CD106, PDGFR α , desmina y P4H β entre las dos



subpoblaciones. La subpoblación de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) exhibió un mayor porcentaje de células que expresaban CD106 en comparación con los fibroblastos CD105(-)/CD34(-) (Figura 22 y Tabla 19). Además, la subpoblación de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) también tenía un mayor porcentaje de células que expresaban PDGFR α , desmina y P4H β (Figura 22 y Tabla 19). Finalmente, no se encontraron diferencias en la expresión de cada marcador/célula (IFM) estudiada al comparar ambas subpoblaciones de fibroblastos (Tabla 19).

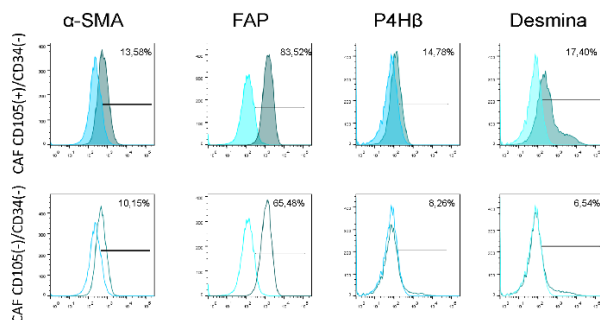
A.

Marcadores de MSCs



B.

Marcadores de CAFs



C.

Otros marcadores

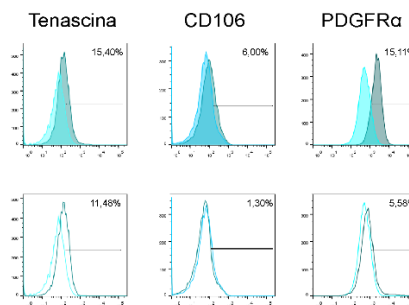


Figura 22. Caracterización fenotípica de las subpoblaciones fibroblásticas CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) de pacientes con cáncer de mama temprano. Histogramas representativos de citometrías de flujo de antígenos en fibroblastos CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) de una paciente con cáncer de mama (CD105(+)/CD34(-), ■; (CD105(-)/CD34(-), □); Control de isotipo (■ y □, respectivamente). En el margen superior derecho del histograma se muestra el porcentaje (%) de CAFs positivos para cada marcador. MSCs células madre mesenquimales/estromales, CAFs: fibroblastos asociados al cáncer.



	CD105(+)/CD34(-)	CD105(-)/CD34(-)		CD105(+)/CD34(-)	CD105(-)/CD34(-)	
	células positivas	células positivas	<i>p</i>	IFM	IFM	<i>p</i>
	(%)	(%)				
CD105	81,52 ± 0,86	5,93 ± 1,36	< 0,0001	1,57 ± 0,30	1,33 ± 0,27	0,5749
CD73	94,24 ± 1,41	93,47 ± 1,18	0,8187	3,25 ± 0,70	3,01 ± 0,77	0,8284
CD90	95,88 ± 1,37	97,68 ± 0,23	0,3903	2,86 ± 0,43	3,16 ± 0,82	0,7593
CD146	13,65 ± 2,69	4,25 ± 1,42	0,0164	1,27 ± 0,47	1,25 ± 0,24	0,9854
CD34	4,06 ± 1,03	3,51 ± 1,06	0,3975	1,04 ± 0,09	0,95 ± 0,04	0,3896
CD11b	3,78 ± 1,34	3,41 ± 1,19	0,5180	0,69 ± 0,31	0,93 ± 0,04	0,5922
CD19	2,52 ± 0,08	2,37 ± 0,05	0,1240	1,26 ± 0,58	0,93 ± 0,11	0,6154
α-SMA	14,36 ± 2,74	10,93 ± 2,81	0,3989	3,54 ± 1,54	4,50 ± 1,40	0,6998
FAP	80,37 ± 4,29	64,80 ± 8,39	0,1334	1,95 ± 0,37	2,76 ± 1,00	0,4963
P4Hβ	15,56 ± 1,59	7,89 ± 1,95	0,0281	2,57 ± 1,07	3,50 ± 1,03	0,6788
Desmina	18,22 ± 1,42	7,67 ± 2,35	0,0040	0,68 ± 0,27	1,09 ± 0,05	0,2713
Tenascina	27,91 ± 7,46	16,94 ± 5,86	0,3809	1,51 ± 0,74	0,83 ± 0,21	0,4609
CD106	5,78 ± 0,35	1,88 ± 0,17	0,0010	1,46 ± 0,84	0,57 ± 0,07	0,3678
PDGFRα	16,05 ± 2,04	5,96 ± 1,39	0,0040	0,94 ± 0,05	0,87 ± 0,10	0,5956

Tabla 19. Análisis fenotípico: Porcentaje e índice de fluorescencia media/relativa de las subpoblaciones fibroblásticas CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) de pacientes con cáncer de mama temprano que expresan CD105, CD73, CD90, CD146, CD34, CD11b, CD19, α-SMA, FAP, subunidad β de prolil 4-hidroxilasa, desmina, tenascina, CD106 y receptor α del factor de crecimiento derivado de plaquetas por citometría de flujo (n=10). Los datos se representan como media ± error estándar (X±ES). **p* < 0,0500. Análisis estadístico: prueba t no pareada con corrección de Welch. Índice de fluorescencia media/relativa (IFM), subunidad β de prolil 4-hidroxilasa (P4Hβ) y receptor α del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR-α).



Diferenciación de las células madres mesenquimales de médula ósea de donantes sanos en fibroblastos asociados al cáncer mediante el uso de medios condicionados de células tumorales mamarias de las líneas MCF-7 y MDA-MB231

Caracterización fenotípica de las células madre/ estromales mesenquimales y plasticidad

Las células estromales provenientes del 3^{er} subcultivo han sido cultivadas a baja densidad y constituyen una población de células adherentes enriquecidas en MSCs de alto grado de multipotencialidad y auto-renovación. El análisis de la expresión de moléculas de superficie por citometría de flujo indicó que las MSCs provenientes de MO de las VS (n = 2) cumplen con los criterios fenotípicos mínimos para clasificarlas como MSCs acorde a la posición tomada por la Sociedad Internacional de Terapia Celular en el año 2006. Se obtuvo una inmuno-tinción positiva (96,7 a 98,5 % de las MSCs) para los marcadores CD73, CD105 y CD90, falta de expresión de CD11b, CD34 y CD79a, lo que indica su naturaleza de MSCs (Figura 23).

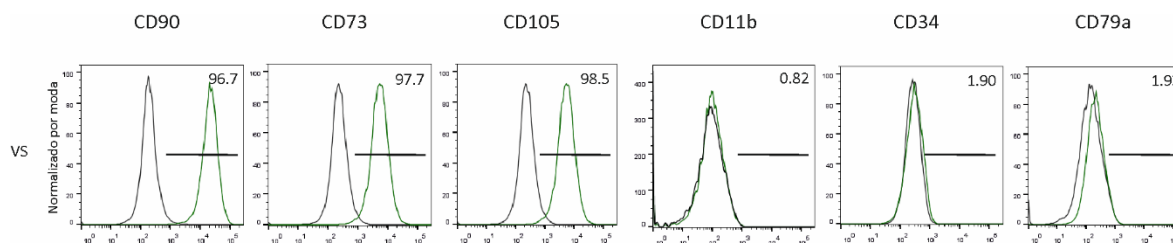


Figura 23. Caracterización fenotípica de las células madre mesenquimales/ estromales de médula ósea. Histogramas representativos de citometrías de flujo de antígenos de superficie en células madre/ estromales mesenquimales (MSCs) de una voluntaria sana (VS, █). Control de isotipo (█). En el margen superior derecho del histograma se muestra el porcentaje (%) de MSCs positivas para cada marcador.



Respecto a la diferenciación a linaje osteogénico hemos observado la presencia de depósitos de calcio en la matriz de mineralización ósea, uniformemente distribuido (**Figura 24A**). Además, los protocolos de diferenciación y técnicas de reconocimiento permitieron identificar por microscopia óptica adipocitos y condroblastos, así como vacuolas lipídicas (Oil Red-O positivas) en los adipocitos y colágeno II positivo en la matriz condrocítica a (**Figura 24B y 24C**). Por lo tanto, las MSCs de las VS utilizadas en este estudio cumplen con los criterios mínimos que definen a las MSCs [166].

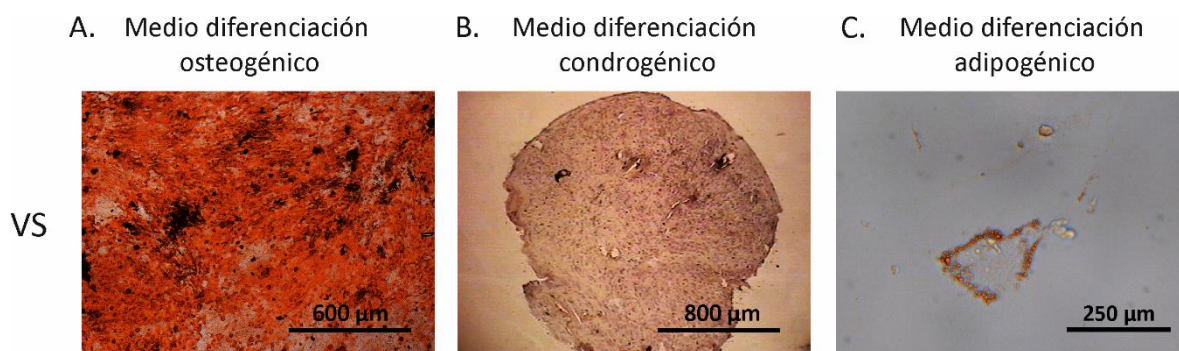


Figura 24. Diferenciación de células madre mesenquimales/estromales de médula ósea normal. **A.** Imágenes representativas de cultivos de células madre mesenquimales/ estromales (MSCs) en condiciones diferenciación osteogénica para una voluntaria sana (VS). Tinción: Alizarin Red (100X). **B.** Imágenes representativas de cultivos de MSCs en condiciones diferenciación condrogénica para una VS. Inmunohistoquímica, Anti-Colágeno II (100X). **C.** Imágenes representativas de cultivos de MSCs en condiciones diferenciación adipogénica para una VS. Tinción: Oil Red-O (200X).

Capacidad de auto-renovación/ eficiencia de clonado para dar unidad formadora de colonias fibroblásticas.

Las MSCs de MO de ambas VS tuvieron capacidad de formar colonias con más de 50 células de morfología fusiforme. La eficiencia de formación de colonias (n° de CFU-F/ 1.250 MSCs), es decir el número de CFU-F formadas cada 1.250 MSCs fue ($X \pm ES$): VS1= $45 \pm 1,5$ y VS2= 42 ± 2 (**Figura 25**).

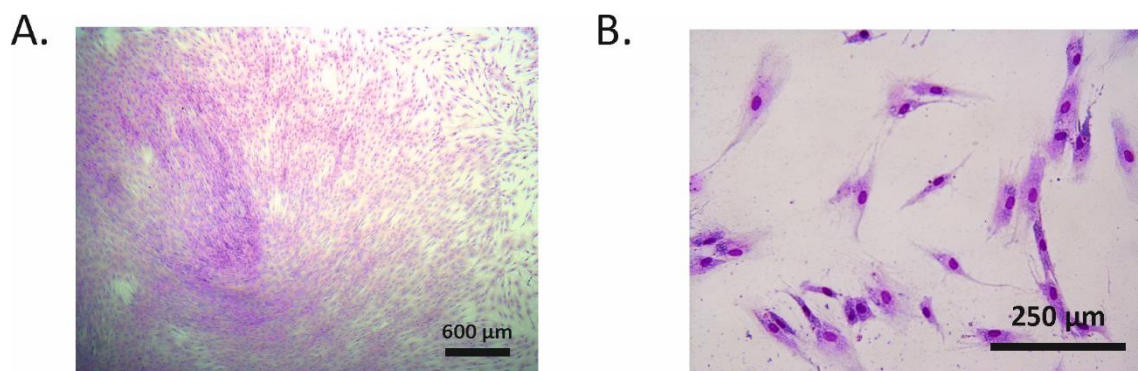


Figura 25. Auto-renovación de las células madre mesenquimales/estromales de médula ósea normal. **A.** Imagen representativa de una unidad formadora de colonia-fibroblástica (CFU-F) observada en una voluntaria sana. Tinción de Giemsa (40X). **B.** Morfología fusiforme de las células estromales observada en el ensayo de CFU-F de una voluntaria sana. Tinción de Giemsa (200X).

Por lo tanto, estos resultados confirman que las MSCs de ambas VS presentan un fenotipo positivo para CD73, CD90 y CD105, poseen capacidad de diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica, así como eficiencia de clonación para formar CFU-F. Por ende, indican que se comportan como células madre mesenquimales.

Diferenciación de células madre mesenquimales/ estromales de médula ósea a fibroblastos asociados al cáncer

Luego de realizar los ensayos de caracterización de las MSCs de MO, nos interesó estudiar el efecto de los MCo de las líneas tumorales sobre las mismas, para determinar si los factores liberados por las células tumorales *in vitro* pueden inducir la diferenciación de las MSCs de MO en CAFs, un evento que posiblemente ocurre, como encontraron otros autores, al inicio del desarrollo del tumor de mama y favorece su evolución. Para ello, investigamos cualitativamente la expresión de marcadores de MSCs y de fibroblastos activados, tanto en las MSCs de MO antes de la diferenciación como después de haber sido tratadas con los MCo de las correspondientes líneas mediante la intensidad de marca por la técnica inmunocitoquímica. Después de 21 días de cultivo con los MCo provenientes de ambas líneas MCF-7 y MDA-MB231, el 100% de las MSCs de MO incrementaron la



intensidad de marca en los marcadores α -SMA y FAP (moderada a abundante), relacionados con la diferenciación a CAFs y su activación (**Figura 26**). Interesantemente, el 100% de estas células mantuvieron la expresión de CD105 (moderada) y CD146 (abundante) (**Figura 26**), no encontrándose diferencias entre las MSCs pre- y post-diferenciación. Al analizar las MSCs tratadas con los medios de la línea MCF-10A (no tumoral) y las tratadas con α -MEM-sup adicionado con 10% SBF (control de no diferenciación), se observó que la expresión de α -SMA y FAP se da en el 100% de las células y la intensidad de marca de ambas moléculas/célula se mantiene leve/baja. Por el contrario, al analizar el perfil de marcadores de las MSCs expuestas a medio α -MEM-sup adicionado con 10% de SBF e hidrocortisona (control positivo de diferenciación), se encontró un aumento en la expresión de los marcadores característicos de CAFs/ célula y se expresó en el 100% de las células tratadas (**Figura 26**), resultados que fueron semejantes a los obtenidos con MCo de las células tumorales MCF-7 y MDA-MB231. Tampoco tuvieron ningún efecto los controles de medio de cada línea celular utilizada (MCF-7, MDA-MB231 y MCF-10A) sobre la expresión de α -SMA y FAP (*datos no mostrados*).

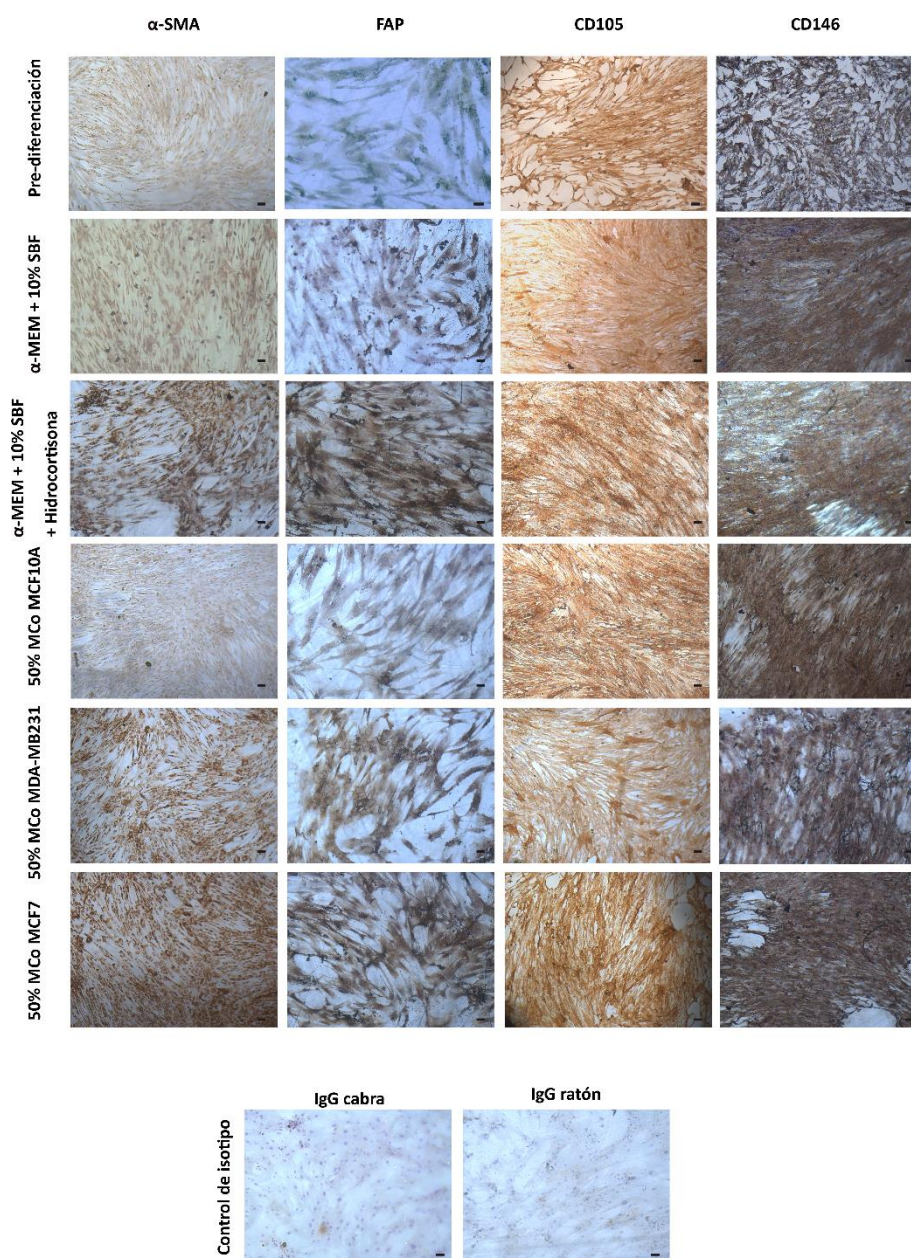


Figura 26. Expresión de actina del músculo liso tipo α , proteína de activación del fibroblasto, CD105 y CD146 en células madre mesenquimales/ estromales de médula ósea de 2 voluntarias sanas, tanto en su estado original como después de ser diferenciadas en fibroblastos asociados al cáncer por efecto de los medios condicionados del cultivo de células tumorales mamarias de las líneas MCF-7 y MDA-MB231. Se utilizó como control los medios condicionados (MCo) de las células epiteliales mamarias de la línea MCF-10A. Se muestran inmunocitoquímicas representativas de células madre mesenquimales (MSCs) cultivadas con 50% de los MCo de los respectivos cultivos de líneas, tanto tumorales como no tumorales, durante 21 días, así como MSCs cultivadas en medio α -MEM suplementado y adicionado con 10% de suero bovino fetal (SBF, control de no diferenciación) y MSCs cultivadas en medio α -MEM suplementado y adicionado con 10% de SBF y 10^{-7} M de hidrocortisona (control positivo de diferenciación). Además, las MSCs se incubaron con inmunoglobulinas (Ig)G de ratón e IgG de cabra normal como controles de isotipo. El control de



isotipo que se ejemplifica fue realizado sobre MSCs tratadas con α MEM suplementado y adicionado con 10% SBF. Se utilizó el sistema peroxidasa/3-3'-diaminobencidina para revelar (precipitado marrón) y hematoxilina para la tinción nuclear (violeta). Visualización en microscopio óptico (400X). Las barras de escala representan 50 μ m. α -SMA: actina del músculo liso tipo α , FAP: proteína de activación del fibroblasto.

Estudio de la capacidad de auto-renovación de las subpoblaciones fibroblásticas CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) y de la morfología de las células estromales mediante el ensayo de unidades formadoras de colonias fibroblásticas

Cada CFU-F se origina a partir de una única MSC o célula diferenciada que mantiene propiedades de *stemness*, en particular auto-renovación, y representa *in vitro* lo que ocurre con las células madre *in vivo*. La población celular dentro de las CFU-F es heterogénea, comprendiendo una jerarquía de precursores y progenitores mesenquimales comprometidos de potencialidad tetra, tri, bi y unipotencial, células diferenciadas similares a fibroblastos, así como MSCs. En diversas enfermedades, el número y las características de las células estromales que forman CFU-F pueden diferir significativamente de las normales, lo que podría ofrecer valiosa información sobre los mecanismos patogénicos [175]. Por lo tanto, basándose en la premisa de que solo las MSCs y/o sus células derivadas pueden formar colonias, este ensayo determina cuántas células en las subpoblaciones estudiadas tienen auto-renovación, es decir el potencial de formar colonias de fibroblastos. Esto proporciona información no solo sobre su posible origen, sino también sobre sus capacidades de auto-renovación y proliferación. Los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) exhibieron una eficiencia de clonado similar a los fibroblastos CD105(-)/CD34(-) pues dieron un número semejante de CFU-F/ 2.500 células plaqueadas (**Figura 27A y B**). Recordemos, que la capacidad de auto-renovación implica divisiones simétricas y asimétricas de la célula madre, así como proliferación de mesenquimales más comprometidas. Por lo tanto, tendremos células madre y precursores/ progenitores mesenquimales dentro de cada colonia. Sin embargo, se identificó un mayor número de células estromales por campo óptico de CFU-F en los cultivos de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) ($p=0,0412$) (**Figura 27C**). Este hallazgo sugiere que las colonias formadas por fibroblastos CD105(+) tenían un mayor



número de células y, en consecuencia, un mayor tamaño de la colonia, lo que indica una mayor capacidad de auto-renovación y proliferación. Al analizar la morfología celular dentro de las colonias, se observó que las células que componían los CFU-F de CD105(+) exhibían un área menor ($p=0,0272$) (**Figura 27D**), especialmente debido a un eje horizontal más pequeño ($p=0,0049$) (**Figura 27F**).

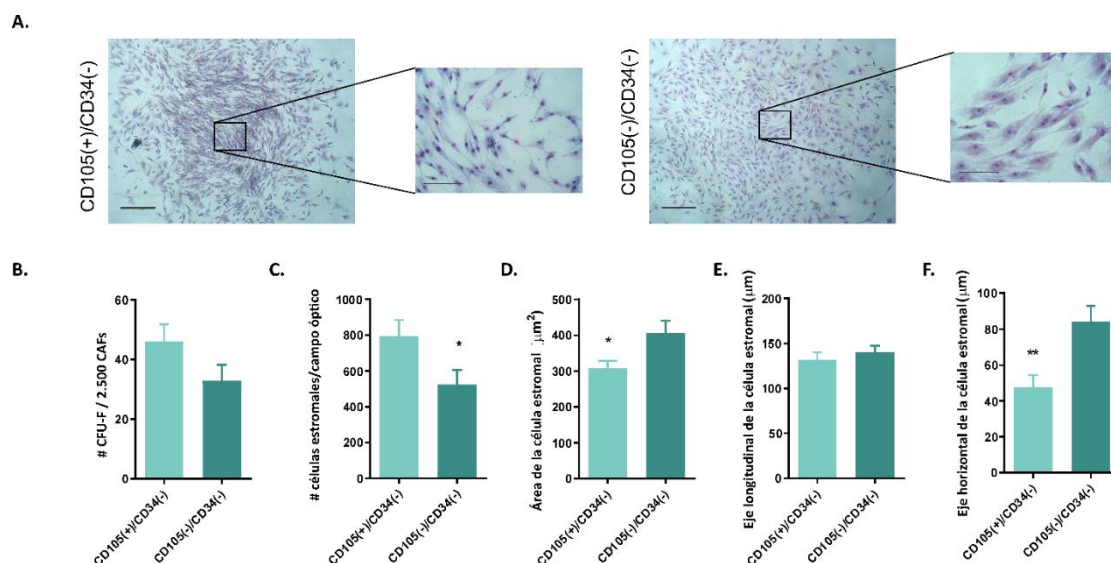


Figura 27. Capacidad de auto-renovación de las subpoblaciones de fibroblastos CD105 (+)/CD34(-) (izquierdo) y CD105 (-)/CD34(-) (panel derecho) de pacientes con cáncer de mama temprano . A. Tamaño y forma de las unidades formadoras de colonias fibroblásticas (CFU-F) observadas en un paciente con cáncer de mama (PCM), representativo. Tinción de Giemsa (40x y 200x en el recuadro). La barra de escala representa 600 μm y 200 μm en el recuadro. **B.** Número (#) de CFU-F observadas ($p=0,1133$). **C.** Número (#) de fibroblastos por campo de microscopio en cada CFU-F (* $p=0,0412$). **D.** Área de células estromales en regiones típicas de cada cultivo de CFU-F (* $p=0,0272$). **E.** Eje elíptico mayor/longitudinal de células estromales en regiones típicas de cultivos de CFU-F ($p=0,4976$). **F.** Eje elíptico menor/horizontal de células estromales en regiones típicas de cultivos de CFU-F (** $p=0,0049$). Todos los valores fueron expresados como media $\pm$ error estándar ($X \pm ES$). Análisis estadístico: prueba t no pareada con corrección de Welch. Los asteriscos indican diferencias significativas. PCM estudiados 10.



Viabilidad celular como una medida indirecta de la capacidad de proliferación y ciclo celular en las subpoblaciones fibroblásticas CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-)

Un mayor índice de proliferación de los CAFs a menudo se asocia con una mayor agresividad tumoral, ya que puede reflejar una mayor capacidad para el crecimiento rápido y la expansión de las células tumorales inducida por estos fibroblastos activados [41, 47, 176]. Por lo tanto, encontramos interesante determinar el estado proliferativo de estas dos subpoblaciones de fibroblastos y evaluar si había diferencias entre ellas. Los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) exhibieron una mayor tasa de viabilidad celular y, en consecuencia, una mayor tasa de proliferación celular en comparación con la población CD105(-)/CD34(-) ($p=0,0460$) (**Figura 28A**). En línea con esta observación, los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) también mostraron un mayor porcentaje de células en la fase S en comparación con los CD105(-)/CD34(-), y una menor proporción de células en la fase G0/G1 ($p=0,0207$ y $p=0,0067$; respectivamente) (**Figura 28B**).

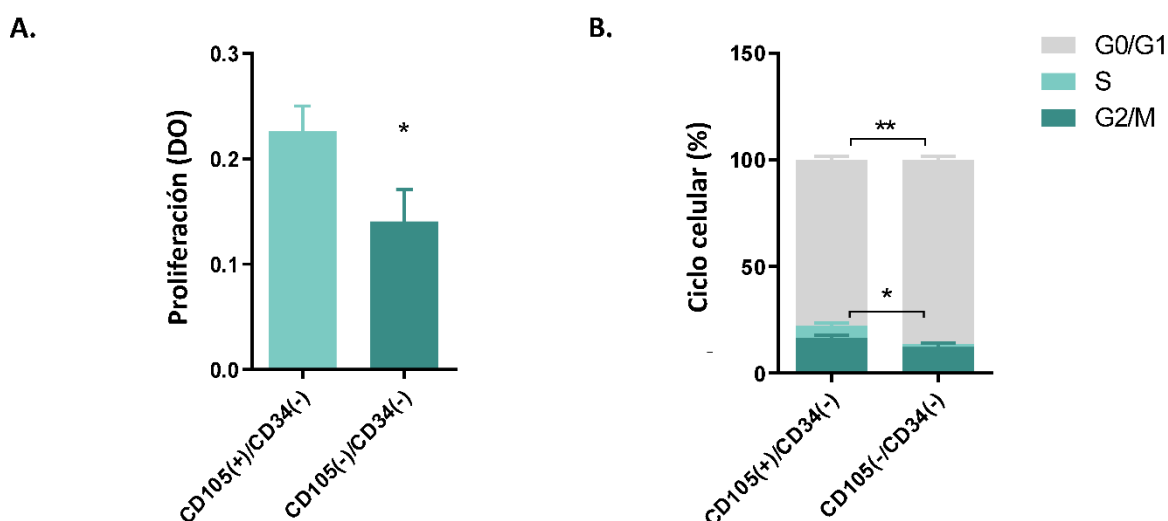


Figura 28. Estudio del número de células viables como una medida indirecta de proliferación celular y la progresión del ciclo celular de los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-). A. Proliferación de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) (pacientes con cáncer de mama, PCM=10). Valores expresados como media $\pm$ error estándar ($X \pm ES$). Análisis estadístico: prueba t no pareada con corrección de Welch (el asterisco indica diferencia significativa, $*p=0,0460$). DO:



densidad óptica. **B. Análisis del ciclo celular.** Porcentaje de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) en cada fase del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) (PCM=10). Valores expresados como $X \pm ES$. Análisis estadístico: prueba *t* no pareada con corrección de Welch. Los asteriscos indican diferencias significativas (* $p=0,0207$ y ** $p=0,0067$).

