

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 762**

51 Int. Cl.:

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2011** **E 11758243 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015** **EP 2619582**

54 Título: **Diagnóstico de cáncer de mama**

30 Prioridad:

22.09.2010 EP 10178345

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.04.2015

73 Titular/es:

**IMBA-INSTITUT FÜR MOLEKULARE
BIOTECHNOLOGIE GMBH (100.0%)
Dr. Bohrgasse 3
1030 Wien, AT**

72 Inventor/es:

**PENNINGER, JOSEF;
SCHRAMEK, DANIEL;
SCHETT, GEORG;
WIDSCHWENDTER, MARTIN;
JACOBS, IAN J. y
MENON, USHA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 533 762 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Diagnóstico de cáncer de mama

La presente invención se refiere al campo del diagnóstico de cáncer de mama.

El cáncer de mama es uno de los cánceres más comunes en seres humanos y afectará de media a una de cada ocho mujeres a lo largo de su vida en los Estados Unidos y en Europa. La Women's Health Initiative (WHI) y Million Woman Study han mostrado que la terapia de reemplazo hormonal (TRH) está asociada con un aumento del riesgo de la frecuencia y mortalidad del cáncer de mama. En particular, los derivados sintéticos de la progesterona (progestinas) tales como el acetato de medroxiprogesterona (MPA), usado por millones de mujeres para la TRH y en anticonceptivos, aumenta notablemente el riesgo de desarrollar cáncer de mama.

El activador del receptor del ligando NF- κ B (RANKL, también conocido como ODF, TRANCE, OPGL, TNFSF11) y de su receptor RANK (TRANCE-R, TNFRSF11A), son esenciales para el desarrollo y la activación de osteoclastos. La inhibición de RANKL está a punto aprobarse posiblemente para millones de pacientes para la prevención de la pérdida ósea. RANK y RANKL se han clonado y caracterizado (documentos US 6.017.729, EP 0 873 998, EP 0 911 342, US 5.843.678, WO 98/46751, WO 98/54201). Tanto la expresión de RANKL como la de RANK se han observado en cánceres de mama primarios en seres humanos y en líneas celulares de cáncer de mama y se ha propuesto que el sistema RANKL/RANK puede regular la metástasis ósea de tumores epiteliales¹⁴ sin un efecto sobre la proliferación o susceptibilidad a la muerte.

Terpos y col., Blood 102 (3) (2003): 1064-1069, describen marcadores para el pronóstico del desarrollo del mieloma múltiple, un cáncer que causa lesiones óseas e interfiere con la producción de células sanguíneas en la médula ósea.

Hashimoto y col., Cancer & Chemotherapy 7 (31) (2004): 1027-1033 (resumen), mencionan que los marcadores metabólicos óseos, incluyendo RANKL y OPG solubles, reflejan actividad osteoclástica y osteoblástica, proporcionando información sobre la gravedad y el pronóstico de las enfermedades óseas.

El documento WO 2005/060627 A2 se refiere a procedimientos para determinar el riesgo de fractura ósea no traumática midiendo el nivel de RANK. Las herramientas para el uso en dicho procedimiento son, por ejemplo, anticuerpos contra RANK o contra RANKL.

El documento WO 00/43553 A1 desvela procedimientos de cribado de mujeres para el cáncer de mama determinando un nivel de un marcador relacionado con estrógenos. Los marcadores determinados en este procedimiento son una enzima aromatasa, actividad aromatasa, un subproducto de la síntesis de estrógenos y una proteína efectora que actúa aguas arriba de la síntesis de estrógenos, obtenida de fluidos ductales mamarios.

Beleut y col., Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America 107 (7) (2010): 2989-2994, proporcionan una investigación de los mecanismos que conducen a la proliferación de la glándula mamaria. Predominantemente, la progesterona dirige la proliferación de las células epiteliales mamarias.

Leibbrandt y col., revisan en el artículo European Journal of Clinical Investigation 39 (10) (2009): 842-850, las funciones de RANK, RANKL y OPG en osteoblastos y osteoclastos.

Reid y col., Molecular Molecular Cancer 8 (49) (2009): 1-10, desvelan la estimulación de la producción de OPG por las células endoteliales.

Bo-Ying y col., Annals of Surgical Oncology 17 (6) (2010): 1675-1681, describen la identificación de un determinado polimorfismo en el gen de TNFRSF11B que está implicado en el aumento de la metástasis ósea del cáncer de próstata.

Park y col. (2003) contiene una discusión del papel de la OPG y RANKL en metástasis óseas de cáncer de mama.

Chen y col. (2006) desvelan que la expresión de RANKL/RANK/OPG aumenta en el carcinoma de próstata metastásico agresivo.

Es un objetivo de la presente solicitud proporcionar procedimientos diagnósticos y medios para identificar el cáncer.

La presente invención se refiere al papel específico de RANKL en el cáncer, a su uso para diagnosticar y predecir el cáncer y al desarrollo del cáncer.

De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar un cáncer o predecir si un paciente desarrollará cáncer, en el que dicho cáncer es cáncer de mama, que comprende determinar la actividad de RANKL y la cantidad de OPG en una muestra de dicho paciente. La presente invención se define adicionalmente en las reivindicaciones.

De acuerdo con la presente invención, se ha descubierto que la ruta de RANK/RANKL está asociada con el

desarrollo del cáncer y que puede usarse para detectar el cáncer y predecir su aparición. Se encontró que RANKL era responsable de proteger a las células de mutaciones cancerosas ya que impide la muerte celular después de dichas mutaciones inducidas por daño en el ADN. La supervivencia de las células, a pesar de las mutaciones transformantes, es una propiedad clave de las células cancerosas. El papel de RANKL recientemente descubierto en esta actividad permite correlacionar la actividad de RANKL y/o la concentración de OPG con el desarrollo del cáncer. Por lo tanto, se puede estimar la probabilidad de que un paciente tenga o desarrolle un cáncer. La presente invención también se refiere al procedimiento de identificación o predicción del riesgo de desarrollar células cancerosas en un sujeto determinando la actividad de RANKL o la concentración de OPG en una muestra del sujeto.

De acuerdo con la presente invención, "predecir" no debe interpretarse en un sentido absoluto, es decir, en el significado en el que se puede predecir con una certidumbre del 100 % que un paciente desarrollará definitivamente cáncer, pero la invención se refiere a estimar el riesgo de un paciente para desarrollar cáncer. De manera similar, "detectar un cáncer de mama" tampoco reivindica que todos los pacientes con cáncer puedan identificarse determinando la actividad de RANKL, pero el paciente puede tener una alta probabilidad de tener cáncer. Por lo tanto, determinar la actividad de RANKL puede ser una primera pista para identificar un cáncer de mama, posiblemente seguido de más ensayos invasivos.

La invención se basa en el resultado de que la actividad de RANKL – así como la concentración de POG, su ligando natural– puede correlacionarse con la aparición y el desarrollo del cáncer y, por lo tanto, en una realización preferida dicha correlación puede incluirse de acuerdo con el procedimiento de la invención. Por ejemplo, es posible correlacionar datos de un control negativo (por ejemplo, de pacientes que no desarrollan o desarrollaron cáncer) y/o de un control positivo (de pacientes que desarrollaron cáncer) y comparar dichos datos de control negativo o positivo con la actividad de RANKL de la muestra del paciente. Además, para mejorar la potencia del diagnóstico es posible controlar la actividad de RANKL, es decir, medir la actividad de RANKL en muestras del paciente de distintos momentos, por ejemplo, en determinados intervalos de al menos o como máximo, por ejemplo, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses o 12 meses o más. Los cambios en la actividad de RANKL en dos o más momentos pueden indicar desarrollo del cáncer. En realizaciones particulares, se prefiere controlar los valores de la actividad de RANKL al mismo tiempo en el ciclo menstrual ya que la actividad de RANKL puede estar influenciada por hormonas sexuales femeninas. Por ejemplo, se prefiere que la actividad de RANKL de la muestra se mida a una cantidad fija de días después de la ovulación.

En realizaciones preferentes, el cáncer de mama es un cáncer de mama dependiente de hormonas del crecimiento. Dichas hormonas puede ser hormonas sexuales, tal como hormonas sexuales femeninas como progesterona o un estrógeno. Las células cancerosas pueden tener receptores hormonales, especialmente receptores de progesterona o receptores estrogénicos. Son ejemplos de receptores estrogénicos el ESR1 (que comprende cadenas alfa del RE), el ESR2 (que comprende cadenas beta del RE) o los receptores heteroméricos, tales como las cadenas mixtas alfa y beta del RE. La presencia de dichos receptores puede indicar una necesidad de señalización hormonal en la célula. En particular, esta señalización puede estar mediada por RANKL. La activación de RANKL por hormonas protege al cáncer o a la célula precancerosa de la muerte celular inducida por daño en el ADN. Por lo tanto estas hormonas pueden mantener el cáncer mediante la actividad aumentada de RANKL, que por lo tanto puede usarse para diagnosticar o predecir el cáncer de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo con la invención, el cáncer puede ser un cáncer primario. Como se muestra en este documento, incluso hasta dos años antes de la manifestación clínica del cáncer, se puede diagnosticar un desarrollo canceroso y, por lo tanto, el cáncer puede predecirse mediante la determinación de la actividad de RANKL. Por lo tanto, el cáncer primario puede diagnosticarse o predecirse. Además, también es posible diagnosticar o predecir el desarrollo del cáncer recurrente.

De acuerdo con la invención, se encontró que los niveles de RANKL diferían distintivamente de los de los controles negativos hasta dos años antes del desarrollo de un cáncer. Por ejemplo, se descubrió que los niveles de RANKL en suero aumentan significativamente de 12 a 24 meses antes de la aparición de la manifestación clínica del cáncer, que puede, por ejemplo, diagnosticarse mediante una biopsia convencional. Sorprendentemente, los niveles de RANKL en suero disminuyen de 5 a 12 meses antes de una manifestación de un cáncer. Mediante la comparación con los datos de las muestras del control positivo, tomadas antes de pacientes que en un determinado momento desarrollan cáncer, es posible correlacionar los datos de la muestra y predecir el futuro desarrollo del cáncer e incluso hasta el momento en que pueden detectarse los síntomas clínicos de un cáncer por medios convencionales, tal como por biopsia.

RANKL es un ligando conocido del receptor de superficie celular RANK, que regula la función de las células dendríticas y osteoclastos. De acuerdo con la presente invención, se ha descubierto un mecanismo adicional en el desarrollo del cáncer. RANKL dirige el desarrollo del cáncer influenciado por hormonas. Dichas hormonas pueden ser del acervo hormonal normal de cualquier individuo o pueden haberse administrado artificialmente (tal como en terapias de reemplazo hormonal, en el tratamiento de la menopausia o como anticonceptivo). Además, se han investigado y caracterizado el mecanismo molecular y la actividad de este ligando en cáncer. El efecto de RANKL, "actividad de RANKL", incluye la unión de RANKL a RANK y su activación resultante. RANK en cambio activa adicionalmente IKK α , I κ B α , P-NF κ B y ciclina D1 o activa la ruta de Id2-p21, MAPK Erk y p38. Cualquier regulación

positiva de esta ruta debida a RANKL puede usarse como un indicador para el procedimiento diagnóstico de la invención. Del mismo modo, la modificación de la actividad de cualquiera de estos factores puede usarse para un procedimiento terapéutico que se describe adicionalmente en el presente documento. Por lo tanto, cualquier regulación positiva o activación de cualquiera de los miembros de esta ruta puede usarse para estimar la "actividad de RANKL". La mayoría de estas proteínas son intracelulares y es posible evaluar su concentración usando muestras celulares. Como alternativa, o además de la estimación de la concentración de proteínas es posible determinar la expresión de estas proteínas, por ejemplo, determinando las concentraciones de ARNm en las células, en particular de las células de tejido mamario. Por lo tanto, la presente invención comprende la determinación de la actividad de RANKL determinando la señalización de una cualquiera de RANK, IKK-alfa, I κ B-alfa, P-NF-kappa-B, CiclinaD1 (Id2-p21, MAPK Erk o p38). La señalización y activación de cualquiera de estos factores puede medirse, por ejemplo, detectando y/o cuantificando la cantidad de RANK, IKK-alfa, I κ B-alfa, P-NF-kappa-B, y/o CiclinaD1 o Id2-p21, MAPK Erk y/o p38 activada. Las formas activadas de estas proteínas pueden determinarse, por ejemplo, determinando versiones fosforiladas de estas proteínas o determinando agregados proteicos. Como siempre una comparación con un control negativo o positivo puede ayudar a identificar el aumento de la activación de una o más de estas proteínas. Por razones de accesibilidad, sin embargo, se prefiere determinar la concentración de RANKL en muestras de sangre o suero de un paciente.

RANK no es el único receptor para RANKL. La osteoprotegina (OPG) es un receptor señuelo secretado que puede reducir la actividad de RANKL (unión de RANKL a RANK y su ruta de señalización mediante IKK α , I κ B α , P-NF κ B y ciclina D1). Además, RANKL regula positivamente la expresión de la OPG y puede conducir a una concentración aumentada de OPG, en particular, en una muestra de sangre o suero. La OPG puede reducir la concentración de RANKL libre uniéndose al mismo. En algunas realizaciones de la presente invención, la concentración de RANKL puede determinarse en su forma libre soluble. En otras realizaciones, la concentración total de RANKL (RANKL libre además de RANKL unido a OPG) puede ser un indicador de cáncer. No obstante, la actividad de RANKL es una causa del desarrollo de cáncer de mama, la regulación positiva de las concentraciones de RANKL que, a su vez, también puede regular positivamente su ligando OPG regulador que puede actuar como un marcador diagnóstico para diagnosticar o predecir el cáncer. Por lo tanto, para fines diagnósticos, la expresión "determinar la actividad de RANKL" incluye tanto la determinación de cualquier regulación positiva en la ruta de señalización de RANKL como en cualquier concentración de RANKL. En realizaciones particulares preferidas, como marcador para las predicciones o diagnóstico de la invención, se usa una combinación de OPG y RANKL, especialmente en una muestra puede usarse la relación entre RANKL como cantidades de OPG. Las concentraciones aumentadas de OPG pueden dar como resultado de la disminución de RANKL soluble libre lo que más probablemente es un resultado de una fase previa de concentraciones aumentadas de RANKL (sin un efecto tamponador del aumento de OPG) que puede haberse iniciado ya en las primeras etapas del desarrollo del cáncer. Por lo tanto, en línea con los hallazgos de las distintas concentraciones de RANKL durante diferentes fases de aparición del cáncer, que conducen a un desarrollo clínico del cáncer, la OPG es un marcador inverso similar del desarrollo del cáncer. Por lo tanto, la presente invención se refiere al uso de OPG como un marcador diagnóstico para el diagnóstico o pronóstico del cáncer.

En realizaciones preferidas, se usa una actividad de RANKL o concentración en suero de RANKL aumentada para estimar que un cáncer se desarrollará (más probablemente) en el intervalo de 12 a 24 meses. Una concentración de RANKL en suero disminuida puede usarse para predecir la aparición de cáncer en el intervalo de 5 a 12 meses, tanto el aumento como la disminución se detectan preferentemente en comparación con un control negativo. Preferentemente, como indicativo para el diagnóstico o predicción/pronóstico de la invención se usa una disminución de RANKL y un aumento de OPG. En realizaciones preferidas, se usan controles positivos comparativos para estimar el tiempo hasta el que un cáncer se desarrollará con mayor probabilidad. Los valores de los controles negativos y positivos pueden usarse en un análisis de correlación, preferentemente seguido de análisis estadístico para determinar el significado estadístico, por ejemplo, comparando grupos usando el ensayo de la T de Student.

Preferentemente, la actividad de RANKL se determina determinando la cantidad de RANKL y/o RANK en la muestra. Aunque, para predecir la aparición del desarrollo de cáncer de mama puede analizarse cualquier factor de señalización dentro de la cascada de RANKL/RANK, se prefiere determinar la propia cantidad de RANKL y/o RANKL. Habitualmente, la cantidad de RANKL o RANK se refiere a una concentración dentro del volumen de la muestra o, como alternativa, a una cantidad por célula en la muestra. En el caso particular de RANKL se prefiere determinar las concentraciones de RANKL en el soluto, en particular, en una muestra de sangre o suero.

Las muestras celulares preferentemente comprenden células tisulares del paciente que pueden diagnosticarse o indicar el desarrollo adicional del cáncer. Preferentemente, las células comprenden células mamarias. La cantidad de concentración de RANKL, RANK o cualquier miembro adicional de la ruta de señalización de RANKL puede estimarse por procedimientos conocidos en la técnica, en particular mediante uniones a ligando y detección de dichos acontecimientos de unión. Los ligandos preferidos son anticuerpos dirigidos contra RANKL o RANK o contra cualquier proteína celular de la ruta de señalización. Los anticuerpos anti-RANKL, por ejemplo, Denosumab, están disponibles en el comercio y se desvelan en el documento US 2008/107597. Para determinar las proteínas intracelulares habitualmente es necesario romper la membrana celular u homogeneizar una muestra celular o usar marcadores intracelulares. Preferentemente, los acontecimientos de unión se detectan usando un marcador, especialmente marcadores fluorescentes.

En realizaciones adicionales, es posible estimar la actividad de RANKL determinando la concentración de los niveles de ARNm de RANKL o los niveles de ARNm de cualquier factor de la ruta de señalización de RANKL, incluyendo RANK, $IKK\alpha$, $IKB\alpha$, P-NF κ B y ciclina D1, solos o en combinación con uno o más de estos factores, preferentemente de RANKL. La expresión aumentada de cualquiera de estos factores y en particular de RANKL es un indicador directo de la actividad aumentada de RANKL que es la causa del desarrollo de cáncer y por lo tanto puede usarse para diagnosticar o predecir cáncer.

Además, la actividad de RANKL puede correlacionarse con la progresión y expansión del cáncer, especialmente un cáncer dirigido por hormonas como el cáncer de mama. El cáncer puede ser de origen epitelial. Preferentemente, dichas correlaciones se realizan en comparación con muestras de controles positivos de pacientes que desarrollaron cáncer que progresó a una velocidad específica.

El paciente es preferentemente un mamífero, en particular preferentemente un primate, incluso más preferentemente un ser humano, en particular una mujer. El paciente puede haberse sometido, o no, a terapia con hormonas sexuales femeninas.

La progesterona, y en particular sus derivados sintéticos (progestinas), se usan en terapias de reemplazo hormonal (TRH) combinadas en mujeres postmenopáusicas, inicialmente para disminuir el riesgo de desarrollar cáncer endometrial dirigido por estrógenos y para mejorar los síntomas de la menopausia. El acetato de medroxiprogesterona (MPA) es la progestina de uso más frecuente y duradero en anticonceptivos hormonales y se usa comúnmente para la TRH.

De acuerdo con la invención, se encontró que la actividad de RANKL en el desarrollo de cáncer estaba influenciada por las hormonas sexuales, incluyendo hormonas sexuales femeninas, tales como estrógenos o progesterona, en particular por la progesterona o sus derivados (progestinas). Por lo tanto, en realizaciones preferidas, el paciente que se trata con una hormona, preferentemente recibe terapia de reemplazo hormonal, preferentemente con progesterona o con una progestina, o con un anticonceptivo hormonal. Los ejemplos de progestinas son medroxiprogesterona (o su acetato, por ejemplo, el 17-acetato), noretisterona, etisterona, noretinodrel, acetato de noretindrona, diacetato de etinodiol, levonorgestrel, norgestrel, desogestrel, gestodeno, norgestimato, drospirenona, dienogest, nesterona, acetato de nomegestrol, trimegestrona, tanaproget, acetato de megestrol, pranova, etnogestrel. Preferentemente la hormona o el derivado tienen efectos progestínicos.

