

❖ **BIOLOGÍA DEL PROCESO METASTÁSICO**

Dr. Eduardo Sandes¹, Dra. Denise Belgorosky², Dra. Lydia Puriccelli³, Dra. Elisa Bal de Kier Joffé⁴

¹Jefe División Inmunoquímica, Área Investigación

²Investigador, Departamento de Inmunobiología, Área Investigación

³Ex directora del Área de Investigación

⁴ Investigadora Superior de CONICET.

• **GENERALIDADES**

El cáncer es uno de los problemas de salud pública más importante a nivel mundial [1]. La detección de metástasis en el paciente oncológico determina cambios en la estrategia terapéutica y ensombrece el pronóstico del mismo. La diseminación metastásica constituye la principal causa de muerte en más del 90% de los pacientes con cáncer [2, 3]. Esto hace que sea imperativo desentrañar la complejidad biológica del proceso metastásico, permitiendo el desarrollo de nuevas terapias enfocadas a inhibir la diseminación tumoral desde la lesión primaria a órganos distantes.

Una de las primeras observaciones sobre el comportamiento biológico de la metástasis la realizó en 1889 el cirujano inglés Stephen Paget. Después de examinar los registros de las autopsias de 735 pacientes con cáncer de mama, propuso la hipótesis de "semilla y suelo", donde las células tumorales (semillas) sólo pueden crecer en el órgano cuyo microambiente (suelo) sea el apropiado [4, 5]. Esta hipótesis, fue contrastada en 1928 por el médico estadounidense James Ewing quien postuló que la metástasis está determinada por un proceso puramente mecánico dependiente de factores anatómicos y hemodinámicos del sistema vascular [6].

En la última década, se puso énfasis en la identificación de las diferentes moléculas que determinan el comportamiento de la célula metastásica y se evaluó su utilidad como marcadores del diagnóstico precoz de la diseminación, o como "blancos" terapéuticos que permitan prevenir o erradicar las metástasis.

La metástasis es el resultado de un proceso selectivo, complejo, multifactorial y altamente ineficiente, ya que menos del 0.01% de las células que se desprenden de un tumor y entran en la circulación llegarán a dar un crecimiento secundario. Para que, este proceso metastásico sea exitoso, la célula tumoral debe tener la capacidad de adaptarse a diferentes microambientes. Inicialmente debe adaptarse al microambiente circundante del tumor primario y adquirir la capacidad de invadir el tejido huésped circundante. Luego, ingresar en los vasos sanguíneos y/o linfáticos cercanos (intravasación), determinando su adaptación al microambiente circulatorio, que le permitirá transitar a través del sistema linfático y/o circulatorio. Por último, la detención e ingreso al parénquima de un órgano

distante (extravasación), estará determinado por su adaptación al microambiente del órgano “blanco” [7], donde la célula tumoral realizará la denominada “colonización”, proliferando y formando nódulos pequeños (micrometástasis) que eventualmente crecerán para dar lugar a tumores macroscópicos. Este proceso se conoce como cascada metastásica. Por otro lado, se acepta que las metástasis establecidas tienen el potencial de reiniciar la cascada y diseminarse a sitios terciarios, constituyéndose en metástasis de metástasis e incluso recolonizar el tumor primario [8].

El estrés metabólico en el tumor primario altera el equilibrio entre factores pro y antiangiogénicos, promoviendo el reclutamiento de células precursoras capaces de formar nuevos vasos en el estroma circundante [9]. Este proceso angiogénico no solo repara las necesidades metabólicas de las células tumorales, sino que aporta vías de infiltración local y de diseminación a distancia [10].

Otro evento crítico en la promoción de las metástasis es el cambio fenotípico de las células tumorales denominado transición epitelio-mesenquimática (TEM), que se produce en respuesta a diferentes señales inductoras de TEM. Las células con fenotipo epitelial realizan cambios moleculares, celulares y morfológicos hacia un fenotipo mesenquimático perdiendo su polarización ápico-basal incrementando su motilidad, permitiéndoles a las células malignas acceder a los sistemas vasculares a través de los vasos en neoformación [11,12].

