

# PROGRESIÓN TUMORAL Y METASTASIS

Francisco Arvelo<sup>1,2</sup>, Felipe Sojo<sup>1,2</sup> y Carlos Cotte<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Biociencias, Fundación Instituto de Estudios Avanzado-IDEA, Caracas 1015-A; Venezuela, Apartado 17606. <sup>2</sup>Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores, Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela, Apartado 47114, Caracas-Venezuela, 1041-A.

Correspondencia: [franarvelo@yahoo.com](mailto:franarvelo@yahoo.com)

**Resumen.** Los dos mecanismos biológicos que determinan la malignidad del cáncer son la *infiltración* y la *metástasis*, para los cuales el *microambiente tumoral* juega un papel decisivo al crear y establecer las características de crecimiento, morfología e invasividad de un tumor maligno. El microambiente está formado por un tejido complejo que contiene la matriz extracelular, las células tumorales y no tumorales, una red de señales por citosinas, quimosinas, factores de crecimiento, proteasas, que controlan la comunicación autocrina y paracrina entre las células individuales, haciendo posible la progresión tumoral. Durante el desarrollo del tumor primario, el estroma tumoral y los continuos cambios genéticos en sus células hacen factible que ellas migren, debiendo contar con un *nicho premetastásico* receptor que permita su supervivencia y su crecimiento a distancia. Estos nichos son inducidos por factores producidos por el tumor primario, que si es erradicado, los nichos activos pasan a ser los responsables de la activación de las células diseminadas que están en estado de latencia. Dada la importancia de estos mecanismos se revisan las estrategias que desarrollan las células tumorales durante la progresión tumoral y la forma en que el microambiente influye en la formación de las metástasis. También se plantea que el *nicho metastásico* puede ser un blanco ideal para nuevas terapias que hagan posible el control de las metástasis.

**Palabras clave.-** cáncer, infiltración, metástasis, microambiente, nicho metastásico, latencia, transición epitelio/mesénquima

## Introducción

El término *metástasis* se define como “*el proceso de diseminación de las células cancerosas desde su lugar de origen hasta un órgano distante*” (1), siendo un proceso complejo, que comprende varias etapas: a) la activación de la transición epitelio/mesénquima o EMT en inglés, durante el cual las células cancerosas pierden tanto el contacto célula-célula como la adhesión al sustrato, adquiriendo la propiedad de movimiento; b) la invasión local, para lo cual las células malignas degradan la lámina basal, que es la matriz extracelular especializada que organiza los tejidos epiteliales separándolos del estroma, que juega un papel importante tanto en la señalización como en ser reservorios de factores de crecimiento liberados por las células tumorales; c) la intravasación, durante la cual las células tumorales atraviesan la pared de los vasos sanguíneos y entran en la circulación; d) la capacidad de sobrevivir en el torrente

circulatorio; d) la extravasación, propiedad de las células tumorales de salir del torrente circulatorio, atravesando la pared de los vasos sanguíneos en el tejido de un órgano en particular; e) establecimiento de las células tumorales en los tejidos del órgano donde se va a formar la metástasis, es decir de un *nicho premetastásico* para crear un ambiente favorable para el crecimiento de las células cancerosas (Fig 1).

Cada uno de los pasos necesarios para que se produzca la metástasis, desde la llegada de las células malignas hasta su crecimiento y proliferación en el órgano huésped, está dirigido por las alteraciones genéticas y/o epigenéticas adquiridas y acumuladas durante el curso de la progresión del tumor (2,3). A pesar de los recientes avances en las técnicas quirúrgicas, la radioterapia y el desarrollo de terapias dirigidas molecularmente, la mayoría de las muertes debidas a cáncer -más del 90%- son el resultado del crecimiento progresivo de las metástasis resistentes a las terapias (4). Las células metastásicas proceden de una población de células biológicamente heterogéneas del tumor primario que en el tiempo son seleccionadas, experimentan una alta tasa de mutación espontánea, una mayor tendencia a sufrir una rápida diversificación fenotípica y ser resistentes a los tratamientos terapéuticos (5).