Los niveles hormonales naturales pueden ser suficientes para inducir una protección cancerosa de RANKL de las mutaciones cancerosas en las células. Las hormonas también pueden aumentar de forma artificial en un sujeto. En las terapias de reemplazo hormonal o que usan anticonceptivos hormonales, el nivel hormonal, en general de las hormonas sexuales, se regula positivamente conduciendo a niveles aumentados de progesterona que pueden estar vinculados al desarrollo del cáncer por medio de la ruta de RANKL de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, los pacientes que reciben o que se han tratado con una hormona o con un anticonceptivo hormonal tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer. Para estos pacientes, la determinación de la actividad de RANKL, como se describe anteriormente, es particularmente predictiva de cáncer, de desarrollo de cáncer o de progresión de cáncer.

En particular, se encontró que incluyendo la determinación de una hormona del ciclo menstrual u hormona sexual femenina o función derivada de la misma (tal como progestina) y preferentemente incluyendo estos datos en una correlación junto con el valor de la actividad de RANKL, en particular en comparación con controles negativos y/o positivos, podía mejorarse el valor predictivo de un diagnóstico de la invención, la predicción de cáncer o una predicción de la progresión de un cáncer. Además, o como una alternativa, también es posible determinar la concentración de un ligando de RANKL en la muestra. Esto permite una correlación de la determinación de la concentración de RANKL libre en suero incluyendo información de RANKL posiblemente unido a un ligando. Un ligando preferido de RANKL es un ligando en suero de RANKL, tal como OPG. Por lo tanto, en realizaciones preferidas adicionales, los procedimientos de la invención comprenden la determinación de la concentración en suero de una hormona del ciclo menstrual o un derivado funcional de la misma o un ligando de RANKL en una muestra del paciente. El ligando de RANKL puede ser una proteína reguladora de RANKL que se regula por la concentración de RANKL *in vivo*, tal como OPG.

Un ejemplo de dicha hormona es la progesterona y ejemplos de derivados de progesterona son las progestinas, tales como el acetato de medroxiprogesterona (MPA). En particular, los altos niveles de progestina o de progesterona (por ejemplo concentración en suero $>0,3$ ng/ml) y la actividad de RANKL puede correlacionarse con el desarrollo del cáncer. Por lo tanto, en realizaciones preferentes de la presente invención, se proporciona la determinación del riesgo de desarrollar cáncer de mama estimando tanto los valores de la actividad de RANKL como de la progesterona (y/o niveles de progestina), especialmente las concentraciones en suero de las mismas.

Como alternativa, o además, la presente invención también incluye la determinación de una cantidad de osteoprotegerina (OPG) en una muestra de dicho paciente, preferentemente en una muestra de suero. La osteoprotegerina es un ligando natural secretado de RANKL que puede reducir la concentración de RANKL libre en suero. Además la OPG puede estar regulada positivamente en respuesta a concentraciones aumentadas de RANKL en el suero y por lo tanto la OPG es un indicador alternativo o adicional de cáncer, o del riesgo de desarrollar cáncer.

En particular se prefiere determinar tanto la actividad de RANKL como la concentración de OPG y correlacionar ambas concentraciones y actividades en comparación con muestras de controles negativos y/o positivos para el diagnóstico de la invención o la predicción del cáncer. Para dicha correlación, puede usarse cualquier adición, sustracción o relación entre osteoprotegerina y RANKL. En realizaciones preferentes, el cáncer (de nueva aparición) se diagnostica o predice determinando la relación entre la osteoprotegerina y RANKL. Sorprendentemente, dicha relación alcanzó un significado estadístico muy alto en los datos del suero que usaban las concentraciones en suero de osteoprotegerina y las concentraciones en suero de RANKL libre soluble. El RANKL libre soluble es una especie preferida de RANKL que se determina de acuerdo con la presente invención.

Los medios para detectar RANKL incluyen la unión a ligandos, especialmente anticuerpos anti-RANKL, que son específicos para RANKL. Los anticuerpos adecuados se desvelan en el documento US 2008/107597 y están comercialmente disponibles, por ejemplo, el anticuerpo Denosumab. "Anticuerpo anti-RANKL" incluye cualquiera de los equivalentes funcionales y derivados de los mismos, incluyendo fragmentos de anticuerpos tales como Fab, F(ab)₂, Fv o anticuerpos monocatenarios (Acmc). Los anticuerpos que se unen específicamente a las proteínas y factores asociados con la actividad de RANKL, especialmente RANKL y RANK y cualquiera de las proteínas de la ruta de señalización de RANKL, también se incluyen en la invención. Los anticuerpos pueden producirse por inmunización con la proteína de longitud completa, formas solubles de la proteína o un fragmento de la misma. Los anticuerpos de la invención pueden ser policlonales o monoclonales, o pueden ser anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos quiméricos en los que las regiones constantes murinas de las cadenas ligera y pesada se han reemplazado por secuencias humanas, o anticuerpos con las CDR injertadas en los que solamente las regiones determinantes de la complementariedad son de origen murino. Los anticuerpos de la invención pueden ser también anticuerpos humanos preparados, por ejemplo, mediante inmunización de animales transgénicos capaces de producir anticuerpos humanos (documento WO 93/12227). Los anticuerpos son útiles para detectar RANKL en muestras biológicas, permitiendo de este modo la identificación de células o tejidos que producen la proteína.

La presente invención también proporciona kits que comprenden un agente de detección para RANKL, un agente de detección para OPG, y un agente para detección para progesterona o una progestina.

Los kits pueden comprender aditivos, reactivos de detección, soluciones de lavado y/o tampones (tampones Tris, acetato o fosfato) que tengan diversos valores de pH y fuerzas iónicas, solubilizantes tales como Tween o Polisorbato, transportadores tales como albúmina de suero humano o gelatina, conservantes tales como timerosal o alcohol bencílico, y antioxidantes tales como ácido ascórbico o metabisulfito de sodio. La selección de una composición de kit particular dependerá de diversos factores, incluyendo la muestra que vaya a usarse.

Un "agente de detección" se refiere a medios para la detección y/o cuantificación de un analito determinado en una muestra.

El ligando fisiológico de RANKL es la OPG. La hormona puede ser una progestina, especialmente progesterona.

El agente de detección de RANKL puede ser un ligando de unión a RANKL, incluyendo ligandos sintéticos y moléculas pequeñas. Preferentemente, el ligando de unión a RANKL es un anticuerpo anti-RANKL. El ligando de unión a RANKL puede estar marcado, tal como por fluorescencia o un isótopo radioactivo.

Este kit puede usarse para el procedimiento de determinación, predicción o pronóstico del cáncer, desarrollo del cáncer o de identificación de células cancerosas de la invención tal como se describe con detalle anteriormente.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos, sin estar limitada a dichos ejemplos específicos.

Figuras:

Figura 1. El derivado de progesterona MPA desencadena la expresión de RANKL *in vivo* y la proliferación de células epiteliales mamarias por medio de RANK.

a, Proliferación epitelial en glándulas mamarias de hembras de las camadas control y RANK^{Δmam} 3 días después del tratamiento simulado y de la implantación de MPA. La proliferación se determinó por inmunotinción *in situ* de Ki67. **b,c**, Marcado aumento de la población enriquecida en células madre (CMMa) CD24⁺CD49^{alto} en glándulas mamarias tratadas con MPA en el control pero no en las glándulas mamarias de las RANK^{Δmam}. **b**, Perfiles representativos de FACS que muestran la expresión de CD24 y CD49 de los linajes negativos (CD31⁻ (células endoteliales) CD45⁻ (células hematopoyéticas) TER199⁻ (células eritroides)) de las CMMa mamarias de hembras vírgenes de 8 semanas de vida tratadas con MPA o simulación. **c**, Cuantificación de la población enriquecida en CMMa CD24⁺CD49^{alto} de glándulas mamarias de hembras vírgenes RANK^{Δmam} y de la camada control tratadas con MPA o simulación. Para todos los experimentos de CMMa se trató a los ratones con MPA durante 3 días. n = 4 por grupo +/- dtm. * P < 0,05; *** P < 0,001 (ensayo de la t de Student).

Figura 2. RANK controla la frecuencia y la aparición de cáncer mamario dirigido por progestina.

a, Esquema de carcinogénesis de MPA/DMBA. A hembras nulíparas de seis semanas de vida se les implantaron por vía s.c. tapones con MPA y se las trató por vía oral con DMBA como se indica durante 8 semanas. **b**,

Aparición de tumores mamarios palpables en hembras MMTV-Cre rank^{floxeado/Δ} (RANK^{Δmam}) (n=14) y hembras de la camada control de la misma edad (n=19) tratadas con gránulos de MPA y DMBA tal como se indica en la Fig. 2a. Los datos se muestran como porcentaje de ratones libres de tumores después de la última exposición a DMBA. La aparición media de los tumores para los controles fue de 11 días después del tratamiento con DMBA y de 30 días para las hembras RANK^{Δmam}. **c**, Secciones histológicas representativas de tumores mamarios aislados de hembras de la camada control y de las RANK^{Δmam} 22 días después del último tratamiento con DMBA. Se muestra la tinción con citoqueratina 5. 20 x aumentos **d,e**, Números de carcinomas *in situ* y cánceres mamarios invasivos en hembras control y RANK^{Δmam} el día 7 (**d**) y día 22 (**e**) después del final del tratamiento con DMBA. Los datos se muestran como valores medios por ratón +/- dtm. n=3 ratones por genotipo. Se analizaron las 10 glándulas mamarias de cada ratón. * P < 0,05 (ensayo de la t de Student). Los paneles inferiores muestran secciones histológicas representativas con adenocarcinomas invasivos típicos en las hembras control. Para las hembras RANK^{Δmam} se muestran, la morfología normal acinar (día 7) y un carcinoma *in situ* (día 22). Se muestran secciones teñidas con H&E e inmunotinción para el marcador de proliferación Ki67. 20 X aumentos.

Figura 3. RANK induce la señalización de NFκB, el crecimiento independiente de anclaje, y protege de la apoptosis epitelial inducida por radiación.

a, Transferencia de Western de IKKα fosforilado (P), IKKα total, p65 NFκB fosforilado (P), p65 NFκB total, IκBα fosforilado (P) e IκBα total en células epiteliales de glándula mamaria (CEM) de ratón primarias aisladas en respuesta a estimulación con RANKL (1 μg/ml). Se muestra la β-actina como un control de carga. **b**, Transferencia de Western para IKKα, IKKβ, IKKγ, p65 NFκB fosforilada (P), p65 NFκB total, IκBα fosforilado (P) e IκBα total en adenocarcinomas mamarios en estadio tardío combinados (n=4 para cada carril) que se desarrollaron en hembras control, RANK^{Δmam} e IKKα^{Δmam}. Se muestra la β-actina como un control de carga **c**, Expresión de ARNm de RANK, CiclinaD1, y p21 en adenocarcinomas mamarios de estadio tardío que se desarrollaron en hembras control, RANK^{Δmam} e IKKα^{Δmam}. La expresión se determinó por cRT-PCR. Los datos son valores medios +/- dtm. n=4 por grupo. **d**, Ensayo de Formación de Colonias en Agar Blando. Crecimiento de células humanas de cáncer de mama SKBR3 en agar blando en respuesta a la estimulación con RANKL (1 μg/ml) o EGF (100 ng/ml). Después de 18 días en cultivo con RANKL, se formaron colonias macroscópicas independientes del anclaje lo que se impidió con el receptor señuelo de la OPG (1 μg/ml). Los controles fueron células SKPR3 no estimuladas. **e**, Aparición de tumores mamarios palpables en hembras IKKα^{Δmam} (n=10) y de la camada control de la misma edad (n=11) tratadas con gránulos de MPA y DMBA. Los datos se muestran como el porcentaje de ratones libres de tumor después de la última exposición a DMBA. La aparición media de tumores en los controles fue de 10 días después del tratamiento con DMBA y de 24 días para las hembras IKKα^{Δmam}. **f,g** La radiación γ (5 Gray) indujo la apoptosis de las células epiteliales mamarias en camadas de hembras control y RANK^{Δmam} bien con operación simulada o implantadas con un tapón de MPA. La apoptosis se detectó por inmunotinción para Caspasa 3 activa. **f**, Los núcleos apoptóticos de las células epiteliales (flechas) se muestran para secciones representativas de glándula mamaria. 40 X aumentos. **g**, Cuantificación de la apoptosis epitelial mamaria. Se contaron un mínimo de 5000 núcleos para cada ratón. Los resultados mostrados son los valores medios +/- dtm. n=3 ratones por grupo. * P < 0,05; ** P<0,02 (ensayo de la t de Student).

Figura 4. RANK controla la autorrenovación de células madre cancerosas y los niveles de RANKL/OPG en suero en pacientes humanos con cáncer de mama.

a, Análisis de sRANKL y progesterona en muestras de suero de las mismas cohortes que en e. Aunque no pudo encontrarse asociación entre RANKL y progesterona en suero en el grupo control (p = 0,43) existe una clara asociación entre RANKL y los niveles de progesterona en suero en mujeres que desarrollaron cáncer de mama 12-24 meses después del muestreo de suero. p = 0,047 (ensayo de rango de Spearman). No hubo correlaciones de los niveles de progesterona y RANKL en suero en mujeres que desarrollaron cáncer de mama al cabo de 6-12 meses después de que se ensayara el suero (p = 0,76). Los datos se muestran como una función de la progesterona en suero (bajo <0,2 ng/ml; medio 0,2-0,3 ng/ml; alto >0,3 ng/ml).

b, Análisis de relaciones de OPG con respecto a sRANKL en muestras de suero del UKCTOCS recogidas prospectivamente de 182 mujeres postmenopáusicas sanas que no desarrollaron cáncer de mama durante su seguimiento y de 41 mujeres sanas de la misma edad que desarrollaron cáncer de mama positivo para el RE 5-12 meses después de que se recogiera su suero. Los gráficos de cajas muestran relaciones de OPG con respecto a sRANKL significativamente más altas en las mujeres que desarrollaron cáncer de mama dentro del primer año después del muestreo del suero. p = 0,022 (ensayo de la U de Mann Whitney). **c**, Análisis de las relaciones de OPG con respecto a sRANKL en muestras de suero del UKCTOCS de 182 mujeres postmenopáusicas sanas y de 57 mujeres de la misma edad que desarrollaron cáncer de mama positivo para el RE 12-24 meses después de que se recogiera su suero. No se observaron diferencias significativas.

Figura 5. Las hembras RANK^{fl/Δ} cruzadas con los ratones K5-Cre muestran desarrollo lóbulo-alveolar defectuoso en la gestación.

a, Análisis de montaje completo de tejido mamario de hembras nulíparas y lactantes (L1) RANK^{fl/Δ} cruzadas con K5-Cre en comparación con glándulas mamarias de camadas control. Alveolos en hembras gestantes de tipo silvestre (flechas) de estructuras lóbulo-alveolares, aunque en hembras K5-Cre RANK^{fl/Δ} este desarrollo se detiene en un botón alveolar rudimentario (flecha). **b**, Transferencia de Southern de células epiteliales mamarias purificadas derivadas de hembras K5-Cre+ RANK^{fl/Δ} y RANK^{fl/Δ}. Se indica el alelo RANK de tipo silvestre o floxeado (fl/+; 9,6 kb) y el alelo RANK deleciónado (Δ; 3,9 kb) después de la digestión de ADN genómico con PvuII y SphI. **c**, Análisis de montaje completo de glándulas mamarias de hembras BALBc desnudas (nu/nu)

control que muestran estructuras lóbulo-alveolares normales el día 1 de la lactancia (L1), estructuras lóbulo-alveolares normales el día L1 en ratones *nu/nu* “depurados” trasplantados con tejido de glándulas mamarias de tipo silvestre y desarrollo lóbulo-alveolar defectuoso en ratones *nu/nu* L1 “depurados” trasplantados con tejido de glandular mamario de $RANK^{fl/\Delta}$; K5-Cre. Se muestran también los panículos adiposos de ratones *nu/nu* después de la depuración quirúrgica. Todas a 5 X aumentos.

Figura 6. Formación normal de una glándula mamaria lactante en hembras MMTV-Cre, $RANK^{fl/\Delta}$ gestantes.

a, Análisis con H&E de tejido mamario de hembras MMTV-Cre nulíparas de la camada control y $RANK^{fl/\Delta}$; que muestran estructuras epiteliales alveolares/ductales normales. 10 X aumentos (superior) y 40 X aumentos (paneles inferiores).

b, Análisis de montaje completo de tejido mamario completo de hembras nulíparas y lactantes (L1) $RANK^{fl/\Delta}$ cruzadas con MMTV-Cre en comparación con glándulas mamarias de las camadas control. La delección de $RANK$ mediada por MMTV-Cre no afectó a la formación de una glándula mamaria lactante. **c**, Transferencia de Southern de células epiteliales mamarias purificadas derivadas de hembras $RANK^{fl/\Delta}$ y $RANK^{fl/\Delta}$; MMTV-Cre. El alelo de $RANK$ de tipo silvestre o floxeado ($fl/+$; 9,6 kb) y el alelo de $RANK$ delecionado (Δ ; 3,9 kb) se indican después de digestión de ADN genómico con PvuII y SphI. En lo sucesivo, los animales $RANK^{fl/\Delta}$; MMTV-Cre se indican como $RANK^{\Delta mam}$.

Figura 7. MPA induce la expresión de $RANKL$ y la proliferación epitelial en glándulas mamarias.

a-c, Cuantificación de la proliferación epitelial en glándulas mamarias de hembras de las camadas control y $RANK^{\Delta mam}$ 3 días después de tratamiento simulado e implantación de MPA tal como se muestra en la Fig. 1d. **a**, Los datos se muestran como cambios relativos en células epiteliales $Ki67^+$ totales en comparación con hembras operadas de manera simulada del genotipo respectivo. Se contaron al menos 1000 células epiteliales de la glándula mamaria por ratón. $n = 3$ ratones por genotipo. $** P < 0,005$; $*** P < 0,001$ (ensayo de la t de Student). **b**, Cuantificación de células teñidas inmunológicamente *in situ* con $Ki67$ por acino de glándulas mamarias de hembras de la camada control y $RANK^{\Delta mam}$ 3 días después de la implantación s.c. de MPA. Mientras que en las hembras control ~ 80 % de los acinos mostraron signos de proliferación media a alta, más del 60 % de los acinos en hembras $RANK^{\Delta mam}$ mostraron tasas de proliferación muy bajas. **c**, Para controlar los niveles residuales de proliferación dependientes del estro, se analizaron hembras súperovuladas y operadas de manera simulada de la camada control y de $RANK^{\Delta mam}$. Se contaron al menos 1000 células por glándula mamaria. $n = 3$ por genotipo. En **b**, y **c**, se muestran los datos como porcentaje de acinos/conductos con números bajos (<20 % de las células epiteliales son $Ki67^+$), medios (20-80 % de las células epiteliales son $Ki67^+$) y altos (>80 % de las células epiteliales son $Ki67^+$) de células proliferantes +/- dtm. $*** P < 0,001$; $* P < 0,03$ (ensayo de la t de Student). **d**, Proliferación epitelial en glándulas mamarias de hembras de las camadas control y de $RANK^{\Delta mam}$ 1 día después de inyección i. p. de PBS o $RANKL$ (1 μg). La proliferación se determinó por inmunotinción *in situ* de $Ki67$. 40 X aumentos. **e**, Cuantificación de la proliferación epitelial 1 día después de la inyección i. p. de PBS o $RANKL$ (1 μg). Se muestran los porcentajes medios de células positivas a $Ki67$ +/- dtm. $* P < 0,03$; $n = 5$ (ensayo de la t de Student).