La actividad de las células tumorales en el microambiente circulatorio comienza con la intravasación y culmina con la extravasación. La primera implica la disminución de la adhesión intercelular, el aumento de la motilidad citoesquelética, la remodelación activa de la matriz extracelular (MEC) y la ampliación de las brechas endoteliales. Las células tumorales que rompen el endotelio vascular normal se convierten en células tumorales circulantes (CTC). Con el desgaste celular sustancial inducido por la migración transmembrana, menos del 1% de las CTC originales son capaces de una colonización exitosa en sitios secundarios [12]. Esta pérdida de CTC se debe también a la actividad de las células inmunes como macrófagos y linfocitos T, que las destruyen en la circulación [13] **(Figura 1)**

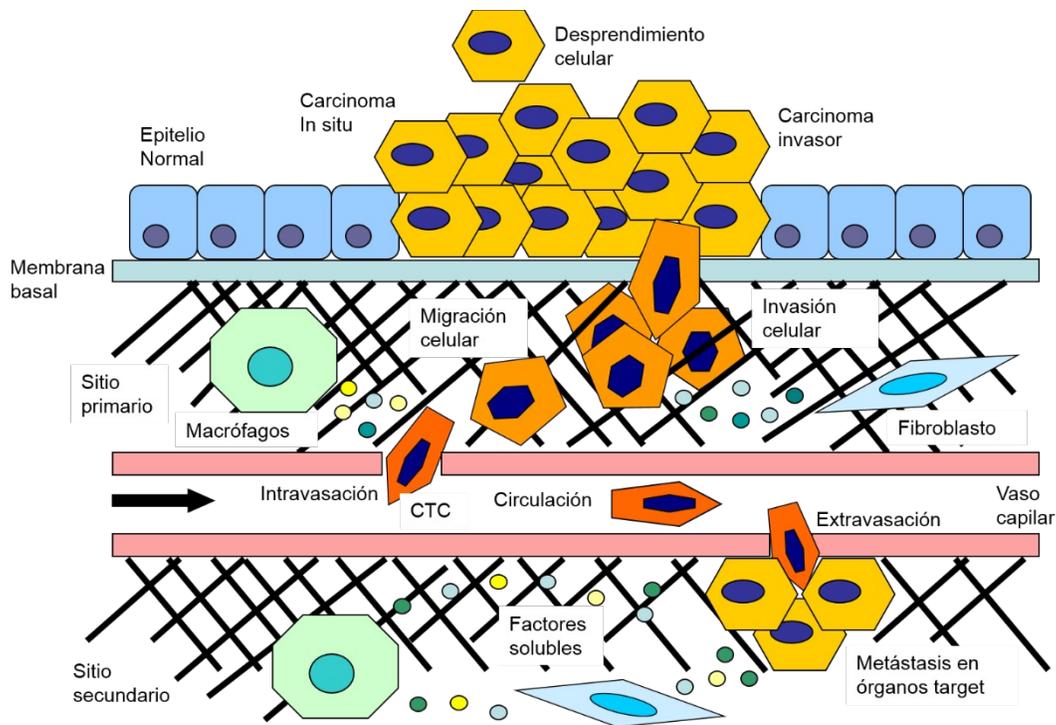


Figura 1: Esquema de la invasión tumoral y metástasis

Otro mecanismo de supervivencia de las CTC es la inhibición de la anoikis, un tipo de muerte celular producto de la pérdida de las interacciones célula-célula y célula-MEC. La sobreexpresión de receptores de superficie que activan vías de supervivencia y resistencia a la anoikis permite a la célula tumoral sobrevivir en el microambiente circulatorio [14].

Cabe recalcar que la colonización no siempre implica el desarrollo metastásico, ya que muchos pacientes presentan miríadas de micrometástasis que nunca progresarán. Un concepto que explicaría parcialmente la ineficiencia del proceso metastásico propone que las metástasis sólo se originan a partir de células “stem o troncales” tumorales. Este tipo de células a pesar de ser escasas, son altamente resistentes a terapias convencionales, capaces de repoblar los tumores (primarios o metastásicos) luego de los tratamientos instaurados [15]. El lapso temporal entre el asentamiento de la célula tumoral en un órgano distante y la colonización constituye el período de latencia metastásica.