La supervivencia de las células malignas en el órgano receptor para formar micrometástasis no está asegurada, ya que pueden existir diferencias entre el microambiente del tumor primario y el lugar a donde se establecerán las células cancerosas (6). Por tal razón se ha propuesto *el modelo de nicho premetastásico*, el cual se puede describir como “*el lugar con las condiciones microambientales necesarias para la supervivencia de las células tumorales diseminadas*” (7). Para que su adaptación ocurra, ellas despliegan mecanismos para modificar el nuevo microambiente. Para ello establecen, junto con las células del estroma, una red de señalización para promover su crecimiento, satisfacer las demandas metabólicas para sintetizar proteínas proangiogénicas para formar nuevas redes vasculares y facilitar la supervivencia inicial en la nueva localización ectópica (8).

La metástasis es un proceso bastante ineficiente, por lo que es llamado “*ineficiencia metastásica*”, ya que en los modelos animales solo un 0,01% de las células tumorales que entran en la circulación tiene éxito en la formación de un tumor secundario (9). Con estos modelos ha sido posible seleccionar poblaciones de células con fenotipo metastásico, y que estas células presentan cada vez más una selectividad después de

cada ciclo de selección por un órgano específico en particular (10). Por otra parte, la inestabilidad genómica de las neoplasias aumenta la probabilidad de que algunas células adquieran competencias que le permitan desarrollar metástasis. Varios estudios han demostrado que el incremento de la capacidad metastásica no es el resultado de mecanismos de adaptación de las células tumorales que les permitan el crecimiento en un órgano específico, siendo más bien la selección gradual de un clon con mutaciones diferentes de las observadas en el tumor primario. La inestabilidad genómica y la heterogeneidad de las células cancerosas, se evidencia en las pérdidas, ganancias y reordenamiento cromosómicos de los tumores (11). Las nuevas tecnologías de *secuenciación en paralelo* han permitido el análisis de alta resolución del genoma de los pacientes con cáncer, haciendo posible comparar el tumor primario con respecto a la metástasis.

Estos estudios han puesto de manifiesto que existen genes inactivos en el tumor primario, mientras que en la metástasis ellos están activados, lo cual hace posibles activar otros oncogenes, confirmando el concepto de *heterogeneidad tumoral* (12). Adicionalmente, se ha observado que el patrón de mutaciones es compartido en la metástasis de un mismo órgano, en tanto que es diferente entre las metástasis de diferentes órganos de un mismo paciente, lo cual ha permitido establecer la hipótesis de que las metástasis derivan de una expansión clonal, donde los sub-clones que colonizan un órgano ya tiene alteraciones genéticas que permiten la adecuación específica al medio (13). El período de tiempo que transcurre entre la infiltración del órgano y la colonización del mismo, se conoce como *tiempo de latencia*, en la que algunas células tumorales se mantienen fuera del ciclo celular en los órganos secundarios, en tanto que otras son incapaces de provocar cambios angiogénicos necesarios para la expansión tumoral (14).

Por lo visto se puede asegurar que la metástasis es un proceso que está determinado por una compleja red de interacciones entre las células metastásicas y su microambiente en los órganos afectados, razón por la que se hace necesario actualizar los aportes realizados para el conocimiento de los diferentes elementos del microambiente que participan en la formación de la metástasis. Es necesario centrar la atención sobre las principales interacciones que se establecen entre las células tumorales y el microambiente a partir del tumor primario hasta alcanzar el sitio donde se origina y

desarrolla la metástasis. En todos estos fenómenos hay que considerar también el tiempo como un factor de singular y trascendental importancia (Fig.2).