Estudio de la expresión de genes de *stemness* (auto-renovación y multipotencialidad, particularmente diferenciación osteoblástica), así como genes relacionados con la regulación de la osteoclastogénesis, capacidad de migración y evolución tumoral en las subpoblaciones fibroblásticas CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-)

Otro aspecto que encontramos interesante fue evaluar los niveles de expresión de genes relacionados con la fisiología de las MSCs, como su propiedad de *stemness*, la cual incluye la auto-renovación y multipotencialidad (en particular a través de evaluar SOX2 y OCT4). También nos interesó estudiar genes asociados con la diferenciación osteoblástica y la regulación de la osteoclastogénesis (por ejemplo, RUNX2, BMP6 y RANKL), ya que el estudio retrospectivo del presente proyecto (parte A) indicó que los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) estaban asociados con microcalcificaciones anárquicas y vinculados a la ocurrencia de metástasis óseas [177]. Esto nos llevó a hipotetizar que estos fibroblastos podrían derivar de las MSCs y estar involucrados en los trastornos óseos en sitios secundarios. Además, nos interesó estudiar la expresión de otros genes relacionados con su migración y migración tumoral, así como con la progresión tumoral, como VCAM (CD106), CCL-2, IL-6, TNC y RANKL [89, 92, 178–184].



Encontramos que los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) exhibieron niveles más altos de expresión génica de MCAM (CD146, marcador de osteoprogenitores), RUNX2, RANKL, VCAM (CD106) y TNC en comparación con los fibroblastos CD105(-)/CD34 (-) ($p=0,049$, $p=0,0237$, $p=0,0293$, $p=0,0303$ y $p=0,0251$, respectivamente) (**Figura 29**). Encontramos expresión de los otros genes (SOX2, OCT4, BMP-6, CCL-2 e IL-6) pero dicho valor no mostró diferencias significativas entre las dos subpoblaciones de fibroblastos.

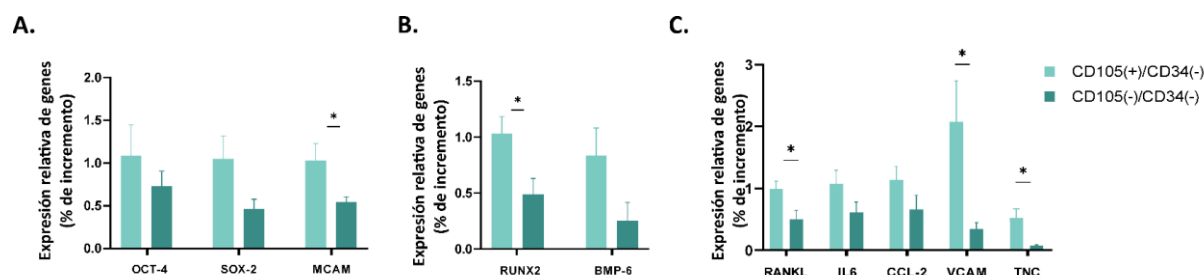


Figura 29. Expresión de genes de stemness, regulación de la osteoclastogénesis y migración en los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) de pacientes con cáncer de mama . A. Expresión génica de factores de stemness (auto-renovación y multipotencia) como OCT-4, SOX-2 y MCAM utilizando reacción en cadena de polimerasa en tiempo real cuantitativa (q-PCR). **B.** Expresión génica de factores osteogénicos, como RUNX-2 y BMP6, así como factores osteoclásticos como CCL-2 e IL-6. **C.** Expresión génica de factores relacionados con el proceso de migración de células estromales mesenquimales, así como células tumorales de mama y evolución tumoral, como: VCAM, RANKL, CCL-2, IL-6 y tenascina (TNC). Todos los resultados fueron normalizados al gen de referencia GAPDH. Los valores se expresan como media $\pm$ error estándar ($X \pm ES$). Análisis estadístico: prueba t de Student no pareada con corrección de Welch. Los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0,0500$). Pacientes con cáncer de mama: 10

Estudio del estrés oxidativo de las subpoblaciones fibroblásticas CD105(+)/CD34(-) y CD105 (-)/CD34(-)

Dado que es sabido que los niveles elevados de ROS dentro de los fibroblastos conducen a la liberación de señales pro-invasivas [19, 73, 185], nos interesó estudiar los niveles de ROS totales (CellROX) y ROS mitocondriales (MitoSOX) en ambas subpoblaciones de fibroblastos. Los CAFs CD105(+)/CD34(-) mostraron un porcentaje significativamente mayor de células positivas para ambas sondas, CellROX y MitoSOX ($p=0,0393$ y $p=0,0110$, respectivamente) en comparación con los valores de CD105(-)/CD34(-) (**Figura 30**). Además,



encontramos valores similares de IFM (nivel de ROS por célula) para ambas sondas, independientemente del tipo de subpoblación fibroblástica (**Figura 30**).

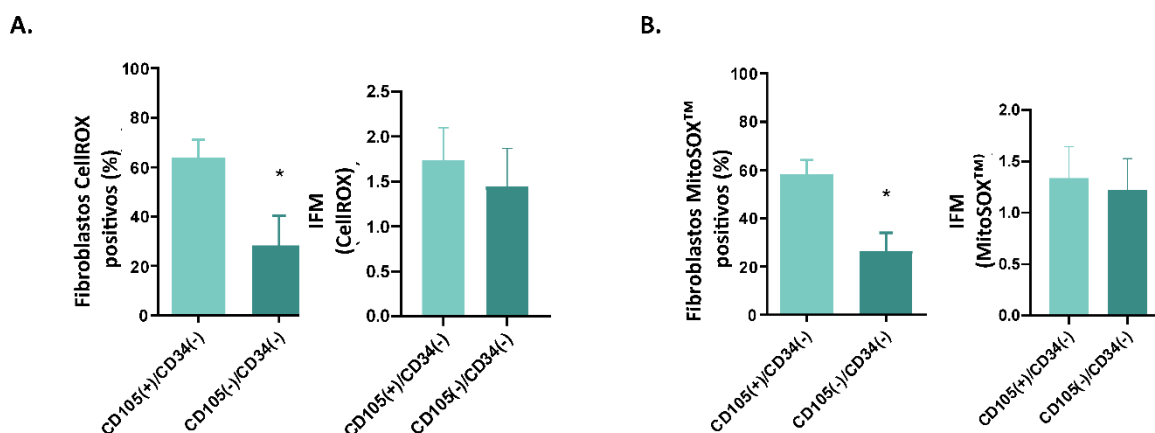


Figura 30. Niveles de especies oxigenadas reactivas celulares en subpoblaciones fibroblásticas CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) aisladas de pacientes con cáncer de mama . A. Porcentaje de células positivas para especies oxigenadas reactivas (ROS) totales. Tinción con el Kit CellROX para fibroblastos CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) . **B.** Porcentaje de células positivas para ROS mitocondriales. Tinción con el Kit MitoSOx Red para fibroblastos CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) . Los valores se expresan como media $\pm$ error estándar ($X \pm ES$). Análisis estadístico: prueba *t* de Student no apareada con corrección de Welch. Los asteriscos indican diferencias significativas (* $p=0,0393$ y * $p=0,0110$; respectivamente). Pacientes con cáncer de mama: 10

Estudio de la senescencia celular a través de la detección de SA- β -galactosidasa en las subpoblaciones fibroblásticas CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-)

Los CAFs senescentes dentro del microambiente tumoral juegan un papel crucial en la progresión del cáncer al secretar factores pro-tumorales [186, 187]. Además, la senescencia inducida por la terapia en los fibroblastos a menudo resulta en resistencia a la quimioterapia y radioterapia y, estimula la promoción de un fenotipo secretor pro-tumoral [186, 187]. El programa de senescencia en estas células puede ser desencadenado por diversos factores de estrés, como el estrés oxidativo. Tanto los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) como los CD105(-)/CD34(-) mostraron un porcentaje comparable de células positivas para SA- β -



galactosidasa medido por esta técnica, lo que indica un nivel similar de senescencia celular (Figura 31).

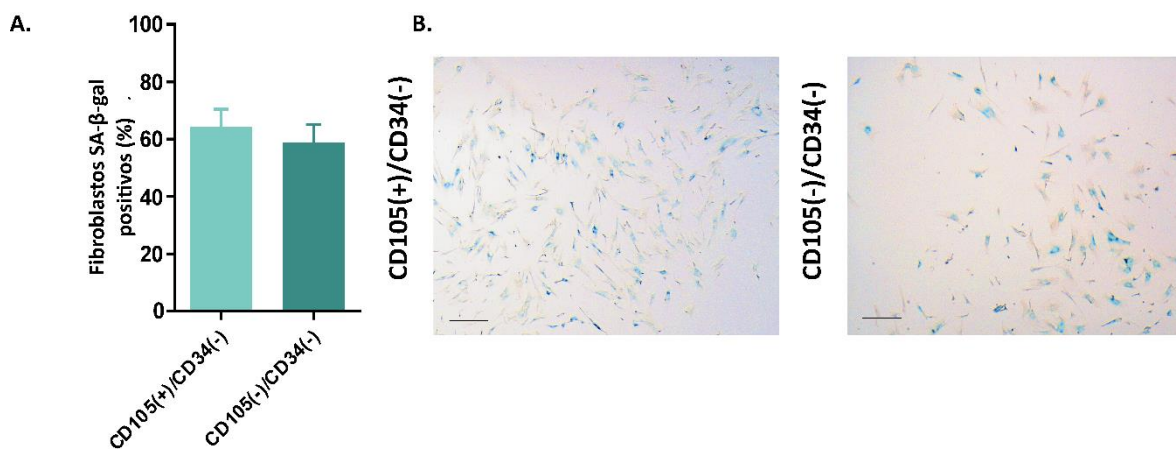


Figura 31. Fenotipo senescente de las subpoblaciones fibroblásticas CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) de pacientes con cáncer de mama. A. Ensayo de tinción para la β-galactosidasa asociada a la senescencia (SA-β-gal). El gráfico muestra el porcentaje de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) β-gal positivos en las pacientes. Los valores se expresan como media ± error estándar ($X \pm ES$). Análisis estadístico: prueba t no pareada con corrección de Welch ($p=0,5402$). B. Imagen representativa de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) (panel izquierdo) y fibroblastos CD105(-)/CD34(-) (panel derecho) (100X). La barra de escala representa 200 μm. Pacientes con cáncer de mama: 10

Estudio del secretoma en el medio condicionado de las subpoblaciones fibroblásticas CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) a través de un análisis proteómico masivo

Diferentes subpoblaciones de fibroblastos pueden tener funciones específicas dentro del tejido tumoral mamario. Al analizar su secretoma, se puede revelar cómo estas células contribuyen a la diversidad funcional del microambiente celular y cómo pueden influir en el comportamiento de otras células, como células inmunitarias o células tumorales. Además, se pueden identificar factores que promueven o inhiben el crecimiento tumoral y la metástasis. Como caracterización general, se distinguieron tres grupos de proteínas dentro del secretoma de ambas subpoblaciones fibroblásticas, las cuales presentaron



diferentes patrones de abundancia entre las subpoblación de fibroblastos CD105(+)/CD34 (-) y CD105(-)/CD34(-), evidenciada en los diferentes mapas de calor (**Figura 32A**).

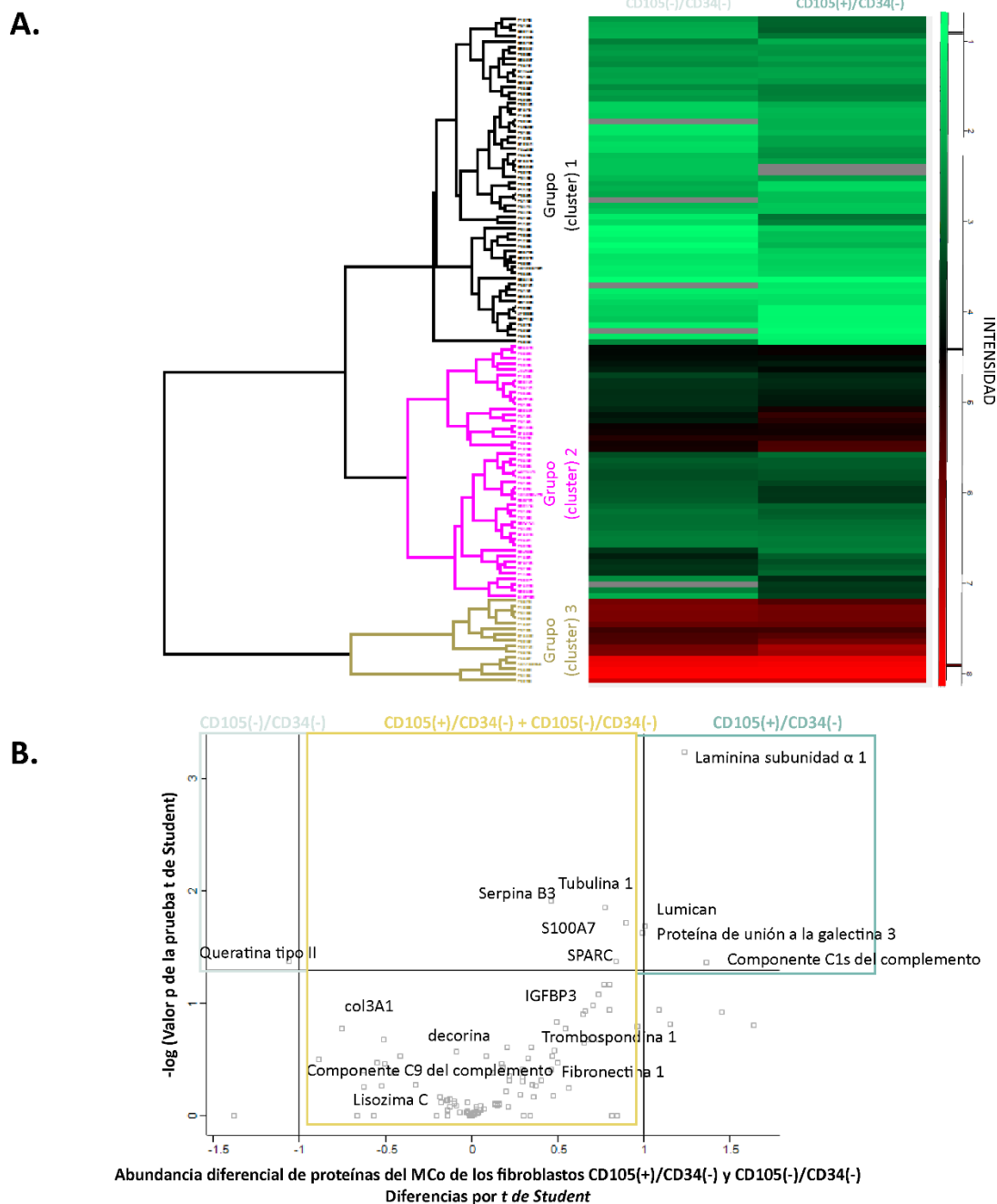


Figura 32. Estudio del secretoma de las subpoblaciones de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34 (-) en el cáncer de mama. **A.** Mapa de calor que muestra el total de proteínas encontradas en pool de los medios condicionados de las pacientes con cáncer de mama (10 MCo). La escala de colores indica la abundancia de expresión de las proteínas encontradas en las subpoblaciones de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) (columna derecha) y CD105(-)/CD34(-) (columna izquierda). Los niveles de abundancia proteica alta y baja se muestran en color rojo y verde, respectivamente (ver escala a la derecha del mapa de calor). **B.** Representación (scatter plot) de las proteínas encontradas en el secretoma de las subpoblaciones de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-). Las proteínas ubicadas en los cuadrantes superiores derecho e izquierdo son las que tienen un cambio relativo mayor a 2 (en el gráfico menor a -1 o mayor a 1, escala logarítmica) y un valor de $p < 0,0500$ (en el gráfico mayor a 1,3, escala logarítmica). En el cuadrante superior



*derecho se encuentran las proteínas que están aumentadas en la fracción de fibroblastos CD105(+)/CD34(-), en el cuadrante superior izquierdo las proteínas que están aumentados en los fibroblastos CD105(-)/CD34(-), mientras que en el cuadrante superior del medio están las proteínas que se encontraron abundantes pero que no existe diferencia en la abundancia entre ambas poblaciones de fibroblastos. Test estadístico: prueba t de Student, *p < 0,0500.*

En el primer grupo se identificaron varias proteínas con relevancia biológica significativa, asociadas a procesos cruciales en la biología tumoral. Entre ellas, se destacaron proteínas relacionadas con la motilidad celular, como la proteína de unión al calcio S100A7 (**S100A7**), tubulina-1, serpina B3, proteína 3 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (**IGFBP3**), cadena alfa 1 de colágeno tipo III (**COL3A1**), decorina, entre otras (**Figura 32 y 33**). Además, se observó la presencia de proteínas vinculadas a la regulación del sistema inmune, incluyendo lisozima C, proteína de unión al calcio de la familia S100A7, componente C9a del complemento, entre otras. También se identificaron otras proteínas relacionadas con procesos de diferenciación celular, regulación de la comunicación y señalización celular (ver **Figura 33**). Por otro lado, considerando que el secretoma estudiado proviene de dos subpoblaciones de fibroblastos, se identificaron proteínas asociadas a actividades clásicas características de este tipo celular. Esto incluye la participación en vías de síntesis de colágeno, organización de fibras de colágeno, así como organización de la matriz extracelular. Además, se evidenció la presencia de proteínas vinculadas a procesos de diferenciación condrogénica y de osificación (**Figura 33**). En el segundo grupo, también se identificaron proteínas relacionadas con procesos fibroblásticos clásicos, como organización de filamentos intermedios, queratinización y organización del citoesqueleto (**Figura 34**). Además, se encontraron proteínas asociadas a la diferenciación y desarrollo epitelial, adhesión celular y activación del complemento. Algunas de las proteínas interesantes encontradas en este grupo incluyeron SPARC (osteonectina), ligando de unión a galectina-3 (**Gal-3BP**) y lumican 1 (**Figura 34**). El tercer grupo estuvo compuesto principalmente por proteínas vinculadas al proceso de queratinización y desarrollo epidérmico. Cabe destacar que las proteínas que constituyen este grupo son las más abundantes dentro del secretoma (**Figura 35**). Dos proteínas interesantes encontradas en



este grupo son trombospodina 1 y fibronectina 1, ambas conocidas por su implicación en el desarrollo tumoral (**Figura 35**).

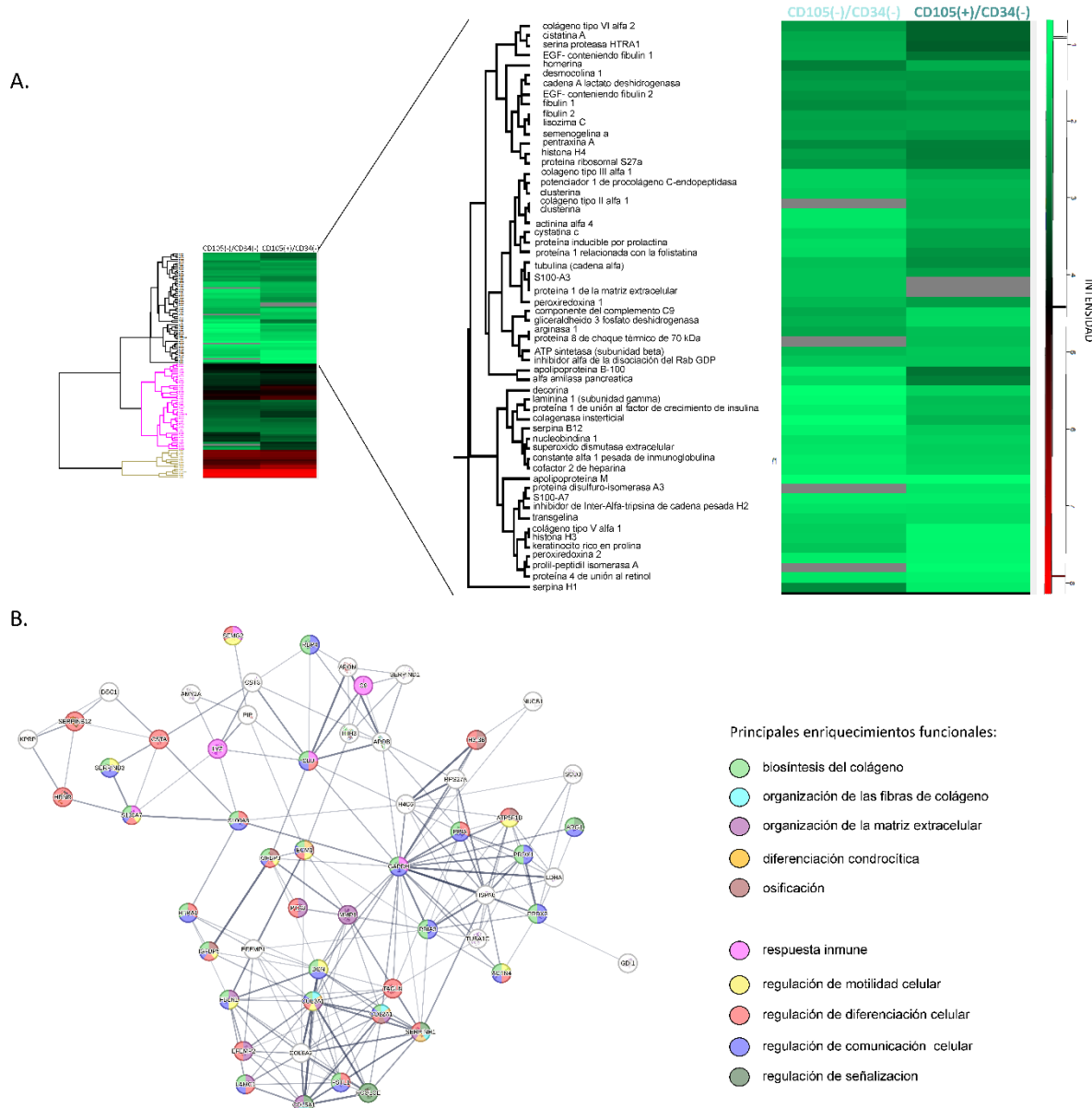


Figura 33. Estudio del secretoma de las subpoblaciones de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34 (-) en el cáncer de mama. A. Mapa de calor que muestra el total de proteínas del primer cluster con expresión diferencial en cuanto a abundancia entre poblaciones de fibroblastos. Los niveles de expresión altos y bajos se muestran en color rojo y verde, respectivamente (escala a la derecha del mapa de calor). **B.** Red de interacción entre las proteínas encontradas en el primer cluster. La red de interacción fue realizada mediante la herramienta online String. La red tiene en cuenta asociaciones tanto funcionales como físicas de las proteínas. El grosor de la línea que conecta cada proteína indica la fuerza del respaldo de datos (confidencia). Se detallan los principales procesos biológicos (gene ontology) con círculos de colores.



Más allá de la caracterización en cuanto a la composición de proteínas en nuestros MCo, se observó un patrón distintivo de abundancia para cada proteína dentro de cada subpoblación fibroblástica. Sin embargo, a pesar de la variación en la abundancia de varias proteínas, evidenciada en los diferentes mapas de calor (ver **Figura 32A**), solo se identificaron diferencias significativas en la abundancia de laminina, lumican (subunidad gamma 1), Gal-3BP y el componente C1s del complemento (**Figura 32B**).

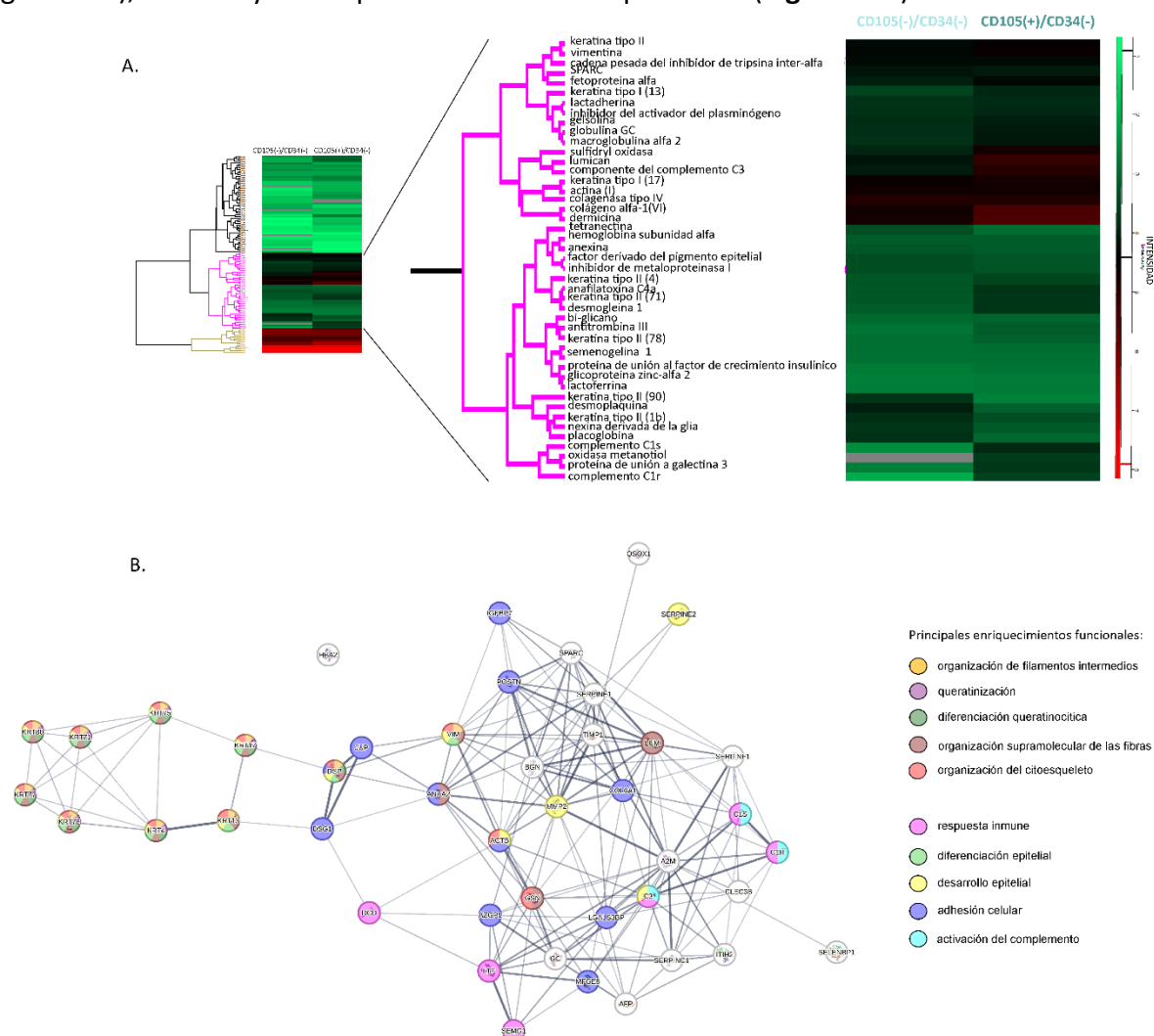


Figura 34. Estudio del secretoma de las subpoblaciones de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) en el cáncer de mama. A. Mapa de calor que muestra el total de proteínas del segundo cluster con expresión diferencial en cuanto a abundancia entre poblaciones de fibroblastos. Los niveles de expresión altos y bajos se muestran en color rojo y verde, respectivamente (escala a la derecha del mapa de calor). **B.** Red de interacción entre las proteínas encontradas en el segundo cluster. La red de interacción fue realizada mediante la herramienta online String. La red tiene en cuenta asociaciones tanto funcionales como físicas de las proteínas. El grosor de la línea que conecta cada proteína indica la fuerza del respaldo de datos (confidencia). Se detallan los principales procesos biológicos (gene ontology) con círculos de colores.