- **PULMÓN COMO ÓRGANO BLANCO DE LA METÁSTASIS**

El trabajo de Fidler y col aplicado a la metástasis pulmonar, fue uno de los primeros en intentar explicar la hipótesis de “semilla y suelo” de Paget utilizando modelos experimentales [16]. El experimento consistió en implantar en el flanco de ratones singéneos fragmentos de pulmón e hígado y riñón como tejidos control. Los animales fueron luego inoculados por vía endovenosa con células de un melanoma maligno, con capacidad metastásica sólo en pulmón. Las células inyectadas formaron metástasis en los pulmones del huésped (primera estación anatómica de la vía de inoculación) y en los implantes ectópicos de pulmón, mientras que no se observó crecimiento tumoral en los

restantes órganos del huésped ni en los órganos implantados como control. Ésta fue la primera evidencia experimental que indicó que la diseminación metastásica está predominantemente determinada por interacciones específicas entre la célula maligna y el órgano secundario.

En el Área de Investigación del Instituto se ha demostrado que factores solubles derivados del pulmón, único órgano "blanco" de la diseminación metastásica de los modelos de adenocarcinoma mamario murino desarrollados en el Área, estimulan *in vitro* la proliferación, la secreción de proteasas y la migración de la célula tumoral, así como también exaltan la angiogénesis y el crecimiento tumoral local y metastásico *in vivo*, siendo además capaces de rescatar de la apoptosis a células tumorales mamarias tratadas con diferentes quimioterápicos [17,18]. Otros autores demostraron que las células tumorales adhieren con preferencia a los endotelios correspondientes a los órganos que metastatizan, incluyendo pulmón. Se detectó que los capilares son diferentes en términos moleculares, ya que las células endoteliales de diferentes órganos expresan distintas proteínas de superficie, que son reconocidas en forma específica por las células tumorales metastásicas. Por ejemplo, la proteína metadherina, que se expresa en la superficie de células de cáncer de mama, se une selectivamente al endotelio del pulmón, su órgano "blanco" [19]. Si se bloquea esta proteína, la metástasis experimental (o sea la metástasis iniciada por la inoculación de células tumorales directo a la circulación) se reduce, indicando que tal procedimiento puede impactar en el proceso metastásico.

En 2005, Minn y col [20, 21] trataron de identificar en células de cáncer de mama patrones de expresión génica asociados con la metástasis al pulmón. Los autores encontraron cambios en la expresión (aumentada o disminuida) de genes que codifican para factores de crecimiento y supervivencia, quimioquinas, moléculas de adhesión y proteasas extracelulares, entre otros. Estos genes se subclasificaron en dos grupos: 1) genes con una función dual, ya que estimulan tanto la capacidad tumorigénica como la capacidad metastásica, y 2) genes que cumplen funciones específicas sólo en el microambiente pulmonar, facilitando la virulencia de la célula diseminada en el órgano blanco. La relevancia clínica del perfil génico encontrado en los modelos experimentales se evaluó en una cohorte de pacientes de cáncer de mama primario, presuponiendo que un perfil semejante debería expresarse en el subgrupo que sufriera una recaída con metástasis pulmonares [21]. Se analizó la expresión de 54 genes en el tejido tumoral y se encontró que 12 estaban significativamente relacionados con menor supervivencia libre de metástasis pulmonar, como los que codifican para la metaloproteasa MMP1 y la quimioquina CXCL1 entre otros. Por lo tanto, por primera vez se pudo identificar un grupo de genes cuya expresión interviene en la función metastogénica con selectividad para pulmón, y que posee relevancia clínica.

Otro mediador específico de la extravasación en el pulmón es la citoquina tipo angiopoyetina 4, que induce la disociación de las uniones que vinculan entre sí a las células endoteliales, favoreciendo la infiltración de las células tumorales en los pulmones [22].