### ***Componentes del nicho premetastásico.***

El nicho metastásico juega un papel fundamental dentro de los factores primordiales que determinan el éxito o el fracaso de la metástasis. En su formación ocurren una serie de eventos donde destacan: la *modificación de la matriz extracelular*, MEC; la remodelación de la red vascular; la participación de células de la médula ósea; la hipoxia y la expresión de una gran variedad de moléculas de señalización. A ello se suma la participación de células no transformadas, como es el caso de los fibroblastos y las células endoteliales, más la deposición de moléculas tales como la fibronectina, tenascina-c y la periostina (15). En cuanto a tejidos receptores particulares, la fibulina-5 reduce sus niveles para que la metaloproteasa MMP-9 remodela la matriz en la metástasis del hígado y pulmón, contribuyendo de esta manera a la formación del nicho metastásico (16). La enzima lisil-oxidasa, LOX, participa activamente en la remodelación de la matrix MEC y en la formación del nicho, ya que esta enzima tiene la capacidad de enlazarse al colágeno y la elastina. La expresión de la enzima LOX es incrementada en las células tumorales expuestas a condiciones de hipoxia (17). El desarrollo y consolidación de estas investigaciones tienen su origen en los trabajos pioneros de Kaplan y col (18), quienes utilizaron tantas muestras de tejidos humanos de pacientes con cáncer como las líneas celulares LLC y la B16 en un modelo animal. Ellos demostraron que las células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea, que expresan el receptor-1 del factor vascular de crecimiento endotelial VEGFR-1, forman agregados celulares en los nichos pre-metastásicos. La utilización de anticuerpos específico contra VEGFR-1, así como la eliminación de estos agregados celulares pre-metastásicos impiden la formación de la metástasis. También estudiaron la adhesión y formación de agregados celulares después de la implantación de las células tumorales, observando un incremento en la expresión de la fibronectina y un aumento en la proliferación de los fibroblastos residentes en respuesta al tumor primario. Por otra parte, las metaloproteasas -en particular MMP-9 producidas por las células progenitoras de la médula ósea- degradan la membrana basal acelerando la extravasación de células con fenotipo VEGFR-1<sup>+</sup> en el nicho. Junto a la fibronectina, asociada con las células estromales, las células VEGFR-1<sup>+</sup> alteran el ambiente local, lo cual activa la integrina y la quimiosinas para promover la adhesión, supervivencia y crecimiento de

las células tumorales. El tumor primario induce la producción de MMP-9 de las células endoteliales y macrófagos del pulmón a través de un mecanismo dependiente de VEGFR-1/FLT-1 tirosina quinasa, TK, que promueven la metástasis. Por otra parte, en muestras extraídas de pacientes que poseían tumores en otros órganos fuera del pulmón se examinó la expresión de MMP-9 en regiones sanas del pulmón. En el pulmón de pacientes con cáncer de esófago, melanoma, ovario, etc se encontró una alta expresión de MMP-9, lo cual sugiere que los tumores primarios pueden estimular la producción de MMP-9 en regiones pre-metastásicas (19).

### *Tipos de células*

Existen varios tipos de células que forman parte de los componentes importantes del nicho metastásico, destacando poblaciones heterogéneas de células inmunes, células endoteliales, fibroblastos, macrófagos, pericitos y células progenitoras de la médula ósea, entre las que destacan:

*Las células inmunes.*- Están representadas por las células que participan activamente en los procesos de inmunidad, incluyendo macrófagos, neutrófilos, mastocitos, células supresoras de origen mieloide, células dendríticas, células asesinas naturales o NK, más células de la inmunidad adaptativa tales como linfocitos T y B. Las células inmunes que infiltran el tumor, excluyendo las células NK, producen citosinas promotoras de tumores tales como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  o TNF $\alpha$  y los tipos interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, que incrementan la señalización en las células pre-malignas. Así mismo, esta señalización no sólo estimula la progresión tumoral, sino que induce la producción de citosinas por parte de las propias células tumorales (20).

*Neutrófilos.*- Son los leucocitos humanos más abundantes, siendo las primeras células que acuden al sitio de la infección. Su degranulación libera enzimas líticas, así como también especies reactivas ROS, O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HOCL con potencial microbiano (21). También producen citosinas como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1R $\alpha$ , IL-12 y VEGF; las quimiosinas CXCL1, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CCL3, and CCL4, involucradas en la angiogénesis (22). La quimiosina CXCL8 es producida abundantemente por las células tumorales, que liberadas al microambiente, representan un potente quimioatrayente de neutrófilos al interior del tumor. Además, CXCL8 y otras quimiosinas se han asociado con la angiogénesis por activación directa de CXCR2 (23) extracelular, en particular la MMP9 (24). La citosina TNF $\alpha$ , liberada en el microambiente tumoral, está relacionada

con la progresión tumoral induciendo la degranulación de los neutrófilos, liberando VEGF y favoreciendo la angiogénesis por la producción de CXCL8, CXCL1 (25)