Figura 8. Curvas de supervivencia de cánceres mamarios estimulados por progestina en ratones $RANK^{\Delta mam}$.

a,b, MPA induce la expresión de $RANKL$ en células epiteliales mamarias. Hembras nulíparas de tipo silvestre se trataron con sonda oral de DMBA o vehículo en aceite, se les implantaron, por vía s.c., gránulos de MPA de liberación lenta, o se trataron con cirugía simulada. **a**, El ARNm de $RANKL$ se determinó en células epiteliales mamarias purificadas mediante cRT-PCR 3 días después de la implantación/sonda oral. Los datos se muestran como factores de cambio en comparación con tratamiento simulado +/- dtm. $n=3$ ratones por grupo. **b**, La expresión de la proteína(s) $RANKL$ soluble (19 kDa) se ensayó en lisados celulares de células epiteliales mamarias purificadas por transferencia de Western 3 días después del tratamiento con vehículo en aceite, DMBA, MPA, o cirugía simulada. Se muestra la β -actina como un control de carga. Cabe destacar, que solamente MPA pero no DMBA o el vehículo en aceite por sí solo indujeron la expresión del ARNm y de la proteína de $RANKL$. **c**, Aparición de tumores mamarios palpables en hembras $RANK^{\Delta mam}$ ($n=14$) y hembras de la camada control de la misma edad con MMTV-Cre (Cre+ control; $n=13$) o sin MMTV-Cre (Cre- control; $n=9$) tratadas con gránulos de MPA y DMBA tal como se indica en la Fig. 2a. Los datos se muestran como porcentaje de ratones libres de tumores después de la última exposición a DMBA. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos control Cre+ y Cre-. La aparición media de los tumores para los controles Cre+ fue de 9 días, para los controles Cre- fue de 11 días, y para las hembras $RANK^{\Delta mam}$ 30 días después del último tratamiento con DMBA. **d**, Transferencia de Southern representativa de tumores mamarios inducidos por MPA/DMBA derivados de hembras $RANK^{fl/+}$; MMTV-Cre+ y $RANK^{fl/\Delta}$; MMTV-Cre+ ($RANK^{\Delta mam}$). El alelo de $RANK$ de tipo silvestre o floxeado ($fl/+$; 9,6 kb) y el alelo de $RANK$ delecionado (Δ ; 3,9 kb) se indican después de la digestión de ADN genómico con PvuII y SphI. Todos los tumores derivados de hembras $RANK^{\Delta mam}$ mostraron delección casi completa. **e**, Análisis de Kaplan Mayer para la supervivencia total de hembras $RANK^{\Delta mam}$ ($n=9$) y de la camada control de la misma edad ($n=9$) después de tratamiento con MPA/DMBA. La supervivencia media fue de 48 días para el control y de 93 días después del último tratamiento de DMBA para las hembras $RANK^{\Delta mam}$.

Figura 9. Desarrollo de adenocarcinomas escamosos en hembras $RANK^{\Delta mam}$.

a,b, Secciones histológicas representativas de tumores mamarios aislados de hembras de la camada control y $RANK^{\Delta mam}$ 7 (**a**) y 21 (**b**) días después del último tratamiento con DMBA. Se muestran tinciones con H&E y E-cadherina que indican las características típicas de los adenocarcinomas ductales en tumores de hembras de las camadas control y $RANK^{\Delta mam}$. La expresión de citoqueratina 14 (K14) demuestra el origen de las células basales

en hembras tanto de control como en las $RANK^{\Delta mam}$. Sin embargo, las hembras $RANK^{\Delta mam}$ tienden a mostrar características de metaplasia escamosa. Todas a X 20 aumentos.

Figura 10. Aparición de cáncer mamario en ratones Mx-Cre $RANK^{floxead/\Delta}$ y NeuT $RANK^{\Delta mam}$.

a, Aparición de tumores mamarios palpables en hembras Mx-Cre $rank^{floxead/\Delta}$ (n=4) y de la camada control Mx-Cre $rank^{+/+}$ (n=6) de la misma edad, tratadas con gránulos de MPA y DMBA tal como se indica en la Fig. 2a. La Cre recombinasa estimulada por Mx se activó mediante cuatro inyecciones de poli I:C por vía i. p. durante 8 días (200 μ g en 200 ml de PBS). Los datos se muestran como porcentaje de ratones libres de tumores después de la última exposición a DMBA. No se descubrieron diferencias significativas. **b**, Transferencia de Southern del alelo de $RANK^{floxead}$ (fl/+) no deleciónado y después de la inducción de la deleción (Δ) en ratones Mx-Cre $rank^{floxead/\Delta}$.

c, Transferencia de Southern de diversos órganos después de la inducción de la deleción (Δ) en ratones Mx-Cre $rank^{floxead/\Delta}$. Aunque pueden observarse diversos grados de deleción (50-100 %) en timo, corazón, hígado y bazo, la deleción del alelo Mx-Cre $rank^{floxead}$ no se indujo en células epiteliales mamarias (CEM) purificadas. Figura 11. Señalización aguas abajo de RANKL/RANK en CEM.

a, Explicación esquemática de rutas de señalización confirmadas genéticamente que controlan la formación mediada por RANKL-RANK de una glándula mamaria lactante durante la gestación. **b**, Transferencia de Western para AKT fosforilado (P), AKT total, ERK1/2 fosforilado (P), ERK1/2 total, p38-MAPK fosforilado (P) y p38-MAPK en células epiteliales primarias aisladas de glándulas mamarias de ratón en respuesta a la estimulación con RANKL (1 μ g/ml). Los datos son representativos de 4 experimentos.

Figura 12. El MPA activa la ruta de NF κ B y desencadena la expresión de ciclina D1 por medio de RANKL/RANK.

a, Activación de la ruta de NF κ B y de la expresión de ciclina D1 por el MPA. A las hembras nulíparas $RANK^{\Delta mam}$ y de la camada control se les implantaron, por vía s.c., gránulos de MPA de liberación lenta o se trataron con cirugía simulada. **a**, Inmunotinción *in situ* para detectar I κ B α fosforilado (P) en células epiteliales mamarias de hembras $RANK^{\Delta mam}$ y de la camada control después de 3 días de tratamiento con MPA. **b**, Análisis de transferencia de Western de Ciclina D1 y RANKL en células epiteliales mamarias aisladas de hembras $RANK^{\Delta mam}$ y de la camada control después de 3 días de tratamiento con MPA. Se muestra la proteína recombinante murina sRANKL para la comparación del peso molecular. Se muestra la β -actina como un control de carga.

Figura 13. Rutas de señalización aguas abajo de RANKL/RANK.

a, Transferencia de Western para p65 NF κ B fosforilado (P), NF κ B p65 total, I κ B α fosforilado (P), I κ B α total, ERK1/2 fosforilado (P), ERK1/2 total, p38-MAPK fosforilado (P) y p38-MAPK en las células humanas de cáncer de mama SKBR3 en respuesta a la estimulación con RANKL (1 μ g/ml). Los datos son representativos de 3 experimentos. **b**, Curva de crecimiento de las células de cáncer de mama SKBR3 cultivadas en medio de crecimiento normal (control, DMEM complementado con el 10 % de FCS) o en presencia de RANKL (1 μ g/ml). Los números celulares se determinaron contando células vivas (exclusión en azul de tripano) a lo largo de 3 días. **c**, Aparición de tumores mamarios palpables en las hembras NFATc1 $^{\Delta mam}$ (n=10) y de la camada control de la misma edad (n=16) tratadas con gránulos de MPA y DMBA. Los datos se muestran como porcentaje de ratones libres de tumores después de la última exposición a DMBA. No se descubrieron diferencias significativas. **d**, Cuantificación de la expresión del ARNm de NFATc1 en células epiteliales mamarias purificadas (CEM) y tumores mamarios dirigidos por MPA de las hembras NFATc1 $^{\Delta mam}$ y de la camada control. El ARNm se determinó por cRT-PCR. Los datos se muestran como factores de cambio en comparación con el control (+/- dtm). n=5 por grupo. * P < 0,05 (ensayo de la t de Student).

Figura 14. RANKL protege a las células epiteliales mamarias murinas primarias y a las células humanas de cáncer de mama SKBR3 de la apoptosis en respuesta a la radiación γ .

a, Análisis de Transferencia de Western para γ H2AX, Chk1 fosforilado (P), Chk1 total, p53 y β -actina en células epiteliales primarias aisladas de glándula mamaria de ratón en respuesta a la radiación γ (2 Gray) en presencia de (1 μ g/ml) o ausencia de estimulación con RANKL. **b,c**, Análisis por FACS de células epiteliales mamarias **b** y **c**, células humanas de cáncer de mama SKBR3 teñidas con yoduro de propidio (IP) después de la radiación γ (2 Gray) en ausencia o presencia de RANKL (1 μ g/ml). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos. Aparecen células apoptóticas con un contenido de ADN <2 n en la región sub-G1. Se proporciona el porcentaje de células en sub-G1 (M1), fase G1 (M2), fase S/G2/M (M3) así como células poliploides con un contenido en ADN >4n en los puntos temporales indicados.

Figura 15. RANKL protege a las células epiteliales mamarias murinas primarias y a las células humanas de cáncer de mama SKBR3 de la apoptosis en respuesta a doxorubicina.

a,b, Análisis FACS de **a**, células epiteliales mamarias y **b**, células humanas de cáncer de mama SKBR3 incubadas con el agente genotóxico doxorubicina (Dox, 1 μ M) en presencia (1 μ g/ml) o ausencia de RANKL. Los datos son representativos de al menos 3 experimentos. Se proporciona el porcentaje de células en sub-G1 (M1), fase G1 (M2), fase S/G2/M (M3) así como las células poliploides con un contenido en ADN >4 n durante 24 y 36 horas después del tratamiento con doxorubicina. **c**, Expresión de ARNm de genes pro-apoptóticos Bim, Puma y Noxa, 6 horas después de la radiación γ (2 Gray) en presencia (1 μ g/ml) o ausencia de estimulación con RANK. Los datos se muestran como factores de cambio en comparación con el control (+/- dtm). n=3). * P < 0,05; ** P < 0,005 (ensayo de la t de Student).

Figura 16. IKK α media la protección inducida por MPA de la apoptosis epitelial inducida por radiación.

a,b, Inducción reducida de la apoptosis de las células epiteliales mamarias en respuesta a la radiación γ en las hembras IKK $\alpha^{\Delta mam}$. Las hembras de las camadas control y las IKK $\alpha^{\Delta mam}$ fueron operadas simultáneamente o se les

implantó un tapón de MPA y se les irradió con radiación γ (5 Gray). Los gránulos de MPA se implantaron 3 días antes de la radiación γ . Veinticuatro horas después de la radiación, se detectó la apoptosis por inmunotinción para la Caspasa 3 activa. **a**, Se muestran los núcleos apoptóticos de células epiteliales (flechas) para secciones de glándula mamaria representativas. 40 X aumentos. **b**, Cuantificación de la apoptosis epitelial mamaria. Se contó un mínimo de 5000 núcleos para cada ratón. Los resultados se muestran como valores medios \pm dtm. $n=3$ ratones por grupo. * $P < 0,05$ (ensayo de la t de Student).

Figura 17. Las proporciones RANKL/OPG cambian en mujeres que desarrollan cáncer de mama al cabo de 5-12 meses pero al cabo de 12-24 meses después del muestreo de suero.

a, Análisis de niveles de RANKL y OPG individuales en muestras de suero recogidas prospectivamente del UKCTOCS (Ensayo Cooperativo de la Cribado del Cáncer de Ovario en el RU) de 182 mujeres postmenopáusicas sanas que no desarrollaron cáncer de mama durante su seguimiento y de 41 mujeres sanas de la misma edad que desarrollaron cáncer de mama positivo al RE 5-12 meses después de que se recogiera su suero. El desarrollo del cáncer de mama se diagnosticó mediante biopsias. Ninguna de estas mujeres estaba sometida a terapia de reemplazo hormonal en el momento de la extracción de la muestra. Se muestran gráficos de cajas de los niveles de OPG y sRANKL así como de la relación entre OPG y sRANKL. Las mujeres que desarrollaron cáncer de mama durante el primer año después de que el suero se ensayara tenían niveles significativamente más altos de OPG ($p=0,041$; ensayo de la U de Mann Whitney) así como proporciones significativamente aumentadas entre OPG y sRANKL ($p=0,022$; ensayo de la U de Mann Whitney) en comparación con las mujeres que no desarrollaron cáncer de mama. **b**, Análisis de niveles de RANKL y OPG individuales en muestras de suero recogidas prospectivamente del UKCTOCS de 182 mujeres postmenopáusicas sanas que no desarrollaron cáncer de mama durante su seguimiento y de 57 mujeres sanas de la misma edad que desarrollaron cáncer de mama positivo a RE 12-24 meses después de que se recogiera su suero. Se muestran gráficos de cajas de los niveles de OPG y sRANKL así como las proporciones entre OPG y sRANKL. No hubo diferencias significativas (ensayo de la U de Mann Whitney). Los gráficos de cajas indican niveles medios de relación e intervalos intercuartil.

Figura 18. Cuantificación de transferencias de Western.

Se realizó una densitometría en al menos tres transferencias de Western independientes por experimento. Los datos se muestran para las transferencias de Western de las Fig. 1b, Fig. 1c, Fig. 3a y Fig. 3b. Los valores de expresión para las proteínas indicadas se normalizaron frente a controles de carga de β -actina. Para la cuantificación de la fosforilación los datos se normalizaron frente a las bandas de proteína total respectivas. * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$ (ensayo de la t de Student).

Ejemplos:

Ejemplo 1: **Ratones**. Recientemente se han generado ratones *Rank*^{floxead}¹. Resumiendo, para generar ratones portadores de un alelo nulo de *Rank* (alelo *rank* ^{Δ}), se cruzaron ratones *rank*^{floxead} con ratones β -actina-eliminador ubicuo de Cre. Los ratones que portaban los alelos *rank*^{floxead} o *rank* ^{Δ} , así como los ratones MMTV-Cre, se retrocruzaron siete veces en un fondo BALBc antes de generar los ratones MMTV-Cre *rank*^{floxead}. Guido Forni, Milán proporcionó generosamente los ratones MMTV-NeuT. Los ratones MMTV-Cre (repertorio n° 003553) y Mx-Cre (repertorio n° 003556) se obtuvieron del Laboratorio Jackson. Los ratones K5-Cre, *IKK α* ^{floxead} y *NFATc1*^{floxead} se han descrito anteriormente²⁻⁴. Los genotipos de los ratones se determinaron mediante análisis de PCR y de transferencia de Southern. En todos los experimentos se usaron solamente ratones de camadas procedentes de los mismos cruces. Todos los ratones se criaron y mantuvieron de acuerdo con la normativa institucional.

Deleción de RANK en tumores y efectos Cre. La transferencia de Southern de los tumores que se desarrollaron en hembras *RANK* ^{Δ mam} mostraron deleción de RANK, aunque se observó alguna banda residual de tipo silvestre (Fig. 8c) que podría explicarse por la presencia de otros tipos de células y/o células de escape. No se observaron diferencias en la aparición de tumores entre las hembras de control negativo de Cre y las camadas que expresaban el transgén MMTV-Cre, indicando que la expresión de Cre de por sí no altera la frecuencia tumoral en el modelo tumoral mamario MPA/DMBA (Fig. 8d).

Ejemplo 2: Carcinogénesis mamaria inducida por MPA/DMBA.

El tratamiento con MPA/DMBA se realizó tal como se ha descrito^{5,6}. Resumiendo, se anestesió a ratones hembra de seis semanas de vida con ketamina-xilacina y se les implantaron quirúrgicamente, por vía s. c. en el costado derecho, gránulos de acetato de medroxiprogesterona (MPA) de liberación lenta (50 mg, liberación en 90 días; Innovative Research of America). Se administraron 200 μ l de DMBA (5 mg/ml diluidos en aceite de semilla de algodón) por sonda oral 6 veces durante las 8 semanas siguientes, como se explica en la Fig. 2a. La aparición de tumores mamarios se determinó por palpación. No se observaron diferencias en la aparición de los tumores en las hembras del control negativo Cre y las camadas que expresaban el transgén MMTV-Cre indicando que la expresión de Cre de por sí no altera la frecuencia tumoral en el modelo tumoral mamario MPA/DMBA.

Ejemplo 3: Trasplantes de tejido mamario.

Para los estudios de trasplantes, se aisló tejido epitelial mamario de donantes nulíparas de 3 semanas de vida y se implantó en los panículos adiposos mamarios limpios (desprovistos de epitelio endógeno) de ratones huésped *nu/nu* de 3 semanas de vida como se ha descrito⁷. Tres semanas después de la cirugía, los ratones huésped se emparejaron y se aisló el tejido mamario para su análisis.

Ejemplo 4: Histología, montaje completo e inmunohistoquímica.

Para el análisis histológico, se cortaron secciones de 5 μm y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). La tinción de montaje completo de las glándulas mamarias se realizó como se describe⁸. Para la tinción con inmunoperoxidasa se deshidrataron secciones incluidas en parafina y los epítomos antigénicos se expusieron usando un tampón citrato 10 mM o microondas. Las secciones se incubaron con anticuerpos contra citoqueratina 5, citoqueratina 14, E-cadherina, anti-Ki67 (Novocastra) y anti-Caspasa 3 activa (Cell Signaling) y se visualizaron usando anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa. Los índices histomorfométricos (proliferación y apoptosis) se calcularon como el número de células epiteliales positivas dividido entre el número total de células epiteliales, con no menos de 1000 núcleos para las tinciones de Ki67 y no menos de 5000 células para la tinción de Caspasa 3 activa contados por sección.

Ejemplo 5: Transferencia de Western.

La línea de células epiteliales tumorales de mama humanas SKBR3 y células epiteliales mamarias primarias de ratón no transformadas se dejaron sin tratar o se estimularon con RANKL recombinante murino^{ref.9}. Los adenocarcinomas se aislaron de los ratones control y mutantes y se prepararon lisados de proteína total. La transferencia de Western se llevó a cabo usando los protocolos convencionales. Resumiendo, las transferencias se bloquearon con BSA al 5 % en TBS 1x con Tween-20 (TBST) al 0,1 % de durante 1 hora y se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C (diluido en TBST de acuerdo con el protocolo del fabricante). Se usaron anticuerpos primarios reactivos contra RANKL murino (AF462; R&D), Ciclina D1 (Santa Cruz n° Sc-8396), β -actina (Sigma), NF- κ B fosforilado (P) (n° 3033), NF- κ B (n° 4767), I κ B α fosforilado (P) (n° 2859), I κ B α (n° 4814), IKK α fosforilado (P) (n° 2681), IKK α (n° 2678), IKK β (n° 2678), IKK γ (n° 2685), Akt fosforilado (P) (n° 3787), Akt (n° 9272), Erk1/2 fosforilado (P) (n° 9101), Erk1/2 (n° 9102), y p38-MAPK (n° 9212), p53 (n° 2524), Chk1 fosforilado (P) (n° 2348), Chk1 (n° 2345) (todos de Cell Signaling), p38-MAPK (AF869; R&D), y γ H2Ax (Ser139 n° 07-164 Millipore). Las transferencias se lavaron 3 veces en TBST durante 30 minutos, se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con HRP (1:2000, Promega) durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces en TBST durante 30 minutos y se visualizaron usando ECL.