Actualmente, nuestro entendimiento del rol del microambiente del tejido blanco está cambiando, ya que no sólo se tiene en cuenta su arquitectura estable sino también el influjo de células de otros sitios. A este respecto, Kaplan y col describieron un mecanismo

novedoso de la iniciación de la metástasis, que involucra la movilización de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) de la médula ósea hacia los órganos blanco de la metástasis en respuesta a factores solubles secretados por el tumor primario [23]. La MEC del órgano donde se formarán las metástasis se remodela en forma selectiva y específica en respuesta a estos factores, iniciando así la formación de un sitio permisivo para el establecimiento de la futura metástasis (**nichos pre-metastásicos**). En una etapa posterior, y aún previo a la llegada de las células tumorales, las CPH que expresan el receptor 1 de VEGF (VEGFR1) pueden atravesar el endotelio del órgano blanco y alojarse en los nichos pre-metastásicos. Una vez allí, secretarían enzimas capaces de desorganizar las membranas basales y de liberar factores de crecimiento y quimioquinas unidos a las MEC, creando así un gradiente quimioattractante para las células tumorales y para otras células progenitoras de la médula ósea. Un ejemplo de ellas son las que expresan VEGFR2, que contribuyen a la neovascularización de las metástasis.

Se observó que, cuando se bloquea la función de VEGFR1 o se eliminan las células VEGFR1+ de la médula ósea en modelos experimentales, no se observa la formación de estos nichos pre metastásicos en pulmón ni el desarrollo de las metástasis. Esta es la primera evidencia directa que una población celular no neoplásica puede modular un futuro sitio metastásico y que su manipulación puede prevenir la diseminación tumoral. Validado este modelo, en tejidos humanos se encontraron células VEGFR1+ en sitios donde comúnmente se desarrollan metástasis, asociados o no con células tumorales, sugiriendo la posibilidad de que sean sitios preferenciales para el desarrollo posterior de metástasis [23].

- **METÁSTASIS ÓSEA**

Es la principal complicación de los cánceres osteotrópicos avanzados, entre los que se incluye el cáncer de mama (BC), cáncer de próstata (PC), cáncer de pulmón (LC) y mieloma múltiple (MM). Tienen una morbilidad significativa debido a eventos relacionados con el esqueleto, como son la fractura patológica, la compresión de la médula espinal, el dolor óseo y la hipercalcemia maligna. Además, estas lesiones óseas contribuyen a un mal pronóstico, a pesar de las estrategias terapéuticas actuales. Por lo tanto, es imprescindible desarrollar nuevos tratamientos más efectivos, a través de una mejor comprensión de la biología de las metástasis óseas malignas en el entorno clínico [24].

Normalmente, la homeostasis ósea se mantiene por el equilibrio entre los osteoblastos y los osteoclastos. Estos últimos son células multinucleadas derivadas de precursores del linaje monocito-macrófago, que degradan la matriz ósea liberando proteasas lisosomales funcionales como la catepsina K. Mientras que, los osteoblastos son células mononucleadas derivadas de células madre mesenquimales (MSC) de la cavidad de la médula ósea, éstas forman MEC y favorecen la re-mineralización [25].

Si en el tumor primario existen células osteotrópicas con capacidad proliferativa, la angiogénesis es un proceso de importancia crítica. El microambiente de los tejidos óseos proporciona un "suelo" fértil para que las células tumorales osteotrópicas que están en la circulación se asienten y lo pueblen. Este proceso estaría mediado por la liberación de la quimioquina atractante CXCL12 derivada de los osteoblastos que recluta células

tumorales que sobreexpresan el receptor funcionalmente activo de esta quimioquina denominado CXCR4[26]. Otra molécula que interviene facilitando el proceso de colonización tumoral es la expresión de la molécula de adhesión cadherina 11 dentro del microambiente oseo y que se encuentra sobreexpresada en las células tumorales de cáncer de mama [27].

Las lesiones metastásicas óseas se pueden clasificar en dos microambientes clásicos: 1) osteolíticos (como en las metástasis óseas de cáncer de mama) y 2) osteoblásticos (como en las metástasis óseas de cáncer de próstata), las que presentan apariencias radiográficas distintas.