*Células Dendríticas.*- Representan una población heterogénea constituida por dos tipos de células: la mielóide CD11c<sup>+</sup> y CD123<sup>lo</sup> y las plasmocitoides CD11c<sup>-</sup> y CD123<sup>hi</sup> (26). Se ha demostrado que en diversos tipos de tumores, ellas presentan alteraciones específicas en su capacidad estimulante con el consecuente desarrollo anómalo de la diferenciación de las células mieloides (27). Uno de los mecanismos por medio del cual hay una diferenciación anormal de las células mielóide, es la activación constitutiva de los traductores de señal del activador de transcripción-3, STAT3 que promueve la proliferación continua y la acumulación de células mieloides inmaduras, contribuyendo a la supresión de la respuesta inmune ante el tumor asociada a la angiogénesis (28). Dos moléculas pro-inflamatorias liberadas por las células dendríticas, como son TNF $\alpha$  y la osteopontina, están asociadas a la angiogénesis (29,30). Las células dendríticas pueden secretar quimiosinas proangiogénicas tales como CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL8 y CCL2 (31). Por el contrario, células dendríticas maduras pueden inhibir la angiogénesis por la liberación de la citosina IL-12 y las quimiosinas CXCL9, CXCL10 y CCL21 (32).

*Células supresoras de origen mielóide.*- Estas células, por sus siglas MDSCs, representan un papel activo en la promoción de tumores y en la evasión de la respuesta inmune. Cuando son células inmaduras parecen tener características de monocitos/macrófagos y granulocitos. (33). Altos niveles de factores pro-inflamatorios en el ambiente microtumoral, tales como GM-CSF, IL-1b, IL-6, y S-100, inducen el reclutamiento y expansión de las células supresoras de origen mielóide, aumentando la actividad pro-tumoral (34). Por otra parte, las MDSCs participan en la promoción de la angiogénesis del tumor, a través de la liberación de factores solubles tales como MMP9 y VEGF. Datos experimentales sugieren que estas células son también capaces de diferenciarse en células endoteliales (35).

*Células asesinas naturales.*- Estas células, conocidas como NK, son efectoras de linfocitos de la inmunidad innata que potencialmente pueden controlar los tumores por su actividad citotóxica. Como otros tipos celulares, las células NK pueden infiltrarse dentro de la masa tumoral, donde su microambiente es capaz de afectar la funcionalidad de estas células por una amplia gama de citosinas y factores solubles, ya sea inhibiendo

la función citotóxica o promoviendo el fenotipo angiogénico. Células NK del tipo CD56<sup>bright</sup> y CD16<sup>-</sup> predominante en el cáncer de pulmón, ejercen baja citotoxicidad en las células K562 (36). Se ha reportado que la infiltración de células NK en cáncer de pulmón (NSCLC) produce elevados niveles de VEGF, PIGF y IL-8, induciendo “*ex vivo*” actividad angiogénica (37). La reducción de la actividad de las células NK se asocia con la generación del nicho premetastásico y la eficiencia de la metástasis en modelos murinos (38).

*Células T.*- La inhibición del flujo de linfocitos T durante la angiogénesis y la remodelación del estroma representa una característica del microambiente tumoral, dando lugar a alteraciones de su funcionalidad. Ello es debido a la activación y expansión de las células mieloides y los factores solubles secretados por el tumor y las células inflamatorias. El típico ambiente tumoral inmunosupresivo es caracterizado por una fuerte inducción de CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3 Treg y activación de Th2, Th17 (39,40). En el cáncer de ovario la hipoxia induce la angiogénesis en humanos y ratones, donde CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg secreta altas cantidades de VEGFA y promueve la proliferación de células endoteliales tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”. En un tumor de ovario trasplantado en ratón, la depleción de Treg se correlaciona con una reducción de VEGFA, sugiriendo el papel de Treg en la angiogénesis en este tipo de tumor (41)

*Células B.*- La estimulación de las células B culmina en la producción de las inmunoglobulinas Ig que participan en la inmunidad humoral. Ellas segregan una variedad de citosinas como las interleucinas IL-6, IL-10, el factor de necrosis tumoral TNF- $\alpha$ , el factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos GM-CSF y la linfotoxina LT, que participan en la inmunidad humoral (42). En el desarrollo de tumores sólidos, con características similares a los tejidos dañados con disfunción inmune, como lo es la infiltración de células inmunes crónica, remodelación tisular o la angiogénesis, no es sorprendente que individuos con enfermedades autoinmunes presentan un mayor riesgo de sufrir cáncer (43). Proteínas del complemento se asocian con las inmunoglobulinas y forman complejos circulantes inmunológicos CIC, cuya deposición en el parénquima es debida a los defectos en la red vascular, bien sea por el tumor o por una angiogénesis patológica, lo cual inicia una cascada de reacciones (44). En algunos tipos de cáncer se ha encontrado que los niveles de complejo CIC en el parénquima tumoral se correlacionan con un aumento de la carga tumoral, por tanto indica un mal pronóstico (45). En el modelo de ratón K14-HPV16, portador de un carcinoma de células escamosas SCC, la supresión de linfocitos B y T produjo una