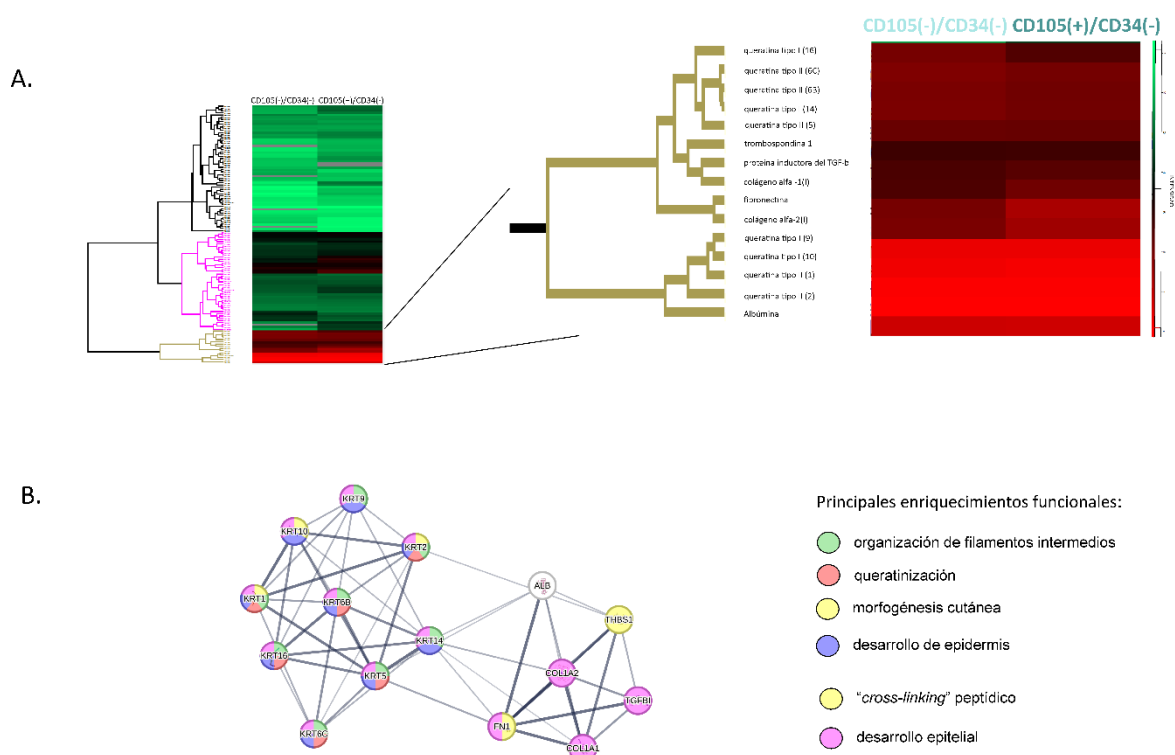


Figura 35. Estudio del secretoma de las subpoblaciones de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34 (-) en el cáncer de mama. A. Mapa de calor que muestra el total de proteínas del tercer cluster con expresión diferencial en cuanto a abundancia entre poblaciones de fibroblastos. Los niveles de expresión altos y bajos se muestran en color rojo y verde, respectivamente (escala a la derecha del mapa de calor). **B.** Red de interacción entre las proteínas encontradas en el tercer cluster. La red de interacción fue realizada mediante la herramienta online String. La red tiene en cuenta asociaciones tanto funcionales como físicas de las proteínas. El grosor de la línea que conecta cada proteína indica la fuerza del respaldo de datos (confidencia). Se detallan los principales procesos biológicos (gene ontology) con círculos de colores.



Estudio del efecto del pool de medio condicionado de subpoblaciones fibroblásticas CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) en células tumorales de mama humana de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB231

Finalmente, nos interesó estudiar cómo estas dos subpoblaciones de fibroblastos podrían influir en las células tumorales mamarias y, en consecuencia, en la progresión tumoral. Para lograr esto, evaluamos el impacto del MCo de ambas subpoblaciones de fibroblastos en la capacidad de migración, la viabilidad celular (indicando indirectamente la proliferación) y la expresión génica de dos líneas celulares de cáncer de mama, MCF-7 y MDA-MB231.

Estudio de migración

El *pool* de MCo de los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) mostró una mayor capacidad para inducir la migración de las células tumorales MCF-7 en comparación con el MCo de los fibroblastos CD105(-)/CD34(-) ($p < 0,0001$) (**Figura 36 A y B**). En contraste, ninguno de los MCo pudo estimular la migración de las células tumorales MDA-MB231 (**Figura 37 A y B**). Además, se encontró que el α MEM-sup y adicionado con 10% SBF (control positivo) indujo la migración en ambas líneas celulares (**Figura 36 A vs 37 A**).

Estudio de viabilidad como una medida indirecta de la capacidad de proliferación

Sorprendentemente, en contraste con el ensayo de migración, encontramos que el *pool* MCo de los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) tiene una mayor capacidad para inducir la proliferación en las células tumorales MDA-MB231 en comparación con el MCo de los fibroblastos CD105(-)/CD34(-) (**Figura 37, panel C**) ($p = 0,0433$). Esta diferencia no se observó en la línea celular MCF-7 (**Figura 36, panel C**). Sin embargo, aunque no se encontraron diferencias significativas en la inducción de la proliferación entre estos dos *pooles* de MCo



en la línea MCF-7, ambos medios inducen la proliferación de estas células de cáncer de mama (**Figura 36, panel C**).

Estudio de expresión génica

En cuanto al impacto del *pool* de MCo en la expresión de genes asociados con la diferenciación osteogénica y la mineralización ósea, se observó un aumento significativo en la expresión de BMP6 ($p=0,0196$) y FGF10 ($p<0,0001$) en las células tumorales MCF-7 cuando se expusieron al *pool* de MCo derivado de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) (**Figura 36, D**). Analizando el efecto de estos pooles en la línea MDA-MB231, se encontró que el *pool* de MCo de los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) aumentó la expresión de BMP2 ($p<0,0001$), BMP6 ($p<0,0001$), FGF10 ($p=0,0059$), RUNX2 ($p=0,0299$) y RANKL ($p=0,0458$) (**Figura 37, D**). Además, se observó que el *pool* de MCo de los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) indujo la expresión de SOX2 y OCT4 en la línea celular MDA-MB231 ($p=0,0116$ y $p=0,0016$; respectivamente) en comparación con el *pool* de los MCo de los fibroblastos CD105(-)/CD34(-) (**Figura 37, D**). Este efecto no se observó en la línea celular MCF-7 (**Figura 36, D**).

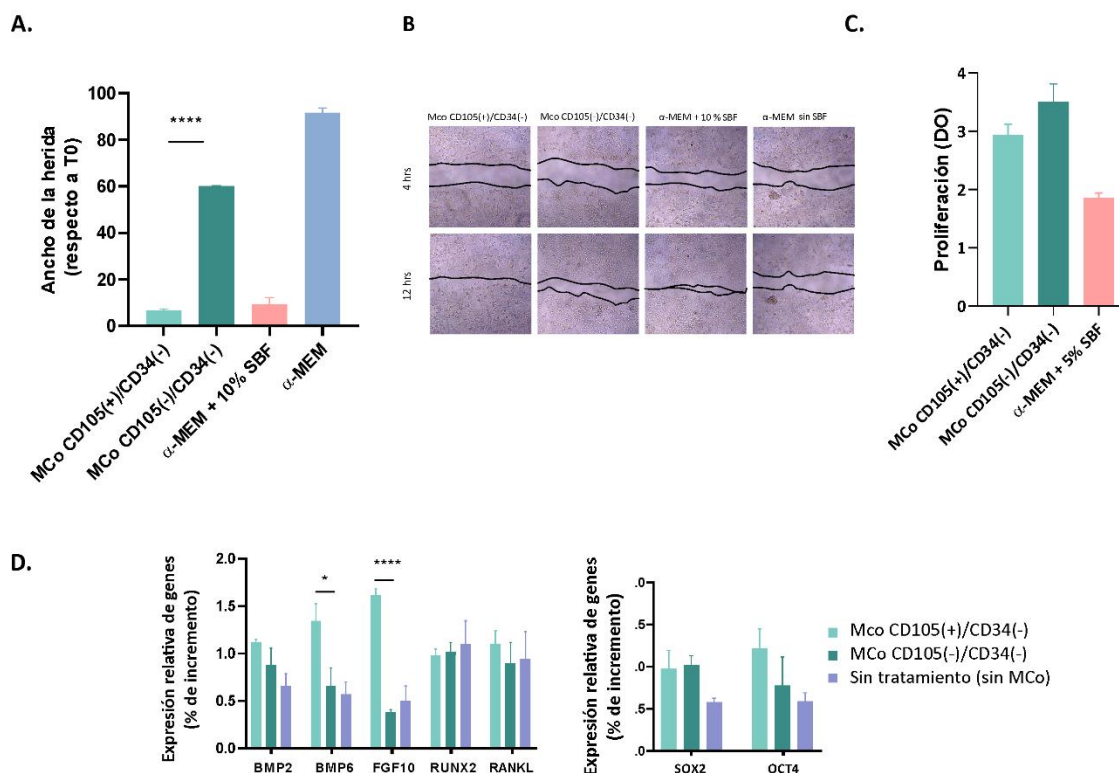


Figura 36. Impacto del pool de medio condicionado de las subpoblaciones fibroblásticas CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) de pacientes con cáncer de mama temprano en la migración, proliferación y expresión génica de células tumorales de mama humanas de la línea MCF-7. **A.** Estudio de la migración mediante el ensayo de cicatrización de heridas. Gráfico que representa el ancho de la herida medido en el punto de tiempo final (12 horas) (normalizado al tiempo 0) bajo diferentes condiciones [pool de medio condicionado (MCo) de CD105(+)/CD34(-), CD105(-)/CD34(-), control positivo [α -MEM 10% suero fetal bovino (SBF)], y control negativo (solo α -MEM)] (n=7). Los valores se expresan como media $\pm$ error estándar ($X \pm ES$). Se realizó un análisis estadístico utilizando ANOVA de dos vías, seguido de comparaciones múltiples post hoc utilizando el método de Bonferroni. Los asteriscos indican diferencias significativas (****p<0,0001). **B.** Imágenes representativas del área de la herida en el tiempo 1 (4 horas) y en el punto de tiempo final (12 horas) bajo cada condición. **C.** Estudio de la proliferación. Tratamiento bajo diferentes condiciones durante 48 horas: pool de MCo de CD105(+)/CD34(-), MCo CD105(-)/CD34(-), solo α -MEM (control basal o negativo) y α -MEM + 10% SBF (control positivo) (n=4). Los valores se expresan como $X \pm ES$ SEM. Se realizó un análisis estadístico utilizando ANOVA de dos vías, seguido de comparaciones múltiples post hoc utilizando el método de Bonferroni (*p < 0,0500). **D.** Estudio de la expresión génica. Tratamiento bajo diferentes condiciones durante 48 horas: pool de MCo de CD105(+)/CD34(-), MCo CD105(-)/CD34(-), solo α -MEM (control basal o negativo) y α -MEM + 10% SBF (control positivo). La expresión de factores de stemness (auto-renovación y multipotencia), incluidos SOX-2 y OCT-4, así como la expresión de factores de diferenciación osteo-condrogénica y mineralización ósea como BMP2, BMP6, FGF10, RUNX2 y RANKL se evaluó mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (q-PCR) (n=7). Todos los resultados fueron normalizados al gen de referencia GAPDH. Los valores se expresan como $X \pm ES$. Análisis estadístico: Se realizó un análisis estadístico utilizando ANOVA de dos vías, seguido de comparaciones múltiples post hoc utilizando el método de Bonferroni (*p = 0,0196; ****p<0,0001) Siempre se trabajo con un pool de MCo de 10 pacientes con cáncer de mama.

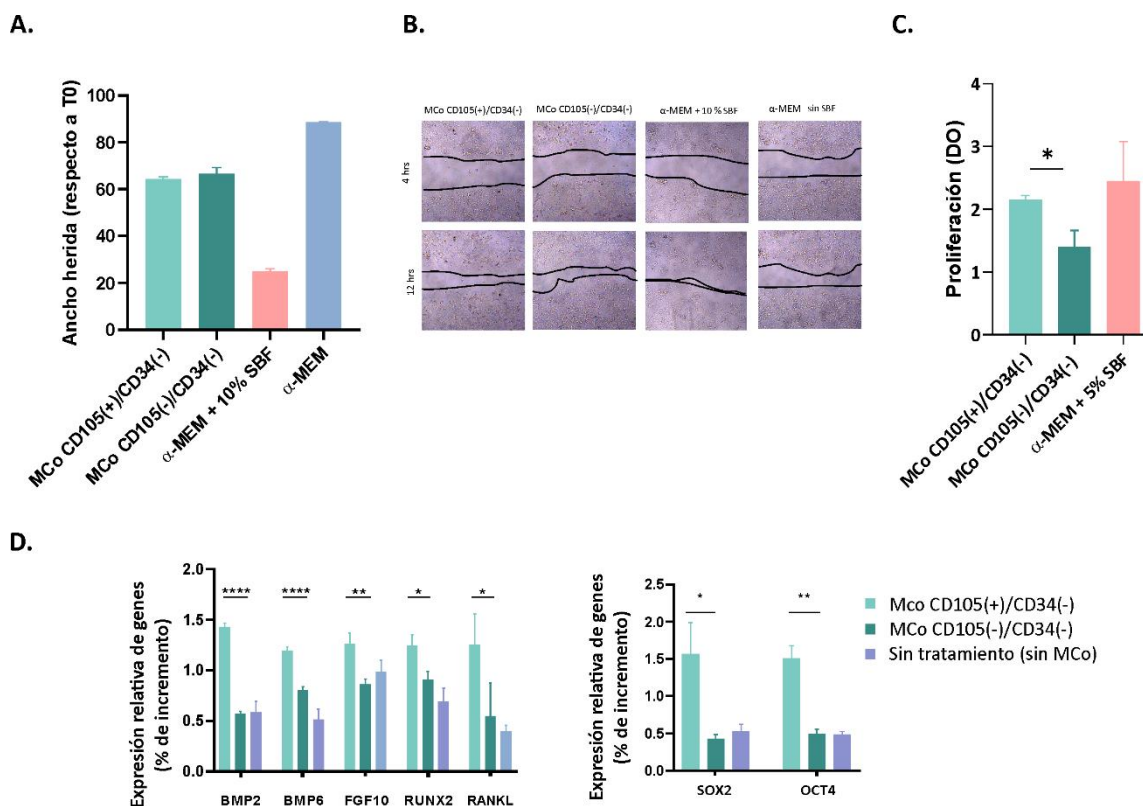


Figura 37. Impacto del pool de medio condicionado de las subpoblaciones fibroblásticas CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) de pacientes con cáncer de mama temprano en la migración, proliferación y expresión génica de células tumorales de mama humanas de la línea MDA-MB231.

A. Estudio de la migración mediante el ensayo de cicatrización de heridas. Gráfico que representa el ancho de la herida medido en el punto de tiempo final (12 horas) (normalizado al tiempo 0) bajo diferentes condiciones [pool de medio condicionado (MCo) de CD105(+)/CD34(-), CD105(-)/CD34(-), control positivo [α -MEM 10% suero fetal bovino (SBF)], y control negativo (solo α -MEM)] (n=7). Los valores se expresan como media $\pm$ error estándar ($X \pm ES$). Se realizó un análisis estadístico utilizando ANOVA de dos vías, seguido de comparaciones múltiples post hoc utilizando el método de Bonferroni ($p < 0,0500$). **B.** Imágenes representativas del área de la herida en el tiempo 1 (4 horas) y en el punto de tiempo final (12 horas) bajo cada condición. **C.** Estudio de la proliferación. Tratamiento bajo diferentes condiciones durante 48 horas: pool de MCo de CD105(+)/CD34(-), CD105(-)/CD34(-), solo α -MEM (control basal o negativo) y α -MEM + 10% SBF (control positivo) (n=4). Los valores se expresan como $X \pm ES$. Se realizó un análisis estadístico utilizando ANOVA de dos vías, seguido de comparaciones múltiples post hoc utilizando el método de Bonferroni. Los asteriscos indican diferencias significativas (* $p = 0,0433$). **D.** Estudio de la expresión génica. Tratamiento bajo diferentes condiciones durante 48 horas: pool de MCo de CD105(+)/CD34(-), CD105(-)/CD34(-), solo α -MEM (control basal o negativo) y α -MEM + 10% SBF (control positivo). La expresión de factores de stemness (auto-renovación y multipotencia), incluidos SOX-2 y OCT-4, así como la expresión de factores de diferenciación osteo-condrogénica y mineralización ósea como BMP2, BMP6, FGF10, RUNX2 y RANKL se evaluó mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (q-PCR) (n=7). Todos los resultados fueron normalizados al gen de referencia GAPDH. Los valores se expresan como $X \pm ES$. Análisis estadístico: Se realizó un análisis estadístico utilizando ANOVA de dos vías, seguido de comparaciones múltiples post hoc utilizando el método de Bonferroni (* $p < 0,0500$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$).



DISCUSIÓN

Entender las complejas dinámicas de la progresión del cáncer de mama exige un estudio exhaustivo del microambiente tumoral. Entre los numerosos componentes que conforman este entorno, los CAFs emergen como células coordinadoras claves, ejerciendo efectos profundos sobre el comportamiento tumoral y la respuesta a la terapia. Actualmente, se sabe que los CAFs son una de las principales poblaciones celulares que promueven la progresión del cáncer de mama [47]. Por lo tanto, determinar los tipos específicos de CAFs y sus roles en el entorno tumoral es crucial para comprender mejor el proceso de evolución de esta enfermedad. Debido a su gran heterogeneidad, aún no se conocen completamente todas las subpoblaciones de fibroblastos presentes en cada subtipo tumoral. Por ello, es fundamental realizar investigaciones para caracterizarlos y entender a fondo su papel específico en el microambiente tumoral mamario. Esto facilitará el desarrollo futuro de nuevas terapias que prevengan la progresión del tumor primario hacia lesiones metastásicas. Recordemos que la mayoría de los CAFs del estroma tumoral mamario que provienen de las MSCs, son de MO fundamentalmente [128, 130, 133, 187, 188]. En este sentido, la presencia de CAFs CD105(+)/CD34(-), no asociados a la vasculatura, en el estroma intratumoral de las PCM podrían indicar potencialmente la existencia de fibroblastos derivados de las MSCs que puedan haber migrado desde la MO durante las etapas iniciales del desarrollo del tumor primario [71, 125], y que consecuentemente influyen en el pronóstico de la PCM propiciando la ocurrencia de metástasis óseas futuras [177]. En relación con este último comentario, como ya hemos mencionado previamente, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio, hemos observado que las células tumorales de las PCM (carcinoma ductal infiltrante, estadio I/II) producen sustancias quimiotácticas de las MSCs de la MO, como IL-6, SDF-1 y CCL-2, entre otras [92]. Además, hemos encontrado una asociación significativa entre la expresión de estos ligandos en las células tumorales de mama y la expresión de sus respectivos receptores, IL-6R, CXCR-4 y CCR-2, en células estromales fusiformes, *fibroblast-like*, no asociadas a la vasculatura, que se encuentran dentro del microambiente tumoral de estas PCM [92]. Por otro lado, varios



estudios *in vitro* demostraron que las MSCs pueden diferenciarse en CAFs que expresan α -SMA tras la incubación con células tumorales [188, 189]. En relación, en el estudio preliminar de diferenciación realizado en la presente tesis, encontramos que las MSCs de MO de VS, expuestas durante 21 días a MCo de líneas tumorales mamarias humanas (MCF-7 y MDA-MB231), se diferenciaron en CAFs, mostrando un aumento en la expresión de α -SMA y FAP, manteniendo las moléculas CD146 y CD105 presentes en las MSCs. Todo esto sugiere que las células tumorales liberan factores que pueden atraer a las MSCs de la MO hacia el tumor primario y luego también facilitar su diferenciación en CAFs.

Por otra parte, al dividir nuestra cohorte de PCM en alta y baja de expresión de CAFs CD105(+)/CD34(-) según un *score final* que tenía en cuenta la abundancia de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) y el nivel de expresión/célula, encontramos que la alta expresión de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) estaba asociada con la edad y el tamaño del tumor. Observamos que las pacientes menores de 50 años, así como aquellas con un tamaño de tumor mayor a 2 cm, tenían una abundancia de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) mayor. Es bien sabido que las pacientes más jóvenes o aquellas con tumores más grandes tienden a tener un perfil tumoral más agresivo y un peor pronóstico en el cáncer de mama [190, 191]. Por lo tanto, la presencia de este tipo de fibroblastos podría indicar potencialmente una mayor agresividad tumoral en pacientes más jóvenes. Esto sugiere la existencia de un microambiente tumoral fibroblástico que facilitaría la progresión y el crecimiento del tumor de mama. En relación, la abundancia de estroma, especialmente el compuesto por abundantes fibroblastos, y con abundante desmoplasia han surgido como factores cruciales que influyen en la progresión del tumor mamario y en los resultados para la paciente [156, 192–195]. Los fibroblastos dentro del estroma desempeñan roles multifacéticos en la promoción del crecimiento tumoral, angiogénesis y metástasis [196]. La desmoplasia es consecuencia de la activación de los CAFs, y refleja la deposición de componentes de la matriz extracelular, particularmente fibras de colágeno, contribuyendo a un microambiente fibroso [196]. Estos componentes del estroma tumoral crean un nicho de soporte para las células tumorales, facilitando su supervivencia, invasión y diseminación [47]. Los resultados de nuestro estudio revelaron una asociación significativa entre la expresión de CD105 y el



porcentaje de estroma intratumoral, la abundancia de fibroblastos y el grado de desmoplasia. Aquellas PCM con una alta proporción de estroma intratumoral, una gran abundancia de fibroblastos o desmoplasia severa tenían una mayor proporción de CAFs CD105(+)/CD34(-) indicando un posible papel de este tipo celular en la deposición de los MEC y el desarrollo de un microambiente tumoral fibroso.

Por otro lado, los resultados de este estudio revelan una asociación significativa entre la presencia de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) y el riesgo de desarrollar metástasis en las PCM. Las pacientes con una mayor expresión de CD105 en dichas células mostraron una mayor tasa de ocurrencia de metástasis en comparación con aquellas con baja expresión de CD105. Estos hallazgos son consistentes con un estudio previo de nuestro laboratorio que ha destacado el papel de CD105 en la promoción de la progresión tumoral [137]. Interesantemente, al considerar el sitio de metástasis, observamos una asociación significativa entre la presencia de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) y el sitio metastásico óseo. El hueso representa uno de los sitios predominantes de propagación metastásica en PCM y representa un importante contribuyente a la mortalidad de las pacientes [197]. A pesar de esto, la mayoría de las células que se liberan de los tumores primarios no pueden generar metástasis, lo que indica que los microentornos de los órganos diana son desfavorables para las células tumorales. Esto sugiere que las células de cáncer de mama deben someterse a un proceso de adaptación para ajustarse a las nuevas condiciones del órgano anfitrión. El hueso, en particular, presenta características únicas que pueden ser aprovechadas por las células cancerosas: experimenta una remodelación constante y ofrece una variedad de microambientes [198]. En nuestra cohorte de PCM, aquellas con presencia de metástasis óseas mostraron una alta expresión de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) lo que sugiere un papel preferencial de estas células en la ocurrencia de metástasis óseas. Esto implica que los fibroblastos CD105(+) podrían tener un impacto significativo en el desarrollo y la progresión del tumor primario de mama, y posiblemente contribuir a la evolución de la cascada metastásica, especialmente hacia la MO y el hueso. En investigaciones previas, encontramos una asociación significativa entre la expresión de RANKL y CCL-2 en células estromales fusiformes, no asociadas a la vasculatura, en tumores primarios de carcinoma



de mama tempranos, con la expresión de los receptores RANK y CCR-2 en las células tumorales de mama, respectivamente [92]. Estos hallazgos, junto con los descubrimientos de otros investigadores, sugieren que estas células estromales, a través de las acciones de RANKL y CCL-2, pueden influir en la proliferación, supervivencia, invasión, migración e intravasación de las células tumorales de mama durante las etapas tempranas de este tipo de cáncer [95–98, 199]. En estudios de otros investigadores, se ha reportado que el cáncer de mama, tipo desmoplásico, muestra una alta expresión de podoplanina, P4H β , S100A4, PDGFR α y PDGFR β [60]. En las PCM con metástasis óseas, podoplanina, S100A4 y PDGFR α se encuentran significativamente elevadas en los CAFs del tumor primario [200]. Estos resultados se alinean con nuestras observaciones, donde la presencia de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) se correlacionó con un estroma tumoral desmoplásico. Asimismo, a través de nuestro estudio prospectivo de caracterización, encontramos que estos fibroblastos tenían una mayor proporción de células que expresan P4H β y PDGFR α , y en el análisis del secretoma, observamos que liberaban S100A4. Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) podrían contribuir a la formación de un estroma desmoplásico y, en última instancia, estar implicados en la ocurrencia de metástasis óseas, en parte a través de estas proteínas involucradas.

También encontramos que la expresión de CD105 en los CAFs, no asociados a la vasculatura, se asoció significativamente con el número de focos metastásicos por órgano, particularmente en el hueso. Las pacientes con alta expresión de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) tuvieron una mayor incidencia de múltiples focos dentro del mismo órgano en comparación con aquellas con baja expresión de estos fibroblastos, y esta tendencia fue particularmente evidente en las PCM con metástasis óseas. Esto sugiere que la alta expresión de CD105 en los CAFs puede contribuir al establecimiento y crecimiento de múltiples lesiones metastásicas en sitios específicos de órganos, particularmente en el microambiente óseo. Las PCM con alta expresión de CD105 también mostraron un MFS, un BMFS y una OS más cortos. Asimismo, el CD105 fue un predictor independiente para estos tiempos en nuestras pacientes con carcinoma ductal infiltrante en estadios tempranos. Estos resultados enfatizan el valor pronóstico de CD105 como un posible biomarcador



independiente del riesgo de ocurrencia de metástasis óseas, así como también de la sobrevida de las PCM. Este hallazgo es fundamental porque no sólo nos indica el riesgo de ocurrencia de metástasis óseas sino la importancia de desarrollar estrategias para prevenir la diseminación secundaria hacia y desde el hueso tempranamente. Estudios clínicos han sugerido que el hueso podría no ser el destino final de las células cancerosas de mama que se alojan en él, ya que la metástasis inicial en el hueso se ha asociado con un alto riesgo de recaída en otros órganos. Además, las terapias adyuvantes que eliminan las células tumorales de la MO contribuyen a reducir el riesgo de metástasis extra-óseas en pacientes con células cancerosas mamarias en estado de latencia en la MO o con metástasis óseas. Es importante recordar que la médula ósea y el hueso funcionan como una unidad integrada. Estos datos clínicos respaldan la hipótesis de que el hueso actúa como un sitio de paso para la diseminación secundaria [139, 201].

La microcalcificación mamaria anárquica es reconocida como una característica diagnóstica importante en el cáncer de mama [202–204]. Estas microcalcificaciones, que se detectan comúnmente mediante mamografía, están asociadas con diversas condiciones patológicas, incluidas lesiones mamarias benignas y malignas [202]. Se identifican dos tipos: tipo I (oxalato de calcio), que se restringe al tejido benigno, y tipo II (hidroxiapatita de calcio), presente en ambas lesiones [205]. Un hallazgo notable en nuestro estudio fue la correlación entre la presencia de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) en el tumor primario y la microcalcificación anárquica. Nuestros resultados mostraron que las pacientes con mayor expresión de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) presentaban una incidencia significativamente mayor de microcalcificaciones anárquicas antes del diagnóstico del tumor, así como una mayor abundancia de microcalcificaciones en el estroma tumoral. Además, observamos una asociación significativa entre la presencia de estas microcalcificaciones y la ocurrencia de metástasis óseas. Estas observaciones sugieren que los CAFs CD105(+), no asociados a la vasculatura, pueden desempeñar un papel en el desarrollo de microcalcificaciones en la mama, fomentando un microentorno similar al del tejido óseo. Aunque no se comprenden completamente los mecanismos que subyacen a su formación, la evidencia emergente indica que los procesos de calcificación en el microambiente mamario involucran células



tumorales con características similares a osteoblastos [202, 203, 205, 206]. Varios estudios han revelado que, durante la mineralización patológica, las células “osteomiméticas” expresan factores de transcripción y proteínas de la matriz ósea involucradas en la calcificación fisiológica, al igual que los osteoblastos (como BMPs y RUNX2) [205, 207, 208]. Esto sugiere que, durante la tumorigénesis, una población de células cancerosas epiteliales adquiere el fenotipo mesenquimal a través de la EMT, y algunas de estas células invasivas pueden diferenciarse en células “similares a osteoblastos”, impulsadas por factores osteoblásticos [207, 209, 210]. Incluso hay estudios que demuestran que las células de cáncer de mama metastásico presentan una alta expresión de genes osteoblásticos, como RUNX2, osteopontina y osteonectina, entre otros, junto con una mayor mineralización [207, 211, 212]. Otros trabajos han mostrado que las pacientes con microcalcificaciones anárquicas presentan niveles elevados de proteínas como RANKL y SDF-1 en comparación con aquellos sin microcalcificaciones [208, 213]. Estos hallazgos coinciden con un estudio previo en el que observamos una expresión positiva de RANKL y SDF-1 en células tumorales mamarias de pacientes con carcinoma ductal infiltrante en etapas tempranas [92]. Asimismo, en la parte B de nuestro estudio, al exponer líneas tumorales al MCo de los CAFs CD105(+)/CD34(-), encontramos un aumento en la expresión de genes de diferenciación osteogénica, reforzando lo mencionado anteriormente. Por lo tanto, es plausible proponer que estos fibroblastos CD105(+)/CD34(-) podrían favorecer la presencia de células tumorales con características de osteoblastos, induciendo así la formación de microcalcificaciones. Sin embargo, aún es necesario esclarecer si la generación de un estroma inflamatorio previo a la lesión tumoral mamaria podría favorecer el desarrollo de microcalcificaciones anárquicas, o si estas son consecuencia de la evolución tumoral propiamente dicha, como describimos previamente [205]. Finalmente, es importante mencionar que, dado que nuestro registro no pudo determinar la naturaleza de las microcalcificaciones, es posible que las pacientes con microcalcificaciones anárquicas y metástasis óseas presenten microcalcificaciones de hidroxapatita, componente mineral típico de la matriz de mineralización ósea, mientras que aquellas sin metástasis presenten microcalcificaciones de oxalato de calcio. Por lo tanto, evaluar no solo la presencia, sino



también la naturaleza de las microcalcificaciones anárquicas sería crucial para un seguimiento más minucioso de las pacientes que podrían desarrollar metástasis óseas en el futuro.