La formación de las lesiones osteolíticas requieren de la activación de los osteoclastos. Las células tumorales osteotrópicas, particularmente las de cáncer de mama, secretan diferentes moléculas con actividad biológica sobre los osteoblastos, como el péptido relacionado con la paratohormona (PTHrP), las interleuquina 6 y 8 (IL6 y IL8) y la prostaglandina E2 (PGE2). Estas moléculas de señalización determinan que los osteoblastos incrementen la secreción del ligando activador del receptor de NF-kB (RANKL) y disminuyan la de osteoprotegerina (OPG). La OPG es un receptor soluble de RANKL, que bloquea su actividad sobre las células precursoras de los osteoclastos, las cuales poseen el receptor RANK en su superficie celular. La activación de este receptor promueve la formación de osteoclastos maduros funcionales, determinando que su actividad va a depender del balance RANKL/OPG (**Figura 2**) [28]. Además, RANKL puede inducir la liberación de factores que favorecen la migración, la invasión y la angiogénesis, como las metaloproteasas de matriz 1 y 9 (MMP1 y MMP9), y el factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) [29].

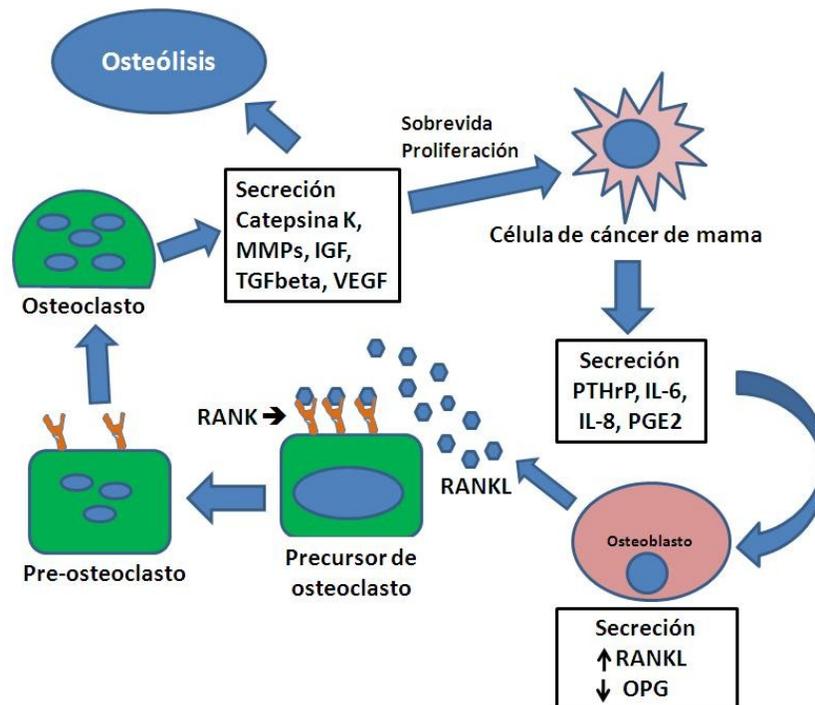


Figura 2. Adaptado de N. Brook et al. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 96 (2018) 63–78

Con respecto a la metástasis ósea en cáncer de próstata, las células tumorales generan varios factores de crecimiento, como endotelina 1 (ET-1) y proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), que reclutan células progenitoras osteoblásticas y estimulan la maduración produciendo hueso patológico nuevo denominado osteoide rodeando a la metástasis [29].

Actualmente, existen varios agentes terapéuticos para el tratamiento de las metástasis óseas, como los bifosfonatos y los inhibidores de la vía RANK/RANKL. Los bifosfonatos son agentes antireabsortivos: los de última generación como el pamidronato, alendronato, ibandronato, zolendronato, contienen nitrógeno y promueven, además, la apoptosis de los osteoclastos por la inhibición de la enzima farnesil difosfato sintasa [30]. Estos compuestos reducen significativamente el riesgo de eventos relacionados con el esqueleto, pero no mejoran la supervivencia de los pacientes [31]. A pesar de los beneficios clínicos del tratamiento con bifosfonatos, estos se asocian principalmente con la osteonecrosis de la mandíbula (ONJ) [32], efectos secundarios gastrointestinales [31] y toxicidad renal [33].

Dentro de los inhibidores de la vía RANK/RANKL, está el Denosumab (AMG162 / Xgeva) que es un anticuerpo monoclonal completamente humano que se une a RANKL para inhibir la resorción ósea mediada por señalización de RANKL/RANK [34], suprime el recambio óseo y reduce el riesgo de eventos relacionados al esqueleto, en pacientes con metástasis óseas [35]. Ensayos clínicos con pacientes con cáncer de mama y metástasis óseas, muestran que el Denosumab fue superior al ácido Zoledrónico [36, 37]. Como resultado de estos hallazgos, Denosumab se agregó a la lista de la Guía de Práctica Clínica de la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) como agente modificador óseo recomendado para el tratamiento del cáncer de mama metastásico [38].