disminución de la angiogénesis y de la hiperproliferación epitelial. La transferencia de células B (B220+CD19+) de ratones K14-HPV16 en ratones K14-HPV16, deficientes de linfocitos T y B, restauraron las características malignas como son la hiperproliferación y la angiogénesis. Estos datos señalan que la activación de las células B es esencial para el desarrollo de una neoplasia epitelial, y que mediadores solubles secretados por las células B son necesarios para establecer un proceso inflamatorio que potencie la progresión tumoral (46).

*Mastocitos.*- Representan un subtipo peculiar de granulocitos que desempeñan un papel central en el proceso inflamatorio, participando en la vascularización durante la artritis (47). También se han encontrado que participan en la vascularización de tumores malignos hematológicos, donde pueden integrarse en la pared del vaso por un proceso de mimetismo vascular (48). La participación de los mastocitos en el proceso de la angiogénesis está asociada con la producción de diversos citosinas y quimosinas (49). Por otra parte, las proteasas producidas por los mastocitos promueven la angiogénesis (50). La b-triptasa es una proteasa neutra que representa un abundante mediador que se encuentra almacenada en los gránulos de los mastocitos y juega un papel importante en la inflamación, ya que activa la liberación de la proteasa por los receptores tipo 2 que está directamente involucrado en la vascularización (51).

*Los macrófagos asociados al tumor.*- Los macrófagos asociados al tumor TAM, se comportan como reguladores de la tumorogénesis, bien sea como residentes o como derivados de la médula ósea o bazo. Los macrófagos son considerados clásicamente como células efectoras durante la defensa inmune, sin embargo numerosos estudios han demostrado su papel en la progresión tumoral (52). Estos macrófagos son una fuente importante de proteasas, como la cisteína y la catepsina, que participan en la progresión tumoral (53) Los TAM presentan funciones antagónicas entre la homeostasis del tejido normal y la tumorogénesis, razón por la cual los macrófagos son funcionalmente plásticos y pueden alterar su fenotipo para adaptarse a diferentes condiciones fisiológicas (54). Los TAM pueden presentar un fenotipo “M1” que producen la citosina pro-inflamatoria tipo I que participa en la presentación de antígenos, jugando un papel antitumorogénico, más un fenotipo “M2” que producen citosina tipo II que promueven la respuesta anti-inflamatoria y la función protumorogénica (55). Se ha sugerido que en algunas condiciones ambientales, como en la hipoxia tumoral, en una transición de



“M1” a “M2”, los TAM se acumulan en las regiones de hipoxia del tumor, además de la endotelina-2 y VEGF. Hay que destacar que la acumulación de TAM, se correlaciona con la angiogénesis y la posterior adquisición del fenotipo invasivo (56). Por otra parte, en un modelo de ratón, se ha identificado una población de *macrófagos asociado a la metástasis*, MAMs, que promueve la extravasación, diseminación y crecimiento de las células de cáncer de mama en el pulmón. La inhibición de la señalización por parte de CCL2-CCR2, inhibe la acumulación de MAMs y reduce la metástasis (57) Además, la coagulación juega un papel importante durante la metástasis, por lo que la proteína de coagulación o factor tisular TF se correlaciona con un mal pronóstico para los pacientes, ya que interfiere con las células NK a través de la lisis de las micrometástasis. La proteína TF induce la formación de coágulos de plaquetas que estimulan el reclutamiento de macrófagos derivados de la médula ósea, con la consiguiente supervivencia de las células de melanoma en el pulmón. Estos coágulos reclutan células MDSCs en los nichos secundarios, impidiendo el rechazo inmunológico del tumor (58).