Por otro lado, un porcentaje importante de las PCM con alta expresión de CD105 experimentaron dolor óseo, antes del inicio de eventos metastásicos, en comparación con el grupo de pacientes con baja expresión de CD105. En relación a este hallazgo, investigaciones han demostrado que las células tumorales y/o las células del estroma tumoral, como los CAFs y células del sistema inmune, secretan una variedad de factores que sensibilizan o excitan directamente a las neuronas aferentes primarias pudiendo inducir dolor óseo. Estos factores incluyen prostaglandinas, bradiquinina, TNF- α , endotelinas, IL-1 e IL-6, EGF, TGF- α , PDGF y factor de crecimiento nervioso, CCL-2, entre otros [214–217]. En trabajos previos, nuestro grupo ha encontrado expresión de IL-6 y CCL-2 en las células tumorales y estromales fusiformes, no asociadas a la vasculatura, en tumores primarios de carcinoma de mama, ductal infiltrante, temprano [92]. Además, un hecho importante, es que tanto la IL-6 como CCL-2, son factores que favorecen la formación de osteoclastos, célula involucrada en la remodelación ósea y dolor óseo [218–222]. Es decir, el dolor óseo podría ser anterior al evento metastásico y luego aumentar con la metástasis ósea, jugando un papel clave los CAFs CD105(+), no asociados a la vasculatura.

Estudiar la expresión de CD105 a nivel proteico mediante inmunohistoquímica nos permitió visualizar directamente la presencia y distribución de CD105 en el microentorno tumoral, particularmente en los CAFs. Esta técnica nos brinda la capacidad de evaluar la localización y abundancia de CD105 en el compartimento estromal, proporcionando información valiosa sobre su posible papel en la progresión tumoral. No obstante, considerando que los niveles de mRNA pueden ofrecer información crucial sobre los patrones de expresión génica, nos pareció interesante explorar si la expresión de CD105 a nivel de mRNA también se correlaciona con el pronóstico de las pacientes. Esta investigación adicional tuvo como objetivo validar nuestros hallazgos en otro nivel de expresión génica, proporcionando una comprensión más completa del posible papel de CD105 en el contexto de la enfermedad. Para investigar esto, segregamos la población de



datos según la expresión de mRNA de CD105, FAP y FSP, y la ausencia de expresión de mRNA de CD34, considerando que los datos de estas bases de datos incluyen todo el tumor. En este sentido, obtuvimos resultados similares a los de nuestra cohorte. Encontramos que las muestras con una expresión elevada de mRNA de CD105 tenían una OS más corta. Lamentablemente, esta base de datos no proporciona información sobre la ocurrencia de metástasis en diferentes sitios y el tiempo hasta estos eventos, por lo que no pudimos analizar en mayor profundidad si existía una asociación entre la expresión del mRNA de CD105 y la ocurrencia de metástasis óseas. Además, observamos diferencias en la asociación con parámetros clásicos. En nuestra cohorte de PCM, la expresión de CD105 se asoció con el tamaño del tumor y la edad de las pacientes, lo cual no se encontró en la cohorte de datos de METABRIC. Sin embargo, en esta última cohorte, sí encontramos una asociación entre el estado de los RE y RP y la expresión de mRNA de CD105. Estas diferencias en los resultados pueden atribuirse a varios factores, incluyendo el sesgo de la cohorte, diferencias en las características demográficas de las pacientes y las metodologías experimentales en general.

De todo lo expuesto, se puede afirmar que la expresión de CD105 proporciona un parámetro prometedor que no solo es fácilmente detectable, sino también reproducible y eficiente en términos de tiempo en varios subtipos moleculares del cáncer de mama. Considerando estas ventajas, la expresión de CD105 en los CAFs, no asociados a la vasculatura, es un biomarcador candidato que puede incorporarse fácilmente en la práctica diagnóstica rutinaria de patología mamaria. Su inclusión mejoraría la precisión de la estratificación del riesgo de metástasis óseas en las PCM, lo que permitiría tomar mejores decisiones de tratamiento, mejorando así los resultados y sobrevida de las pacientes.

Desde otra perspectiva, nuestro estudio explora las características fenotípicas de dos subpoblaciones distintas de fibroblastos dentro del microambiente tumoral mamario: los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-). En principio, para comprender su posible origen, evaluamos marcadores tanto de CAFs como de MSCs. Se estableció que las MSCs se caracterizan por ser positivas para CD105, CD73 y CD90, y negativas para CD45, CD34, CD14 o CD11b y CD19 [223–225]. Ambas subpoblaciones de fibroblastos expresan



marcadores de MSCs, CD73 y CD90, y muestran la negatividad esperada para CD34, CD11b y CD19, indicando una identidad compartida. Sin embargo, la subpoblación de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) se destaca por expresar de manera única los tres marcadores canónicos de MSCs (CD73, CD90 y CD105). Al respecto, Yizhu Chen y colaboradores, hablan en lugar de CAFs de células progenitoras mesenquimales aisladas de tumores de mama de pacientes con carcinoma ductal infiltrante, las cuales expresan características de células madre, incluyendo CD105, CD90 y CD73 [226], con morfología fusiforme, *fibroblast-like*.

Las MSCs además pueden expresar marcadores adicionales positivos como CD106, CD146, entre otros [223, 227]. En particular, según los resultados de varios estudios, la expresión de CD146 distingue a las MSCs de las células no-MSCs de MO, como son los fibroblastos, así como de las células óseas, como osteoblastos/ osteocitos que expresan varios marcadores de MSCs, pero no CD146 [228–230]. En este sentido, los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) del tumor de mama muestran un porcentaje significativamente mayor de células que expresan el marcador CD146 (MCAM) y CD106 (VCAM), así como mayor expresión génica de ambos marcadores, en comparación con los fibroblastos CD105(-)/CD34(-). Si bien el CD146 está presente en numerosas células tumorales, células endoteliales, pericitos y MSCs, hallazgos de bibliografía sugieren que su papel se extiende más allá de ser únicamente una molécula de adhesión y migración, con la capacidad de unirse a varios ligandos, incluidos factores de crecimiento y matrices extracelulares [231, 232]. Está bien establecido que las MSCs que expresan niveles elevados de CD146 exhiben perfiles superficiales modificados, secreción elevada de IL-6 y mayor eficacia en la supresión de células T activadas [233]. Como mencionamos anteriormente, el CD146 es un marcador de las MSCs osteoprogenitoras, y su mayor expresión en las MSCs, en particular en las derivadas de la MO, indica células madre con mayor capacidad de auto-renovación, proliferación, multipotencialidad, regulación de la hematopoyesis, migración y mayor resistencia a la senescencia, entre otras propiedades [228–230]. Por otro lado, el CD106 es una glicoproteína transmembrana esencial para la adhesión celular a la matriz extracelular y la comunicación celular mediante la unión con diversos ligandos, tal como VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) [234]. Se sabe que ambos se expresan de manera aberrante en varios tipos de cáncer, como



el cáncer de mama, lo que lleva a la invasión y metástasis a órganos distantes [234]. Específicamente, el CD106 también se conoce por promover la ocurrencia de metástasis óseas al activar los osteoclastos debido a su unión a $\alpha V\beta 3$, fomentando así el establecimiento de un ciclo vicioso crucial para la metástasis osteolítica en el cáncer de mama [234]. Además, se han reportado otras observaciones que indican que las características inmunosupresoras de las MSCs y los niveles elevados de la proteína CD106 promueven el crecimiento tumoral [235, 236]. Por lo tanto, los fibroblastos CD105(+) y CD106(+) pueden desempeñar un papel potencial en la mediación de la inmunotolerancia en el sitio tumoral.

Los CAFs se distinguen de los fibroblastos normales de mama a través de la expresión diferencial de α -SMA, FAP, FSP y PDGFR α , entre otros [44–46]. Mientras que los CAFs manifiestan negatividad para los marcadores de CD34, CD31 y citoqueratina, una proporción sustancial muestra positividad para α -SMA, FSP, FAP, desmina, TNC, P4H β y PDGFR- α , entre otras proteínas [41, 54]. En el presente estudio, ambas subpoblaciones de fibroblastos expresaron marcadores de fibroblastos activados, incluyendo α -SMA y FAP, con una prevalencia notable de células positivas para FAP. Es interesante destacar que la subpoblación de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) exhibió características moleculares distintas, demostrando porcentajes de células que expresan PDGFR α , desmina y P4H β elevados en comparación con los fibroblastos CD105(-)/CD34(-). Está bien establecido que PDGFR α está sobreexpresado tanto en células tumorales como en CAFs, y esta expresión anormal parece propiciar el crecimiento tumoral [237]. Los PDGFs funcionan principalmente como factores de crecimiento parácrinos, activando vías de señalización que regulan la proliferación, supervivencia, angiogénesis y migración de ambos tipos celulares, fomentando en última instancia la progresión tumoral [237]. Por otro lado, P4H β , que codifica una chaperona molecular del RE, muestra una expresión elevada en cánceres como el glioma y el cáncer de pulmón [238]. Si bien su impacto en el pronóstico del tumor mamario no está claro, el nivel de expresión de P4H β influye en la progresión tumoral, sugiriendo su potencial como un indicador pronóstico independiente y un biomarcador diagnóstico para el cáncer [238].



Al examinar las características funcionales, aunque tanto los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) como los CD105(-)/CD34(-) mostraron una eficiencia de clonado comparable para formar CFU-F (número de CFU-F/100 células viables sembradas), la primera subpoblación presentó características distintivas en cuanto al tamaño de las colonias y la morfología celular. En particular, el número significativamente mayor de células estromales por campo/CFU-F y la presencia de células más pequeñas dentro de las colonias formadas por fibroblastos CD105(+)/CD34(-) sugieren una disposición espacial única o una distribución particular del tamaño celular dentro de estas colonias, observaciones que indican que estos fibroblastos presentan mayor auto-renovación y proliferación que los CD105(-)/CD34(-) por CFU-F formada. Al comparar esta capacidad de clonado con la de las MSCs de la MO en experimentos previos de nuestro laboratorio, observamos que cuando sembramos MSCs de la MO de VS a una densidad de 100 células/cm², alcanzaban la confluencia después de 14 días, lo que dificultaba distinguir los límites entre las diferentes CFU-F. Por esta razón fue necesario reducir la concentración de siembra a 50 MSCs/cm². Esto indica que la eficiencia de clonado de las MSCs de MO normales es mayor que la observada en ambas subpoblaciones de fibroblastos, al igual que el número de células mesenquimales por campo óptico de CFU-F [239]. Estos hallazgos sugieren, que las MSCs de MO normal poseen una mayor capacidad de auto-renovación y proliferación [239] en comparación con los CAFs, lo que podría estar relacionado en estos últimos con la menor expresión génica de CD146. Investigaciones previas de nuestro laboratorio [161] indican que los aspirados de MO normal, que contienen MSCs del nicho vascular, presentan un $99,80 \pm 0,14$ % de MSCs-CD146(+) y una intensidad de fluorescencia relativa de $82,68 \pm 12,24$. Esto reafirma que la expresión de CD146 en las subpoblaciones fibroblásticas evaluadas en el presente trabajo, es baja. Por lo tanto, aunque ambas subpoblaciones fibroblásticas poseen características propias de las MSCs, como la capacidad de auto-renovación y proliferación, así como marcadores de superficie, su nivel de *stemness* no sería comparable al de las MSCs de MO que podrían haberles dado origen al llegar al tumor primario de mama.



Los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) mostraron una tasa de crecimiento celular más alta en comparación con la población CD105(-)/CD34(-). Esta capacidad proliferativa elevada fue coincidente con un mayor porcentaje de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) en la fase S, lo que indica síntesis activa de DNA, en comparación con las células de la subpoblación CD105(-)/CD34(-). Estos hallazgos concuerdan con la complejidad del papel de los CAFs en la progresión del cáncer de mama [41, 240]. Los fibroblastos mamarios activados, influenciados por factores como el TGF- β , muestran un aumento en la proliferación, lo que puede conducir potencialmente a la fibrosis tisular [241, 242]. Si este proceso patológico se ve exacerbado, puede alterar la arquitectura del tejido y contribuir a la disfunción del órgano. Es crucial señalar que los cambios fibróticos están relacionados con el desarrollo del cáncer de mama [243]. Como se ha mencionado anteriormente, en los tumores de mama, la presencia persistente de CAFs activados, que se asemejan a miofibroblastos, contribuye a la formación de un estroma desmoplásico, en línea con la noción del tumor como “una herida que no cicatriza” [44, 244]. Por lo tanto, los CAFs con un perfil CD105(+)/CD34(-) exhiben una alta tasa de proliferación y contribuirían a la desmoplasia del estroma, favoreciendo la evolución tumoral.

En cuanto al estrés oxidativo, los CAFs CD105(+)/CD34(-) mostraron niveles significativamente más altos de ROS totales y mitocondriales en comparación con los fibroblastos CD105(-)/CD34(-). Este aumento del estrés oxidativo en los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) implica un entorno redox potencialmente más dinámico dentro de esta subpoblación. El microambiente hipóxico en los tejidos de cáncer de mama desmoplásico contribuye al estrés oxidativo debido a la producción de ROS mitocondriales y la vía glucolítica [245]. Es importante destacar que tanto las células cancerosas como los CAFs generan altos niveles de ROS que influyen en la formación de nuevos CAFs y la estimulación de su función, así como en la inducción de alteraciones genómicas en las células epiteliales mamarias [245, 246]. Además, es bien sabido que los niveles elevados de ROS dentro de los fibroblastos estromales conducen a la liberación de señales pro-invasivas (como IL-6, HGF, VEGF, CXCL12, CXCL14, entre otros). Estas señales activan vías de señalización, fomentando



la motilidad celular tumoral y la neo-angiogénesis, amplificando así el potencial de diseminación metastásica [19, 73, 185, 247, 248].

Por otro lado, tanto los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) como los CD105(-)/CD34(-) mostraron niveles comparables de senescencia celular, dado que encontramos un porcentaje similar de células positivas para SA- β -galactosidasa. Los CAFs senescentes dentro del microambiente tumoral juegan un papel crucial en la progresión del cáncer, secretando factores pro-tumorales [186, 187]. La senescencia inducida por la terapia en los fibroblastos a menudo resulta en resistencia a la quimio y radioterapia y estimula la promoción de un fenotipo secretor pro-tumoral [186, 187]. El programa de senescencia en estas células puede ser desencadenado por diversos factores estresantes, como el estrés oxidativo. Por lo tanto, comprender el papel de los CAFs senescentes es esencial para abordar la resistencia terapéutica y mejorar los resultados del tratamiento del cáncer. Sin embargo, es importante mencionar que se necesitan estudios adicionales sobre la senescencia celular para verificar verdaderamente estos hallazgos. A futuro sería interesante también evaluar la expresión de proteínas relacionadas con la senescencia (p16, p21 o p53) o medir el fenotipo secretor asociado a la senescencia.

Ampliando nuestra exploración a perfiles de expresión génica relacionados con aspectos cruciales de la función celular, los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) mostraron una expresión significativamente elevada de genes clave asociados con la capacidad *stemness*, diferenciación osteogénica, regulación de la osteoclastogénesis, migración y progresión tumoral en comparación con los fibroblastos CD105(-)/CD34(-). Específicamente, los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) exhibieron niveles de expresión más altos de CD146, RUNX2, RANKL y TNC. Estos hallazgos sugieren una firma molecular en los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) que se alinea con propiedades de células madre, potencial osteogénico y capacidades migratorias, proporcionando una mayor comprensión de la diversidad funcional de las subpoblaciones de fibroblastos dentro del microambiente tumoral de mama. Se sabe que las proteínas de la matriz extracelular no estructurales, como TNC, también son expresadas por los CAFs [78]. Estudios como el de Huang et al. han demostrado *in vitro* que TNC estimula la proliferación, migración y metástasis de la línea celular de



cáncer de mama humano MDA-MB231 [79]. La elevada expresión génica de TNC en los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) está posiblemente vinculada a su papel en la modulación de la señalización de las células madre tumorales, al posiblemente influir en reguladores clave de las vías de Wnt y Notch, asociadas con un mayor riesgo de recurrencia [249–251]. Además, el hecho de que una baja expresión de TNC en el estroma esté vinculada a mejores resultados, mientras que una alta expresión de TNC se asocia con una pobre supervivencia a los 5 años en las PCM, resalta la importancia de TNC como un posible marcador pronóstico [249, 252–254]. A la luz de la elevada expresión de RUNX2 observada en la subpoblación CD105(+)/CD34(-) de los CAFs, los descubrimientos han revelado su contribución significativa a la progresión tumoral y las metástasis óseas en el cáncer de mama, sugiriendo su relevancia en múltiples tipos de cáncer [255]. En relación, RUNX2 es un factor de transcripción con un papel fundamental en la regulación de genes propicios para la formación ósea, lo que indicaría un posible potencial de diferenciación osteogénica de los CAFs estudiados y exhibe una expresión anormal en tumores propensos a metástasis óseas [256, 257]. En relación con la expresión aumentada de RANKL, hay estudios que destacan el impacto proliferativo derivado de la interacción entre RANKL y RANK en las células de cáncer de mama, sugiriendo su participación tanto en la iniciación como en la progresión del cáncer de mama [183, 258–264]. RANKL actúa como una citoquina específica del tejido que facilita la migración celular tumoral y desempeña un papel crítico en la promoción de la metástasis específica del hueso, particularmente en tumores epiteliales, como es el cáncer de mama [183]. En consecuencia, el enfoque terapéutico dirigido a las interacciones entre RANKL y su receptor RANK emerge como un tratamiento prometedor para interrumpir la metástasis y la progresión tumoral dentro del hueso [183, 258–262]. Nuestros hallazgos destacan que los CAFs CD105(+)/CD34(-) muestran una elevada expresión génica de RANKL, lo que resalta su posible implicación en la regulación de estos procesos. En estudios paralelos a este trabajo, observamos la co-expresión de CD105 y RANK en los CAFs, no asociados a la vasculatura CD34(-), de tumores primarios de PCM de tipo ductal infiltrante, temprano [184]. Más aún, encontramos que estos CAFs tenían la capacidad de migrar en respuesta a la estimulación con RANKL recombinante humano, y



este efecto migratorio se inhibía al agregar un anticuerpo anti-RANKL y/o anti-RANK [184]. Además, resultados previos de nuestro grupo sugieren una comunicación recíproca entre la expresión de RANKL en las células tumorales de mama y estas células estromales, no asociadas a la vasculatura, y una regulación autócrina y parácrina de RANK, especialmente en este tipo de CAFs [92]. Considerando esta información y nuestros resultados del presente trabajo, surge la hipótesis de que el sistema RANKL-RANK podría desempeñar un papel significativo en la migración de los CAFs dentro del microambiente tumoral mamario, así como su intravasación a sangre y su extravasación hacia futuros nichos pre-metastásicos, como lo es la MO/hueso. En relación, estudios realizados por otros autores han demostrado que los CAFs pueden aumentar la supervivencia y el establecimiento de las células tumorales en partes distantes del cuerpo al propagarse a través del torrente sanguíneo, ya sea como CAFs circulantes independientes o junto con células tumorales [265, 266]. Al respecto, un estudio detectó CAFs circulantes y conglomerados de CAFs en la sangre periférica de PCM con enfermedades metastásicas [266].

Al evaluar el secretoma de ambas poblaciones fibroblásticas, nuestro análisis reveló tres grupos distintivos de proteínas, cada uno asociado con procesos biológicos específicos integrales para la biología tumoral. En el primer grupo, se encontraron determinadas proteínas que resultan interesantes por estar implicadas en diversas vías tumorales, como por ejemplo S100A7, tubulina-1, serpina B3, IGFBP3, decorina y COL31A. Al respecto, en ambos MCo se encontró la proteína S100A7. Se sabe que los genes S100, particularmente S100A7, se expresan de manera diferente entre tejido normal y tumoral, así como entre las distintas etapas del cáncer de mama [267]. La sobreexpresión de S100A7, observada principalmente en situaciones de estrés e inflamación, también se produce en respuesta a hormonas y factores de crecimiento, como el estrógeno y el EGF. S100A7 actúa como una citoquina al unirse a su receptor **RAGE** (receptor para los productos finales de glicación avanzada) y se ha demostrado que la vía activada S100A7/RAGE promueve efectos angiogénicos y facilita la diseminación metastásica en el cáncer de mama [268]. Por otro lado, tubulina-1 es una proteína de la subunidad de los microtúbulos, estructura crítica en la mitosis, el crecimiento y el movimiento celular, procesos especialmente relevantes en las



células tumorales [269]. La tubulina-1 es el blanco de algunos de los fármacos anticancerígenos más utilizados en entornos clínicos, conocidos como agentes de unión a la tubulina, que incluyen alcaloides de la vinca, taxanos y epotilonas. Por lo tanto, esta proteína desempeña un papel fundamental en la resistencia de las células tumorales a los fármacos [270]. En relación a la serpina B3, pocos estudios se han realizado para evaluar su rol dentro del tumor mamario. Sin embargo, es sabido que serpina B3 emerge como un potencial biomarcador predictivo en cáncer de pulmón avanzado, asociándose con una baja supervivencia post-quimioterapia [271]. Además, la sobreexpresión de serpina B3 impulsa la proliferación epitelial y fibrosis pulmonar en modelos murinos [272]. Asimismo, se revela que serpina B3/B4, activadas por STAT3, favorecen la supervivencia de las células de carcinoma escamoso [273]. Estos estudios sugieren un papel significativo de la serpina B3 en el microambiente tumoral y su potencial relevancia como diana terapéutica. La vía del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I (**IGF1R**) desempeña un papel crucial en el cáncer de mama, especialmente en la señalización dependiente de estrógeno [274]. La proteína de unión al IGFBP3 es destacada en la regulación, mostrando capacidad para proteger contra la apoptosis y estimular la proliferación celular. IGFBP3 tiene un papel multifacético, actuando como supresor o promotor tumoral según el estadio y las interacciones con otras vías de señalización. Estudios demuestran que IGFBP3 induce senescencia en células de cáncer de mama MCF-7 al inhibir la actividad de la telomerasa [275], así como existen otros estudios que indican que IGFBP3 podría desempeñar un papel en la señalización apoptótica de la vitamina D y podría estar implicada en la resistencia adquirida al efecto pro-apoptótico de la vitamina D en el cáncer de mama [276]. En relación a la decorina, un importante proteoglicano en la matriz extracelular, desempeña un papel crucial en la proliferación celular y la cicatrización. La disminución de la expresión de decorina en el estroma se asocia comúnmente con un peor pronóstico en cánceres epiteliales. Sin embargo, en un estudio en cáncer de mama, se examinaron los niveles plasmáticos de decorina, revelando un incremento en etapas avanzadas que podría ser un indicador potencial de la progresión tumoral [277]. También, estudios han reportado que la familia del colágeno, incluido el COL3A1, está estrechamente involucrada en la



carcinogénesis y la resistencia a medicamentos [278–280]. Se sabe que el silenciamiento de COL3A1 reprime la proliferación, migración, invasión y escape inmunológico de las células de TNBC al inhibir la expresión de PD-L1 [281]. Además, en otro estudio se encontró que una subpoblación especial de fibroblastos positivos para la proteína de membrana epitelial 1 y COL3A1 estaba enriquecida en muestras de metástasis ósea de cáncer de mama [282]. Estos fibroblastos facilitan el proceso de metástasis ósea al interactuar con las células tumorales a través de la comunicación COL3A1-ADGRG1 [282]. Todos estos resultados nos llevan a pensar en el rol fundamental de ambas subpoblaciones fibroblásticas CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-) en la progresión metastásica del cáncer de mama, a través de la liberación de COL3A1. Y en particular, los CAFs CD105(+)/CD34(-), que de intravasarse a sangre periférica y extravasarse a MO/ hueso podrían contribuir a la progresión de la cascada metastásica ósea.

Otra proteína interesante encontrada en el segundo cluster fue SPARC. En el cáncer de mama, SPARC, también conocido como osteonectina, ha sido asociado con un peor pronóstico. Se han reportado funciones pro-tumorales, estimulando la EMT, promoviendo la activación de MMP-2, contribuyendo así a las cascadas proteolíticas asociadas con la invasión tumoral y consecuente migración de las células tumorales como MCF-7 [283–286]. Finalmente, dos proteínas de interés encontradas en el tercer clúster son la trombospondina-1 y la fibronectina-1, ambas conocidas por su implicancia en el desarrollo tumoral. La trombospondina-1 es una glicoproteína matriz extracelular producida por diversas células, incluidas plaquetas, hepatocitos y otras, que puede interactuar con múltiples factores, como CD36, integrinas, CD47 y TGF- β . Esta proteína participa en diversas funciones, incluyendo la inflamación, la regulación de la angiogénesis y la apoptosis [287]. Se secreta en respuesta a la inflamación [287] y se ha demostrado que está involucrada en lesiones tisulares, enfermedades inflamatorias y cáncer. La trombospondina-1 podría contribuir a la formación del nicho pre-metastásico, ya que se ha demostrado que facilita la metástasis del cáncer de mama al interrumpir la integridad de las uniones intercelulares endoteliales [288]. Además, tanto la trombospondina-1 como la fibronectina-1 han sido reportadas como biomarcadores de enfermedad mamaria cuando son identificadas en el



plasma de las pacientes [289, 290]. Por otro lado, la fibronectina-1 es un componente importante de la matriz extracelular. Estructuralmente, la fibronectina-1 se define como una glicoproteína de gran peso molecular, que exhibe diferentes expresiones y funciones en varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama [291, 292]. Particularmente, desempeña un papel importante en la adhesión, proliferación, migración e invasión de las células tumorales [293, 294]. De todo lo expuesto, surge que tanto las subpoblaciones de CAFs CD105(+)/CD34(-) como CD105(-)/CD34(-) secretan proteínas con potencial pro-tumoral. Asimismo, todos estos hallazgos subrayan la complejidad de las interacciones en el microambiente tumoral [274], particularmente subrayan la complejidad de la heterogeneidad de los fibroblastos y destacan la importancia de una exploración adicional para elucidar sus contribuciones específicas a la progresión del cáncer de mama.