Diferentes blancos terapéuticos están emergiendo con potencial utilidad clínica para el tratamiento de metástasis óseas. Estos incluyen un universo amplio de moléculas que incluyen a inhibidores de cathepsina K (odanacatib), inhibidores de Src (saracatinib), bloqueantes de TGF- β , inhibidores de CXCR4 y antagonistas de integrinas $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ [29].

- **NUEVAS ALTERNATIVAS EN EL TRATAMIENTO DE LA DISEMINACIÓN METASTÁSICA**

Al momento del diagnóstico, un alto porcentaje de pacientes ya presenta diseminación en ganglios linfáticos u otros órganos distantes, muchas veces no detectados por estar bajo los niveles de sensibilidad de los métodos diagnósticos en uso. Por lo tanto, el tratamiento de la metástasis debería abocarse a frenar los últimos pasos de la cascada metastásica, como la angiogénesis y la colonización en el órgano blanco. Sin embargo, el modelo de nicho premetastásico sugiere que sería beneficioso aplicar tempranamente terapias sistémicas que apunten al microambiente metastásico, quizás en forma conjunta con el tratamiento inicial del tumor primario. Las características del nicho premetastásico, como

los acúmulos de células mieloides, fibroblastos activados o fibronectina del estroma, podrían utilizarse para identificar una tendencia a desarrollar enfermedad metastásica en forma más temprana [39].

Puesto que se desconoce aún el perfil de la célula que es capaz de iniciar y mantener la metástasis, la cual podría tener una respuesta diferente a los tratamientos convencionales comparada con la célula del tumor primario, la preocupación principal de los médicos oncólogos es determinar si se está atacando a la célula correcta. Es probable que las CTC o las células quiescentes que se alojan en el órgano blanco, aunque minoritarias, tengan un profundo significado biológico en términos de la erradicación o cronificación de metástasis. Además, se conoce que los tumores son heterogéneos, compuestos de múltiples clones que muestran distinta sensibilidad/ resistencia a las drogas citotóxicas, imponiendo un desafío aún mayor para el desarrollo de terapias exitosas. La necesidad de entender la biología de la metástasis se incrementa con el progreso de la oncología clínica hacia una medicina personalizada del cáncer. La disección de los componentes moleculares y celulares que dirigen los patrones de especificidad de órgano dará lugar a una mejor clasificación de los tumores en base a marcadores moleculares del potencial metastásico y, permitirá una intervención terapéutica más efectiva contra la enfermedad metastásica latente y activa.

Los tratamientos deberían ser ajustados a cada etapa de la progresión metastásica: premetastásica, micrometastásica y macrometastásica. Sin embargo, falta aún transitar un largo recorrido hasta que la información que provee este tipo de estudios se convierta en una verdadera herramienta a nivel clínico.

Bibliografía

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2016; 66(1):7–30.
2. Rankin EB, Giaccia AJ. Hypoxic control of metastasis. *Science*. 2016; 352(6282):175–80.
3. Massague J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*. 2016;529 (7586):298–306.
4. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet*. 1889; 133(3421):571–3.
5. Fidler IJ, Poste G. The “seed and soil” hypothesis revisited. *The Lancet Oncology*. 2008;9 (8):808.
6. Ewing J. *Metastasis, neoplastic disease: a treatise on tumors*. London: Philadelphia and London; 1928.
7. Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XH, Norton L, Massague J. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell*. 2009;139(7): 1315–26.
8. Comen E, Norton L, Massague J. Clinical implications of cancer self-seeding. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(6):369–77.
9. Douglas Hanahan, Judah Folkman. Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell* 1996;86,353–364 ()