*Fibroblastos asociados al cáncer.*- Los fibroblastos asociados al cáncer, CAFs, son las células predominantes del tejido conectivo responsables de la elaboración de los componentes de la matriz extracelular y la membrana basal, estando asociados a la diferenciación de las células epiteliales, siendo mediadores de la respuesta inmune (59). Estos fibroblastos son altamente numerosos en el microambiente tumoral, siendo muy distintos de los fibroblastos normales. En ratones, células epiteliales de próstata normal originan tumores intraepiteliales cuando se co-inyectaron con fibroblastos asociados al cáncer, pero no cuando se inyectaron con fibroblastos normales (60). Igualmente, en cáncer de mama, los fibroblastos asociados al cáncer estimula la metástasis de células malignas, mientras que los fibroblastos normales suprimen la metástasis (61) Esto evidencia que los fibroblastos asociados al cáncer constituye una célula algo diferente de su contraparte normal. Por otra parte, no está claro el origen de los fibroblastos asociados al cáncer durante la progresión de la enfermedad (62), algunos estudios sugieren que se generan a partir de la transición endotelio-mesénquimal EMT de las células endoteliales de los vasos sanguíneos asociados a los tumores (63) La transición TEM, promueve la generación de fibroblastos asociados al cáncer en la cual tumores de origen epitelial, como mama y próstata, las células epiteliales se dediferencian para generar células mesenquimales, que expresan marcadores de los fibroblastos asociados al cáncer (64). Los fibroblastos asociados al cáncer interactúan con las células tumorales

y otros componentes del estroma a través de la producción y secreción de diversos factores de crecimiento, citosinas y quimiosinas. Estos fibroblastos, activados por la infiltración de células inmunes, producen quimiosinas proinflamatorias como CXCL1 y CXCL2 mediante el reclutamiento de TAM en los tumores primarios (65), mientras que la quimiosina CCL5 secretada por fibroblastos asociados al cáncer reclutan las células T-reg -siglas de *tumor-infiltrating regulatory T cells*- por señalización a través del receptor CCR1 expresado en estas células (66). La CCL5 secretada por las *células madre mesenquimales*, MSC, también actúan a través del receptor CCR5 expresado por las células del carcinoma de mama, incrementando la invasión y la metástasis (67). Por otra parte, la quimiosina CXCL12 y el *factor de crecimiento de fibroblastos 2*, FGF-2, liberado por CAF, estimula la neoangiogénesis por reclutamiento de células progenitoras endoteliales y células endoteliales vasculares (68). En la transición epitelio-mesénquima, TEM, los fibroblastos asociados a tumores son activados por TGF- $\beta$ , PDGF, FGF y proteasas (69). Una vez activados los fibroblastos asociados al cáncer, estos secretan factores de crecimiento, incluyendo VEGF que induce permeabilidad vascular y la angiogénesis (70,71).

*Pericitos.*- Los pericitos son células mesenquimales especializadas que están relacionadas con el músculo liso, actúan como soporte de las células endoteliales y contribuyen tanto a la homeostasis como a la estabilización, maduración y remodelación de los capilares (72). La íntima relación anatómica entre células endoteliales y los pericitos sugiere una estrecha interacción mediante los contactos celulares a través de la señalización paracrina. El factor PDGFB, siglas de *Platelet-derived growth factor B*, es un miembro de la familia PDGF secretado por las células endoteliales que se une al receptor tirosín-quinasa PDGFR expresado en la superficie de los pericitos. Cuando el ligando PDGFB se une a PDGFR hay una dimerización y origina una cascada de señalización intracelular que promueve la proliferación y migración celular (73) La angiopoyetina-1, Ang-1, es un ligando soluble producido por los pericitos que se une al receptor tirosín-quinasa Tie-2 expresado por las células endoteliales (74). La interacción entre Ang-1 y Tie-2 es fundamental para la maduración y estabilización del endotelio (75). El TGF $\beta$ , siglas de *transforming growth factor* $\beta$ , es un factor de crecimiento expresado por las células endoteliales y los pericitos durante el proceso de la angiogénesis (76). La vascularización en los tumores es caótica e irregular, una inestabilidad que se ha atribuido frecuentemente a una reducción en el número de

pericitos. (77). La presencia de pericitos puede variar según el tipo de tumor, viéndose que aumentan, por ejemplo, en el carcinoma de páncreas y que disminuyen en los glioblastomas, hecho notable cuando se comparan con los tejidos normales respectivos. En realidad se encuentran presentes en la mayoría de los tumores, aunque su asociación con el endotelio sea anómala. (78). Diferentes estudios han demostrado que son imprescindibles para el mantenimiento de la red vascular tumoral, al igual que sucede con los vasos normales, ya que el VEGF producido por el pericito es necesario para la supervivencia de las células endoteliales en ambos contextos (79). Una hipótesis considera que la reducción del número de pericitos en los vasos tumorales podría aumentar la intravasación de células tumorales, promoviendo su diseminación hematológica (78). De hecho, se ha demostrado la existencia de una correlación inversa entre el contenido en pericitos de los vasos tumorales y el número de metástasis en pacientes con cáncer colorrectal (80).