Ahora bien, más allá de la caracterización del secretoma, se evidenciaron patrones de abundancia distintos dentro de cada subpoblación fibroblástica, con diferencias identificadas en la abundancia de laminina, lumican, Gal-3BP y el componente C1s del complemento para los CAFs CD105(+)/CD34(-) y queratina tipo II, para CD105(-)/CD34(-). Está reportado que las PCM con niveles séricos de Gal-3BP superiores a 11 µg/mL tienen un mal pronóstico y una tendencia a la ocurrencia de metástasis; por lo tanto, Gal-3BP se considera un antígeno asociado al tumor en el cáncer de mama [295]. Otros estudios sugieren que lumican puede tener efectos supresores y promotores en los tumores en diferentes contextos, especialmente en el cáncer de mama [296]. En los tejidos de cáncer de mama, el lumican está sobreexpresado en los fibroblastos adyacentes a las células cancerosas. Este alto nivel de expresión está además asociado con un mayor grado tumoral, niveles más bajos de receptores de estrógeno y pacientes más jóvenes [297]. En cuanto a laminina, este factor desempeña un papel crucial en la regulación de los MEC y está estrechamente asociado con varios procesos celulares, así como con la invasión tumoral y el pronóstico clínico en varios cánceres epiteliales [298–302]. Niveles elevados de laminina están asociados con una mayor capacidad de migración de las células cancerosas contribuyendo significativamente a la invasión y metástasis del cáncer de mama [298]. Esto coincide con los hallazgos de nuestro estudio, donde los CAFs CD105(+)/CD34(-) exhibieron



una mayor abundancia de laminina en el secretoma, resaltando su relevancia potencial en la promoción de la progresión tumoral y el comportamiento metastásico. En cuanto a las queratinas de tipo II como ligandos, no se ha identificado la presencia de receptores en el sentido tradicional en las células tumorales mamarias. Sin embargo, estas queratinas, al ser proteínas estructurales del citoesqueleto, interactúan con diversas proteínas intracelulares, desempeñando un papel crucial en la funcionalidad celular. Estas interacciones pueden tener implicaciones significativas en la progresión del cáncer de mama y su tratamiento. [303, 304]. Futuros estudios deben ser realizados para conocer como actúa al ser liberada por los CAFs del microambiente tumoral mamario.

De todo lo expuesto se concluye que los CAFs CD105(+)/CD34(-) no muestran un perfil secretor distintivo en comparación con los CAFs CD105(-)/CD34(-), lo que sugiere que ambos son fibroblastos activados pro-tumorales. Sin embargo, la variación en la abundancia relativa de las proteínas mencionadas anteriormente podría indicar diferencias en su actividad secretora pro-tumoral. Desafortunadamente, no se pudo detectar en el secretoma la presencia de citoquinas esperadas tales como CCL-2, IL-6, RANKL, entre otras. El análisis del secretoma basado en espectrometría de masas es un enfoque interesante para determinar las moléculas liberadas por diversas subpoblaciones de fibroblastos. Sin embargo, es importante reconocer que este método tiene limitaciones. La ausencia de estas citoquinas esperadas podría atribuirse, por un lado, al tiempo insuficiente asignado para que las células liberen estos factores; el período de incubación de 48 horas puede que no haya sido adecuado. Por otro lado, algunos factores secretados pueden tener concentraciones bajas debido a la dilución del medio de cultivo, lo que dificulta su detección. Otras limitaciones del estudio incluyen la interferencia potencial de la sal y otros compuestos presentes en los medios de cultivo en el análisis proteómico, lo que requiere una precipitación específica de proteínas para obtener resultados precisos [305].

Por último, estudiando el impacto de los MCo en el comportamiento de las células tumorales, los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) exhibieron una capacidad superior para inducir la migración en las células MCF-7 en comparación con los fibroblastos CD105(-)/CD34(-), sin diferencias significativas observadas en la línea celular MDA-MB231.



Sorprendentemente, el MCo de los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) demostró un mayor potencial para inducir la proliferación en las células MDA-MB231 en comparación el MCo de los fibroblastos CD105(-)/CD34(-), sin un efecto en las células MCF-7. Los resultados variables obtenidos de los tratamientos con MCo de ambas subpoblaciones de fibroblastos en las líneas de cáncer de mama humana estudiadas concuerdan con las observaciones realizadas por otros investigadores, sugiriendo que cada subtipo de tumor mamario puede desarrollarse junto con diferentes subtipos de CAFs, y que una misma subpoblación de CAFs puede afectar de manera distinta a cada subtipo molecular de cáncer de mama [306]. Estos autores, encontraron que los CAFs pueden experimentar distintos cambios genéticos en genes supresores de tumores como TP53 y PTEN, así como alteraciones epigenéticas de acuerdo al subtipo de cáncer de mama [306]. Además, el estado de RE y HER2/neu en las células tumorales de mama puede influir en la expresión génica y las funciones de los CAFs [307–309]. Por ejemplo, los CAFs derivados de tumores de mama HER2/neu-positivos tienden a mostrar una mayor expresión de genes asociados con las vías de señalización de integrinas y del citoesqueleto, en comparación con los CAFs aisladas de TNBC y tumores de mama RE-positivos [308].

El estudio de expresión génica también reveló que el MCo de los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) indujo la expresión de genes asociados con la capacidad de *stemness*, auto-renovación y multipotencialidad, (SOX2 y OCT4) en la línea celular MDA-MB231. Además, tanto en las células MCF-7 como en las MDA-MB231, el MCo de los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) aumentó la expresión de genes asociados con la diferenciación osteogénica y la mineralización ósea, tales como BMP6 y FGF10. Particularmente en la línea MDA-MB231 tratada con el MCo de la subpoblación de fibroblastos CD105(+)/CD34(-) se encontró un aumento en la expresión de RUNX2 y RANKL, genes relacionados con la inducción de un fenotipo *stem* de tipo osteoblástico en las células tumorales mamarias y osteoclastogénesis. Estos hallazgos establecen una conexión directa y refuerzan los resultados de la parte A del actual trabajo, donde hemos encontrado una asociación entre la presencia de CAFs CD105(+)/CD34(-) y la presencia de microcalcificaciones anárquicas [177]. Por lo tanto, estos resultados consolidan nuestra hipótesis de que los CAFs CD105(+)



pueden estar involucrados en la progresión de la metástasis ósea, posiblemente desencadenando la transformación de las células epiteliales del tumor primario en células tumorales similares a osteoblastos o *osteoblasts-like*. La transición de las células tumorales mamarias en un fenotipo similar al de los osteoblastos, a través de la EMT, podría desempeñar un papel crucial en la progresión tumoral hacia la metástasis ósea [203, 213]. Esta transición fenotípica se caracteriza por un fenotipo mesenquimal que expresa genes como OCT-4 y SOX-2, otorgando auto-renovación y multipotencialidad, proliferación y, en última instancia, migración. Simultáneamente, estas células tumorales similares a osteoblastos están caracterizadas por la expresión de ciertos marcadores osteogénicos, particularmente RUNX2 y RANKL [202, 213]. En consecuencia, estas células adquieren no solo la capacidad de proliferación, migración e invasión, sino también desarrollan resistencia a múltiples fármacos. Además, la presencia de marcadores específicos de osteoblastos asociados a microcalcificaciones anárquicas en el estroma tumoral mamario sugiere una correlación entre la aparición de estas células, similares a osteoblastos, y la mineralización del estroma, lo que podría ser un paso clave en el inicio de las metástasis óseas. Este proceso de EMT y posterior diferenciación a una célula *osteoblast-like* podría establecer un nicho de soporte y un entorno de señalización, facilitando la migración de estas células tumorales similares a osteoblastos a la MO/hueso. Posteriormente, pueden establecer nichos pre-metastásicos óseos, que finalmente culminan en metástasis óseas. Estos hallazgos subrayan colectivamente la posible influencia de los CAFs CD105(+)/CD34(-) en el comportamiento de las células tumorales, sugiriendo un papel fundamental en la formación del microambiente tumoral y la progresión del cáncer de mama hacia la metástasis ósea. Se necesitan más investigaciones para descifrar los mecanismos moleculares subyacentes que orquestan estos efectos observados y sus implicaciones para intervenciones terapéuticas dirigidas a las interacciones tumor-estroma en el cáncer de mama.

De todo lo expuesto se deduce que investigar los rasgos fenotípicos, moleculares y funcionales de los CAFs en los tumores de mama es esencial para comprender con mayor precisión el pronóstico del paciente y desarrollar terapias alternativas y específicas. Sin



embargo, la presencia de diversos subtipos de CAFs, con distintos orígenes, marcadores y propiedades funcionales dentro del microambiente tumoral mamario, presenta un gran desafío. Por lo tanto, antes de avanzar en estrategias terapéuticas que involucren fármacos contra los CAFs, es crucial identificar con precisión los subtipos que promueven el tumor en el cáncer de mama para dirigir eficazmente dichas terapias. Nuestros hallazgos destacan la relevancia de los CAFs CD105(+)/CD34(-) en el pronóstico y tratamiento del cáncer de mama. La abundancia de estos CAFs en el estroma intratumoral se asocia con una mayor incidencia de metástasis óseas [177]. En consecuencia, evaluar la presencia de este tipo de fibroblastos podría ayudar a identificar a las pacientes con mayor riesgo de desarrollar metástasis óseas futuras. Por lo tanto, para trasladar estos hallazgos a la práctica clínica, proponemos un seguimiento más detallado de las PCM en etapas tempranas, realizando controles regulares cada seis meses en lugar de cada doce, y realizando estudios de la calidad ósea mediante densitometrías. Además, sería útil evaluar marcadores de desorganización ósea en análisis de sangre rutinarios.

Por otro lado, la identificación de estos fibroblastos podría facilitar la implementación de terapias dirigidas para reducir su contribución a la progresión tumoral hacia la metástasis ósea. Una estrategia terapéutica prometedora podría resultar de la combinación de tratamientos convencionales (quimio/radio/hormo/inmunoterapia según corresponda) junto con tratamientos que aborden otras vías de progresión tumoral. Inhibir citoquinas quimiotácticas como CCL-2 y RANKL, así como moléculas de adhesión como CD106 (VCAM), que facilitan la intravasación y adhesión de células tumorales y estromales al endotelio, permitiendo además su extravasación a sitios secundarios como la MO/hueso, podría resultar un enfoque prometedor [310]. Como describimos, la señalización CCL-2/CCR-2 es esencial en el proceso metastásico, estimulando la proliferación, invasión y migración de células tumorales, y promoviendo el crecimiento metastásico [311]. Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que las PCM de estadios I/II expresan CCL-2 y CCR-2 tanto en células tumorales como en células fusiformes no asociadas a la vasculatura [CD34(-)] (*fibroblast-like*). Además, en los estadios avanzados III-B, encontramos que las PCM no tratadas y con el tumor presente, muestran niveles elevados de CCL-2 en el plasma de MO,



sugiriendo que CCL-2 juega un papel crucial en la quimioatracción de células tumorales, pre-osteoclastos y CAFs hacia sitios secundarios como la MO/hueso [312]. Interesantemente, Tsuyada et al. [313] reveló que CAFs humanos co-cultivados con líneas celulares de cáncer de mama, aumentan la expresión de CCL-2 en las células tumorales, provocando un fenotipo de formación de mamósferas similar a las CSC. Este grupo demostró que CCL-2 también mejora la auto-renovación y expansión de CSC sugiriendo que CCL-2 puede conferir un fenotipo tumoral más agresivo [313]. En cuanto a estudios clínicos, el carlumab, un anticuerpo monoclonal que bloquea CCL-2, se evaluó en un estudio de fase I (NCT01204996) [314]. Los resultados muestran que a pesar de que se administró de manera segura y fue bien tolerado, no se observaron efectos anti-tumorales significativos [314].

Por otro lado, como describimos previamente, en un estudio reciente de nuestro grupo, encontramos que los CAFs CD105(+) expresan RANK y pueden migrar en presencia de RANKL *in vitro*; esta migración se inhibe al bloquear tanto el receptor (RANK) como el ligando (RANKL) [184]. Esto sugiere que el sistema RANK/RANKL podría estar involucrado en la migración de estos fibroblastos hacia sitios secundarios, posiblemente junto con la tumoral mamaria, favoreciendo el entorno propicio para el desarrollo de metástasis óseas. Actualmente, existen tratamientos dirigidos contra el eje RANK/RANKL, como el Denosumab, que es un anti-RANKL y por ende bloquea esta interacción reduciendo la osteoclastogénesis y la resorción ósea, siendo beneficioso en cánceres que metastatizan al hueso. Otra terapia que tiene objetivos semejantes son los bifosfonatos, como el ácido zoledrónico y el pamidronato [315]. Estas drogas se utilizan para reducir el riesgo de complicaciones óseas, como fracturas y dolor óseo, al fortalecer los huesos y disminuir la actividad osteoclástica [316, 317]. Estos tratamientos han demostrado mejoras significativas en la sobrevida global, así como en el tiempo libre de recidiva local en las PCM, especialmente en mujeres post-menopáusicas. Por lo tanto, la combinación de bifosfonatos y denosumab podría aumentar la densidad mineral ósea, mejorar el metabolismo óseo y reducir la disminución de calidad ósea en PCM que sufren pérdida ósea. Cabe aclarar, que el tratamiento con zoledrónico no sólo inhibe la actividad osteoclástica sino también la liberación en la MSCs de MO de factores quimiotácticos de célula tumoral mamaria como



CCL-5 e IL-6 [318] y promueve la diferenciación osteogénica de esta célula madre adulta por inhibición del estrés oxidativo [316]. Finalmente, integrar todos estos tratamientos con fármacos anti-CD106 (VCAM) podría prevenir la infiltración de precursores osteoclásticos, células tumorales y CAFs CD105(+), reduciendo así la osteoclastogénesis y la formación de metástasis óseas. Es sabido que CD106(VCAM) desempeña un papel clave en el reclutamiento de pre-osteoclastos hacia micrometástasis óseas incipientes [178]. Además, la expresión aberrante de CD106(VCAM) ha sido reportada en células tumorales mamarias [319]; y en nuestro estudio, la encontramos en los fibroblastos CD105(+)/CD34(-). Más aún, en un estudio previo encontramos niveles elevados de VCAM-1 en el plasma de MO de las PCM de tipo ductal infiltrante en estadio III-B, previo a la cirugía y tratamiento, es decir como componente del nicho pre-metastásico de MO/ hueso. Observación que nos sugirió que este factor podría estar involucrado no sólo en quimiotaxis de los pre-osteoclastos sino también en el escape de la célula de cáncer de mama circulante y CAFs fuera de los vasos sanguíneos a MO, proceso llamado extravasación [170]. Aunque actualmente no existen muchas terapias específicamente dirigidas contra CD106 (VCAM) aprobadas para el cáncer de mama, el bloqueo del eje CD106 (VCAM)/ $\alpha 4\beta 1$, combinado con tratamientos anti-CCL-2 y anti-RANKL, podría ser una estrategia prometedora. Este enfoque podría prevenir la colonización de CAFs y células tumorales en el nicho pre-metastásico óseo, además de inhibir el reclutamiento de pre-osteoclastos que promueven la resorción ósea y crean un entorno propicio para la metástasis.

Finalmente, otro blanco terapéutico interesante que resulta de nuestro estudio es CD105. Las terapias contra CD105, utilizadas en cáncer de próstata para inhibir la neovascularización, podrían adaptarse al cáncer de mama, dada la función crucial de CD105 en la diferenciación y activación de los CAFs. Por ejemplo, el Carotuximab (TRC105) es un anticuerpo monoclonal que se une a CD105, inhibe la señalización pro-angiogénica mediada por TGF- β e induce citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. En modelos preclínicos de xenoinjertos murinos de cáncer de mama, el carotuximab inhibió selectivamente la angiogénesis tumoral y retrasó el crecimiento de tumores establecidos, mientras preservaba la vasculatura normal [320]. Incluso hay estudios que probaron



TRC105 en combinación con quimioterapia e inhibidores de VEGF, y como agente único en pacientes con cáncer de mama [321]. Respecto al efecto del TRC105, sobre el estroma tumoral mamario, un estudio mostró que el tratamiento con TRC105 resultó en una disminución del contenido de CAFs positivos para α -SMA en los tumores de cáncer de mama [322]. Por lo tanto, dado que el porcentaje de estroma tumoral y la abundancia de fibroblastos CD105(+) son marcadores pronósticos importantes en el cáncer de mama, el tratamiento con TRC105 podría reducir los CAFs que expresan CD105, los cuales estimulan el crecimiento tumoral y su desarrollo hacia la metástasis ósea, favoreciendo así la supervivencia del paciente. Todo este enfoque multidimensional no solo mejorará el pronóstico, sino que también abrirá nuevas vías para el tratamiento personalizado del cáncer de mama, optimizando la sobrevida y la calidad de vida de las pacientes.



CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Los CAFs son una de las poblaciones celulares más influyentes en la progresión del cáncer de mama. Se activan tanto en las etapas tempranas como tardías del tumor, y contribuyen a su iniciación, crecimiento, metástasis y resistencia al tratamiento a través de diversos mecanismos. Además de interactuar con las células tumorales de mama, los CAFs también se relacionan con otros componentes del microambiente tumoral, como la matriz extracelular y las células del sistema inmune, lo que potencia aún más la evolución del tumor. Sin embargo, aún existen cuestiones sin resolver sobre el papel de los CAFs en el cáncer de mama. Actualmente, no hay una clasificación molecular clara y precisa de los CAFs, lo que dificulta su uso en el diagnóstico clínico. Es crucial identificar marcadores moleculares específicos y efectivos, así como determinar las subpoblaciones de CAFs en los distintos subtipos de cáncer de mama.

En este trabajo de tesis doctoral, presentamos evidencia de que los CAFs son prometedores como factores pronósticos y posiblemente también como blancos terapéuticos para combatir la progresión del cáncer de mama, especialmente en relación con la metástasis ósea. El desarrollo de terapias de “normalización” del estroma, en combinación con tratamientos estándar, podría mejorar la respuesta del tumor y la supervivencia de las pacientes. Nuestro estudio demuestra que la presencia de CAFs CD105(+)/CD34(-) tiene un impacto significativo en el pronóstico de las PCM. Encontramos que un estroma rico en fibroblastos CD105(+) es un marcador pronóstico desfavorable para mujeres con cáncer de mama ductal infiltrante temprano. Además, la expresión de CD105 en los CAFs actúa como un biomarcador pronóstico independiente para el MFS, en particular para el BMFS y la OS. También observamos que la presencia de CAFs CD105(+)/CD34(-) está asociada con microcalcificaciones anárquicas en la mama previas y posteriores al diagnóstico del tumor. Aunque se requieren más estudios para comprender completamente los mecanismos subyacentes, nuestros hallazgos sugieren que los CAFs CD105(+) podrían estar implicados en la formación del nicho pre-metastásico en la MO/hueso. Esto podría ocurrir a través de la promoción de la diferenciación de las células



tumorales epiteliales hacia células con características de osteoblastos, que posiblemente puedan migrar a sitios secundarios como la MO/hueso. Es sabido que la presencia de metástasis óseas afecta significativamente la calidad de vida de las pacientes y reduce la tasa de supervivencia. Por lo tanto, evaluar la presencia de los CAFs CD105(+) podría ser crucial para estratificar a las pacientes según su perfil de riesgo individual para el desarrollo de metástasis óseas, mejorando así las estrategias y los resultados del tratamiento.

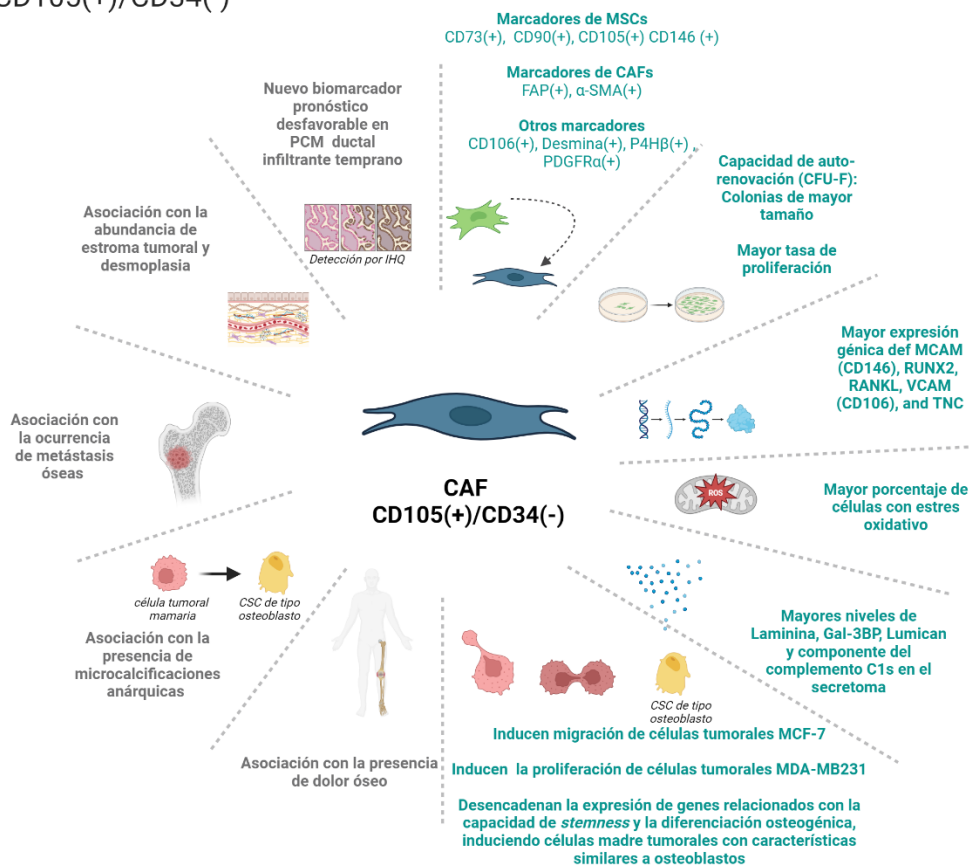
Por otro lado, este estudio ha proporcionado información sobre algunas características fenotípicas, moleculares y funcionales de dos subpoblaciones de fibroblastos en el microambiente tumoral de mama, de tipo luminal: CD105(+)/CD34(-) y CD105(-)/CD34(-). Al identificar marcadores distintivos, como la elevada expresión de CD146, CD106, P4H β y desmina en los fibroblastos CD105(+)/CD34(-), y explorar sus propiedades únicas, incluida su capacidad proliferativa, niveles de ROS y la influencia en la migración y proliferación de células de cáncer de mama, hemos definido en parte contribuciones específicas de estas subpoblaciones a la dinámica tumoral. Además, el perfil de expresión génica y secretora de ambas subpoblaciones proporciona una visión integral de sus posibles roles, destacando la influencia significativa de los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) en la configuración del microambiente tumoral y en la progresión del cáncer de mama. Resulta especialmente interesante que el MCo de los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) induzca la expresión de genes de *stemness* y genes relacionados con el fenotipo osteoblástico en la línea MDA-MB231. Estos hallazgos complementan los obtenidos en la primera parte del estudio, sugiriendo que los fibroblastos CD105(+)/CD34(-) podrían estar implicados en la señalización del tumor primario hacia las metástasis óseas.

Por lo tanto, estos estudios no solo enriquecen nuestra comprensión de la complejidad del microambiente tumoral, sino que también establecen una base sólida para futuras investigaciones y estrategias terapéuticas dirigidas a las interacciones tumorales-estromales en el cáncer de mama.



GRAPHICAL ABSTRACT

FIBROBLASTOS ASOCIADOS AL CÁNCER Subpoblación CD105(+)/CD34(-)



Resumen de los principales hallazgos del presente trabajo de tesis. Se describen en gris los resultados principales de la primer parte del estudio (Parte A, estudio retrospectivo) y en celeste los principales resultados de la segunda parte del estudio (parte B, estudio prospectivo). CAF: fibroblasto asociado al cáncer, PCM: paciente con cáncer de mama, IHQ: inmunohistoquímica, CSC: célula madre tumoral, MSCs: célula madre mesenquimal/estromal, CFU-F: unidad formadora de colonias fibroblástica, CD146 (MCAM): molécula de adhesión celular del melanoma, RUNX2: factor de transcripción 2 de la familia RUNX, RANKL: Ligando del receptor activador del factor nuclear κ B, CD106 (VCAM-1): proteína de adhesión de células vasculares 1, TNC: tenascina, Gal-3BP: proteína de unión a la galectina 3, FAP: Proteína activadora de fibroblastos α -SMA: actina de músculo liso α , P4H β : subunidad beta de prolil 4-hidroxilasa, PDGFR α : Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas de tipo alfa.



CUADRO RESUMEN

Hallazgos claves

- La alta expresión de CD105 en fibroblastos asociados al cáncer (CAFs), negativos para CD34, es un nuevo biomarcador pronóstico independiente para la ocurrencia de metástasis ósea en pacientes con cáncer de mama ductal infiltrante temprano (PCM). Por lo tanto, la evaluación de CAFs positivos para CD105 podría ser crucial para estratificar a las PCM según su perfil de riesgo individual para el desarrollo de metástasis óseas, mejorando así las estrategias y resultados del tratamiento.
- Hemos logrado aislar y cultivar una subpoblación específica de células mesenquimales estromales, o CAFs, que son positivas para CD105 y negativas para CD34, a partir del microambiente del cáncer de mama ductal infiltrante temprano. Encontramos que estas células pueden influir en el desarrollo del tumor mamario al inducir una expresión génica específica y aumentar la capacidad de proliferación y migración de líneas celulares de cáncer de mama humano, como MDA-MB231 y MCF-7

¿Qué se sabe y qué es nuevo?

- Actualmente, el cáncer de mama es el tumor maligno más común entre las mujeres en el mundo. Diversos estudios han investigado los mecanismos de desarrollo de este cáncer, y recientemente, un número creciente de investigadores se ha centrado en el papel del microambiente estromal tumoral, en particular los CAFs, que han demostrado desempeñar un papel clave en el desarrollo y la metástasis, incluyendo la metástasis ósea, del cáncer de mama. Los datos acumulados sugieren que entre el 60% y el 70% de las PCM avanzadas desarrollan metástasis óseas osteolíticas, con una supervivencia global media de 3,4 años. Esto se asocia con una tasa de mortalidad más alta y diversas complicaciones clínicas, como hipercalcemia, dolor, compresión de la médula espinal, fracturas y movilidad reducida, que impactan significativamente en la calidad de vida.
- Encontramos que la alta expresión de CD105 en los CAFs, no asociados a la vasculatura y negativos para CD34, es un nuevo marcador pronóstico independiente para la metástasis ósea, así como para el tiempo libre de metástasis, en particular para el tiempo libre de metástasis óseas, y sobrevida global en las PCM ductal infiltrante temprano. Además, aislamos y expandimos una clase de células mesenquimales estromales, o CAFs, positivos para CD105 y negativos para CD34 del microambiente tumoral, y comparamos sus características fenotípicas y funcionales con las de CAFs negativos para CD105 y negativos para CD34.

¿Cuál es la implicación y qué debería cambiar ahora?

- La expresión de CD105 en los CAFs representa un parámetro prometedor que no solo es fácilmente detectable, sino también reproducible y eficiente en términos de tiempo en varios subtipos de cáncer de mama. Considerando estas ventajas, la expresión de CD105 en los CAFs se presenta como un nuevo biomarcador candidato que puede ser fácilmente incorporado en los diagnósticos rutinarios de los servicios de patología de los hospitales. Su inclusión mejoraría la precisión en la estratificación del riesgo de metástasis óseas para las PCM, lo que permitiría tomar decisiones de tratamiento más adecuadas y lograr mejores resultados. Se justifican investigaciones adicionales y estudios de validación para establecer la utilidad clínica y los beneficios a largo plazo de la expresión de CD105 en los CAFs como herramienta diagnóstica en el manejo temprano del cáncer de mama. Nuestra cohorte incluyó a 350 PCM.
- Finalmente, examinar los CAFs, en particular aquellos que son positivos para CD105 y negativos para CD34, puede proporcionar nuevas perspectivas para la terapia dirigida al microambiente del cáncer.



AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina; al Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCYT), Argentina; al Instituto Nacional del Cáncer (INC), Argentina; a la Fundación Alberto Roemmers, Argentina; a la Fundación Florencio Fiorini, Argentina; a la Fundación René Barón, Argentina; y a la Fundación Williams, Argentina.