Ejemplo 6: cRT-PCR

Se preparó ARN total de tumores usando el Mini Kit RNeasy (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN total (2 μg) se sometió a análisis de (c)RT-PCR cuantitativa. Se usaron los siguientes cebadores:

cebador directo de β -actina: 5'- GCTCATAGCTCTTCTCCAGGG -3';
 cebador inverso de β -actina: 5'-CCTGAACCCTAAGGCCAACCG-3'.
 cebador directo de RANKL: 5' - CTGAGGCCAGCCATTG-3'
 cebador inverso de RANKL: 5' - GTTGCTTAACGTCATGTTAGAGATCTTG-3'
 cebador directo de RANK: 5' - CTTGGACACCTGGAATGAAG-3'
 cebador inverso de RANK: 5' - CAGCACTCGCAGTCTGAGTT-3'
 cebador directo de Ciclina D1: 5' - CTGTGCGCCCTCCGTATCTTA-3'
 cebador inverso de Ciclina D1: 5' - GGCGGCCAGGTTCCACTTGAG-3'
 cebador directo de p21 (Cdkn1a): 5' - GTGGCCTTGTCGCTGTCTT-3'
 cebador inverso de p21 (Cdkn1a): 5' - GCGCTTGGAGTGATAGAAATCTG-3'
 cebador directo de tRANKL: 5' - GCGCCGGGCCAGCCGAGACTAC-3'
 cebador directo de RANKL1: 5' - GTCCCACACGAGGGTCCGCTGC-3'
 cebador directo de RANKL2: 5' - TGCGCACTCCGGCGTCCCG-3'
 cebador directo de RANKL3: 5' - CCGAGACTACGGCGGATCCTAACAG-3'
 cebador directo de inverso de RANKLcom.: 5' - TCAGTCTATGTCCTGAACCTTTGAAAGCCCC-3'
 cebador directo de Puma: 5' -CCGCCTGATGCCCTCCGCTGTAT-3'
 cebador inverso de Puma: 5' -CGGGCCCACTCCTCCTCCTCCAC-3'
 cebador directo de Noxa: 5' -ACTTTGTCTCCAATCCTCCG-3'
 cebador inverso de Noxa: 5' - GTGCACCGGACATAACTGTG-3'
 cebador directo de Bim: 5' - GTTGAATCGTCTCCGATCC-3'
 cebador inverso de Bim: 5' - GCCCCTACCTCCCTACAGAC-3'

Ejemplo 7: Respuestas al daño en el ADN.

Para medir la detención del ciclo celular y la apoptosis se sembraron células epiteliales mamarias primarias de ratón y células humanas de cáncer de mama SKBR3 a una densidad de 100.000 células/pocillo en una placa de 6 pocillos

y se permitió que crecieran durante 24 horas. Después, las células se trataron con doxorrubicina (1 μ M) o radiación γ (2 Gray) en ausencia o presencia de RANKL recombinante (1 μ g/ml). La detención del ciclo celular y los números de células muertas se determinaron usando tinción con yoduro de propidio. Para determinar la muerte de las células epiteliales de las glándulas mamarias *in vivo*, se les dio radiación γ a las hembras de camada control y las RANK^{Amam} con una dosis total de 5 Gray (Gy). Seis horas después, se aislaron las glándulas mamarias y se tiñeron inmunológicamente para Caspasa 3 activa (Cell Signaling) indicativa de apoptosis.

Ejemplo 8: Estudios prospectivos en población humana.

Para los detalles de incorporación en el estudio prospectivo en una población basada en el UKCTOCS véase la ref.¹⁰. Los sujetos eran participantes del Ensayo Cooperativo de la Cribado del Cáncer de Ovario en el Reino Unido (UKCTOCS), el mayor ensayo clínico controlado aleatorio multi-centro para cáncer de ovario. El ensayo clínico se estableció en 13 centros de los Institutos Nacionales de Salud en Inglaterra, Gales e Irlanda del Norte y lo coordinó el Centro de Investigación de Cáncer Ginecológico del UCL. Se invitó aleatoriamente a mujeres con una edad comprendida entre 50-74 años a partir de los registros de sexo/edad de los 27 Centros de Atención Primaria participantes. Las mujeres que aceptaron la invitación recibieron información verbal y escrita acerca del ensayo clínico. Entre 2001 y 2005, un total de 202.638 mujeres postmenopáusicas, con una edad comprendida entre 50-74 años, se asignó a cribado al azar de cáncer de ovario o a no cribado. Al incorporarse al estudio, se extrajo una muestra de sangre de todas las mujeres y además se extrajeron series de muestras de sangre anuales de 50.640 mujeres. Este ensayo clínico está registrado como ISRCTN22488978 y con el número de ClinicalTrials.gov NCT00058032. Se obtuvo la autorización por escrito que incluía el acceso a sus registros médicos y el uso de sus datos/muestras en futuros estudios. Al incorporarse al estudio cada una de las mujeres ofrecía una muestra y cumplimentaba un cuestionario inicial en relación con su historial clínico familiar. Se envió un cuestionario de seguimiento a las mujeres participantes 3,5 años después de la incorporación preguntando si habían desarrollado cualquier tipo de cáncer después de anexionarse al ensayo clínico. Se hizo un seguimiento adicional a las mujeres que en el cuestionario de seguimiento habían indicado cáncer de mama o que la Oficina Nacional de Estadística (ONS) había señalado, a través del médico tratante, que habían desarrollado cáncer de mama. Las mujeres a las que se les diagnosticó cáncer de mama invasivo positivo a RE, que no tuvieron tratamiento con TRH en la incorporación al estudio y que habían entregado una muestra de suero al menos 5-24 meses antes del diagnóstico después de la distribución aleatoria en el ensayo clínico, se seleccionaron para el análisis (98 casos). Los casos de cáncer de mama se emparejaron por edad y se emparejaron con mujeres que no tuvieron historial de cáncer de mama (182 controles) y cuyas muestras de sangre se extrajeron el mismo día y en la misma clínica. Las muestras de sangre extraídas en los centros se centrifugaron a 2.500 rpm durante 5 minutos y por la noche se transportaron en tubos con gel de Grienger y se procesaron el día siguiente en el laboratorio central del UKCTOCS. El suero se separó en alícuotas, en cañas de 500 microlitros que después se sellaron con calor, se identificaron con un código de barras y se almacenaron en envases especiales en tanques con nitrógeno líquido. Las muestras se descongelaron solamente antes de su uso. El Joint UCL/UCLH Committees on the Ethics of Human Research (número de referencia REC: 06/Q0505/102) concedió la aprobación ética.

Ejemplo 9: Pacientes con cáncer de mama

La cohorte del UKCTOCS (Ensayo Clínico Cooperativo de Cribado de Cáncer de Ovario del RU)¹ usada comprende muestras de suero extraídas prospectivamente de 182 mujeres postmenopáusicas sanas que no desarrollaron cáncer de mama durante su seguimiento y de 98 mujeres sanas de la misma edad que desarrollaron cáncer de mama positivo al receptor estrogénico (RE) 5-24 meses después de que se extrajera su suero. De estas 98 mujeres, 41 desarrollaron cáncer de mama durante el primer año y 57 mujeres desarrollaron cáncer de mama 12-24 meses después de la extracción de la muestra de suero. Ninguna de estas mujeres estaba sometida a terapia de reemplazo hormonal en el momento de la extracción de muestra.

Ejemplo 10: Ensayo de progesterona

- 1^a incubación: se incubaron 30 μ l de muestra – en presencia de un anticuerpo monoclonal específico de progesterona marcado con biotina y de un derivado de progesterona marcado con complejo de rutenio – con Danazol para liberar la progesterona. La progesterona de las muestras compitió con el derivado de progesterona marcado por el sitio de unión al anticuerpo.
- 2^a incubación: Después de la adición de micropartículas recubiertas de estreptavidina, el complejo comenzó a unirse a la fase sólida por interacción de la biotina y estreptavidina. La cantidad del derivado de progesterona marcado unido a la fase sólida es inversamente proporcional al contenido de progesterona de la muestra.
- La mezcla de reacción se aspiró en la celda de medición en la que las micropartículas se capturaban magnéticamente sobre la superficie del electrodo. Las sustancias no unidas se eliminaron después con ProCell. Después, la aplicación de un voltaje al electrodo indujo la emisión de quimioluminiscencia que se midió con un fotomultiplicador.
- Los resultados se determinaron mediante una curva de calibrado, que es un instrumento específicamente generado mediante 2 puntos de calibrado y una curva maestra proporcionada mediante el código de barras del reactivo.

Reactivos – soluciones de trabajo

Micropartículas recubiertas de M Estreptavidina (tapa transparente), 1 frasco, 6,5 ml: micropartículas recubiertas de estreptavidina, 0,72 mg/ml; conservante.

5 Ac-anti-progesterona R1 ~ biotina (tapa gris), 1 frasco, 10 ml: anticuerpo (ratón) monoclonal anti-progesterona marcado con biotina 0,15 mg/l, tampón fosfato 25 mmol/l, pH 7,0; conservante.

Péptido de progesterona R2 ~ Ru (bpy)²⁺ (tapa negra), 1 frasco, 8 ml: progesterona (de origen vegetal) acoplada a un péptido sintético marcado con complejo de rutenio, 10 ng/ml; tampón fosfato 25 mmol/l, pH 7,0; conservante.

10 **Ejemplo 11: Datos estadísticos.** Todos los valores del presente documento se dan como medias dtm. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante el ensayo de la t de Student. Para el análisis de Kaplan-Meier de aparición de tumores se realizó un ensayo de rango logarítmico. Un valor de P de 0,05 se aceptó como estadísticamente significativo. Además del ensayo de rango logarítmico se realizó un análisis de fuerza *post-hoc* (Fuerza PS y Cálculos de Tamaño de Muestra, en la web de biostat.mc.vanderbilt.edu/PowerSampleSize) para calcular la probabilidad de rechazar correctamente la hipótesis nula de mismos tiempos de aparición de tumores dado el número de animales experimentales. Para el estudio que implicaba a los animales RANK^{Δmam} la hipótesis nula se puede rechazar con una probabilidad (fuerza) de 0,933 y para los animales IKKα^{Δmam} con una probabilidad de 0,766. La probabilidad de error de Tipo I asociada con este ensayo de esta hipótesis nula es de 0,05. Los datos de seres humanos se analizaron usando un ensayo de la t de muestras relacionadas, el ensayo de la U de Mann Whitney, o un ensayo de rango de Spearman como se indica.

Ejemplo 12: Ratones con RANKL/RANK alterado:

20 Para examinar la posible función de RANKL/RANK en la tumorigénesis, RANK se deletó de las células epiteliales mamarias usando la escisión mediada por K5-Cre y MMTV-Cre de un alelo inducible de RANK (ratones K5-Cre *rank*^{fllox/Δ} y ratones MMTV-Cre *rank*^{fllox/Δ}). Ambas líneas de ratones parecen estar sanas y muestran estructuras óseas y formación de ganglios linfáticos normales. Como se esperaba, los ratones K5-Cre *rank*^{fllox/Δ} mostraron un desarrollo aparentemente normal de las glándulas mamarias en la pubertad; sin embargo, estos ratones no desarrollaron estructuras lóbuloalveolares secretoras de leche durante la gestación (Fig. 5a,b). Estos efectos fueron autónomos de células que usan experimentos de trasplantes (Fig. 5c). En los ratones MMTV-Cre *rank*^{fllox/Δ}, el desarrollo de las glándulas mamarias en hembras nulíparas y la formación de estructuras lóbuloalveolares secretoras de leche durante la gestación parecían normales (Fig. 6a-c). Para excluir que cualquier problema de los efectos en el desarrollo de los ratones K5-Cre *rank*^{fllox/Δ} que pudiera afectar a determinadas poblaciones de células en la fisiología normal, los ratones MMTV-Cre *rank*^{fllox/Δ} se usaron, por lo tanto, para todos los experimentos adicionales. En lo sucesivo, en el presente documento, estos ratones mutantes MMTV-Cre *rank*^{fllox/Δ} se denominan n RANK^{Δmam}.

Ejemplo 13: Mecanismo de activación de RANK después de la administración de progestina:

35 En una población de tipo silvestre, el tratamiento con MPA (una progestina) desencadena la proliferación masiva de células epiteliales mamarias. La proliferación inducida por MPA de las células epiteliales mamarias se redujo significativamente en las hembras RANK^{Δmam} (Fig. 1a; Fig. 7a-c). Por consiguiente, las inyecciones i. p. de RANKL en hembras nulíparas desencadenaron la proliferación de células epiteliales de la glándula mamaria por medio de RANK (Fig. 7d,e). Recientemente se ha notificado que la progesterona endógena afecta al número de células madre Lin-CD24+CD49^{alto} durante la gestación¹⁵ y el ciclo menstrual¹⁶. En ambos estudios, el sistema RANKL/RANK estuvo implicado basándose en estudios de bloqueo de Ac en todo el organismo *in vivo* y en la expresión de RT-PCR, sin embargo, no se supo si éste es un efecto directo de RANKL-RANK en las células epiteliales mamarias más que un efecto secundario. Por lo tanto, se evaluó si las progestinas, tales como MPA, podían expandir también las células Lin-CD24+CD49^{alto}. El tratamiento con MPA dio como resultado una doble expansión de las células Lin-CD24+CD49^{alto}. Dicha expansión no se produjo en hembras RANK^{Δmam} tratadas con MPA (Fig. 1b, c). Estos datos proporcionan la primera demostración genética de que el sistema RANKL/RANK controla la expansión de células Lin-CD24+CD49^{alto}.

Ejemplo 14: Influencia de las progestinas sobre el desarrollo de cáncer mediante RANK/RANKL en ratones control y con déficit de RANK/RANKL:

50 En la Women's Health Initiative (WHI) y el Million Women Study, el uso de progestinas se ha relacionado epidemiológicamente con la aparición y frecuencia del cáncer de mama. El cáncer de mama estimulado por progestinas puede modelarse en ratones hembra en los que la implantación de gránulos de MPA de liberación lenta en presencia del agente dimetilbenz[a]antraceno (DMBA), perjudicial para el ADN, desencadena cáncer de mama (Fig. 2a; Fig. 8a,b).

55 En las hembras control, el tratamiento con MPA/DMBA indujo una aparición rápida de tumores mamarios palpables. Curiosamente, en los ratones hembra RANK^{Δmam}, se observó un notable retraso en la aparición del cáncer mamario inducido por MPA/DMBA (Fig. 2b; Fig. 8c,d). La aparición tardía de tumores en las hembras RANK^{Δmam} también dio como resultado una notable mejora de la supervivencia (Fig. 8e). Las transferencias de Southern de los tumores que

se desarrollaron en hembras $RANK^{\Delta mam}$ confirmaron la delección eficaz de RANK (Fig. 8c). Todos los tumores que se desarrollaron en las hembras control y $RANK^{\Delta mam}$ mostraron una histopatología típica de adenocarcinomas ductales que expresan E-Cadherina, del subtipo celular basal positivo a Citoqueratina (CK) 5 y a CK14 (Fig. 2c, Fig. 9a,b). Sin embargo, los adenocarcinomas ductales originados en hembras $RANK^{\Delta mam}$ frecuentemente desarrollaban grandes áreas de metaplasia escamosa (Fig. 2c, Fig. 9a,b).

Ejemplo 15: Aparición de cáncer después del daño en el ADN en dependencia de la señal de RANKL mediada por progestinas:

Dado que los animales $RANK^{\Delta mam}$ mostraron un retraso en la aparición del cáncer de mama. A continuación se analizó la frecuencia de tumores mamarios en estadios tempranos después de la exposición a DMBA. Para desencadenar la señalización de RANKL/RANK, nuevamente se usó MPA para simular un fondo de progesterona. Una semana después del último tratamiento con DMBA, todas las hembras control que expresaban RANK ya mostraban carcinomas múltiples *in situ* e incluso tumores mamarios invasivos. Por el contrario, se observaron muy pocos carcinomas *in situ* y nunca ningún carcinoma mamario invasivo en los animales $RANK^{\Delta mam}$ una semana después de la última exposición a DMBA (Fig. 2d). Tres semanas después de la última exposición a DMBA la frecuencia de carcinomas *in situ* fue similar entre las hembras control y las $RANK^{\Delta mam}$, pero los carcinomas invasivos fueron aún más infrecuentes en las hembras $RANK^{\Delta mam}$ (Fig. 2e). Además, la proliferación se redujo típicamente en los tumores de las hembras $RANK^{\Delta mam}$ (Fig. 2d,e). La delección de RANK en otros tejidos múltiples, incluyendo el hígado, corazón, músculo y compartimiento hematopoyético, pero no en las células epiteliales mamarias, usando ratones Mx-Cre $rank^{flox/flox}$, no retrasó mucho la aparición de cáncer de mama inducido por MPA/DMBA (Fig. 10a-c), lo que sugiere que los efectos de la alteración de RANK/RANKL son dominantes en las células epiteliales mamarias.

Ejemplo 16: Señalización de RANKL:

En la Fig. 11a se ilustra la señalización de RANKL-RANK mediante $IKK\alpha$ - $NF\kappa B$ -Ciclina D1 en células epiteliales mamarias. De hecho, la estimulación de RANKL, produjo la fosforilación de p65 $NF\kappa B$ e $I\kappa B\alpha$ en células epiteliales primarias de glándula mamaria (CEM) de ratón (Fig. 3a). Además, la estimulación por RANKL de las CEM desencadenó la fosforilación de p38-MAPK y ERK (Fig. 11b). Para mostrar directamente cómo RANK media la activación de $NF\kappa B$ -Ciclina D1 aguas abajo de las progestinas *in vivo*, los ratones se expusieron a MPA. Un tratamiento de tres días con MPA produjo la acumulación nuclear de $I\kappa B\alpha$ fosforilado, indicativa de una ruta activa de $NF\kappa B$, y de la inducción de la expresión proteica de Ciclina D1 en células epiteliales mamarias, ambas de las cuales se redujeron severamente en hembras $RANK^{\Delta mam}$ (Fig. 12a,b). Además, en los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA/DMBA aislados de las hembras control y de las $RANK^{\Delta mam}$ se descubrió una activación alterada de la ruta de $NF\kappa B$ (Fig. 3b) y una expresión regulada negativamente del ARNm de la Ciclina D1 (Fig. 3c). En estos tumores primarios también se observó regulación positiva del ARNm de p21 (Fig. 3c), un gen que se suprime transcripcionalmente por medio de la ruta de $Id2^{17}$. La ruta de $Id2$ es una ruta secundaria genéticamente confirmada aguas abajo de RANKL/RANK en células epiteliales mamarias¹⁷. Para extender estos hallazgos en seres humanos, se ensayaron células humanas de tumores de mama SKBR3. La estimulación de RANKL indujo la activación y proliferación de $NF\kappa B$, de las p38-MAPK y de ERK en células SKBR3 (Fig. 13a,b). Para ensayar adicionalmente los efectos de la estimulación con RANKL, se evaluó la capacidad de estas células para crecer de una manera independiente del anclaje, que correlaciona bien con la tumorigenicidad *in vivo*¹⁸. Cabe destacar que, de manera similar a la estimulación con EGFR, se observó que RANKL indujo el crecimiento de células SKBR3 en agar blando (Fig. 3d), es decir, que la señalización de RANK no solamente desencadena la proliferación sino que también actúa como un agente transformante para inducir el crecimiento independiente del anclaje.