### ***Conformación de un ambiente inflamatorio***

En el establecimiento de un tumor se puede generar un ambiente inflamatorio (81), habiéndose observado que en muchos de ellos se produce un ambiente pro-inflamatorio compuesto de citosinas, quimiosinas, factores de crecimiento, estroma activado, metaloproteinasas que degradan la matriz extracelular y agentes que inducen daño en el ADN (82). El microambiente inflamatorio inducido por las células tumorales afecta la función inmuno-efectora a través de células inmunosupresoras del tipo de *macrófagos asociados al tumor*, TAM, células mieloides inmaduras Gr1<sup>+</sup> y Mac1<sup>+</sup>, linfocitos T reguladores, T reg, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, natural killer T, NKT etc. Es también posible que suceda a través de la reducción del número de células dendríticas, esenciales para iniciar y mantener una respuesta inmune antitumoral (83). Las proteínas de fase aguda C reactiva o CRP, más la A-amiloidoide o SAA, desempeñan un papel muy importante en la inducción de este medio inflamatorio (84). Las proteínas SAA son también quimiotácticas para otras células inflamatorias tales como los mastocitos y linfocitos T (85), así como en la inducción de la expresión de enzimas para la remodelación de la matriz extracelular (86) y en la producción de citosinas inflamatorias como TNF- $\alpha$  que promueven el crecimiento tumoral (87). Las células mieloides supresoras CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup>, inhiben a las células T y NK protegiendo a las células tumorales de la destrucción inmunológica (88). Las células T reguladoras (T<sub>reg</sub>) se encuentran en el microambiente tumoral y presentan diferente actividad inmuno-moduladora en el cáncer (89) En

condiciones fisiológicas normales las células Treg regulan la expansión y activación de los linfocitos T y B, desempeñando un papel crítico en la homeostasis citotóxica de los linfocitos (90). En base a la respuesta a diferentes estímulos ambientales, las células T<sub>reg</sub> tienen diferentes efectos en la tumorigénesis, siendo un ejemplo los tumores de mama, en los cuales se observa que un incremento de las células T<sub>reg</sub> se correlaciona con una menor supervivencia (91), en tanto que en el cáncer colorrectal las T<sub>reg</sub> está asociado a una mejor supervivencia (92). Similar a las *células mieloides supresoras* o MDSCs, las células T<sub>reg</sub> suprimen la presentación del antígeno asociado al tumor, así como también interfieren con la función de las células T citotóxicas mediante la inhibición por la liberación de gránulos citolíticos (93). Las proteínas S100A8 y S100A9, producidas por los tumores primarios, inducen la acumulación de células progenitoras hematopoyéticas y macrófagos en regiones pre-metastásicas del pulmón. En estas regiones el suero amiloide A (SAA)<sub>3</sub>, inducido por S100A8 y S100A9, actúa como un agente de regulación en la acumulación de las células mieloides. En el pulmón, en las células endoteliales y macrófagos, el receptor Toll-like4, (TLR)4, actúa como receptor de A(SAA)<sub>3</sub> en la fase pre-metastásica, el cual a la vez estimula la señalización de NFκB facilitando la metástasis. Esta condición pro-inflamatoria acelera la migración de las células tumorales primarias al nicho pre-metastásico en el pulmón (94). En un modelo animal, con metástasis en el pulmón, se observaron cambios significativos en la permeabilidad vascular que contribuye para el establecimiento de la metástasis. El receptor MD2 representa un coreceptor de (TLR)4, el cual origina regiones de hiperpermeabilidad mediante la sobre regulación del receptor de quimiosina CCR2. El sistema CCR2-CCL2 induce la secreción de factores de permeabilidad tales como el suero amiloide A<sub>3</sub> y S100A8. Este resultado plantea la posibilidad de que la sobrerregulación de CCR2 represente un marcador para regiones de mayor susceptibilidad para la metástasis en cáncer de pulmón (95).