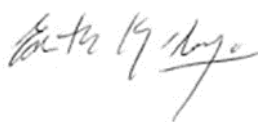
Autor: Lic. María Belén Giorello



Directora de tesis: Dra. Norma Alejandra Chasseing



Directora asistente: Dra. Vivian Labovsky



Consejera de estudios: Dra. Edith Kordon



REFERENCIAS

1. van der Meer DJ, Kramer I, Maaren MC, et al. Comprehensive trends in incidence, treatment, survival and mortality of first primary invasive breast cancer stratified by age, stage and receptor subtype in the Netherlands between 1989 and 2017. *International Journal of Cancer*. 2020. 148:2289–2303. <https://doi.org/10.1002/ijc.33417>
2. Cancer de mama. Estadísticas. 2024. Retrieved from <https://www.paho.org/es/temas/cancer-mama>
3. Instituto Nacional de Cancer. Estadísticas - Incidencia Argentina 2020. 2020. Retrieved from <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/incidencia>
4. Instituto Nacional de Cancer. Estadísticas - Mortalidad Argentina 2020. 2020. Retrieved from <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/mortalidad>
5. Yersal O. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World Journal of Clinical Oncology*. 2014. 5:412. <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.412>
6. Fougner C, Bergholtz H, Norum JH, et al. Re-definition of claudin-low as a breast cancer phenotype. *Nature Communications*. 2020. 11:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15574-5>
7. Al-thoubaity FK. Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study. *Annals of Medicine and Surgery*. 2020. 49:44–48. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2019.11.021>
8. Chin AR and Wang SE. Cancer-derived extracellular vesicles: the ‘soil conditioner’ in breast cancer metastasis? *Cancer and Metastasis Reviews*. 2016. 35:669–676. <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9639-8>



9. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *Journal of Clinical Oncology*. 2010. 28:3271–3277. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.9820>
10. Terceiro LEL, Edechi CA, Ikeogu NM, et al. The breast tumor microenvironment: A key player in metastatic spread. *Cancers*. 2021. 13. <https://doi.org/10.3390/cancers13194798>
11. Ahn S, Cho J, Sung J, et al. The prognostic significance of tumor-associated stroma in invasive breast carcinoma. *Tumor Biology*. 2012. 33:1573–1580. <https://doi.org/10.1007/s13277-012-0411-6>
12. Horimoto Y, Polanska UM, Takahashi Y, et al. Emerging roles of the tumor-associated stroma in promoting tumor metastasis. *Cell Adhesion and Migration*. 2012. 6:193–202. <https://doi.org/10.4161/cam.20631>
13. Bussard KM, Mutkus L, Stumpf K, et al. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Research*. 2016. 18:1–11. <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0740-2>
14. Arendt LM, Rudnick JA, Keller PJ, et al. Stroma in breast development and disease. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2010. 21:11–18. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.10.003>
15. Chantrain CF, Feron O, Marbaix E, et al. Bone marrow microenvironment and tumor progression. *Cancer Microenvironment*. 2008. 1:23–35. <https://doi.org/10.1007/s12307-008-0010-7>
16. Paulsson J and Micke P. Prognostic relevance of cancer-associated fibroblasts in human cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 2014. 25:61–68. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.02.006>
17. Gao D and Mittal V. The role of bone-marrow-derived cells in tumor growth, metastasis initiation and progression. *Trends in Molecular Medicine*. 2009. 15:333–343. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.06.006>



18. Gonda TA, Varro A, Wang TC, et al. Molecular biology of cancer-associated fibroblasts: Can these cells be targeted in anti-cancer therapy? *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2010. 21:2–10. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.10.001>
19. Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, et al. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS ONE*. 2009. 4:e4992.
20. Martin FT, Dwyer RM, Kelly J, et al. Potential role of mesenchymal stem cells (MSCs) in the breast tumour microenvironment: Stimulation of epithelial to mesenchymal transition (EMT). *Breast Cancer Research and Treatment*. 2010. 124:317–326. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0734-1>
21. Rhodes L V., Muir SE, Elliott S, et al. Adult human mesenchymal stem cells enhance breast tumorigenesis and promote hormone independence. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2010. 121:293–300. <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0458-2>
22. El-Haibi CP and Karnoub AE. Mesenchymal stem cells in the pathogenesis and therapy of breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2010. 15:399–409. <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9196-7>
23. Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, et al. Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: Do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells*. 2011. 29:11–19. <https://doi.org/10.1002/stem.559>
24. Luo H, Tu G, Liu Z, et al. Cancer-associated fibroblasts: A multifaceted driver of breast cancer progression. *Cancer Letters*. 2015. 361:155–163. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.02.018>
25. Cheng B, Yu Q and Wang W. Intimate communications within the tumor microenvironment: stromal factors function as an orchestra. *Journal of Biomedical Science*. 2023. 30:1. <https://doi.org/10.1186/s12929-022-00894-z>
26. de Visser KE and Joyce JA. The evolving tumor microenvironment: From cancer



- p>initiation to metastatic outgrowth.
- Cancer Cell*
- . 2023. 41:374–403.
- <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.02.016>
27. Rudnick JA and Kuperwasser C. Stromal biomarkers in breast cancer development and progression. *Clinical & Experimental Metastasis*. 2012. 29:663–672. <https://doi.org/10.1007/s10585-012-9499-8>
 28. Lorusso G and Rüegg C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochemistry and Cell Biology*. 2008. 130:1091–1103. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0530-8>
 29. Bitoux M-A and Stamenkovic I. Tumor-host interactions: the role of inflammation. *Histochemistry and Cell Biology*. 2008. 130:1079–1090. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0527-3>
 30. Garamszegi N, Garamszegi SP, Shehadeh LA, et al. Extracellular Matrix-Induced Gene Expression in Human Breast Cancer Cells. *Molecular Cancer Research*. 2009. 7:319–329. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0227>
 31. Ali S and Lazennec G. Chemokines: Novel targets for breast cancer metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2007. 26:401–420. <https://doi.org/10.1007/s10555-007-9073-z>
 32. Hugo HJ, Lebre S, Tomaskovic-Crook E, et al. Contribution of fibroblast and mast cell (afferent) and tumor (efferent) IL-6 effects within the tumor microenvironment. *Cancer Microenvironment*. 2012. 5:83–93. <https://doi.org/10.1007/s12307-012-0098-7>
 33. Conklin MW, Eickhoff JC, Riching KM, et al. Aligned collagen is a prognostic signature for survival in human breast carcinoma. *American Journal of Pathology*. 2011. 178:1221–1232. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.11.076>
 34. Conklin MW and Keely PJ. Why the stroma matters in breast cancer: Insights into breast cancer patient outcomes through the examination of stromal biomarkers. *Cell Adhesion and Migration*. 2012. 6:249–260. <https://doi.org/10.4161/cam.20567>



35. Hill BS, Sarnella A, D'Avino G, et al. Recruitment of stromal cells into tumour microenvironment promote the metastatic spread of breast cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 2019. 60:202–213. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.028>
36. De Wever O and Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *Journal of Pathology*. 2003. 200:429–447. <https://doi.org/10.1002/path.1398>
37. Bishop J. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*. 1991. 64:235–248. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90636-d](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90636-d).
38. Liotta LA and Kohn EC. The microenvironment of the tumour–host interface. *Nature*. 2001. 411:375–379. <https://doi.org/10.1038/35077241>
39. Dolberg DS, Hollingsworth R, Hertle M, et al. Wounding and its role in RSV-mediated tumor formation. *Science*. 1985. 230:676–678. <https://doi.org/10.1126/science.2996144>
40. Sieweke MH, Thompson NL, Sporn MB, et al. Mediation of wound-related rous sarcoma virus tumorigenesis by TGF- β . *Science*. 1990. 248:1656–1660. <https://doi.org/10.1126/science.2163544>
41. Giorello MB, Borzone FR, Labovsky V, et al. Cancer-Associated Fibroblasts in the Breast Tumor Microenvironment. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2021. 26:135–155. <https://doi.org/10.1007/s10911-020-09475-y>
42. Kalluri R and Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2006. 6:392–401. <https://doi.org/10.1038/nrc1877>
43. Sappino A -P, Skalli O, Jackson B, et al. Smooth-muscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissues. *International Journal of Cancer*. 1988. 41:707–712. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910410512>
44. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2016. 16:582–598. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.73>



45. LeBleu VS and Kalluri R. A peek into cancer-associated fibroblasts: origins, functions and translational impact. *Disease models & mechanisms*. 2018. 11:dmm029447. <https://doi.org/10.1242/dmm.029447>
46. Yoshida GJ, Azuma A, Miura Y, et al. Activated fibroblast program orchestrates tumor initiation and progression; molecular mechanisms and the associated therapeutic strategies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. 20:2256. <https://doi.org/10.3390/ijms20092256>
47. Sarkar M, Nguyen T, Gundre E, et al. Cancer-associated fibroblasts: The chief architect in the tumor microenvironment. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2023. 11:1–24. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1089068>
48. Shekhar MPV, Pauley R and Heppner G. Extracellular matrix-stromal cell contribution to neoplastic phenotype of epithelial cells in the breast. *Breast Cancer Research*. 2003. 5:130–135. <https://doi.org/10.1186/bcr580>
49. Giatromanolaki A, Sivridis E and Koukourakis MI. The pathology of tumor stromatogenesis. *Cancer Biology and Therapy*. 2007. 6:639–645. <https://doi.org/10.4161/cbt.6.5.4198>
50. Fan G, Yu B, Tang L, et al. TSPAN8 + myofibroblastic cancer-associated fibroblasts promote chemoresistance in patients with breast cancer. *Science Translational Medicine*. 2024. 16. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.adj5705>
51. Kundu M, Butti R, Panda VK, et al. Modulation of the tumor microenvironment and mechanism of immunotherapy-based drug resistance in breast cancer. *Molecular Cancer*. 2024. 23:92. <https://doi.org/10.1186/s12943-024-01990-4>
52. Lau R, Yu L, Roumeliotis TI, et al. Secretome of Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs) Influences Drug Sensitivity in Cancer Cells. *Journal of Proteome Research*. 2024. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.4c00112>
53. Ishii G, Ochiai A and Neri S. Phenotypic and functional heterogeneity of cancer-associated fibroblast within the tumor microenvironment. *Advanced Drug Delivery*



- Reviews. 2016. 99:186–196. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.07.007>
54. Qiao A, Gu F, Guo X, et al. Breast cancer-associated fibroblasts: their roles in tumor initiation, progression and clinical applications. *Frontiers of Medicine*. 2016. 10:33–40. <https://doi.org/10.1007/s11684-016-0431-5>
55. Kumar S, Shabi TS and Goormaghtigh E. A FTIR imaging characterization of fibroblasts stimulated by various breast cancer cell lines. *PLoS ONE*. 2014. 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111137>
56. Shiga K, Hara M, Nagasaki T, et al. Cancer-associated fibroblasts: Their characteristics and their roles in tumor growth. *Cancers*. 2015. 7:2443–2458. <https://doi.org/10.3390/cancers7040902>
57. Buchsbaum RJ and Oh SY. Breast cancer-associated fibroblasts: Where we are and where we need to go. *Cancers*. 2016. 8:1–19. <https://doi.org/10.3390/cancers8020019>
58. Sebastian A, Hum NR, Martin KA, et al. Single-Cell Transcriptomic Analysis of Heterogeneity in Breast Cancer. *Cancers*. 2020. 12:E1307. <https://doi.org/10.3390/cancers12051307>
59. Cortez E, Roswall P and Pietras K. Functional subsets of mesenchymal cell types in the tumor microenvironment. *Seminars in Cancer Biology*. 2014. 25:3–9. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.12.010>
60. Park SY, Kim HM and Koo JS. Differential expression of cancer-associated fibroblast-related proteins according to molecular subtype and stromal histology in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2015. 149:727–741. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3291-9>
61. Costa A, Kieffer Y, Scholer-Dahirel A, et al. Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell*. 2018. 33:1–17. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.01.011>



62. Kojima Y, Acar A, Eaton EN, et al. Autocrine TGF- β and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010. 107:20009–20014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013805107>
63. Cirri P and Chiarugi P. Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: A diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2012. 31:195–208. <https://doi.org/10.1007/s10555-011-9340-x>
64. Najafi M, Goradel NH, Farhood B, et al. Tumor microenvironment: Interactions and therapy. *Journal of Cellular Physiology*. 2019. 234:5700–5721. <https://doi.org/10.1002/jcp.27425>
65. Purcell JW, Tanlimco SG, Hickson JA, et al. LRRC15 is a novel mesenchymal protein and stromal target for antibody-drug conjugates. *Cancer research*. 2018. 78:1457–1470. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0327>
66. Neel J-C, Humbert L and Lebrun J-J. The Dual Role of TGF β in Human Cancer: From Tumor Suppression to Cancer Metastasis. *ISRN Molecular Biology*. 2012. 2012:1–28. <https://doi.org/10.5402/2012/381428>
67. Principe DR, Doll JA, Bauer J, et al. TGF- β : Duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2014. 106:1–16. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt369>
68. Knudson KM, Hicks KC, Luo X, et al. M7824, a novel bifunctional anti-PD-L1/TGF β Trap fusion protein, promotes anti-tumor efficacy as monotherapy and in combination with vaccine. *OncoImmunology*. 2018. 7:1–14. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1426519>
69. Boyd N, Berman H, Zhu J, et al. The origins of breast cancer associated with mammographic density: A testable biological hypothesis. *Breast Cancer Research*. 2018. 20:1–13. <https://doi.org/10.1186/s13058-018-0941-y>



70. Öhlund D, Elyada E and Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *Journal of Experimental Medicine*. 2014. 211:1503–1523. <https://doi.org/10.1084/jem.20140692>
71. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2007. 449:557–563. <https://doi.org/10.1038/nature06188>
72. Acharyya S, Oskarsson T, Vanharanta S, et al. A CXCL1 Paracrine Network Links Cancer Chemoresistance and Metastasis. *Cell*. 2012. 150:165–178. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.042>
73. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005. 121:335–348. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.034>
74. Liao D, Luo Y, Markowitz D, et al. Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model. *PLoS ONE*. 2009. 4:e7965. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007965>
75. Sjöberg E, Augsten M, Bergh J, et al. Expression of the chemokine CXCL14 in the tumour stroma is an independent marker of survival in breast cancer. *British Journal of Cancer*. 2016. 114:1117–1124. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.104>
76. Sjöberg E, Meyrath M, Milde L, et al. A novel ACKR2-Dependent role of fibroblast-derived CXCL14 in epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2019. 25:3702–3717. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1294>
77. Allaoui R, Bergenfelz C, Mohlin S, et al. Cancer-associated fibroblast-secreted CXCL16 attracts monocytes to promote stroma activation in triple-negative breast cancers. *Nature Communications*. 2016. 7:13050. <https://doi.org/10.1038/ncomms13050>



78. Jang I and Beningo KA. Integrins, CAFs and Mechanical Forces in the Progression of Cancer. *Cancers*. 2019. 11:721. <https://doi.org/10.3390/cancers11050721>
79. Huang W, Chiquet-Ehrismann R, Orend G, et al. Interference of tenascin-C with syndecan-4 binding to fibronectin blocks cell adhesion and stimulates tumor cell proliferation. *Cancer Research*. 2001. 61:8586–8594.
80. Becker LM, O’Connell JT, Vo AP, et al. Epigenetic Reprogramming of Cancer-Associated Fibroblasts Deregulates Glucose Metabolism and Facilitates Progression of Breast Cancer. *Cell Rep*. 2020. 31:107701. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107701>
81. Eiro N, González L, Martínez-Ordoñez A, et al. Cancer-associated fibroblasts affect breast cancer cell gene expression, invasion and angiogenesis. *Cellular Oncology*. 2018. 1–10. <https://doi.org/10.1007/s13402-018-0371-y>
82. Lappano R, Rigiracciolo DC, Belfiore A, et al. Cancer associated fibroblasts: role in breast cancer and potential as therapeutic targets. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2020. 24:559–572. <https://doi.org/10.1080/14728222.2020.1751819>
83. Yu Y, Xiao CH, Tan LD, et al. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- β signalling. *British Journal of Cancer*. 2014. 110:724–732. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.768>
84. Matà R, Palladino C, Nicolosi ML, et al. IGF-I induces upregulation of DDR1 collagen receptor in breast cancer cells by suppressing MIR-199a-5p through the PI3K/AKT pathway. *Oncotarget*. 2016. 7:7683–7700. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6524>
85. Dumont N, Liu B, Defilippis RA, et al. Breast fibroblasts modulate early dissemination, tumorigenesis, and metastasis through alteration of extracellular matrix characteristics. *Neoplasia (United States)*. 2013. 15:249–262. <https://doi.org/10.1593/neo.121950>
86. Wang JM, Deng X, Gong W, et al. Chemokines and their role in tumor growth and



- p>metastasis. Journal of Immunological Methods. 1998. 220:1–17.
-
- [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(98\)00128-8](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(98)00128-8)
87. Primac I, Maquoi E, Blacher S, et al. Stromal integrin $\alpha 11$ regulates PDGFR β signaling and promotes breast cancer progression. Journal of Clinical Investigation. 2019. 129:4609–4628. <https://doi.org/10.1172/JCI125890>
 88. Tyan SW, Kuo WH, Huang CK, et al. Breast cancer cells induce cancer-associated fibroblasts to secrete hepatocyte growth factor to enhance breast tumorigenesis. PLoS ONE. 2011. 6:1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015313>
 89. Osuala KO, Sameni M, Shah S, et al. Il-6 signaling between ductal carcinoma in situ cells and carcinoma-associated fibroblasts mediates tumor cell growth and migration. BMC Cancer. 2015. 15. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1576-3>
 90. Studebaker AW, Storci G, Werbeck JL, et al. Fibroblasts isolated from common sites of breast cancer metastasis enhance cancer cell growth rates and invasiveness in an interleukin-6-dependent manner. Cancer Research. 2008. 68:9087–9095. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0400>
 91. Kwa MQ, Herum KM and Brakebusch C. Cancer-associated fibroblasts: how do they contribute to metastasis? Clinical and Experimental Metastasis. 2019. 36:71–86. <https://doi.org/10.1007/s10585-019-09959-0>
 92. Labovsky V, Martinez LM, Davies KM, et al. Association between ligands and receptors related to the progression of early breast cancer in tumor epithelial and stromal cells. Clinical Breast Cancer. 2015. 15:e13–e21. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2014.05.006>
 93. Labovsky V, Martinez LM, Davies KM, et al. Prognostic significance of TRAIL-R3 and CCR-2 expression in tumor epithelial cells of patients with early breast cancer. BMC cancer. 2017. 17:280. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3259-8>
 94. Dwyer RM, Potter-Beirne SM, Harrington KA, et al. Monocyte Chemotactic Protein-1 Secreted by Primary Breast Tumors Stimulates Migration of Mesenchymal Stem Cells.



- Clinical Cancer Research. 2007. 13:5020–5027. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0731>
95. Dittmer J, Oerlecke I and Leyh B. Involvement of Mesenchymal Stem Cells in Breast Cancer Progression. In Breast Cancer - Focusing Tumor Microenvironment, Stem cells and Metastasis. 2011. InTech. <https://doi.org/10.5772/21325>
96. Palafox M, Ferrer I, Pellegrini P, et al. RANK induces epithelial-mesenchymal transition and stemness in human mammary epithelial cells and promotes tumorigenesis and metastasis. Cancer Research. 2012. 72:2879–2888. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0044>
97. Potter SM, Dwyer RM, Hartmann MC, et al. Influence of stromal-epithelial interactions on breast cancer in vitro and in vivo. Breast Cancer Research and Treatment. 2012. 131:401–411. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1410-9>
98. Mimeault M and Batra SK. Altered gene products involved in the malignant reprogramming of cancer stem/progenitor cells and multitargeted therapies. Molecular Aspects of Medicine. 2014. 39:3–32. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2013.08.001>
99. Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, et al. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. Nature Cell Biology. 2007. 9:1392–1400. <https://doi.org/10.1038/ncb1658>
100. Attieh Y, Clark AG, Grass C, et al. Cancer-associated fibroblasts lead tumor invasion through integrin- β 3-dependent fibronectin asse. Journal of Cell Biology. 2017. 216:3509–3520. <https://doi.org/10.1083/jcb.201702033>
101. Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, et al. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: Role for cell migration. Pathology International. 2002. 52:255–264. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1827.2002.01343.x>
102. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, et al. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. J Clin Oncol. 2017. 18:1135–1149.



103. Salimifard S, Masjedi A, Hojjat-Farsangi M, et al. Cancer associated fibroblasts as novel promising therapeutic targets in breast cancer. *Pathology Research and Practice*. 2020. 216:152915. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2020.152915>
104. Duda DG, Duyverman AMMJ, Kohno M, et al. Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010. 107:21677–21682. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016234107>
105. Psaila B, Kaplan RN, Port ER, et al. Priming the “soil” for breast cancer metastasis: The Pre-Metastatic Niche. *Breast Disease*. 2006. 26:65–74. <https://doi.org/10.3233/bd-2007-26106>
106. Ursini-Siegel J and Siegel PM. The influence of the pre-metastatic niche on breast cancer metastasis. *Cancer Letters*. 2016. 380:281–288. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.11.009>
107. Feng T, Zhang P, Sun Y, et al. High throughput sequencing identifies breast cancer-secreted exosomal lncRNAs initiating pulmonary pre-metastatic niche formation. *Gene*. 2019. 710:258–264. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.06.004>
108. Taverna S, Giusti I, D’ascenzo S, et al. Breast cancer derived extracellular vesicles in bone metastasis induction and their clinical implications as biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. 21:1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms21103573>
109. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. 2005. 438:820–827. <https://doi.org/10.1038/nature04186>
110. Cox TR, Bird D, Baker A, et al. LOX-Mediated Collagen Crosslinking Is Responsible for Fibrosis-Enhanced Metastasis. *Cancer Research*. 2013. 73:1721–1732. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2233>
111. Malanchi I, Santamaria-Martínez A, Susanto E, et al. Interactions between cancer



- stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature*. 2012. 481:85–91. <https://doi.org/10.1038/nature10694>
112. Bartoschek M, Oskolkov N, Bocci M, et al. Spatially and functionally distinct subclasses of breast cancer-associated fibroblasts revealed by single cell RNA sequencing. *Nature Communications*. 2018. 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07582-3>
113. Raz Y, Cohen N, Shani O, et al. Bone marrow–derived fibroblasts are a functionally distinct stromal cell population in breast cancer. *Journal of Experimental Medicine*. 2018. 215:3075–3093. <https://doi.org/10.1084/jem.20180818>
114. Ghiabi P, Jiang J, Pasquier J, et al. Breast cancer cells promote a notch-dependent mesenchymal phenotype in endothelial cells participating to a pro-tumoral niche. *Journal of Translational Medicine*. 2015. 13:1–19. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0386-3>
115. Weber et al. Osteopontin Mediates an MZF1-TGF- β 1-Dependent Transformation of Mesenchymal Stem Cells into Cancer Associated Fibroblasts in Breast Cancer. *Oncogene*. 2015. 34:4821–4833. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.410>
116. Salimifard S, Masjedi A, Hojjat-Farsangi M, et al. Cancer associated fibroblasts as novel promising therapeutic targets in breast cancer. *Pathology Research and Practice*. 2020. 216:152915. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2020.152915>
117. Rønnov-Jessen L, Petersen OW, Kotliansky VE, et al. The origin of the myofibroblasts in breast cancer: Recapitulation of tumor environment in culture unravels diversity and implicates converted fibroblasts and recruited smooth muscle cells. *Journal of Clinical Investigation*. 1995. 95:859–873. <https://doi.org/10.1172/JCI117736>
118. Bochet L, Lehuédé C, Dauvillier S, et al. Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Research*. 2013. 73:5657–5668. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0530>
119. Nair N, Calle AS, Zahra MH, et al. A cancer stem cell model as the point of origin of



- cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment. *Scientific Reports*. 2017. 7:6838. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07144-5>
120. Chaturvedi P, Gilkes DM, Wong CCL, et al. Hypoxia-inducible factor-dependent breast cancer-mesenchymal stem cell bidirectional signaling promotes metastasis. *Journal of Clinical Investigation*. 2013. 123:189–205. <https://doi.org/10.1172/JCI64993>
121. Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, et al. Inflammation and tumor microenvironments: Defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Therapy*. 2008. 15:730–738. <https://doi.org/10.1038/gt.2008.39>
122. Shi Y, Du L, Lin L, et al. Tumour-associated mesenchymal stem/stromal cells: emerging therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2017. 16:35–52. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.193>
123. Sewell-Loftin MK, Bayer SVH, Crist E, et al. Cancer-associated fibroblasts support vascular growth through mechanical force. *Scientific Reports*. 2017. 7:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13006-x>
124. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2007. 449:557–563. <https://doi.org/10.1038/nature06188>
125. Raz Y, Cohen N, Shani O, et al. Bone marrow–derived fibroblasts are a functionally distinct stromal cell population in breast cancer. *Journal of Experimental Medicine*. 2018. 215:3075–3093. <https://doi.org/10.1084/jem.20180818>
126. Park CW, Kim K-S, Bae S, et al. Cytokine Secretion Profiling of Human Mesenchymal Stem Cells by Antibody Array. *International Journal of Stem Cells*. 2009. 2:59–68. <https://doi.org/10.15283/ijsc.2009.2.1.59>
127. Wobus M, List C, Dittrich T, et al. Breast carcinoma cells modulate the chemoattractive activity of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells by interfering with CXCL12. *International Journal of Cancer*. 2015. 136:44–54. <https://doi.org/10.1002/ijc.28960>



128. Paunescu V, Bojin FM, Tatu CA, et al. Tumour-associated fibroblasts and mesenchymal stem cells: more similarities than differences. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2011. 15:635–646. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01044.x>
129. Mishra PJ, Mishra PJ, Humeniuk R, et al. Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Research*. 2008. 68:4331–4339. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0943>
130. Quante M, Tu SP, Tomita H, et al. Bone Marrow-Derived Myofibroblasts Contribute to the Mesenchymal Stem Cell Niche and Promote Tumor Growth. *Cancer Cell*. 2011. 19:257–272. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.01.020>
131. Mishra PJ, Mishra PJ, Glod JW, et al. Mesenchymal stem cells: Flip side of the coin. *Cancer Research*. 2009. 69:1255–1258. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3562>
132. Worthley DL, Si Y, Quante M, et al. Bone marrow cells as precursors of the tumor stroma. *Exp Cell Res*. 2013. 319:1650–1656. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>
133. Kidd S, Spaeth E, Watson K, et al. Origins of the Tumor Microenvironment: Quantitative Assessment of Adipose-Derived and Bone Marrow-Derived Stroma. *PLoS ONE*. 2012. 7:e30563. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030563>
134. Pasanen I, Lehtonen S, Sormunen R, et al. Breast cancer carcinoma-associated fibroblasts differ from breast fibroblasts in immunological and extracellular matrix regulating pathways. *Experimental Cell Research*. 2016. 344:53–66. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.04.016>
135. Muñoz TG, Amaral AT, Puerto-Camacho P, et al. Endoglin in the spotlight to treat cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22063186>
136. Heneberg P. Paracrine tumor signaling induces transdifferentiation of surrounding



- p>fibroblasts. Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2016. 97:303–311.
-
- <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.09.008>
137. Martinez LM, Labovsky V, de Luján Calcagno M, et al. CD105 Expression on CD34-Negative Spindle-Shaped Stromal Cells of Primary Tumor Is an Unfavorable Prognostic Marker in Early Breast Cancer Patients. PLOS ONE. 2015. 10:e0121421.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121421>
 138. Wu Q, Li J, Zhu S, et al. Breast cancer subtypes predict the preferential site of distant metastases: a SEER based study. Oncotarget. 2017. 8:27990–27996.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.15856>
 139. Huang Y, Wang H, Yue X, et al. Bone serves as a transfer station for secondary dissemination of breast cancer. Bone Research. 2023. 11:21.
<https://doi.org/10.1038/s41413-023-00260-1>
 140. Guarino M, Rubino B and Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. Pathology. 2007. 39:305–318.
<https://doi.org/10.1080/00313020701329914>
 141. Gay LJ and Felding-Habermann B. Platelets Alter Tumor Cell Attributes to Propel Metastasis: Programming in Transit. Cancer Cell. 2011. 20:553–554.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.11.001>
 142. Huang Q, Hu X, He W, et al. Fluid shear stress and tumor metastasis. Am J Cancer Res. 2018. 8:763–777.
 143. Chambers AF, Naumov GN, Varghese HJ, et al. Critical steps in hematogenous metastasis: an overview. Surgical oncology clinics of North America. 2001. 10:243–55, vii. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11382585>
 144. Zarrer J, Haider MT, Smit DJ, et al. Pathological crosstalk between metastatic breast cancer cells and the bone microenvironment. Biomolecules. 2020. 10:1–20.
<https://doi.org/10.3390/biom10020337>



145. Ruocco MR, Avagliano A, Granato G, et al. Involvement of Breast Cancer-Associated Fibroblasts in Tumor Development, Therapy Resistance and Evaluation of Potential Therapeutic Strategies. *Current Medicinal Chemistry*. 2018. 25:3414–3434. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180309120746>
146. Brierley JD, Gospodarowicz MK and Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours*. 2017 (8th ed.).
147. Pestalozzi BC, Luporsi-Gely E, Jost LM, et al. ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up of primary breast cancer. *Annals of Oncology*. 2005. 16:i7–i9. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdi825>
148. Senkus E, Kyriakides S, Penault-Llorca F, et al. Primary breast cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2015. 26:8–30. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv298>
149. Wernicke M, Roitman P, Manfre D, et al. Breast cancer and the stromal factor. The “prometastatic healing process” hypothesis. *Medicina*. 2011. 71:15–21.
150. Bloom HJ and Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *British Journal of Cancer*. 1957. 11:359–377. <https://doi.org/10.1038/bjc.1957.43>
151. Rau KM, Huang CC, Chiu TJ, et al. Neovascularization evaluated by CD105 correlates well with prognostic factors in breast cancers. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2012. 4:231–236. <https://doi.org/10.3892/etm.2012.594>
152. Charpin C, Dales J-P, Garcia S, et al. Tumor Neoangiogenesis by CD31 and CD105 Expression Evaluation in Breast Carcinoma Tissue Microarrays. *Clinical Cancer Research*. 2004. 10:5815–5819. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0021>
153. Dales J-P, Garcia S, Andrac L, et al. Prognostic significance of angiogenesis evaluated by CD105 expression compared to CD31 in 905 breast carcinomas: Correlation with long-term patient outcome. *International Journal of Oncology*. 2004. 24:1197–1204. <https://doi.org/10.3892/ijo.24.5.1197>



154. Li W, Yang D, Wang S, et al. Increased expression of CD146 and microvessel density (MVD) in invasive micropapillary carcinoma of the breast: Comparative study with invasive ductal carcinoma-not otherwise specified. *Pathology - Research and Practice*. 2011. 207:739–746. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2011.09.009>
155. Wernicke M, Piñeiro LC, Caramutti D, et al. Breast cancer stromal myxoid changes are associated with tumor invasion and metastasis: A central role for hyaluronan. *Modern Pathology*. 2003. 16:99–107. <https://doi.org/10.1097/01.MP.0000051582.75890.2D>
156. Walker RA. The complexities of breast cancer desmoplasia. *Breast Cancer Research*. 2001. 3:143–145. <https://doi.org/10.1186/bcr287>
157. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discovery*. 2012. 2:401–404. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>
158. Bartha Á and Györfy B. TNMplot.com: A Web Tool for the Comparison of Gene Expression in Normal, Tumor and Metastatic Tissues. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. 22:2622. <https://doi.org/10.3390/ijms22052622>
159. Crispino S, Brenna A, Colombo D, et al. Ki-67 Labeling Index in Breast Cancer. *Tumori Journal*. 1989. 75:557–562. <https://doi.org/10.1177/030089168907500608>
160. Ylöstalo J, Bazhanov N and Prockop DJ. Reversible commitment to differentiation by human multipotent stromal cells in single-cell-derived colonies. *Experimental Hematology*. 2008. 36:1390–1402. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2008.05.003>
161. Fernández Vallone VB, Hofer EL, Choi H, et al. Behaviour of mesenchymal stem cells from bone marrow of untreated advanced breast and lung cancer patients without bone osteolytic metastasis. *Clinical and Experimental Metastasis*. 2013. 30:317–332. <https://doi.org/10.1007/s10585-012-9539-4>
162. Soule HD, Vazquez J, Long A, et al. A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma 2. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1973.