En osteoclastos, además de la ruta de $NF\kappa B$, se ha descubierto que la ruta de señalización de calcineurina-NFATc1 es esencial para la osteoclastogénesis mediada por RANKL-RANK. NFATc1 también puede regularse por la ruta de $Id2$ durante la osteoclastogénesis mediada por RANKL. Para evaluar si esta activación de las rutas clave de RANKL-RANK también está operativa en el cáncer de mama inducido por MPA/DMBA, se generaron ratones MMTV-Cre $nfatc1^{flox/\Delta}$ ($NFATc1^{\Delta mam}$) y MMTV-Cre $Ikk\alpha^{flox/flox}$ ($IKK\alpha^{\Delta mam}$) para delecionar NFATc1 e $IKK\alpha$ en células epiteliales mamarias. Ambas cepas mutantes de ratón parecen sanas y no muestran defectos aparentes en ninguno de los órganos evaluados. Cuando se estimularon con MPA/DMBA, los ratones $IKK\alpha^{\Delta mam}$ mostraron un retraso de la aparición del cáncer de mama (Fig. 3e). En los tumores de los ratones $IKK\alpha^{\Delta mam}$ se descubrió una expresión normal de $IKK\beta$ e $IKK\gamma$ pero una activación reducida de $NF\kappa B$, como determinan los niveles aumentados de la proteína $I\kappa B$ y la fosforilación disminuida de p65 $NF\kappa B$ (Fig. 3b) y la expresión regulada negativamente del ARNm del gen diana de $NF\kappa B$ Ciclina D1 (Fig. 3c), lo que sugiere que $IKK\alpha$, en efecto, se requiere para la señalización de $NF\kappa B$ en estos tumores. Tal como se esperaba, el gen p21 de la ruta de $Id2$ no estaba afectado en tumores de ratones $IKK\alpha^{\Delta mam}$ (Fig. 3c). No se observaron diferencias significativas en la aparición de tumores entre los ratones control y los $NFATc1^{\Delta mam}$ (Fig. 13c,d), lo que sugiere que los requerimientos de la señalización aguas abajo son distintos en progenitores de osteoclastos y células epiteliales de glándulas mamarias. Por lo tanto, la delección de $IKK\alpha$, pero no la de NFATc1, en las células epiteliales de las glándulas mamarias, afecta a la aparición del cáncer de mama.

Ejemplo 17: Desarrollo de cáncer estimulado por progestinas debido al daño en el ADN:

Para analizar el papel de RANKL en la respuesta celular al daño en el ADN, así como en la detención del ciclo celular y la apoptosis, células epiteliales mamarias (CEM) primarias de ratón y la línea de células humanas de cáncer de mama sensible a RANKL, SKBR3, se trataron con el agente inductor de daño en el ADN, doxorubicina, o radiación γ . El tratamiento con RANKL no alteró la inducción de γ H2AX y p53 o la activación de Chk1, marcadores prototípicos de una respuesta funcional al daño en el ADN (Fig. 14a). Además, RANKL no alteró la detención temprana del ciclo celular después del daño en el ADN con la radiación γ (Fig. 14b,c) o con doxorubicina (Fig. 15a,b). Sorprendentemente, el tratamiento con RANKL produjo una notable protección de la muerte celular en respuesta al daño en el ADN inducido por radiación γ (Fig. 14d,c) y doxorubicina (Fig. 15a,b). Mecánicamente, la regulación positiva inducida por la radiación γ de las moléculas proapoptóticas Bim, Puma y Noxa no ocurrió en presencia de RANKL (Fig. 15c). Se ha mostrado *in vivo* que la radiación γ de hembras de ratón produce una inducción quintuple de la apoptosis de las células epiteliales mamarias¹⁹. Por lo tanto, este sistema previamente establecido se usó para evaluar los efectos del eje progesterona-RANKL/RANK sobre la muerte celular inducida por radiación γ . De hecho, RANKL/RANK inducido por MPA (una progestina) protegió de la apoptosis inducida por radiación γ en las células epiteliales mamarias *in vivo*. La pérdida de la expresión de RANK en las células epiteliales mamarias anuló los efectos protectores del MPA sobre la muerte celular inducida por radiación γ (Fig. 3f,g). Además, la ruta de IKK α estaba implicada en la protección inducida por MPA del epitelio mamario después de la radiación γ (Fig. 16a,b). Por lo tanto, además de promover la progresión del ciclo celular, el MPA puede proteger de la muerte celular después del daño en el ADN mediante la señalización de RANKL/RANK e IKK α .

Ejemplo 18: RANKL como marcador diagnóstico en pacientes con cáncer de mama:

Los datos presentados en este documento muestran que las progestinas pueden inducir RANKL/RANK que después estimula el cáncer mamario. Para confirmar estos estudios en pacientes humanos con cáncer de mama se analizaron los niveles de RANKL y progesterona en suero en mujeres que participaron en el estudio prospectivo UKCTOCS (Ensayo Cooperativo de la Cribado en el Cáncer de Ovario del RU) (Ejemplo 9). Esta cohorte proporcionó una oportunidad única para estudiar cambios en los niveles en suero de RANKL soluble, progesterona y OPG antes de la manifestación del cáncer de mama. De manera asombrosa, mientras que en las mujeres control no hubo correlación entre los niveles de progesterona y RANKL en suero, hubo una asociación estadísticamente significativa en mujeres que desarrollaron cáncer de mama 12-24 meses después de la recogida del suero ($p = 0,047$, ensayo de rangos de Spearman) (Fig. 4a). De hecho, entre mujeres dentro de los grupos de progesterona alta, el RANKL en suero es significativamente más elevado en el grupo que va a desarrollar cáncer de mama ($p=0,01$, ensayo de la suma de rangos de Wilcoxon de una vía) (Fig. 4a). Por lo tanto, para predecir la aparición futura del cáncer de mama, pueden usarse los altos niveles de RANKL en suero y la progesterona alta en suero.

La correlación en mujeres que desarrollaron cáncer de mama después de 5-12 meses tras el muestreo del suero, fue distinta. En cambio, este grupo mostró alteraciones significativas en los niveles de sRANKL y OPG en suero, que se asociaron con la probabilidad futura de desarrollar cáncer de mama (Fig. 4b; Fig. 17a). No se encontró ninguna de dichas alteraciones con OPG en las participantes del UKCTOCS que nunca desarrollaron cáncer de mama o que desarrollaron cáncer de mama entre 12-24 meses después del muestreo del suero (Fig. 4c; Fig. 17b).

Estas alteraciones de RANKL/OPG en suero parecen ser incomprensibles. Sin embargo, este hallazgo está en la línea de los datos anteriores. Por ejemplo, se ha notificado que los niveles de ARNm de RANKL en los huesos afectados de pacientes con osteoartritis se correlacionan positivamente con la destrucción ósea pero se correlacionan de modo inverso con los niveles de RANKL en suero¹¹. Además, un fenómeno similar se mostró para los niveles de RANKL en suero y la osteoporosis: bajos niveles de RANKL en suero están asociados con un riesgo 10 veces mayor de fracturas no traumáticas en mujeres postmenopáusicas²⁰. Además, la OPG aumentada está asociada con pérdida ósea aumentada en mujeres postmenopáusicas que no están sometidas a terapia de reemplazo hormonal²¹. Los mecanismos de estos cambios en suero en cáncer de mama pueden reflejar mecanismos compensatorios contra el desarrollo de microtumores y/o redistribución/secuestro de RANKL/OPG en distintos compartimentos corporales. Para impedir la integración errónea de datos en un diagnóstico o pronóstico se prefiere comparar los datos de la muestra con controles positivos (pacientes y/o aquellos que no desarrollaron cáncer) o negativos (pacientes que no desarrollaron cáncer).

Ejemplo 19: Análisis:

Basándose en estos resultados, es evidente el siguiente escenario molecular de cómo las progestinas, tales como el MPA, estimulan el cáncer mamario: la progesterona y las progestinas (y posiblemente la desregulación del sistema endógeno de progesterona tal como en la pre-menopausia) desencadenan una inducción de RANKL, primero en la glándula mamaria. RANKL por medio de RANK en las células epiteliales mamarias estimula a estas células en el ciclo celular y, notablemente, protege a las células epiteliales de la glándula mamaria de ratones así como de seres humanos de la apoptosis en respuesta al daño en el ADN incluyendo la radiación γ . Además, RANKL-/RANK controla la autorrenovación de las células madre de cáncer mamario y el crecimiento independiente de anclaje. Por lo tanto, RANKL/RANK inducido por progestina proporciona una ventaja de crecimiento y supervivencia al epitelio mamario dañado, un requisito previo para iniciar el cáncer mamario²². Estos efectos están, al menos en parte,

mediados a través de la ruta de señalización de $\text{IKK}\alpha\text{-NF}\kappa\text{B}$.

Estos datos tienen algunas implicaciones interesantes. Por ejemplo, las progestinas se han asociado con un riesgo aumentado de tener una mamografía anómala²³. Puesto que las mamografías detectan microcalcificaciones, así como la densidad glandular y RANKL/RANK tiene papeles clave en el metabolismo/mineralización del hueso^{12,13}, debería suponerse que RANKL/RANK contribuye a la calcificación de dichas lesiones y/o densidades glandulares. Esto es interesante porque las proporciones RANKL/OPG alteradas en el suero de las mujeres antes y después (5-12 meses) de que se descubriera la aparición de las manifestaciones de cáncer de mama, demuestra que los niveles de RANKL/OPG en suero son biomarcadores útiles para la detección del cáncer. Los datos del presente documento también muestran que los niveles aumentados de RANKL y progesterona en suero pueden predecir un futuro cáncer de mama 12-24 meses antes de que los tumores se diagnostiquen. Millones de mujeres toman derivados de progesterona en anticonceptivos y para la terapia de reemplazo hormonal. Dichas hormonas se han asociado epidemiológicamente a un riesgo aumentado de desarrollar cáncer de mama.

Referencias

1. Hanada, R. y col. Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. *Nature* 462, 505-9 (2009).
2. Tarutani, M. y col. Tissue-specific knockout of the mouse *Pig-a* gene reveals important roles for GPI-anchored proteins in skin development. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 94, 7400-5 (1997).
3. Gareus, R. y col. Normal epidermal differentiation but impaired skin-barrier formation upon keratinocyte-restricted IKK1 ablation. *Nat Cell Biol* 9, 461-9 (2007).
4. Aliprantis, A.O. y col. NFATc1 in mice represses osteoprotegerin during osteoclastogenesis and dissociates systemic osteopenia from inflammation in cherubism. *J Clin Invest* 118, 3775-89 (2008).
5. Aldaz, C.M., Liao, Q.Y., LaBate, M. & Johnston, D.A. Medroxyprogesterone acetate accelerates the development and increases the incidence of mouse mammary tumors induced by dimethylbenzanthracene. *Carcinogenesis* 17, 2069-72 (1996).
6. Cao, Y., Luo, J.L. & Karin, M. $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ kinase activity is required for self-renewal of ErbB2/Her2-transformed mammary tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 104, 15852-7 (2007).
7. Robinson, G.W. & Hennighausen, L. Inhibins and activins regulate mammary epithelial cell differentiation through mesenchymal-epithelial interactions. *Development* 124, 2701-8 (1997).
8. Fata, J.E. y col. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin ligand is essential for mammary gland development. *Cell* 103, 41-50 (2000).
9. Lacey, D.L. y col. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93, 165-76 (1998).
10. Menon, U. y col. Sensitivity and specificity of multimodal and ultrasound screening for ovarian cancer, and stage distribution of detected cancers: results of the prevalence screen of the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS). *Lancet Oncol* 10, 327-40 (2009).
11. Findlay, D. y col. Circulating RANKL is inversely related to RANKL mRNA levels in bone in osteoarthritic males. *Arthritis Res Ther* 10, R2 (2008).
12. Kong, Y.Y. y col. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397, 315-23 (1999).
13. Dougall, W.C. y col. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 13, 2412-24 (1999).
14. Jones, D.H. y col. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* 440, 692-6 (2006).
15. Asselin-Labat, M.L. y col. Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature*.
16. Joshi, P.A. y col. Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature*.
17. Kim, N.S. y col. Receptor activator of $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via *Id2*. *Mol Cell Biol* 26, 1002-13 (2006).
18. Freedman, V.H. & Shin, S.I. Cellular tumorigenicity in nude mice: correlation with cell growth in semi-solid medium. *Cell* 3, 355-9 (1974).
19. Ewan, K.B. y col. Transforming growth factor- β 1 mediates cellular response to DNA damage in situ. *Cancer Res* 62, 5627-31 (2002).
20. Schett, G. y col. Soluble RANKL and risk of non-traumatic fracture. *JAMA* 291, 1108-13 (2004).
21. Jorgensen, L. y col. Bone loss in relation to serum levels of osteoprotegerin and nuclear factor- κB ligand: the Tromso Study. *Osteoporos Int* 21, 931-8.
22. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70 (2000).
23. McTiernan, A. y col. Estrogen-plus-progestin use and mammographic density in postmenopausal women: Women's Health Initiative randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 97, 1366-76 (2005).
24. Terpos y col., *Blood* 102 (3) (2003): 1064-1069.
25. Hashimoto y col., *Cancer & Chemotherapy* 7 (31) (2004): 1027-1033; n° de referencia de la base de datos. NLM15272580.
26. Documento WO 2005/060627 A2
27. Documento WO 00/43553 A1
28. Belet y col., *PNAS* 107 (7) (2010): 2989-2994.

29. Leibbrandt y col., European Journal of Clinical Investigation 39 (10) (2009): 842-850.
 30. Reid y col., Molecular Cancer 8 (49) (2009): 1-10.
 31. Bo-Ying y col., Annals of Surgical Oncology 17 (6) (2010): 1675-1681.
 32. Park y col., J Korean Medical Science 18(4) (2003): 541-546.
 33. Chen y col., Cancer 107(2) (2006): 289-298

Listado de secuencias

	<110> IMBA - Institut für Molekulare Biotechnologie GmbH	
	<120> Diagnóstico de cáncer de mama	
	<130> R 59662	
10	<150> EP 10178345.4 <151> 22/09/2010	
	<160> 21	
	<170> PatentIn versión 3.5	
15	<210> 1 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador	
20	<400> 1 gctcatagct cttctccagg g	21
	<210> 2 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador	
	<400> 2 cctgaaccct aaggccaacc g	21
30	<210> 3 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador	
35	<400> 3 ctgaggccca gccatttg	18
	<210> 4 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador	
	<400> 4 gttgcttaac gtcattgttag agatcttg	28
45	<210> 5 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

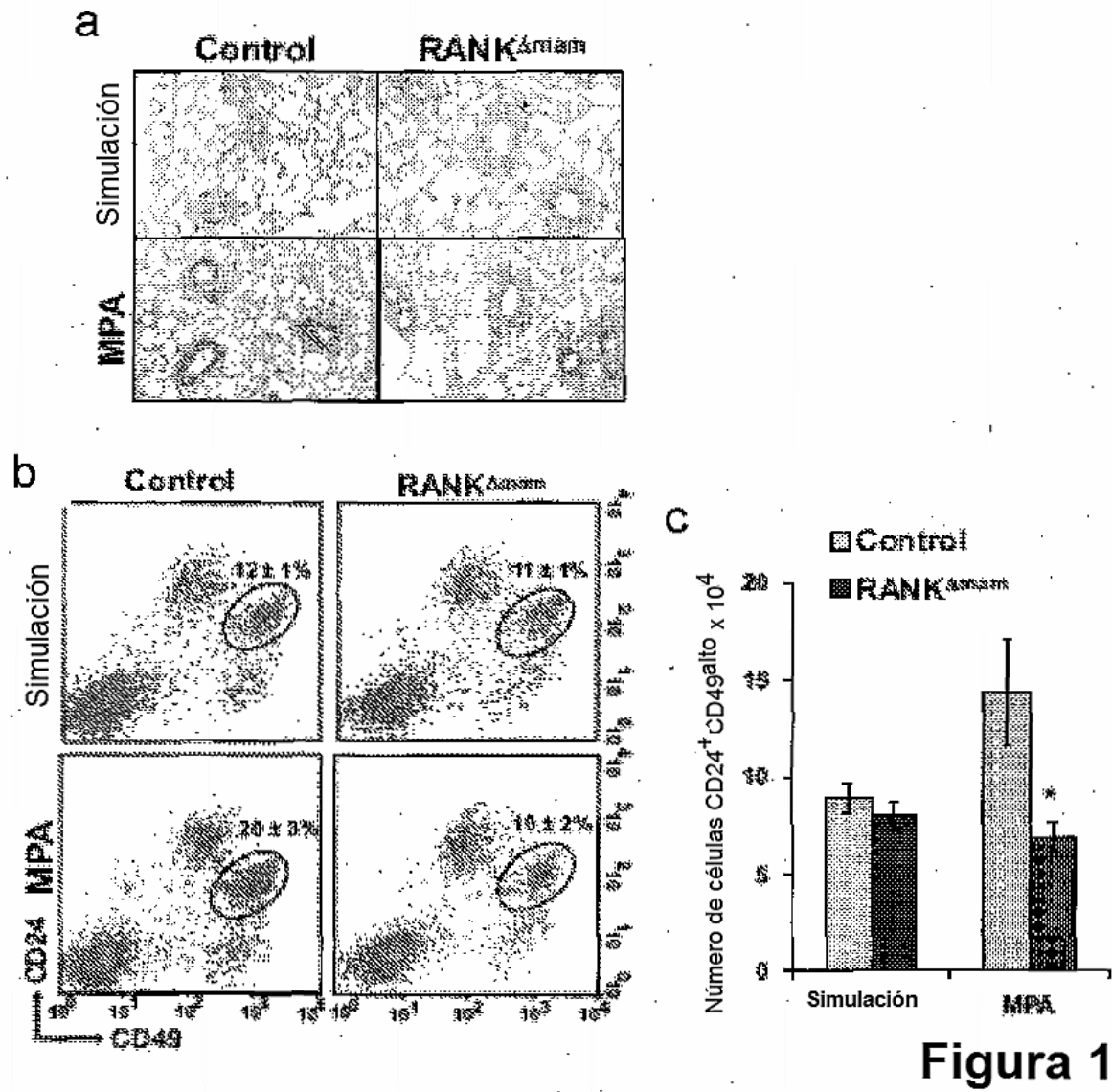
	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 5		
	ctggacacc tggaatgaag	20	
5	<210> 6		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 6		
	cagcactcgc agtctgagtt	20	
	<210> 7		
	<211> 21		
15	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
20	<400> 7		
	ctgtgcgccc tccgtatctt a	21	
	<210> 8		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 8		
	ggcggccagg ttccactga g	21	
	<210> 9		
30	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
35	<400> 9		
	gtggccttgt cgctgtctt	19	
	<210> 10		
	<211> 23		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 10		
	gcgcttgag tgatagaaat ctg	23	
45	<210> 11		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
50	<220>		
	<223> Cebador		

	<400> 11 gcgccgggcc agccgagact ac	22
5	<210> 12 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador	
10	<400> 12 gtccacacg aggggtccgct gc	22
	<210> 13 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cebador	
	<400> 13 tgcgactcc ggcgtccg	19
20	<210> 14 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador	
25	<400> 14 ccgagactac ggcggatcct aacag	25
	<210> 15 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador	
	<400> 15 tcagtctatg tcctgaactt tgaaagcccc	30
35	<210> 16 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador	
40	<400> 16 ccgcctgatg ccctccgctg tat	23
	<210> 17 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador	
45	<400> 17 cgggccact cctcctctc cac	23
50		

	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 18	
	actttgtctc caatcctccg	20
10	<210> 19	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
15	<400> 19	
	gtgcaccgga cataactgtg	20
	<210> 20	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 20	
	gttgaactcg tctccgatcc	20
25	<210> 21	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador	
	<400> 21	
	gcccctacct ccctacagac	20

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de diagnóstico de cáncer o para predecir el desarrollo de un cáncer en un paciente, en el que dicho cáncer es cáncer de mama, que comprende determinar la actividad de RANKL y la cantidad del ligando de RANKL, la osteoprotegerina (OPG), en una muestra de dicho paciente.
- 5 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la actividad de RANKL es determinada determinando en la muestra la cantidad de RANKL y/o de RANK.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la actividad de RANKL es determinada determinando la señalización de uno cualquiera de RANK, IKK-alfa, IκB-alfa, P-NF-kappa-B y de Ciclina D1.
- 10 4. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** la muestra comprende células mamarias del paciente.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado porque** las células comprenden receptores hormonales seleccionados del receptor de progesterona y de un receptor de estrógeno.
6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado porque** el receptor de estrógeno es seleccionado de ESR1, ESR2 o de un receptor heterodimérico.
- 15 7. Procedimiento de la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque** RANKL es determinado en una muestra de suero de dicho paciente.
8. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** el paciente es tratado por una hormona o con un anticonceptivo hormonal.
- 20 9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado porque** el paciente recibe terapia de reemplazo hormonal, progesterona o una progestina.
10. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que adicionalmente comprende determinar la concentración en suero de una hormona del ciclo menstrual o una progestina en una muestra del paciente.
- 25 11. El procedimiento de la reivindicación 10, **caracterizado porque** el riesgo de desarrollar cáncer de mama es estimado determinando al menos tanto la actividad de RANKL, como los niveles de progesterona y/o progestina, y adicionalmente la cantidad de OPG.
12. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el cáncer de mama de reciente aparición se diagnostica o predice determinando la relación de OPG con respecto a RANKL.
13. Un kit que comprende un agente de detección para RANKL, un agente de detección para OPG, y un agente de detección para progesterona o una progestina.