10. Auguste, P. et al. Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2005. 54, 53–61
11. Thiery, J. P. & Sleeman, J. P. Complex networks orchestrate epithelial mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. 7, 131–142
12. Chambers, A. F., Groom, A. C. & MacDonald, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* 2002. 2, 563–572.
13. Adjei, I. M. & Blanka, S. Modulation of the tumor microenvironment for cancer treatment: a biomaterials approach. *J. Func. Biomater.* 2015. 6, 81–103
14. Douma, S. et al. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature* 2004. 430, 1034–1039.
15. Gao, X. I, et al. Cancer cell dormancy: mechanisms and implications of cancer recurrence and metastasis. *OncoTargets and Therapy*, 2017; 10 5219–5228.
16. Fidler, IJ, et al. Critical determinants of cancer metastasis: rationale for therapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1999; 43 Suppl: S3-10.
17. Bal de Kier Joffé E, Alonso DF, Puricelli L. Soluble factors released by the target organ enhance the urokinase-type plasminogen activator activity of metastatic tumor cells. *Clin Exp Metastasis.* 1991; 9:51-6.
18. Ladeda V, Adam A, Puricelli L, Bal de Kier Joffé E. Apoptotic cell death induced by anticancer drugs is prevented by soluble factors present in the target organ of metastasis. *Breast Cancer Res & Treat.* 2001, 69/1: 39-51.
19. Brown DM, Ruoslahti E. Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis. *Cancer Cell.* 2004; 5:365-74.
20. Minn AJ, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature.* 2005; 436:518 -24.
21. Minn AJ, et al. Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors *J Clin Invest.* 2005; 115:44-55.
22. Padua D, et al. TGFβ primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell.* 2008; 133:66-77.
23. Kaplan RN, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature.* 2005; 438:820-7.
24. Qiao, H. et al. Engineering 3D approaches to model the dynamic microenvironments of cancer bone metastasis. *Bone Research* 2018. vol 6.
25. Weidle, U. H. et al. Molecular mechanisms of bone metastasis. *Cancer Genom. Proteom.* 2016. 13, 1–12.
26. Müller, A., et al., Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001. 410 (6824), 50–56.
27. Pohlodek, K., et al. Cadherin-11 expression is upregulated in invasive human breast cancer. *Oncol. Lett.* 2016. 12 (6), 4393–4398.
28. Brook N, Brook E, Dharmarajan A, Dass CR, Chan A. Breast cancer bone metastases: pathogenesis and therapeutic targets. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018. Mar; 96:63-78.
29. Rucci N, Millimaggi D, Mari M, Del Fattore A, Bologna A, Teti A, Angelucci A and Dolo V: Receptor activator of NF-κB ligand enhances breast cancer-induced osteolytic lesions through upregulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147. *Cancer Res* 2010. 70: 6150-6160.
30. Dunford, J.E., et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by

- nitrogencontaining bisphosphonates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001. 296 (2), 235–242.
31. Wong, M.H., Stockler, M.R., Pavlakis, N. Bisphosphonates and Other Bone Agents for Breast Cancer. The Cochrane Library. 2012.
 32. Barasch, A., et al. Risk factors for osteonecrosis of the jaws: a case-control study from the CONDOR dental PBRN. *J. Dent. Res.* 2011. 90 (4), 439–444.
 33. Markowitz, G.S., et al. Toxic acute tubular necrosis following treatment with zoledronate (Zometa). *Kidney Int.* 2003. 64 (1), 281–289.
 34. Bekker, P.J., et al., A single-dose placebo-controlled study of AMG 162: a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. *J. Bone Miner. Res.* 2004. 19 (7), 1059–1066.
 35. Lipton, A., et al. Randomized active-controlled phase II study of denosumab efficacy and safety in patients with breast cancer-related bone metastases. *J. Clin. Oncol.* 2007. 25 (28), 4431–4437.
 36. Fizazi, K., et al., Randomized phase II trial of denosumab in patients with bone metastases from prostate cancer: breast cancer, or other neoplasms after intravenous bisphosphonates. *J. Clin. Oncol.* 2009. 27 (10), 1564–1571.
 37. Stopeck, A.T., et al., Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, doubleblind study. *J. Clin. Oncol.* 2010. 28 (35), 5132–5139.
 38. Van Poznak, C.H., et al., American Society of Clinical Oncology executive summary of the clinical practice guideline update on the role of bone-modifying agents in metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2011. 29 (9), 1221–1227.
 39. Steeg, P. Targeting metastasis. *Nature Reviews Cancer* vol 16, 201-218. 2016.