- 51:1409–1416. <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1409>
163. Lacroix M, Haibe-Kains B, Hennuy B, et al. Gene regulation by phorbol 12-myristate 13-acetate in MCF-7 and MDA-MB-231, two breast cancer cell lines exhibiting highly different phenotypes. *Oncology Reports*. 2004. <https://doi.org/10.3892/or.12.4.701>
164. Pedro A. Martínez Carpio MANM. El cultivo celular en la investigación básica del cáncer de mama. *Revista de oncología*. 2003. 5:184–191.
165. Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, et al. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer research*. 1990. 50:6075–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1975513>
166. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006. 8:315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
167. Grotheer V, Skrynecki N, Oezel L, et al. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells and fibroblasts differs depending on tissue origin and replicative senescence. *Scientific Reports*. 2021. 11:11968. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91501-y>
168. Prockop DJ, Bunnell BA and Phinney DG. *Mesenchymal Stem Cells*. (D. J. Prockop, B. A. Bunnell, & D. G. Phinney, Eds.) *Anticancer research*. 2008 (Vol. 192). Totowa, NJ: Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-169-1>
169. Mishra PJ, Mishra PJ, Humeniuk R, et al. Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Research*. 2008. 68:4331–4339. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0943>
170. Martinez LM, Vallone VBF, Labovsky V, et al. Changes in the peripheral blood and bone marrow from untreated advanced breast cancer patients that are associated with the establishment of bone metastases. *Clinical and Experimental Metastasis*.



2014. 31:213–232. <https://doi.org/10.1007/s10585-013-9622-5>
171. Fernández Vallone VB, Hofer EL, Choi H, et al. Behaviour of mesenchymal stem cells from bone marrow of untreated advanced breast and lung cancer patients without bone osteolytic metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis*. 2013. 30:317–332. <https://doi.org/10.1007/s10585-012-9539-4>
172. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*. 2012. 9:676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
173. Kruger NJ. The Bradford Method For Protein Quantitation. 2009 (pp. 17–24). https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_4
174. Yang K, Wang XQ, He YS, et al. Advanced glycation end products induce chemokine/cytokine production via activation of p38 pathway and inhibit proliferation and migration of bone marrow mesenchymal stem cells. *Cardiovascular Diabetology*. 2010. 9:66. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-9-66>
175. Kuznetsov SA, Mankani MH, Bianco P, et al. Enumeration of the colony-forming units–fibroblast from mouse and human bone marrow in normal and pathological conditions. *Stem Cell Research*. 2009. 2:83–94. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2008.07.007>
176. Avagliano A, Fiume G, Ruocco MR, et al. Influence of Fibroblasts on Mammary Gland Development, Breast Cancer Microenvironment Remodeling, and Cancer Cell Dissemination. *Cancers*. 2020. 12:1697. <https://doi.org/10.3390/cancers12061697>
177. Giorello MB, Martinez LM, Borzone FR, et al. CD105 expression in cancer-associated fibroblasts: a biomarker for bone metastasis in early invasive ductal breast cancer patients. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2023. 11:1–16. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1250869>
178. Lu X, Mu E, Wei Y, et al. VCAM-1 Promotes Osteolytic Expansion of Indolent Bone Micrometastasis of Breast Cancer by Engaging $\alpha 4\beta 1$ -Positive Osteoclast Progenitors.



- Cancer Cell. 2011. 20:701–714. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.11.002>
179. Mulholland BS, Forwood MR and Morrison NA. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1/CCL2) Drives Activation of Bone Remodelling and Skeletal Metastasis. *Current Osteoporosis Reports*. 2019. 17:538–547. <https://doi.org/10.1007/s11914-019-00545-7>
 180. Guo Z, Zhang H, Fu Y, et al. Cancer-associated fibroblasts induce growth and radioresistance of breast cancer cells through paracrine IL-6. *Cell Death Discovery*. 2023. 9. <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01306-3>
 181. Brechbuhl HM, Barrett AS, Kopin E, et al. Fibroblast subtypes define a metastatic matrisome in breast cancer. *JCI Insight*. 2020. 5:1–16. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.130751>
 182. Fernández-Nogueira P, Fuster G, Gutierrez-Uzquiza Á, et al. Cancer-associated fibroblasts in breast cancer treatment response and metastasis. *Cancers*. 2021. 13:1–22. <https://doi.org/10.3390/cancers13133146>
 183. Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, et al. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature*. 2006. 440:692–696. <https://doi.org/10.1038/nature04524>
 184. Giorello MB, Borzone FR, Mora MF, et al. RANK in Cancer-Associated Fibroblasts: A Valuable Prognostic Determinant for Metastasis in Early-Stage Breast Cancer Patients. *Cancer biomarkers*. 2024. in press.
 185. Bhowmick NA, Chytil A, Plieth D, et al. TGF- β Signaling in Fibroblasts Modulates the Oncogenic Potential of Adjacent Epithelia. *Science*. 2004. 303:848–851. <https://doi.org/10.1126/science.1090922>
 186. Gabai Y, Assouline B and Ben-Porath I. Senescent stromal cells: roles in the tumor microenvironment. *Trends in Cancer*. 2023. 9:28–41. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2022.09.002>



187. Takasugi M, Yoshida Y and Ohtani N. Cellular senescence and the tumour microenvironment. *Molecular Oncology*. 2022. 16:3333–3351. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13268>
188. Shangguan L, Ti X, Krause U, et al. Inhibition of TGF- β /Smad signaling by BAMBI blocks differentiation of human mesenchymal stem cells to carcinoma-associated fibroblasts and abolishes their protumor effects. *Stem Cells*. 2012. 30:2810–2819. <https://doi.org/10.1002/stem.1251>
189. Peng Y, Li Z, Yang P, et al. Direct contacts with colon cancer cells regulate the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into tumor associated fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014. 451:68–73. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.074>
190. Rosen PP, Saigo PE, Braun DW, et al. Axillary Micro- and Macrometastases in Breast Cancer. *Annals of Surgery*. 1981. 194:585–591. <https://doi.org/10.1097/00000658-198111000-00006>
191. Ma X, Liu C, Xu X, et al. Biomarker expression analysis in different age groups revealed age was a risk factor for breast cancer. *Journal of Cellular Physiology*. 2020. 235:4268–4278. <https://doi.org/10.1002/jcp.29304>
192. de Kruijf EM, van Nes JGH, van de Velde CJH, et al. Tumor–stroma ratio in the primary tumor is a prognostic factor in early breast cancer patients, especially in triple-negative carcinoma patients. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2011. 125:687–696. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0855-6>
193. Cid S, Eiro N, Fernández B, et al. Prognostic Influence of Tumor Stroma on Breast Cancer Subtypes. *Clinical Breast Cancer*. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2017.08.008>
194. Yamauchi M, Barker TH, Gibbons DL, et al. The fibrotic tumor stroma. *Journal of Clinical Investigation*. 2018. 128:16–25. <https://doi.org/10.1172/JCI93554>
195. Saini H, Rahmani Eliato K, Veldhuizen J, et al. The role of tumor-stroma interactions



- p>on desmoplasia and tumorigenicity within a microengineered 3D platform. Biomaterials. 2020. 247:119975.
- <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119975>
196. Zeltz C, Primac I, Erusappan P, et al. Cancer-associated fibroblasts in desmoplastic tumors: emerging role of integrins. Seminars in Cancer Biology. 2020. 62:166–181. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.004>
197. Othman A, Winogradzki M, Lee L, et al. Bone metastatic breast cancer: Advances in cell signaling and autophagy related mechanisms. Cancers. 2021. 13. <https://doi.org/10.3390/cancers13174310>
198. Salvador F, Llorente A and Gomis RR. From latency to overt bone metastasis in breast cancer: potential for treatment and prevention. The Journal of Pathology. 2019. 249:6–18. <https://doi.org/10.1002/path.5292>
199. Dwyer RM, Potter-Beirne SM, Harrington KA, et al. Monocyte Chemotactic Protein-1 Secreted by Primary Breast Tumors Stimulates Migration of Mesenchymal Stem Cells. Clinical Cancer Research. 2007. 13:5020–5027. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0731>
200. Kim HM, Jung WH and Koo JS. Expression of cancer-associated fibroblast related proteins in metastatic breast cancer: an immunohistochemical analysis. Journal of Translational Medicine. 2015. 13:222. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0587-9>
201. Coleman R, Smith P and Rubens R. Clinical course and prognostic factors following bone recurrence from breast cancer. British Journal of Cancer. 1998. 77:336–340. <https://doi.org/10.1038/bjc.1998.52>
202. Clemenceau A, Michou L, Diorio C, et al. Breast Cancer and Microcalcifications: An Osteoimmunological Disorder? International Journal of Molecular Sciences. 2020. 21:8613. <https://doi.org/10.3390/ijms21228613>
203. Scimeca M, Urbano N, Bonfiglio R, et al. Breast osteoblast-like cells: a new biomarker for the management of breast cancer. British Journal of Cancer. 2018. 119:1129–



1132. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0255-y>
204. Bonfiglio R, Scimeca M, Urbano N, et al. Breast Microcalcifications: Biological and Diagnostic Perspectives. *Future Oncology*. 2018. 14:3097–3099. <https://doi.org/10.2217/fon-2018-0624>
205. Sharma T, Radosevich JA, Pachori G, et al. A Molecular View of Pathological Microcalcification in Breast Cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2016. 21:25–40. <https://doi.org/10.1007/s10911-015-9349-9>
206. Scimeca M, Giocondo R, Montanaro M, et al. BMP-2 Variants in Breast Epithelial to Mesenchymal Transition and Microcalcifications Origin. *Cells*. 2020. 9:1381. <https://doi.org/10.3390/cells9061381>
207. Scimeca M, Giannini E, Antonacci C, et al. Microcalcifications in breast cancer: an active phenomenon mediated by epithelial cells with mesenchymal characteristics. *BMC Cancer*. 2014. 14:286. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-286>
208. Scimeca M, Giocondo R, Montanaro M, et al. BMP-2 Variants in Breast Epithelial to Mesenchymal Transition and Microcalcifications Origin. *Cells*. 2020. 9:1381. <https://doi.org/10.3390/cells9061381>
209. Scimeca M, Bonfiglio R, Montanaro M, et al. Osteoblast-like cells in human cancers: New cell type and reliable markers for bone metastasis. *Future Oncology*. 2018. 14:9–11. <https://doi.org/10.2217/fon-2017-0472>
210. Scimeca M, Trivigno D, Bonfiglio R, et al. Breast cancer metastasis to bone: From epithelial to mesenchymal transition to breast osteoblast-like cells. *Seminars in Cancer Biology*. 2021. 72:155–164. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.01.004>
211. Bellahcène A and Castronovo V. Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins, in human breast cancer. *The American journal of pathology*. 1995. 146:95–100. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7856741>



212. Pratap J, Wixted JJ, Gaur T, et al. Runx2 Transcriptional Activation of Indian Hedgehog and a Downstream Bone Metastatic Pathway in Breast Cancer Cells. *Cancer Research*. 2008. 68:7795–7802. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1078>
213. Tan C-C, Li G-X, Tan L-D, et al. Breast cancer cells obtain an osteomimetic feature via epithelial-mesenchymal transition that have undergone BMP2/RUNX2 signaling pathway induction. *Oncotarget*. 2016. 7:79688–79705. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12939>
214. Miller RE, Tran PB, Das R, et al. CCR2 chemokine receptor signaling mediates pain in experimental osteoarthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012. 109:20602–20607. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209294110>
215. Lozano-Ondoua AN, Symons-Liguori AM and Vanderah TW. Cancer-induced bone pain: Mechanisms and models. *Neuroscience Letters*. 2013. 557:52–59. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.08.003>
216. Mantyh PW. Cancer pain and its impact on diagnosis, survival and quality of life. *Nature Reviews Neuroscience*. 2006. 7:797–809. <https://doi.org/10.1038/nrn1914>
217. Joyce JA and Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature Reviews Cancer*. 2009. 9:239–252. <https://doi.org/10.1038/nrc2618>
218. Kudo O, Sabokbar A, Pocock A, et al. Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. *Bone*. 2003. 32:1–7. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(02\)00915-8](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(02)00915-8)
219. Feng W, Liu H, Luo T, et al. Combination of IL-6 and sIL-6R differentially regulate varying levels of RANKL-induced osteoclastogenesis through NF-κB, ERK and JNK signaling pathways. *Scientific Reports*. 2017. 7:1–11. <https://doi.org/10.1038/srep41411>
220. Sumi K, Abe T, Kunimatsu R, et al. The effect of mesenchymal stem cells on chemotaxis of osteoclast precursor cells. *Journal of Oral Science*. 2018. 60:221–225. <https://doi.org/10.2334/josnurd.17-0187>



221. Kim MS, Day CJ and Morrison NA. MCP-1 Is Induced by Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand, Promotes Human Osteoclast Fusion, and Rescues Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor Suppression of Osteoclast Formation. *Journal of Biological Chemistry*. 2005. 280:16163–16169. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412713200>
222. Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Molecular Medicine Today*. 1996. 2:198–204. [https://doi.org/10.1016/1357-4310\(96\)88772-7](https://doi.org/10.1016/1357-4310(96)88772-7)
223. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*. 1999. 284:143–147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
224. Barry F, Boynton R, Murphy M, et al. The SH-3 and SH-4 Antibodies Recognize Distinct Epitopes on CD73 from Human Mesenchymal Stem Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001. 289:519–524. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6013>
225. Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, et al. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999. 265:134–139. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1620>
226. Chen Y, Zhu L, Wang Y, et al. Tumor-derived mesenchymal progenitor cell-related genes in the regulation of breast cancer proliferation. *Gland Surgery*. 2024. 13:325–339. <https://doi.org/10.21037/GS-23-387>
227. Gronthos S, Zannettino ACW, Hay SJ, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *Journal of Cell Science*. 2003. 116:1827–1835. <https://doi.org/10.1242/jcs.00369>
228. Lv F-J, Tuan RS, Cheung KMC, et al. Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. 2014. 32:1408–1419.



<https://doi.org/10.1002/stem.1681>

229. Jin HJ, Kwon JH, Kim M, et al. Downregulation of Melanoma Cell Adhesion Molecule (MCAM/CD146) Accelerates Cellular Senescence in Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Translational Medicine*. 2016. 5:427–439. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0109>
230. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, et al. Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. *Cell*. 2007. 131:324–336. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.025>
231. Wang Z, Xu Q, Zhang N, et al. CD146, from a melanoma cell adhesion molecule to a signaling receptor. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020. 5:148. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00259-8>
232. Wang Z and Yan X. CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion. *Cancer Letters*. 2013. 330:150–162. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.11.049>
233. Bikorimana J-P, Saad W, Abusarah J, et al. CD146 Defines a Mesenchymal Stromal Cell Subpopulation with Enhanced Suppressive Properties. *Cells*. 2022. 11:2263. <https://doi.org/10.3390/cells11152263>
234. Sharma R, Sharma R, Khaket TP, et al. Breast cancer metastasis: Putative therapeutic role of vascular cell adhesion molecule-1. *Cellular Oncology*. 2017. 40:199–208. <https://doi.org/10.1007/s13402-017-0324-x>
235. Djouad F, Plence P, Bony C, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*. 2003. 102:3837–3844. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1193>
236. Lin K-Y, Lu D, Hung C-F, et al. Ectopic Expression of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 as a New Mechanism for Tumor Immune Evasion. *Cancer Research*. 2007. 67:1832–1841. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3014>
237. Criscitiello C, Gelao L, Viale G, et al. Investigational platelet-derived growth factor



- receptor kinase inhibitors in breast cancer therapy. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2014. 23:599–610. <https://doi.org/10.1517/13543784.2014.895323>
238. Wang F, Yu Z, Liu X, et al. A meta-analysis and bioinformatics analysis of P4HB expression levels in the prognosis of cancer patients. *Pathology - Research and Practice*. 2023. 245:154474. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2023.154474>
239. Borzone FR, Giorello MB, Martinez LM, et al. Senescent mesenchymal stem/stromal cells in pre-metastatic bone marrow of untreated advanced breast cancer patients. *Oncology Research*. 2023. 31:361–374. <https://doi.org/10.32604/or.2023.028104>
240. Eiro N, Gonzalez L, Fraile M, et al. Breast Cancer Tumor Stroma: Cellular Components, Phenotypic Heterogeneity, Intercellular Communication, Prognostic Implications and Therapeutic Opportunities. *Cancers*. 2019. 11:664. <https://doi.org/10.3390/cancers11050664>
241. Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, et al. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *The Journal of cell biology*. 1993. 122:103–111. <https://doi.org/10.1083/jcb.122.1.103>
242. Carthy JM. TGFβ signaling and the control of myofibroblast differentiation: Implications for chronic inflammatory disorders. *Journal of Cellular Physiology*. 2018. 233:98–106. <https://doi.org/10.1002/jcp.25879>
243. Jacobs TW, Byrne C, Colditz G, et al. Radial Scars in Benign Breast-Biopsy Specimens and the Risk of Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 1999. 340:430–436. <https://doi.org/10.1056/NEJM199902113400604>
244. Dvorak HF. Tumors: Wounds That Do Not Heal—Redux. *Cancer Immunology Research*. 2015. 3:1–11. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0209>
245. Costa A, Scholer-Dahirel A and Mechta-Grigoriou F. The role of reactive oxygen species and metabolism on cancer cells and their microenvironment. *Seminars in Cancer Biology*. 2014. 25:23–32. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.12.007>



246. Jezierska-Drutel A, Rosenzweig SA and Neumann CA. Role of oxidative stress and the microenvironment in breast cancer development and progression. *Advances in Cancer Research*. 2013. 119:107–125. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407190-2.00003-4>
247. Gerald D, Berra E, Frapart YM, et al. JunD Reduces Tumor Angiogenesis by Protecting Cells from Oxidative Stress. *Cell*. 2004. 118:781–794. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.025>
248. Allinen M, Beroukhi R, Cai L, et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell*. 2004. 6:17–32. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.06.010>
249. Oskarsson T. Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis. *The Breast*. 2013. 22:S66–S72. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.07.012>
250. Jahkola T, Toivonen T, Virtanen I, et al. Tenascin-C expression in invasion border of early breast cancer: a predictor of local and distant recurrence. *British Journal of Cancer*. 1998. 78:1507–1513. <https://doi.org/10.1038/bjc.1998.714>
251. Zhu J, Xiong G, Trinkle C, et al. Integrated extracellular matrix signaling in mammary gland development and breast cancer progression. *Histology and histopathology*. 2014. 29:1083–92. <https://doi.org/10.14670/HH-29.1083>
252. Ilunga K, Nishiura R, Inada H, et al. Co-stimulation of human breast cancer cells with transforming growth factor- β and tenascin-C enhances matrix metalloproteinase-9 expression and cancer cell invasion. *International Journal of Experimental Pathology*. 2004. 85:373–379. <https://doi.org/10.1111/j.0959-9673.2004.00406.x>
253. Yoshida T, Ishihara A, Hirokawa Y, et al. Tenascin in breast cancer development — is epithelial tenascin a marker for poor prognosis? *Cancer Letters*. 1995. 90:65–73. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(94\)03679-D](https://doi.org/10.1016/0304-3835(94)03679-D)
254. Hancox RA, Allen MD, Holliday DL, et al. Tumour-associated tenascin-C isoforms



- promote breast cancer cell invasion and growth by matrix metalloproteinase-dependent and independent mechanisms. *Breast Cancer Research*. 2009. 11:R24. <https://doi.org/10.1186/bcr2251>
255. Pratap J, Lian JB, Javed A, et al. Regulatory roles of Runx2 in metastatic tumor and cancer cell interactions with bone. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2006. 25:589–600. <https://doi.org/10.1007/s10555-006-9032-0>
256. Qiao M, Shapiro P, Fosbrink M, et al. Cell Cycle-dependent Phosphorylation of the RUNX2 Transcription Factor by cdc2 Regulates Endothelial Cell Proliferation. *Journal of Biological Chemistry*. 2006. 281:7118–7128. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508162200>
257. Kim B, Kim H, Park H, et al. Runx2 phosphorylation induced by fibroblast growth factor-2/protein kinase C pathways. *PROTEOMICS*. 2006. 6:1166–1174. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500289>
258. Gonzalez-Suarez E, Jacob AP, Jones J, et al. RANK ligand mediates progestin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis. *Nature*. 2010. 468:103–107. <https://doi.org/10.1038/nature09495>
259. Schramek D, Leibbrandt A, Sigl V, et al. Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progestin-driven mammary cancer. *Nature*. 2010. 468:98–102. <https://doi.org/10.1038/nature09387>
260. Tonini G, Imperatori M, Vincenzi B, et al. Rechallenge therapy and treatment holiday: different strategies in management of metastatic colorectal cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2013. 32:92. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-32-92>
261. Sigl V, Owusu-Boaitey K, Joshi PA, et al. RANKL/RANK control Brca1 mutation-driven mammary tumors. *Cell Research*. 2016. 26:761–774. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.69>
262. Infante M, Fabi A, Cognetti F, et al. RANKL/RANK/OPG system beyond bone



- remodeling: involvement in breast cancer and clinical perspectives. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2019. 38:12. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-1001-2>
263. Kiesel L and Kohl A. Role of the RANK/RANKL pathway in breast cancer. *Maturitas*. 2016. 86:10–16. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.01.001>
264. Sigl V and Penninger JM. RANKL/RANK - From bone physiology to breast cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2014. 25:205–214. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.01.002>
265. Ortiz-Otero N, Clinch AB, Hope J, et al. Cancer associated fibroblasts confer shear resistance to circulating tumor cells during prostate cancer metastatic progression. *Oncotarget*. 2020. 11:1037–1050. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27510>
266. Ao Z, Shah SH, Machlin LM, et al. Identification of cancer-associated fibroblasts in circulating blood from patients with metastatic breast cancer. *Cancer Research*. 2015. 75:4681–4687. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1633>
267. Emberley ED, Murphy LC and Watson PH. S100A7 and the progression of breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2004. 6:153. <https://doi.org/10.1186/bcr816>
268. Muoio MG, Talia M, Lappano R, et al. Activation of the s100a7/rage pathway by igf-1 contributes to angiogenesis in breast cancer. *Cancers*. 2021. 13:1–19. <https://doi.org/10.3390/cancers13040621>
269. Yakkala PA, Rahaman S, Soukya PSL, et al. An update on the development on tubulin inhibitors for the treatment of solid tumors. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2024. 28:193–220. <https://doi.org/10.1080/14728222.2024.2341630>
270. Wang W, Zhang H, Wang X, et al. Novel mutations involving β I-, β IIA-, or β IVB-tubulin isotypes with functional resemblance to β III-tubulin in breast cancer. *Protoplasma*. 2017. 254:1163–1173. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1060-1>
271. Urquhart G, Kerr KM, Nicolson M, et al. Serpin B3 Is Associated with Poor Survival



- after Chemotherapy and Is a Potential Novel Predictive Biomarker in Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 2013. 8:1502–1509. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000016>
272. Lunardi F, Villano G, Perissinotto E, et al. Overexpression of SERPIN B3 promotes epithelial proliferation and lung fibrosis in mice. *Laboratory Investigation*. 2011. 91:945–954. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.1>
273. Ahmed ST and Darnell JE. Serpin B3/B4, activated by STAT3, promote survival of squamous carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009. 378:821–825. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.11.147>
274. Dittmer J. Biological effects and regulation of IGFBP5 in breast cancer. *Frontiers in Endocrinology*. 2022. 13:1–17. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.983793>
275. Kwon A, Chae HW, Lee WJ, et al. Insulin-like growth factor binding protein-3 induces senescence by inhibiting telomerase activity in MCF-7 breast cancer cells. *Scientific Reports*. 2023. 13:8739. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35291-5>
276. Brosseau C, Pirianov G and Colston KW. Role of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 in 1, 25-Dihydroxyvitamin-D 3 -Induced Breast Cancer Cell Apoptosis. *International Journal of Cell Biology*. 2013. 2013:1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/960378>
277. Hosoya T, Oda G, Nakagawa T, et al. Plasma Levels of Decorin Increased in Patients during the Progression of Breast Cancer. *Journal of Clinical Medicine*. 2021. 10:5530. <https://doi.org/10.3390/jcm10235530>
278. Xu S, Xu H, Wang W, et al. The role of collagen in cancer: from bench to bedside. *Journal of Translational Medicine*. 2019. 17:309. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2058-1>
279. Wu Y-H and Chou C-Y. Collagen XI Alpha 1 Chain, a Novel Therapeutic Target for Cancer Treatment. *Frontiers in Oncology*. 2022. 12:1–9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.925165>



280. Nissen NI, Karsdal M and Willumsen N. Collagens and Cancer associated fibroblasts in the reactive stroma and its relation to Cancer biology. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 2019. 38:1–12. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1110-6>
281. Yang F, Lin L, Li X, et al. Silencing of COL3A1 represses proliferation, migration, invasion, and immune escape of triple negative breast cancer cells via down-regulating PD-L1 expression. *Cell Biology International*. 2022. 46:1959–1969. <https://doi.org/10.1002/cbin.11875>
282. Du H, Wang H, Luo Y, et al. An integrated analysis of bulk and single-cell sequencing data reveals that EMP1+/COL3A1+ fibroblasts contribute to the bone metastasis process in breast, prostate, and renal cancers. *Frontiers in Immunology*. 2023. 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1313536>
283. Hsiao Y-H, Lien H-C, Hwa H-L, et al. SPARC (Osteonectin) in Breast Tumors of Different Histologic Types and Its Role in the Outcome of Invasive Ductal Carcinoma. *The Breast Journal*. 2010. 16:305–308. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4741.2009.00899.x>
284. Briggs J, Chamboredon S, Castellazzi M, et al. Transcriptional upregulation of SPARC, in response to c-Jun overexpression, contributes to increased motility and invasion of MCF7 breast cancer cells. *Oncogene*. 2002. 21:7077–7091. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205857>
285. Sangaletti S, Tripodo C, Santangelo A, et al. Mesenchymal Transition of High-Grade Breast Carcinomas Depends on Extracellular Matrix Control of Myeloid Suppressor Cell Activity. *Cell Reports*. 2016. 17:233–248. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.075>
286. Alcaraz LB, Mallavialle A, Mollevi C, et al. SPARC in cancer-associated fibroblasts is an independent poor prognostic factor in non-metastatic triple-negative breast cancer and exhibits pro-tumor activity. *International Journal of Cancer*. 2023. 152:1243–1258. <https://doi.org/10.1002/ijc.34345>



287. Hassan HM, Liang X, Xin J, et al. Thrombospondin 1 enhances systemic inflammation and disease severity in acute-on-chronic liver failure. *BMC Medicine*. 2024. 22:95. <https://doi.org/10.1186/s12916-024-03318-x>
288. Patwardhan S, Mahadik P, Shetty O, et al. ECM stiffness-tuned exosomes drive breast cancer motility through thrombospondin-1. *Biomaterials*. 2021. 279:121185. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121185>
289. Suh EJ, Kabir MH, Kang U-B, et al. Comparative profiling of plasma proteome from breast cancer patients reveals thrombospondin-1 and BRWD3 as serological biomarkers. *Experimental and Molecular Medicine*. 2012. 44:36. <https://doi.org/10.3858/emm.2012.44.1.003>
290. Barrón-Gallardo CA, Garcia-Chagollán M, Morán-Mendoza AJ, et al. A gene expression signature in HER2+ breast cancer patients related to neoadjuvant chemotherapy resistance, overall survival, and disease-free survival. *Frontiers in Genetics*. 2022. 13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.991706>
291. Mao Y and Schwarzbauer JE. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biology*. 2005. 24:389–399. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2005.06.008>
292. Speziale P, Arciola CR and Pietrocola G. Fibronectin and Its Role in Human Infective Diseases. *Cells*. 2019. 8:1516. <https://doi.org/10.3390/cells8121516>
293. Erdogan B, Ao M, White LM, et al. Cancer-associated fibroblasts promote directional cancer cell migration by aligning fibronectin. *Journal of Cell Biology*. 2017. 216:3799–3816. <https://doi.org/10.1083/jcb.201704053>
294. Cai X, Liu C, Zhang T, et al. Down-regulation of FN1 inhibits colorectal carcinogenesis by suppressing proliferation, migration, and invasion. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2018. 119:4717–4728. <https://doi.org/10.1002/jcb.26651>
295. Capone E, Iacobelli S and Sala G. Role of galectin 3 binding protein in cancer progression: a potential novel therapeutic target. *Journal of Translational Medicine*.