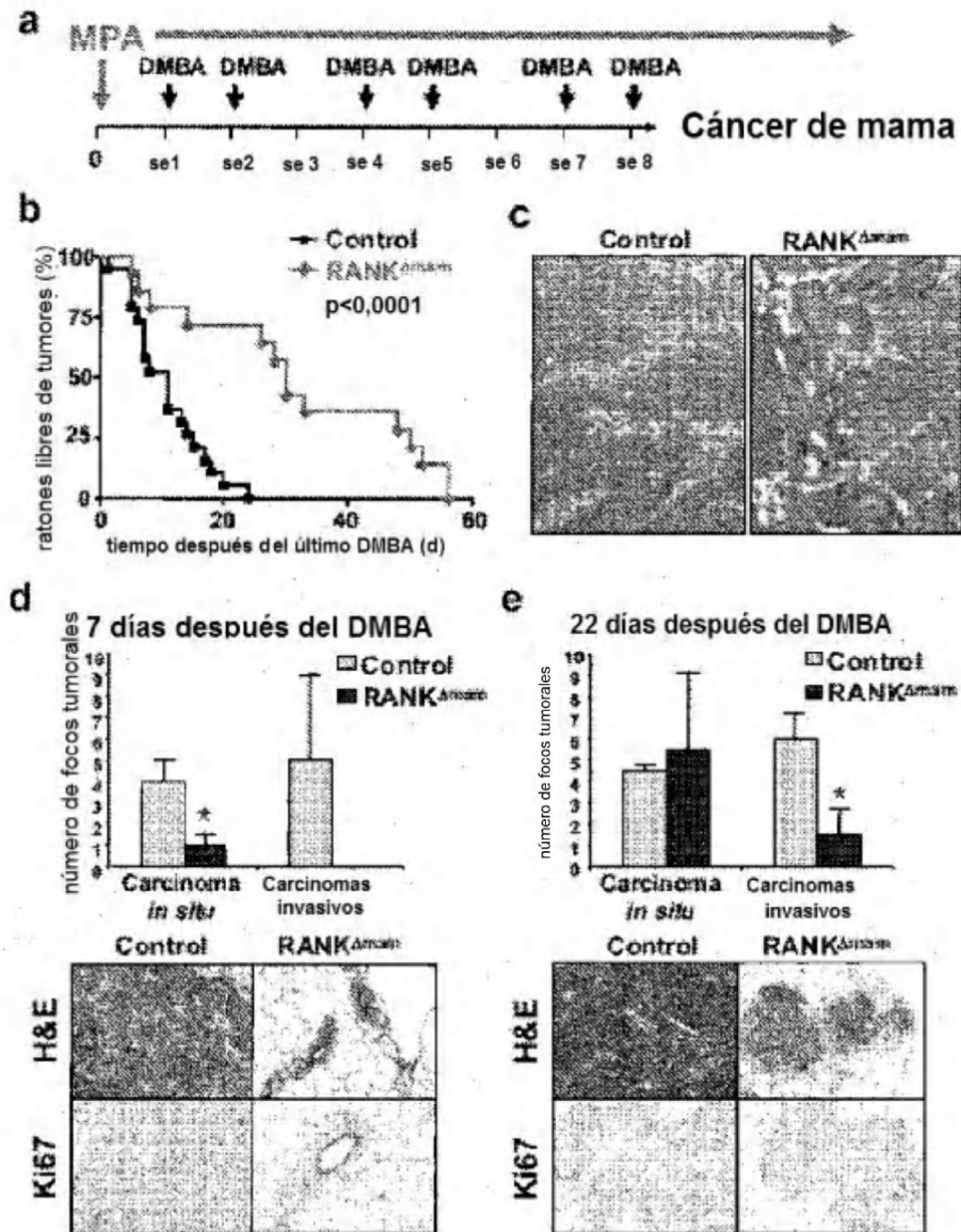


Figura 2

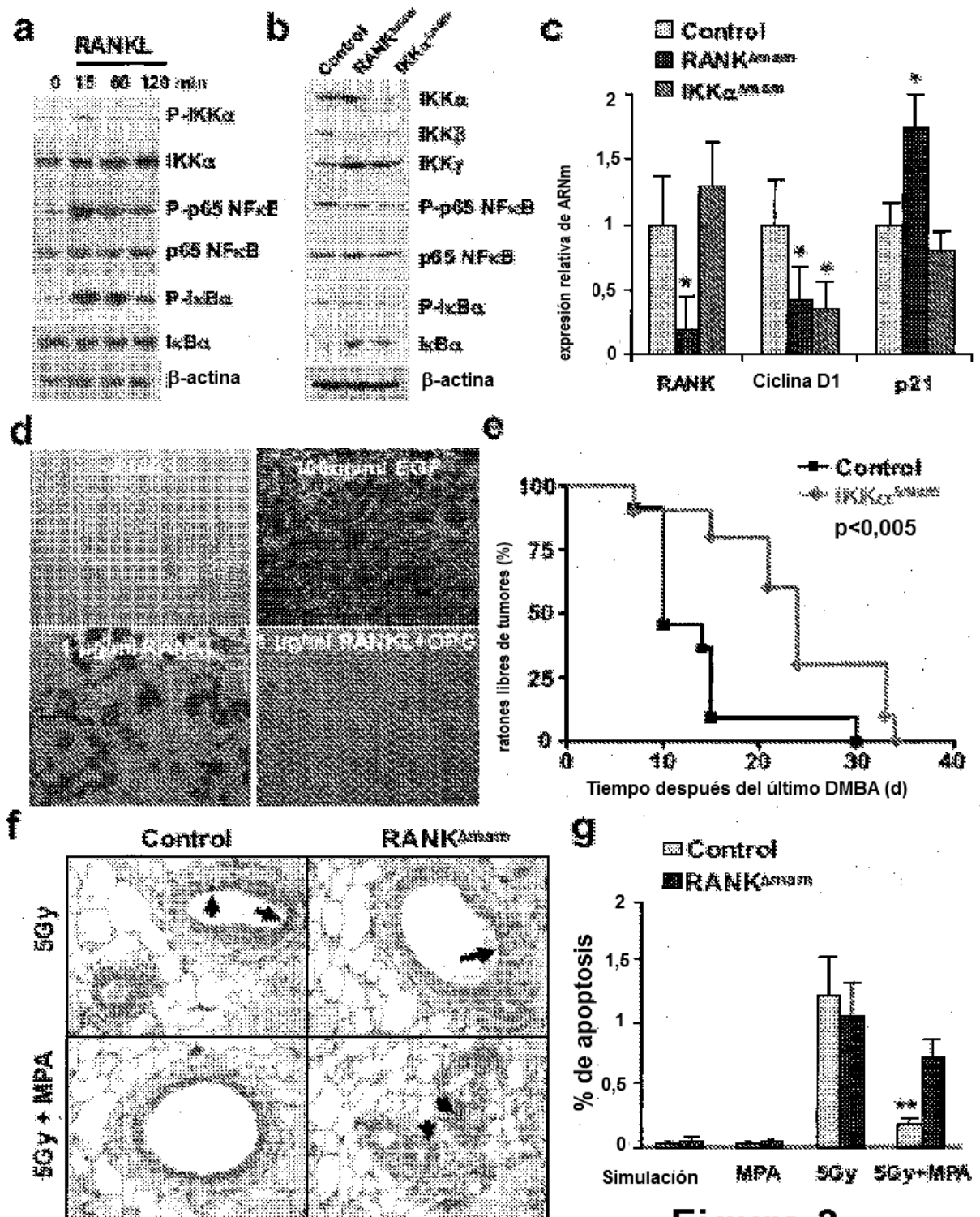


Figura 3

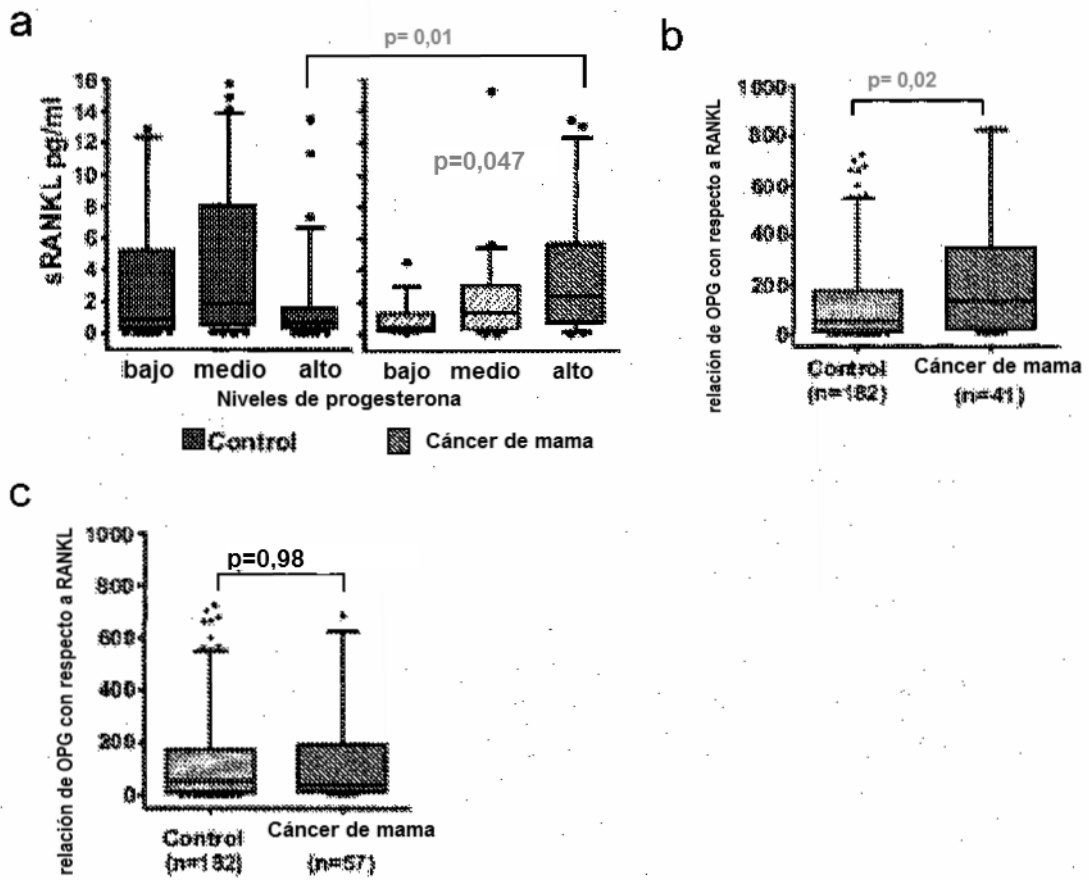


Figura 4

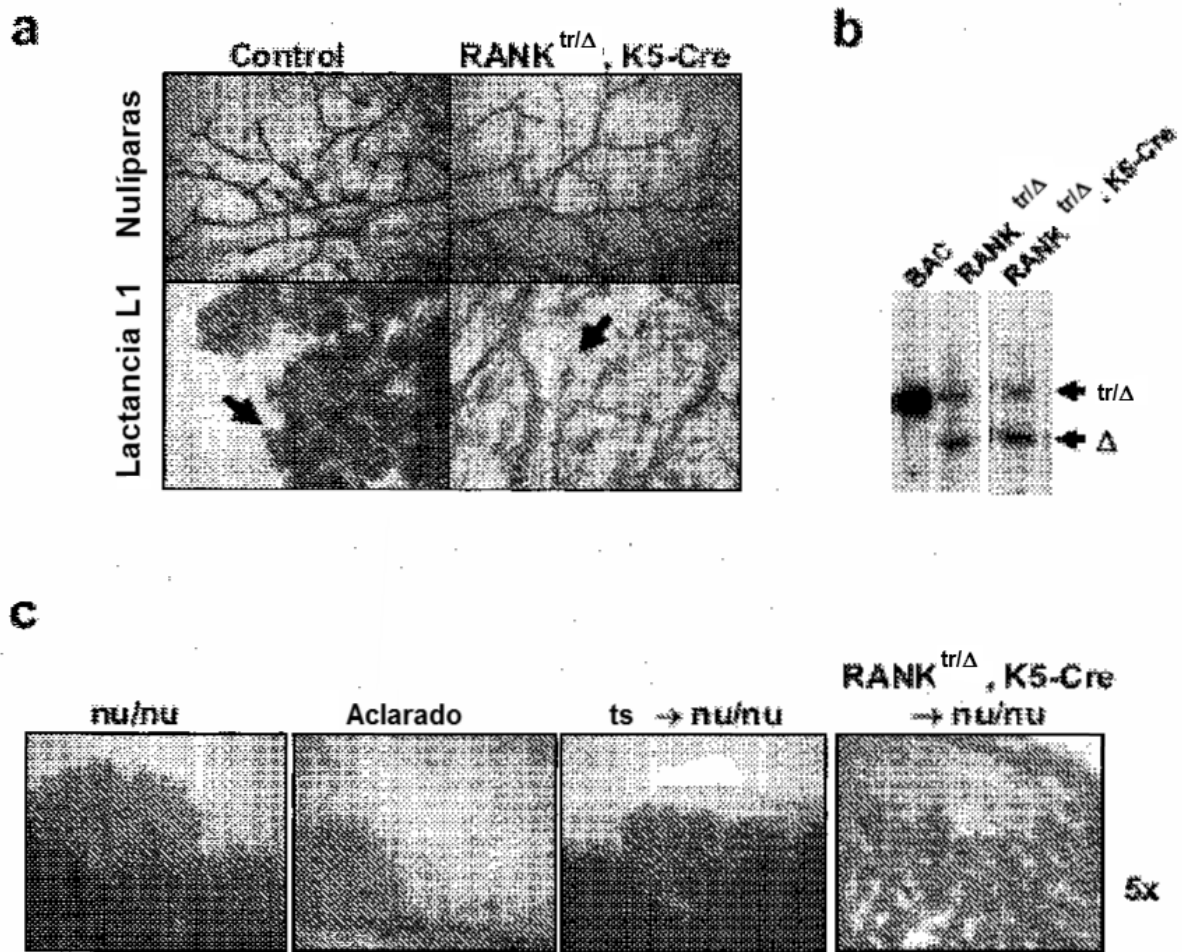


Figura 5

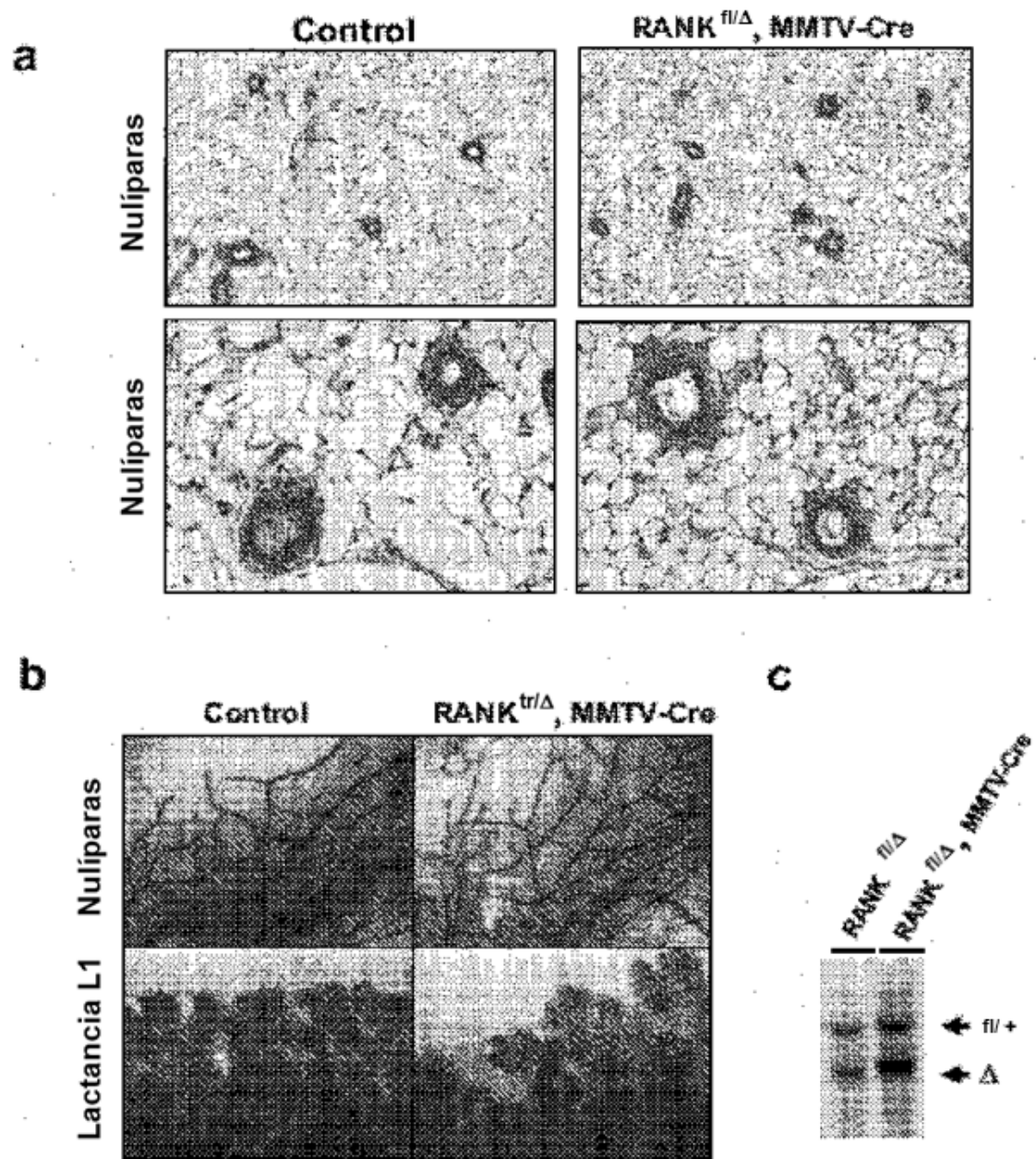


Figura 6

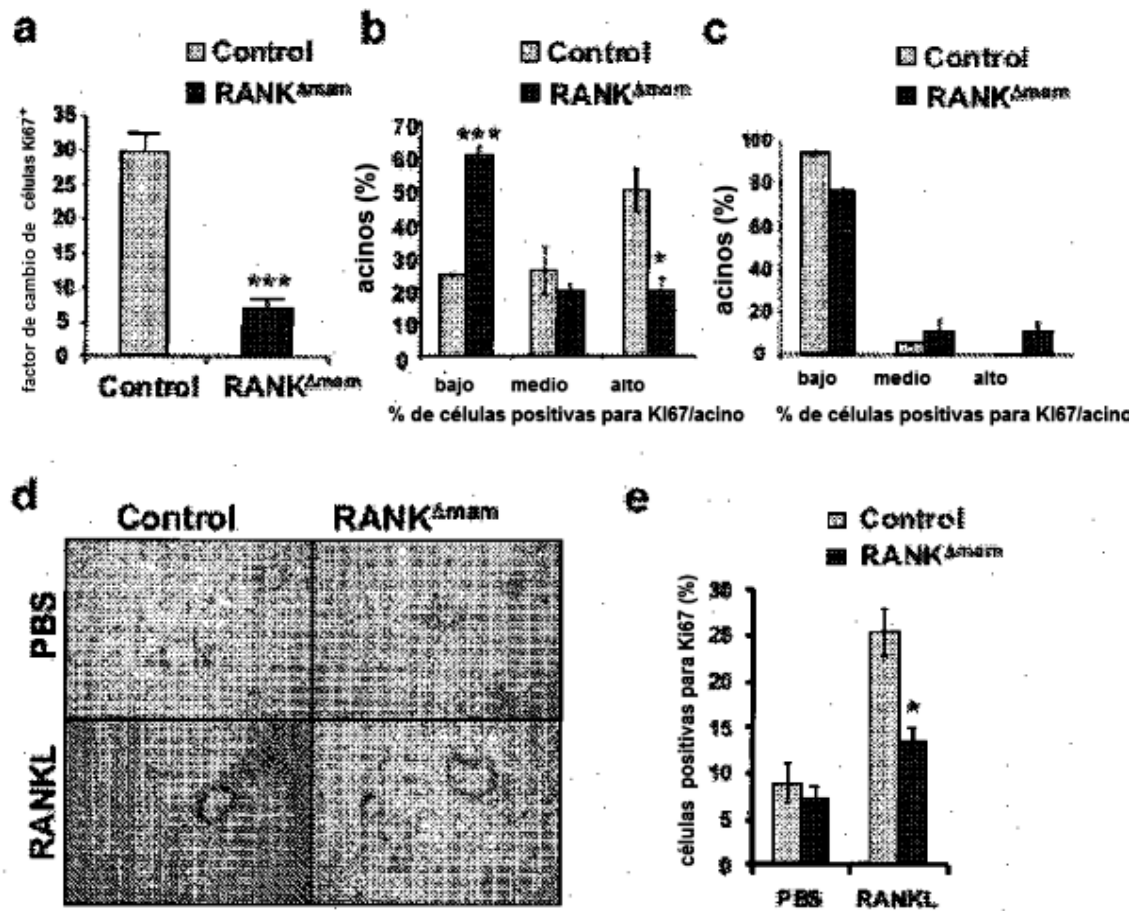


Figura 7

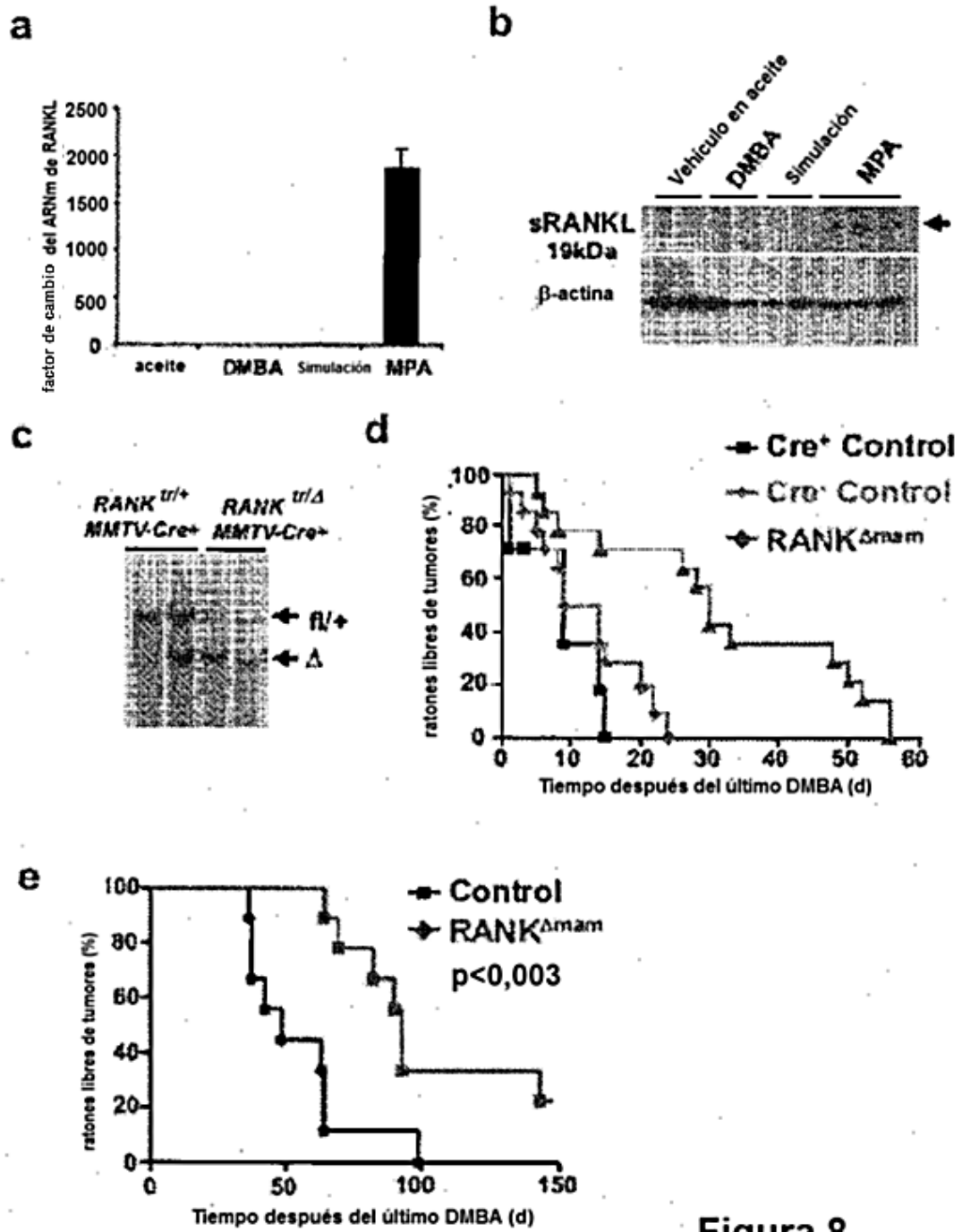
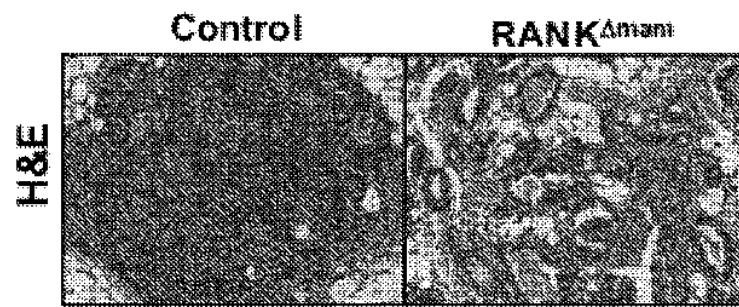


Figura 8

a 7 días después del DMBA



b 22 días después del DMBA

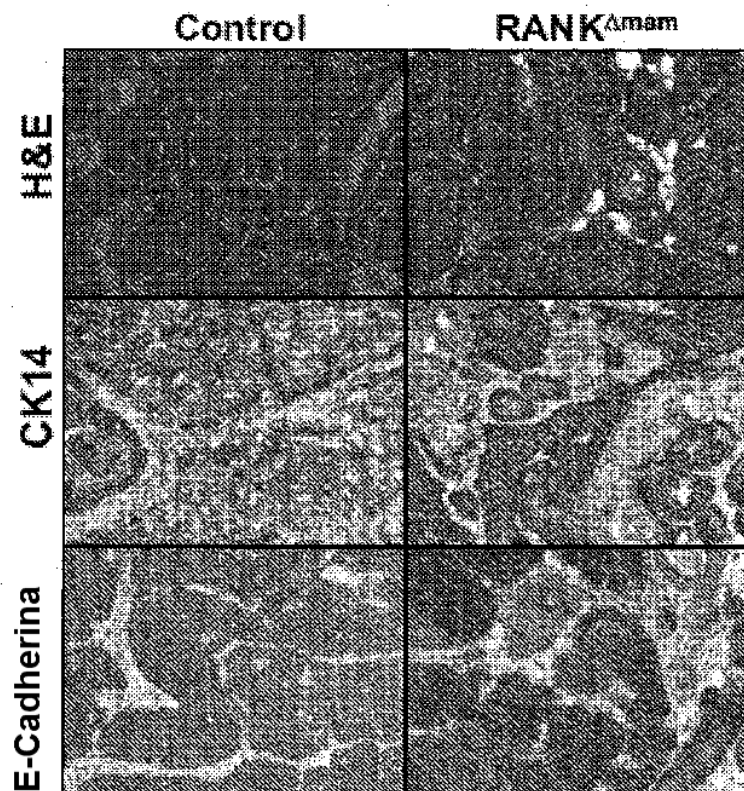


Figura 9

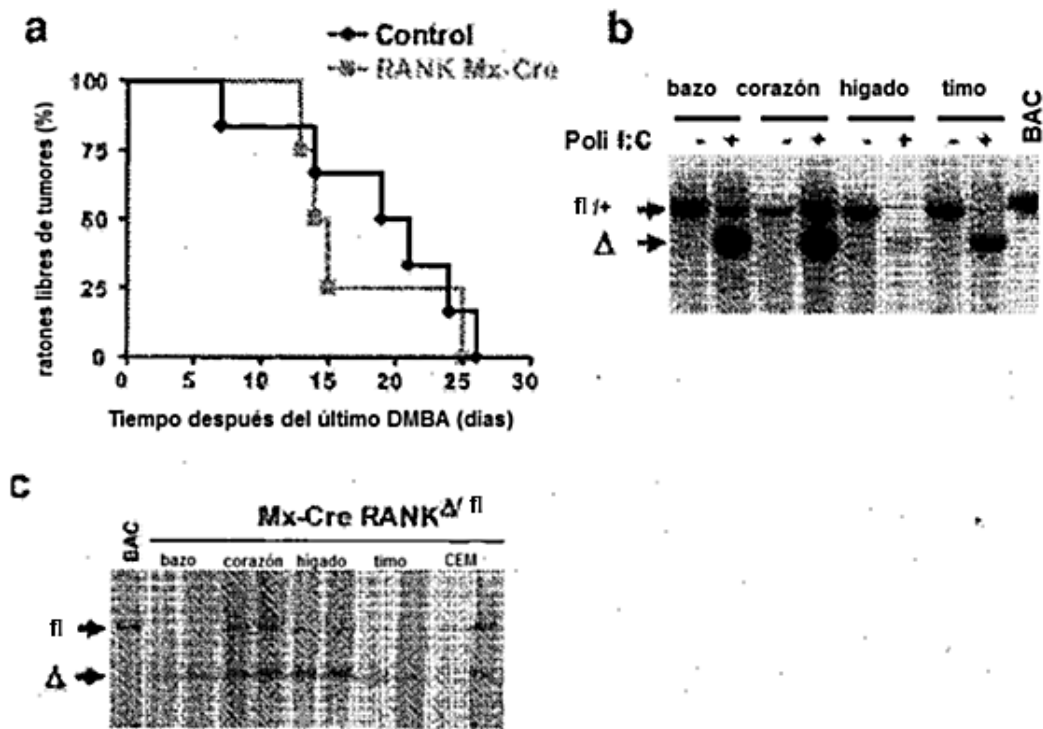


Figura 10

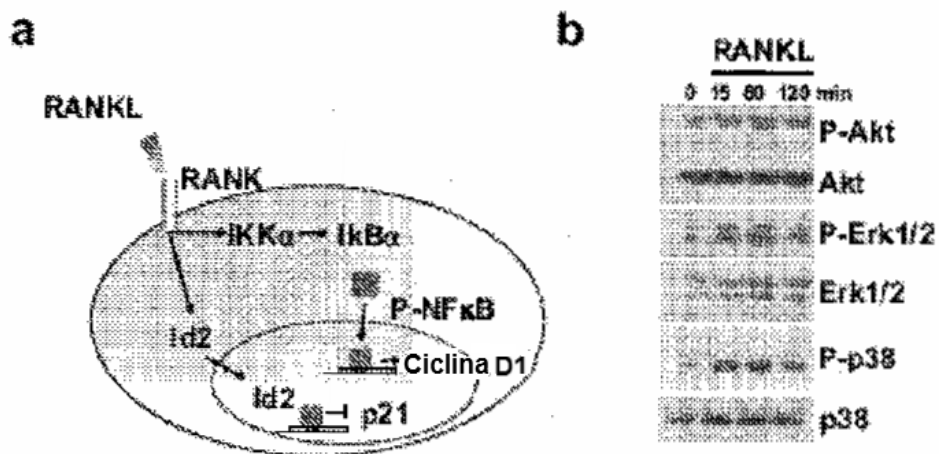


Figura 11

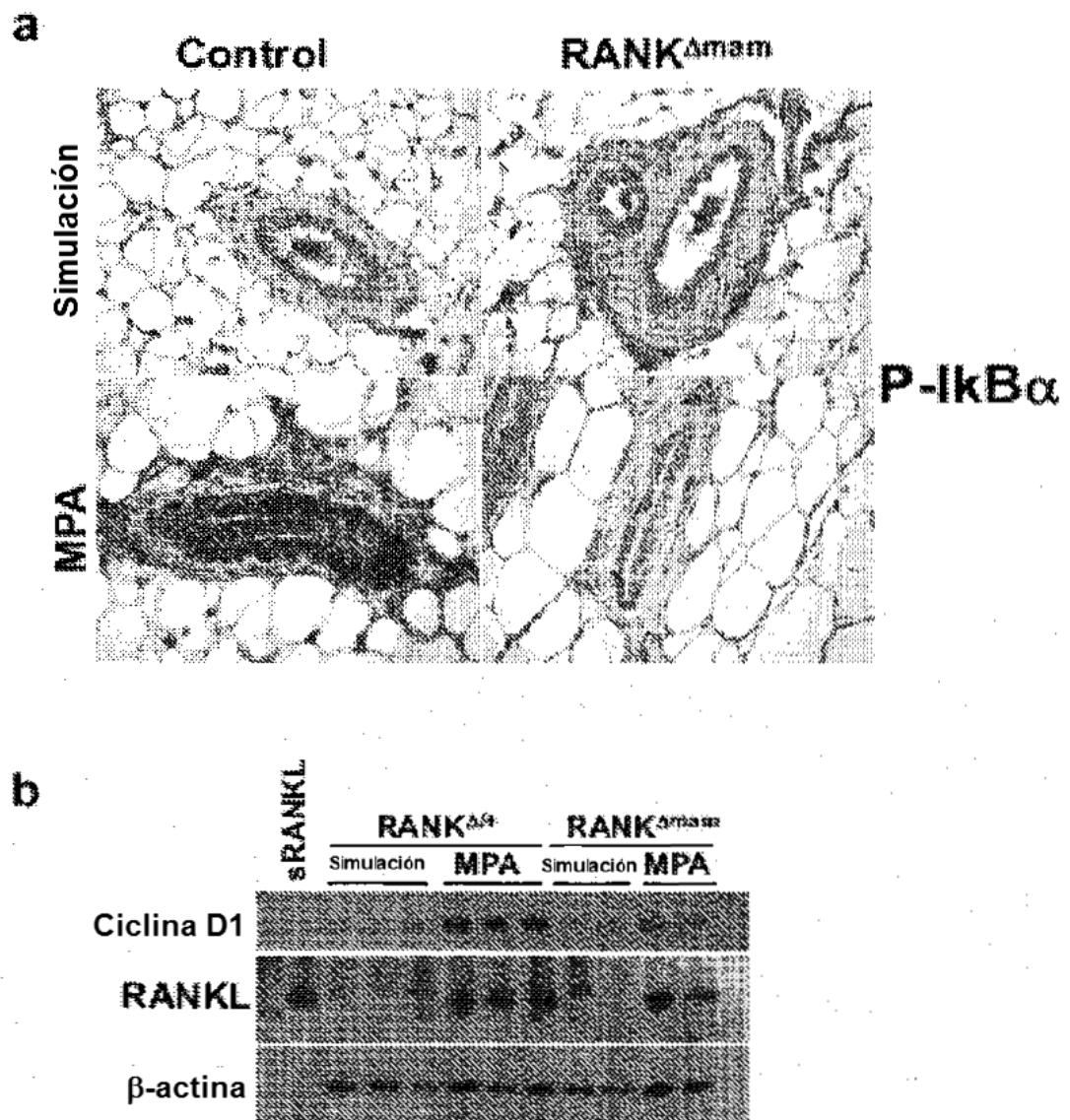


Figura 12

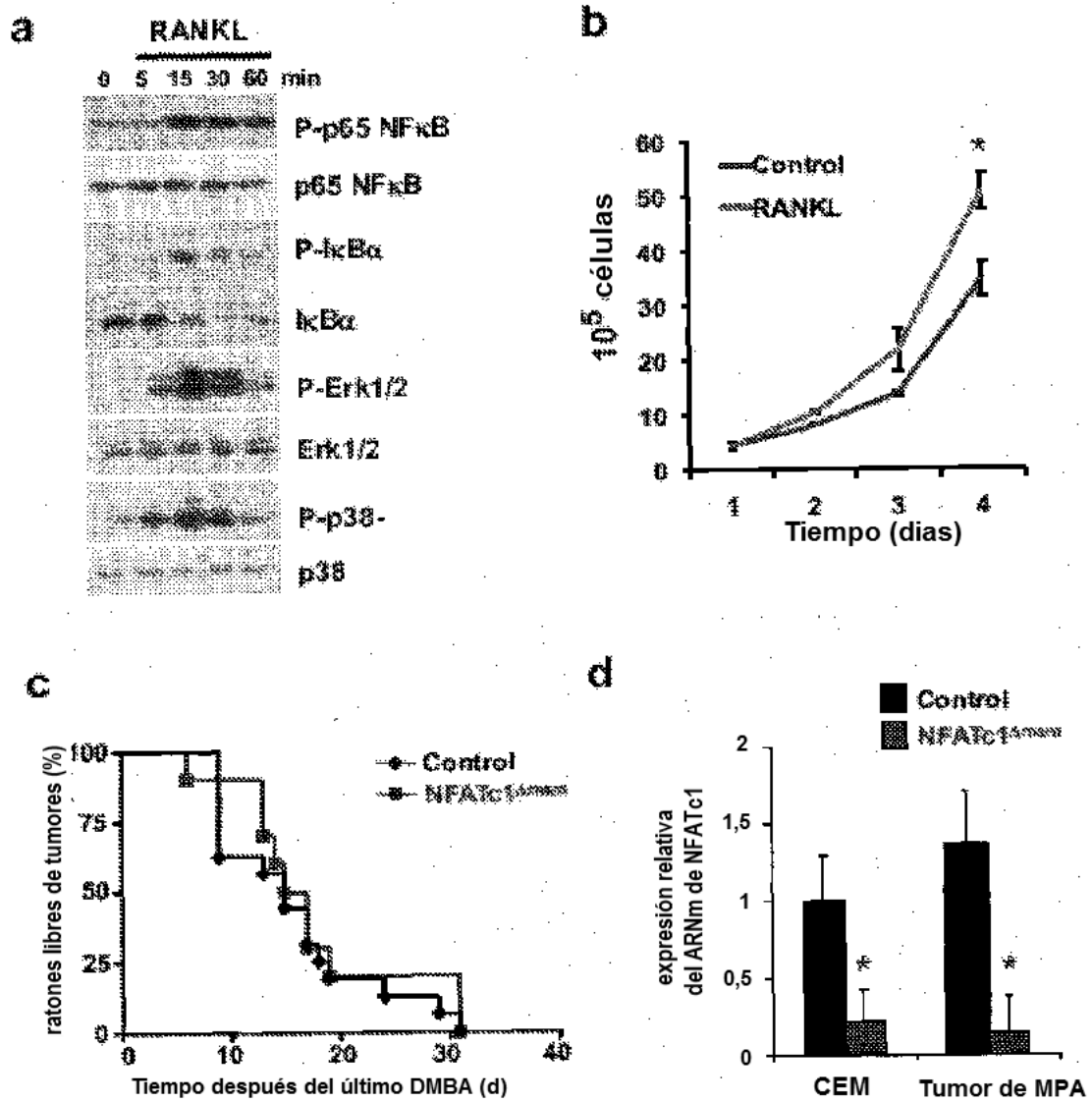


Figura 13

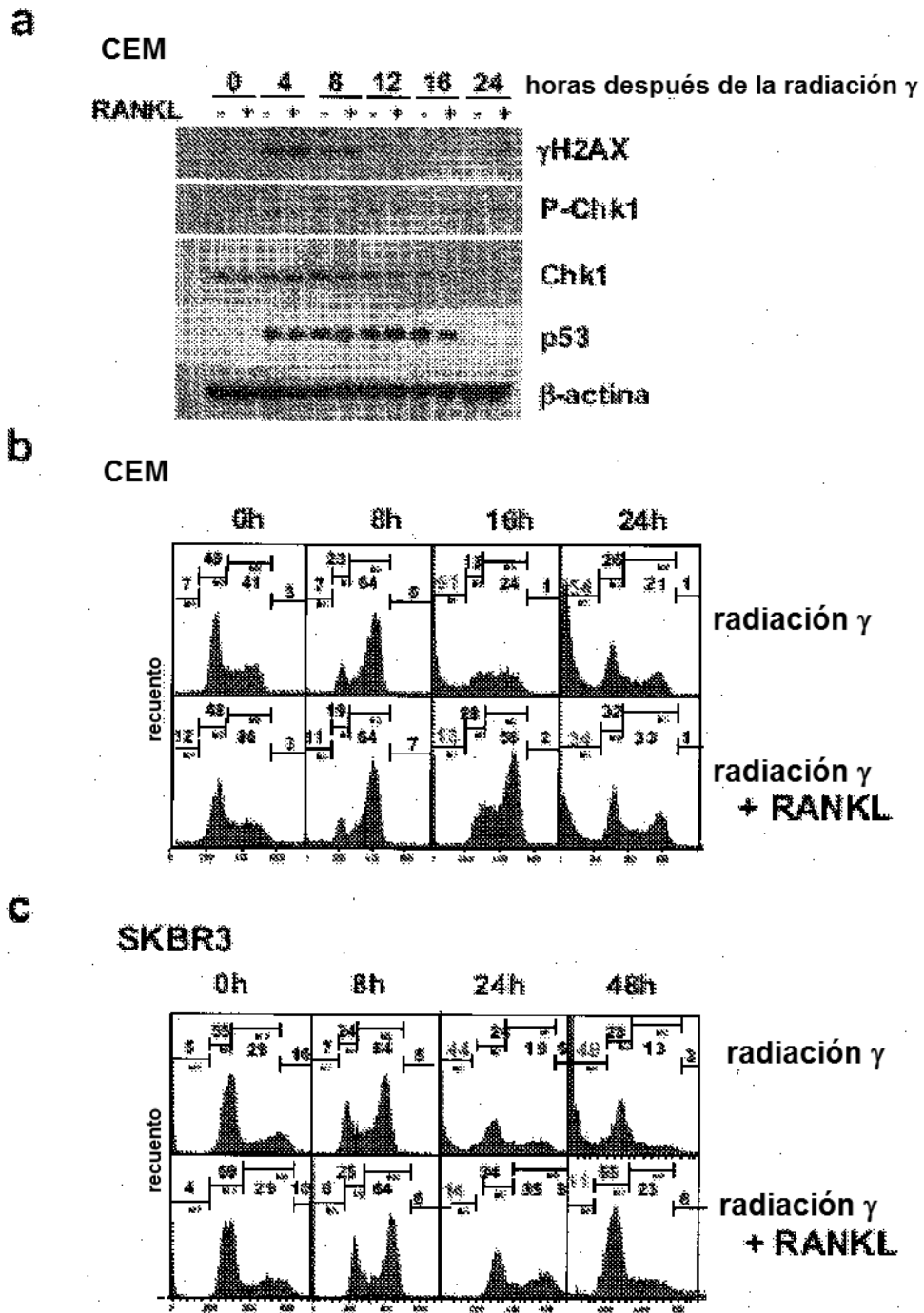


Figura 14

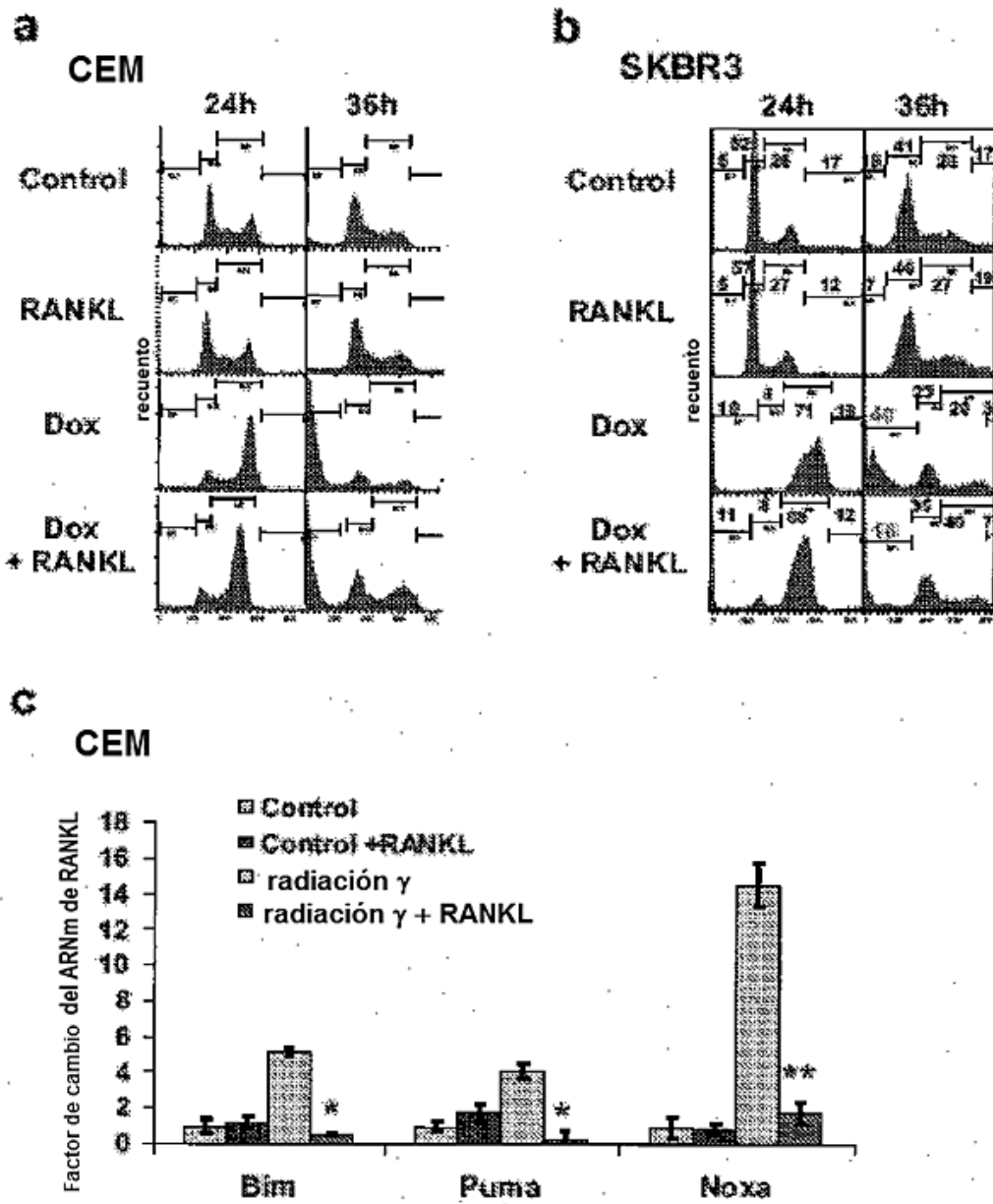