2021. 19:405. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-03085-w>
296. Appunni S, Rubens M, Ramamoorthy V, et al. Lumican, pro-tumorigenic or anti-tumorigenic: A conundrum. *Clinica Chimica Acta*. 2021. 514:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.12.011>
297. Leygue E, Snell L, Dotzlaw H, et al. Expression of lumican in human breast carcinoma. *Cancer research*. 1998. 58:1348–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9537227>
298. Qiu X, Tan H, Fu D, et al. Laminin is over expressed in breast cancer and facilitate cancer cell metastasis. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2018. 14:1170. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.191035>
299. Giannelli G, Pozzi A, Stetler-Stevenson WG, et al. Expression of Matrix Metalloprotease-2-Cleaved Laminin-5 in Breast Remodeling Stimulated by Sex Steroids. *The American Journal of Pathology*. 1999. 154:1193–1201. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65371-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65371-0)
300. Denoyer D, Kusuma N, Burrows A, et al. Bone-derived soluble factors and laminin-511 cooperate to promote migration, invasion and survival of bone-metastatic breast tumor cells. *Growth Factors*. 2014. 32:63–73. <https://doi.org/10.3109/08977194.2014.894037>
301. Pal S, Moulik S, Dutta A, et al. Extracellular Matrix Protein Laminin Induces Matrix Metalloproteinase-9 in Human Breast Cancer Cell Line MCF-7. *Cancer Microenvironment*. 2014. 7:71–78. <https://doi.org/10.1007/s12307-014-0146-6>
302. Tzu J and Marinkovich MP. Bridging structure with function: Structural, regulatory, and developmental role of laminins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2008. 40:199–214. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.07.015>
303. Ogunnigbagbe O, Bunick CG and Kaur K. Keratin 1 as a cell-surface receptor in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2022. 1877:188664. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188664>



304. Moll R, Divo M and Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochemistry and Cell Biology*. 2008. 129:705. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0435-6>
305. Rahimi B, Panahi M, Saraygord-Afshari N, et al. The secretome of mesenchymal stem cells and oxidative stress: challenges and opportunities in cell-free regenerative medicine. *Molecular Biology Reports*. 2021. 48:5607–5619. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06360-7>
306. Wallace JA, Li F, Leone G, et al. Pten in the breast tumor microenvironment: Modeling tumor-stroma coevolution. *Cancer Research*. 2011. 71:1203–1207. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3263>
307. Yamashita M, Ogawa T, Zhang X, et al. Role of stromal myofibroblasts in invasive breast cancer: Stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with worse clinical outcome. *Breast Cancer*. 2012. 19:170–176. <https://doi.org/10.1007/s12282-010-0234-5>
308. Tchou J, Kossenkova A V, Chang L, et al. Human breast cancer associated fibroblasts exhibit subtype specific gene expression profiles. *BMC Medical Genomics*. 2012. 5:39. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-5-39>
309. Busch S, Andersson D, Bom E, et al. Cellular organization and molecular differentiation model of breast cancer-associated fibroblasts. *Molecular Cancer*. 2017. 16:1–12. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0642-7>
310. Sharma G, Pothuraju R, Kanchan RK, et al. Chemokines network in bone metastasis: Vital regulators of seeding and soiling. *Seminars in Cancer Biology*. 2022. 86:457–472. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.02.003>
311. Lim SY, Yuzhalin AE, Gordon-Weeks AN, et al. Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis. *Oncotarget*. 2016. 7:28697–28710. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7376>
312. Fernández Vallone V, Borzone FR, Martínez LM, et al. Spontaneous



- Osteoclastogenesis, a risk factor for bone metastasis in advanced luminal A-type breast cancer patients. *Frontiers in Oncology*. 2023. 13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1073793>
313. Tsuyada A and Wang SE. Fibroblast-Derived CCL2 Induces Cancer Stem Cells—Response. *Cancer Research*. 2013. 73:1032–1033. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3194>
314. Brana I, Calles A, LoRusso PM, et al. Carlumab, an anti-C-C chemokine ligand 2 monoclonal antibody, in combination with four chemotherapy regimens for the treatment of patients with solid tumors: an open-label, multicenter phase 1b study. *Targeted Oncology*. 2015. 10:111–123. <https://doi.org/10.1007/s11523-014-0320-2>
315. Ishikawa T. Differences between zoledronic acid and denosumab for breast cancer treatment. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 2023. 41:301–306. <https://doi.org/10.1007/s00774-023-01408-z>
316. Jin Z-H, Wang S-F and Liao W. Zoledronic acid accelerates osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells by attenuating oxidative stress via the SIRT3/SOD2 pathway and thus alleviates osteoporosis. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2020. 24:2095–2101. https://doi.org/10.26355/eurrev_202002_20389
317. Veeraballi S, Bandaru SS, Kiwan C, et al. A multifaceted role of bisphosphonates from palliative care to anti-cancer therapy in solid tumors. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*. 2024. <https://doi.org/10.1177/10781552241265304>
318. Gallo M, De Luca A, Lamura L, et al. Zoledronic acid blocks the interaction between mesenchymal stem cells and breast cancer cells: Implications for adjuvant therapy of breast cancer. *Annals of Oncology*. 2012. 23:597–604. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr159>
319. Chen Q, Zhang XH-F and Massagué J. Macrophage Binding to Receptor VCAM-1 Transmits Survival Signals in Breast Cancer Cells that Invade the Lungs. *Cancer Cell*.



2011. 20:538–549. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.08.025>
320. Vaklavas C, Stringer-Reasor EM, Elkhanany AM, et al. A phase I/II study of preoperative letrozole, everolimus, and carotuximab in stage 2 and 3 hormone receptor-positive and Her2-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2023. 198:217–229. <https://doi.org/10.1007/s10549-023-06864-9>
321. Rosen LS, Hurwitz HI, Wong MK, et al. A Phase I First-in-Human Study of TRC105 (Anti-Endoglin Antibody) in Patients with Advanced Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2012. 18:4820–4829. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0098>
322. Paauwe M, Heijkants RC, Oudt CH, et al. Endoglin targeting inhibits tumor angiogenesis and metastatic spread in breast cancer. *Oncogene*. 2016. 35:4069–4079. <https://doi.org/10.1038/ONC.2015.509>



ANEXOS

Comite de ética



INSTITUTO UNIVERSITARIO
DEL HOSPITAL ITALIANO



HOSPITAL ITALIANO
de Buenos Aires

Comité de Ética de Protocolos de Investigación

MIEMBROS DEL COMITÉ

Coordinador:

DR. AUGUSTO PÉREZ
Médico

DR. ANIBAL ARIAS
Médico

DR. JORGE BORETTO
Médico

DR. CARLOS BURGE
Abogado

DRA. PAOLA CASCIATO
Médica

DR. OSCAR MAZZA
Médico

DRA. LUCRECIA PIÑEIRO
Dra. en Química

SRA. MARIA E. SAHORES
Lego

DRA. PAULA SCIBONA
Médica

DRA. DEBORA SZEINMAN
Médica

DRA. JULIETA TRINKS
Médica

APROBACIÓN DEL PROTOCOLO N° 5009

Buenos Aires, 13 de junio de 2019.

El Comité de Ética de Protocolos de Investigación* del Hospital Italiano de Buenos Aires ha evaluado y aprobado el protocolo **"IMPORTANCIA DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES CD105 (+) / CD 34 (-) EN LA EVOLUCIÓN DEL CÁNCER DE MAMA"** en conjunto con el **CONSENTIMIENTO INFORMADO**, el cual se entrega sellado y fechado. Se aprueba la realización del estudio en este Hospital a cargo de **ALEJANDRA WERNICKE**, no requiere la aprobación de ANMAT-----

[APROBADO EN REUNIÓN DEL 13 DE JUNIO DE 2019, SEGÚN CONSTA EN LIBRO DE ACTAS N° 13, FOLIO 157]

*Este Comité funciona de acuerdo con las normativas establecidas por el I.C.H. (F.D.A., -EEUU, Comunidad Europea, Japón)

IRB00010193

**El Consentimiento que se adjunta, con firma y sello de este Comité, es el que corresponderá fotocopiar para entregar a los pacientes enrolados en el Hospital Italiano.

***No se podrá enrolar pacientes en el estudio hasta que este Comité no reciba la aprobación de ANMAT del Protocolo, del Centro y del Consentimiento Informado (si lo hubiera).

IMPORTANTE¹:
Los investigadores deberán presentar a este Comité los formularios adjuntos, en el caso que corresponda:

- 1- Copia de la aprobación del protocolo por la ANMAT
- 2- Comunicación de inicio de la investigación (reclutamiento del 1° paciente)
- 3- Informe sobre la marcha del protocolo dentro del año de inicio del mismo:
 - ✓ El progreso del protocolo con los pacientes reclutados y datos parciales si los hubiese, una vez por año, (salvo que este Comité decida que el informe deba ser más frecuente).
 - ✓ Los eventos adversos informados por el patrocinante o detectados por Uds. mismos.
 - ✓ Otras modificaciones al protocolo no se podrán aplicar sin ser antes evaluadas por este Comité, salvo en casos de riesgo de vida para el paciente.
 - ✓ En caso de suspensión del protocolo, la comunicación deberá ser inmediata.
- 4- Comunicación de finalización de la investigación

De este documento se emiten tres copias: una para el archivo del Comité otra para el investigador y otra para el patrocinante (en el caso que corresponda).

¹ Ver Plan de seguimiento de protocolo en página 3 de este documento

CEPI | Juan D. Perón 4190 - 4192, Capital Federal, (C1199ABB) | Av.Pte.Perón 2231 - B1754AZK San Justo
TEL: (005411) 4959-0200 Int. 8425
e-mail: cepi@hospitalitaliano.org.ar | www.hospitalitaliano.org.ar

Página 1 de 4
Version Ago2018



Comité de Ética de Protocolos de Investigación

APROBACIÓN PROTOCOLO N° 5009

Fecha: 13 de junio de 2019.

SIN OBJECIONES ÉTICAS.

Se respondieron las observaciones del Informe de Evaluación del 28/03/2019.

Desde ya, muchas gracias.

CEPI
Comité de Ética de Protocolos de Investigación

Este protocolo ha sido evaluado y aprobado por el Comité de Ética de Protocolos de Investigación y autorizado por la Dirección Médica del Hospital

CEPI | Juan D. Perón 4190 - 4192, Capital Federal, (C1199ABB) | Av.Pte.Perón 2231 - B1754AZK San Justo
TEL: (005411) 4959-0200 int. 8425
e-mail: cepi@hospitalitaliano.org.ar | www.hospitalitaliano.org.ar

Página 2 de 4
Version Ago2018



Comité de Ética de Protocolos de Investigación

APROBACIÓN PROTOCOLO N° 5009

PLAN DE SEGUIMIENTO

El Comité de Ética de Protocolos de Investigación del Hospital Italiano de Buenos Aires, de acuerdo con la disposición 6677/10 de ANMAT, vigente desde el 1 día hábil del año 2011 realizará un seguimiento de este protocolo de investigación, a través de dos mecanismos:

1. El centro deberá remitir, siempre y en el caso que corresponda, completando los formularios adjuntos a la aprobación
 - a. El formulario de aprobación de ANMAT, con la fotocopia de la disposición correspondiente en el caso del protocolo y del centro, enmiendas y consentimientos informados.
 - b. Informe de inicio de la investigación, completando correctamente el formulario de incorporación del Primer paciente
 - c. El formulario de Remito de droga o dispositivo, debidamente acompañado del remito de la droga / dispositivo
 - d. Informes periódicos (cada 6 meses) e informe final, completando el formulario de este comité correctamente,
 - e. Informando sobre las inspecciones a realizarse en el centro a este comité, con el formulario correspondiente
 - f. Informe de desviaciones, en el formulario de este comité.
 - g. Informe final con el formulario de este comité debidamente completo
 - h. Informes de eventos adversos enviados al investigador en formato electrónico de acuerdo a normativa del mismo.

En caso de que de la documentación arriba mencionada se desprenda un alto reclutamiento de pacientes, un alto número de eventos adversos, y numerosas desviaciones, se procederá a realizar monitoreo y/o al menos una vez mientras este dure revisando, además de la documentación arriba mencionada, las historias clínicas de los pacientes, los consentimientos informados y toda otra documentación pertinente.

2. Y, acorde con la Disposición de ANMAT 690/05, (Guía de Inspecciones a Investigadores Clínicos)
 - a. Por involucrar el estudio Población vulnerable,
 - b. Por la Fase de investigación,
 - c. Por ser la Investigación con riesgo mayor,
 - d. Criterios de Selección de Centro,
 - e. Alto reclutamiento,
 - f. Por bajo/alto número de reportes de seguridad;
 - g. Antecedentes del investigador;
 - h. Elevado número de estudios por parte del investigador;
 - i. Cualquier información relevante recibida en los reportes de seguridad, y/o en los informes de avance, que a criterio de este Comité amerite un monitoreo

Este Comité, por cumplir con las normas de GCP para actuar como Comité Independiente, no acepta ingerencia de otro comité independiente para este protocolo.

CEPI | Juan D. Perón 4190 - 4192, Capital Federal, (C1199ABB) | Av.Pte.Perón 2231 - B1754AZK San Justo
TEL: (005411) 4959-0200 int. 8425
e-mail: cepi@hospitalitaliano.org.ar | www.hospitalitaliano.org.ar

Página 3 de 4
Version Ago2018



Comité de Ética de Protocolos de Investigación

APROBACION DEL PROTOCOLO N° 5009

MIEMBROS DEL COMITÉ

NOMBRE Y APELLIDO	CARGO	SEXO	FIRMA
Dr. Anibal ARIAS	Médico de planta del Servicio de Cardiología	Masculino	
Dr. Jorge BORETTO	Médico de Planta Sección de Patología del Miembro Superior Servicio de Ortopedia Integrante del Equipo de Trasplante del Sistema Muscosquelético	Masculino	NO PARTICIPÓ DE LA EVALUACIÓN NI DE LA APROBACIÓN
Dr. Carlos BURGER	Abogado Doctor en Ciencias Jurídicas y Sociales Prof. Jefe de Trabajos Prácticos Fac. Medicina UBA Prof. en Bioética Universidad Nacional Jauretche Director Maestría en Bioética UMSA Ex Prof. Adjunto Fac. de Derecho UBA	Masculino	
Dra. Paola CASCIATO	Médico de Planta del Servicio de Clínica Médica, Sección Hepatología	Femenino	
Dr. Oscar MAZZA	Médico de Planta del Servicio de Cirugía General Jefe de Sector de Cirugía de hígado, vía biliar y páncreas	Masculino	
Dr. Augusto PÉREZ	Jefe Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos Médico de Planta Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos	Masculino	
Dra. Lucrecia PIÑEIRO	Dra. en Ciencias Químicas Profesor Titular Universidad Favaloro Investigador asociado al Laboratorio Proteoglicanos y Matriz Extracelular, IBYME-CONICET	Femenino	
Sra. María Elena SAHORES	Lego	Femenino	
Dra. Paula SCIBONA	Médico de Planta del Servicio de Clínica Médica, Sección Farmacología Clínica	Femenino	
Dra. Débora SZEINMAN	Médico Asociado del Servicio de Medicina Familiar y Comunitaria	Femenino	
Dra. Julieta TRINKS	Investigadora IMTIB-CONICET, Instituto Universitario Escuela de Medicina, Hospital Italiano de Buenos Aires Médica Doctora en Medicina Prof. Titular Fac. Medicina USAL	Femenino	



Modelo de consentimiento informado

Consentimiento informado. Este consentimiento fue elaborado con los colaboradores del Hospital Italiano, Dra. Wernicke A y Dra. Carola Allemand.

CONSENTIMIENTO INFORMADO HOSPITAL ITALIANO
TÉRMINOS DEL CONSENTIMIENTO

Título del proyecto: "Importancia de las células mesenquimales estromales CD105(+)/CD34(-) en la evolución del cáncer de mama".

INTRODUCCIÓN

Usted está invitada a participar en un trabajo de investigación científica. El objetivo es estudiar características biológicas y moleculares del tumor al momento desconocidas. Este estudio se realizará de manera conjunta con otros análisis correspondientes a la evaluación de parámetros de pronóstico clásico para el cáncer de mama. Además, antes de comenzar el tratamiento Usted será evaluada por su Médico con el fin de conocer el estado de su salud. Todos estos estudios serán responsabilidad del Servicio de Oncología del Hospital Italiano. Este estudio no modifica el seguimiento y el tratamiento de su enfermedad.

Usted puede realizar todas las preguntas que considere convenientes acerca de este estudio y requerir una respuesta clara por parte de su Médico antes de la firma de este.

PROCEDIMIENTO

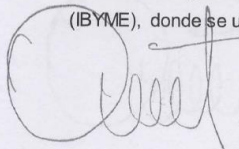
Su participación en este caso consistirá en autorizar a su Médico, a disponer de parte de la muestra de tumor que será obtenida cuando Ud. sea operado con motivo de su cáncer. La obtención de esta porción de tejido no afectará al diagnóstico para el cual se está tomando la muestra. Este estudio no modifica el seguimiento y el tratamiento de su enfermedad.

La obtención de esta muestra no es invasiva y no requiere preparaciones extras.

ANÁLISIS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Las muestras serán enviadas a un laboratorio para su análisis. Las muestras se almacenarán para ser utilizadas en el estudio antes mencionado. Si Ud. acepta ser parte del mismo, las muestras serán guardadas durante un máximo de 15 años para poder hacer nuevos análisis en un futuro, siempre relacionados con los objetivos de este estudio.

Una vez finalizado el Proyecto de Investigación o cuando la paciente solicite un retiro anticipado, las muestras serán eliminadas según las normas de destrucción de material biológico que establece el Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), donde se utilizarán las muestras durante la investigación.


 Dr. Augusto Pérez
Coordinador
Comité de Ética de Protocolos de Investigación
Hospital Italiano Bs. As.

Por el Comité de Investigación Investigadora de...
 ha sido aprobado por el Comité de Ética de
 Protocolos de Investigación del Hospital Italiano
 de Bs. As. en reunión del...
 13 JUN 2019



INFORMACIÓN, RELACIÓN DE COSTO E INDEMNIZACIÓN

La muestra biológica se utilizará sólo para fines de investigación. No recibirá ninguna compensación económica por participar en este trabajo de investigación. Ni tampoco se le exigirá venir más veces al Hospital para la toma de la muestra, ya que la misma será recogida en el momento de la cirugía. En ningún caso se utilizará esta muestra para otro propósito salvo que Usted así lo disponga.

POSIBLES RIESGOS Y MOLESTIAS

La obtención de una porción de tejido no afectará al diagnóstico ni tampoco le producirá ningún riesgo o molestia.

POSIBLES BENEFICIOS

La información obtenida no necesariamente le brindará un beneficio directo, pero contribuirá a un mejor conocimiento de los mecanismos responsables del desarrollo del cáncer de mama.

GARANTÍA DE CONFIDENCIALIDAD

Su nombre no será utilizado en ningún informe, ni divulgado en forma alguna. El estudio involucra obtención de información contenida en su historia clínica relacionada con su salud. Toda documentación será conservada en forma estrictamente confidencial, al igual que su identidad, para lo cual se utilizará un sistema de código especial.

DERECHO A RETIRARSE DEL ESTUDIO

La decisión de participar depende exclusivamente de su voluntad. Si Usted decide no participar, ello no le ocasionará la pérdida de beneficio alguno en relación con el cuidado de su salud. Su participación es totalmente voluntaria y tendrá el tiempo suficiente para decidir si participa o no. Asimismo, está en libertad de decidir en cualquier momento, continuar participando o no del estudio, sin tener que dar explicación alguna. Ello no afectará la continuidad de su tratamiento o la relación con el Médico tratante o con el personal de la Institución. Bajo cualquier circunstancia, Usted podrá solicitar un informe escrito actualizado de lo actuado hasta ese momento. Si existiera algún inconveniente o pregunta, su Médico estará a su disposición y podrá contactarlo a la siguiente dirección.

Dr. Augusto Pérez
Coordinador
Comité de Ética de Protocolos de Investigación
Hospital Italiano Bs. As

Por el presente se manifiesta el consentimiento informado de...
ha sido aprobado por el Comité de Ética de...
Protocolos de Investigación del...
13 JUN 2019



Nombre y apellido del Médico: Dr. Carola Allemand
Matrícula: MN 114058
e-mail: carola.allemand@hospitalitaliano.org.ar

Nombre y apellido de la Investigadora Principal: Dr. Wernicke Alejandra
Matrícula: MN 108790
e-mail: alejandra.wernicke@hospitalitaliano.org.ar
Teléfono: 15-54877994

También podrá comunicarse con el Comité de Ética de Protocolos de Investigación (CEPI), Departamento de Docencia e Investigación del Hospital Italiano de Buenos Aires, si tiene dudas respecto a la participación como sujeto en un estudio de investigación.

Dirección: Gascón 450 1^{er} piso, Capital federal, (1881)

Tel: (005411) 4959-0200 int. 8425

Mail: cepi@hospitalitaliano.org.ar / www.hospitalitaliano.org.ar

Investigador Principal del Proyecto: Dra. Alejandra Wernicke

Responsable de enrolar a las pacientes: Dr. Carola Allemand

Por favor, tome el tiempo necesario para analizar esta información y no tenga dudas en hacer preguntas. Asimismo tiene el derecho de solicitar una copia de este documento luego de haber sido firmado por las partes intervinientes.

He leído y comprendido la información anterior y tuve la posibilidad de formular preguntas, las cuales me fueron respondidas satisfactoriamente. De manera voluntaria acepto participar donando una porción del tejido tumoral extirpado durante mi cirugía en el Hospital Italiano. Entiendo que mi participación en este estudio no implica riesgos ni beneficios directos para mi persona. Conozco que tengo el derecho a retirar las muestras en cualquier momento y mi propia participación sin obligación de brindar ninguna explicación. El tiempo de conservación de las muestras dependerá del avance del Proyecto. Esperamos que este Proyecto pueda concretarse en no más de 4-5 años. Pero como los tiempos de publicaciones no son cortos, las muestras serán almacenadas por un período de 10 años por si se requiere algún ensayo extra por parte de los evaluadores del trabajo.

Acepto: marcar la opción correcta

i) Que los cortes del tumor sean utilizados para cumplir los objetivos de este proyecto: ☐

ii) Que los cortes del tumor sean utilizados para cumplir los objetivos de este proyecto y otros objetivos futuros que puedan surgir relacionados con el tema en estudio: ☐

Dr. Augusto Pérez
 Coordinador
 Comité de Ética de Protocolos de Investigación
 Hospital Italiano Bs. As

Por medio de la presente se certifica que el presente documento ha sido aprobado por el Comité de Ética de Protocolos de Investigación del Hospital Italiano de Bs. As. en reunión del 13 JUN 2019



Nombre y apellido del paciente:

Firma:

Aclaración:

Fecha:

Nombre y apellido del Profesional responsable:

Firma:

Nombre y apellido del Médico: Dr. Carola Allemand

Matrícula: MN 129537

Fecha:

Coordinador del Comité de Ética de Protocolos de Investigación (CEPI): Dr. Augusto Pérez.

Este Consentimiento Informado fue aprobado por el Comité de Ética de Protocolos de Investigación (CEPI) y autorizado por la Dirección Médica del Hospital Italiano.

Dr. Augusto Pérez
Coordinador
Comité de Ética de Protocolos de Investigación
Hospital Italiano Bs. As.

Este consentimiento informado de...
fue aprobado por el Comité de Ética de
Protocolos de Investigación del Hospital Italiano
de Bs. As. en reunión del 1/3 JUN 2019



UNIDAD DE TRASPLANTE DE MEDULA OSEA FUNDACION FAVALORO

UTCPH-CI-D05-14

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA EXTRACCION DE MEDULA OSEA EN QUIROFANO (DONACION)

CONFIERE AUTORIZACION: Declaro bajo juramento, que autorizo expresamente al equipo de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) de la Fundación Favaloro y a otros profesionales que estos designen si fueren necesarios, para la realización del procedimiento de extracción de médula ósea con el objeto de ser trasplantada a:

Me declaro plenamente consciente de los riesgos que implica el procedimiento de donación de médula ósea, como ser las punciones reiteradas, anestesia, infección y dolor local, anemia.

Declaro entender la necesidad de este procedimiento.

Autorizo también a los profesionales del equipo de trasplante de CPH de la Fundación Favaloro o a quien ellos designen, a efectuar tratamientos de emergencia sin mi autorización cuando tal urgencia determinara la posibilidad de muerte.

Consciente de que la medicina no es una ciencia exacta, eximo de toda responsabilidad a los médicos del equipo de trasplante de CPH de la Fundación Favaloro, por complicaciones imprevisibles.

Autorizo el uso de datos médicos obtenidos de la historia clínica para ser empleados con fines de investigación en registros nacionales, como el INCUCAI, GATMO o internacionales como el IBMTR, EBMT u otros, manteniendo la confidencialidad de los mismos.

Autorizo a la utilización de una alícuota del producto obtenido de sangre periférica y / o (Médula ósea) (según corresponda) para la determinación del N° de células CD34+ y viabilidad celular por citometría y para la eventual utilización en estudios de investigación, en los lugares en donde sea decidido por el Equipo de Trasplante.

Autorizo a los profesionales del equipo de trasplante de CPH de la Fundación Favaloro a utilizar los datos de mi historia clínica con fines académicos.

La donación es voluntaria y en fe suscribe el testigo:

.....DNI:.....

Domiciliado en:.....

Firmo este documento en prueba de mi absoluta conformidad luego de leerlo o haberseme leído y comprendido claramente su contenido.

Leída y ratificada se extienden dos ejemplares a los.....días del mes de..... de 201.....

PACIENTE

N y A: _____

DNI: _____

MEDICO

N y A: _____

DNI: _____

TESTIGO

N y A: _____

DNI: _____

Dr. LEONARDO J. FELDMAN
M.N. 45141
JEFE TRASPLANTE DE MEDULA OSEA
FUNDACION FAVALORO

Firma: _____