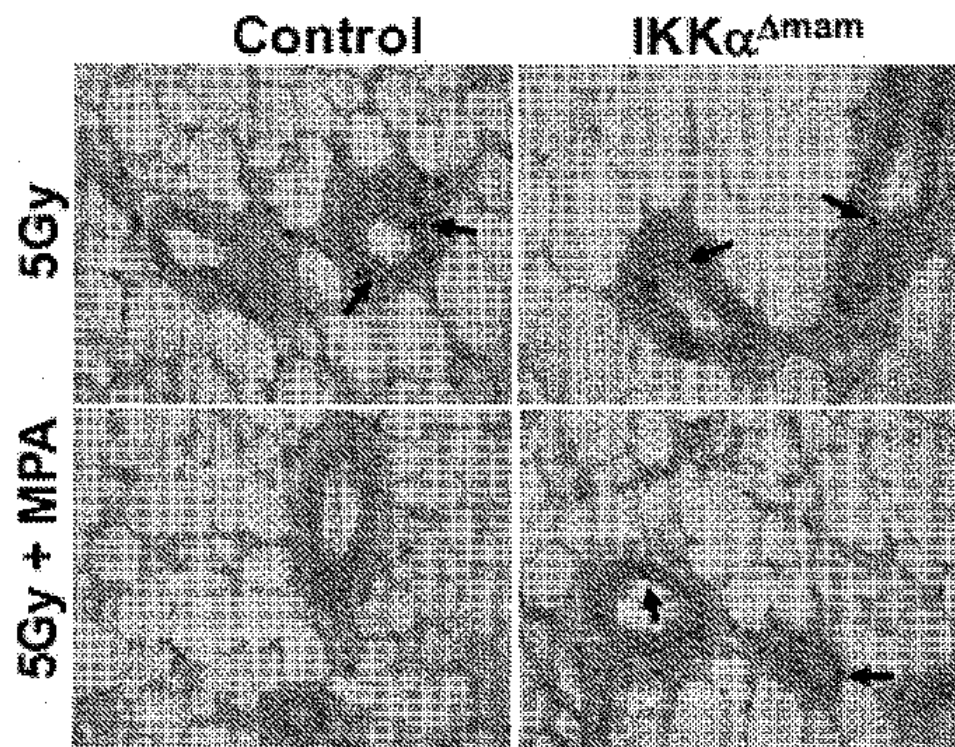


Figura 15

a



b

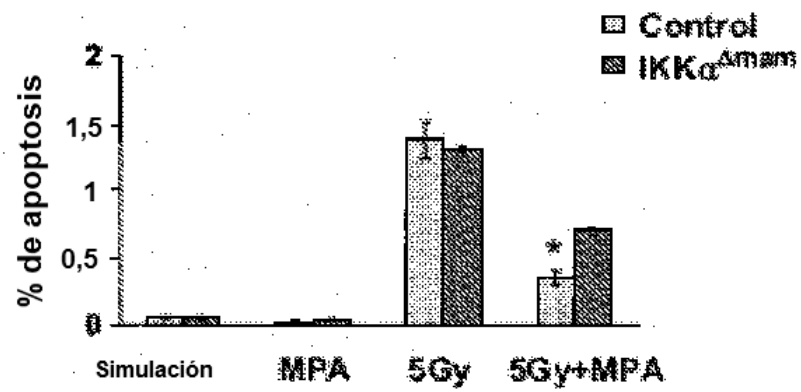


Figura 16

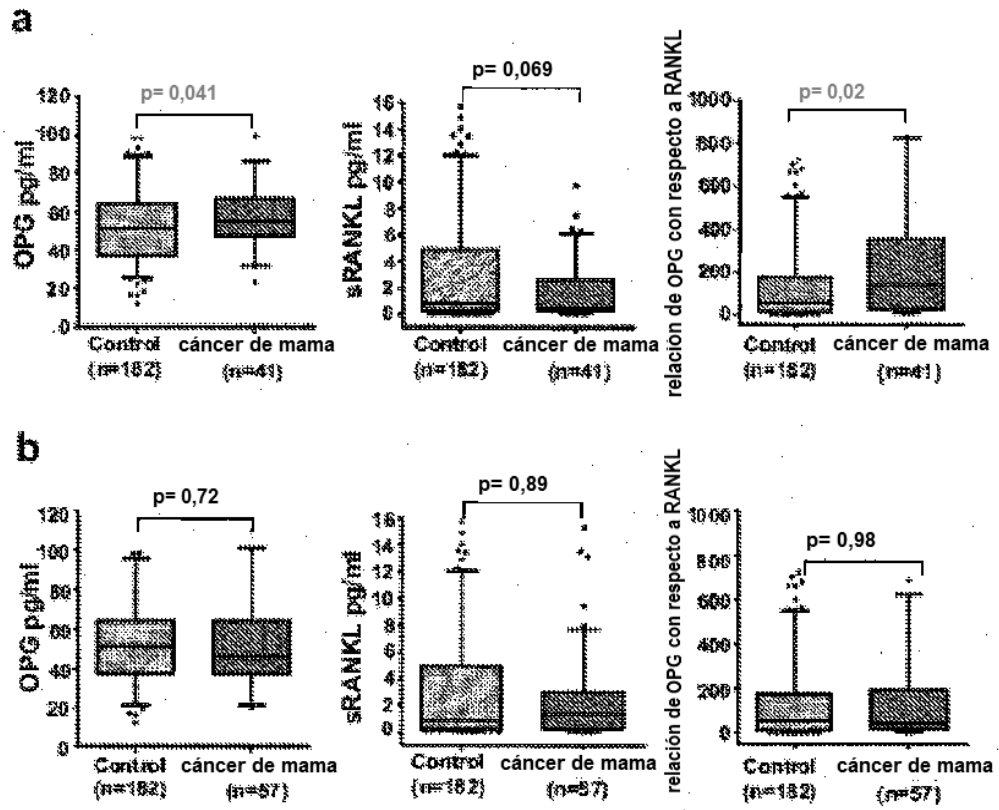


Figura 17

Densitometría

Fig. 1b

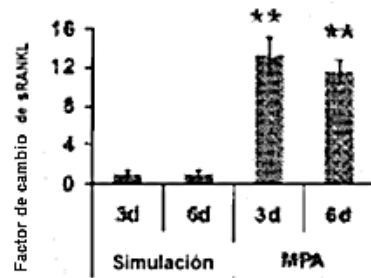


Fig. 1c

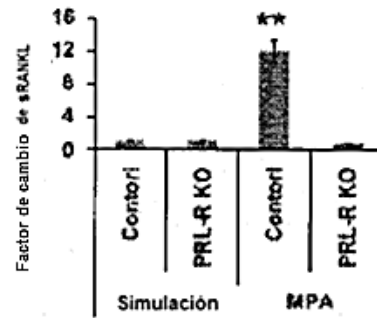


Fig. 3a

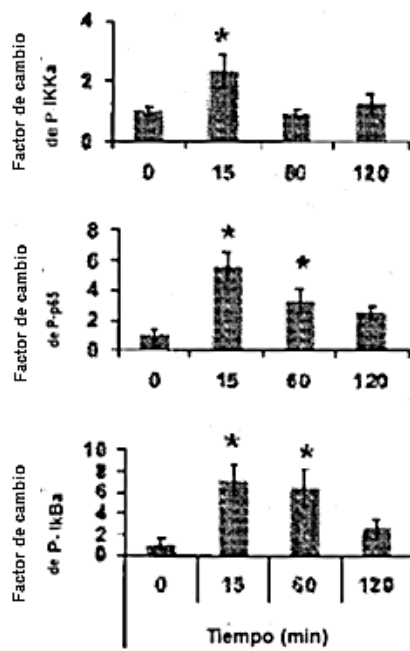


Fig. 3b

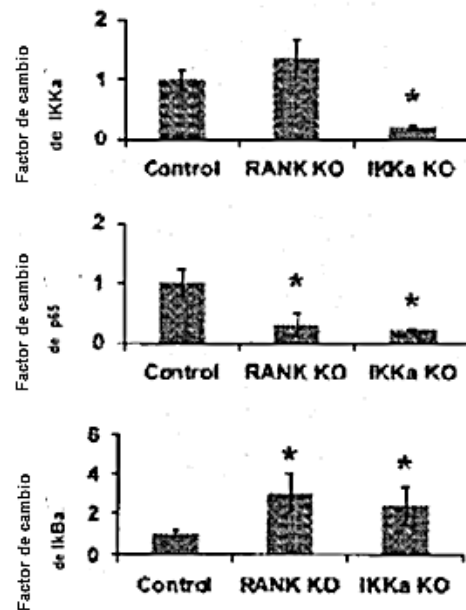


Figura 18