### ***Transición epitelio-mesénquima***

La invasión local implica cambios profundos en la adhesión y en las propiedades proteolíticas y migratorias de las células tumorales, lo que favorece la disociación celular, la degradación de la matriz extracelular y la migración a los tejidos adyacentes. Por otra parte, la excesiva proliferación de las células epiteliales y la angiogénesis son los marcadores de la iniciación y crecimiento, lo cual se puede observar en un carcinoma primario (96). Durante la progresión de un carcinoma, las células tumorales

aún diferenciadas alteran su genoma, lo que le confiere a la célula una ventaja en el crecimiento. En etapas posteriores, las células continúan cambiando su genoma y exhiben un fenotipo no diferenciado acompañado frecuentemente de una baja expresión de marcadores epiteliales, lo que conlleva a una pérdida de uniones intercelulares y de polaridad epitelial. A menudo estos cambios van acompañados de un incremento de la expresión de marcadores mesenquimales, así como de la movilidad de las células, lo que le otorga mayor capacidad invasiva. El proceso mediante el cual las células cambian de un fenotipo epitelial a un fenotipo mesenquimal es conocido como *transición epitelio-mesénquima* o EMT, siglas de *epithelial to mesenchymal transition*. Este proceso se puede definir como un programa celular que permite la transición fenotípica de célula epitelial a mesenquimal (97,98).

La zona marginal de un tumor es un lugar activo e interactivo de suma importancia en el microambiente tumoral, donde se acumulan células inmune y células estromales. En el caso de las células mieloides inmaduras que se acumulan en esta región, ellas impiden la diferenciación de las células presentadoras de antígenos, favoreciendo de esta manera la evasión por parte de las células tumorales (99). Los macrófagos son otro tipo de células principales que se encuentran en la zona marginal, los cuales son reclutados por productos secretados por las células tumorales (100). Los estudios han demostrado, mediante la presencia o ausencia de TGF-  $\beta$ , la importancia del estroma durante la transición epitelio-mesénquima en el cáncer (101). En los teratocarcinomas la acumulación de macrófagos induce la transición epitelio-mesénquima, debido al factor TGF-  $\beta$  producido por los macrófagos asociados a tumores (102).

También la transición epitelial-mesénquima puede ser inducida por TGF-  $\beta$  secretado por las plaquetas (103). Los macrófagos también promueven la invasión de las células tumorales a través del suministro de factores migratorios, tal como el EGF, que mediante la regulación en la producción de colágeno fibrilar, acelera la motilidad celular e induce la actividad proteolítica para la remodelación de la matriz extracelular (104). Durante la transición EMT se producen alteraciones en la adhesión célula-célula, interacción célula-sustrato, degradación de la matriz extracelular y en la reorganización del citoesqueleto (105). La EMT se alcanza completamente cuando tiene lugar la degradación de la membrana basal y una célula mesenquimática pueda migrar, adquiriendo así la capacidad invasiva, lo que permite la diseminación metastásica. La

activación del programa de la EMT se ha propuesto como mecanismo crítico para la adquisición del fenotipo maligno por las células epiteliales (106).

Las células que presentan la transición EMT y que se encuentran en el frente invasivo de los tumores primarios expresando marcadores mesenquimales que son capaces de efectuar la intravasación, siendo transportadas a través de la circulación para formas micro o macro metástasis (6). Por otra parte, las metástasis y los tumores primarios son histológicamente similares, lo cual puede interpretarse como una EMT reversible que permitiría, en primera instancia, la migración y diseminación hacia diferentes órganos. Una vez ubicadas las células que han presentado la EMT, activarían el programa opuesto, la transición MET, lo cual permitirá establecer colonias secundarias retomando la morfología epitelial y adquiriendo de nuevo la habilidad de crecer y proliferar (107).

### ***Regulación transcripcional de la transición epitelio-mesenquima.***

Un número elevado de procesos moleculares cooperan en la iniciación y finalización de la transición EMT, destacando la activación de factores de transcripción, la expresión de proteínas específicas de superficie, la reorganización y expresión de proteínas del citoesqueleto, la producción de enzimas que degradan la matriz extracelular y los cambios en la expresión de miRNAs (108). Un paso clave en la EMT, es tanto la reducción en la adhesión célula-célula mediante la represión transcripcional de las cadherinas, componentes de las uniones adherentes como de la ocludina y claudina componentes de las uniones estrechas, a lo que se suma las desmoplaquinas componentes de los desmosomas (109). La  $\beta$ -catenina forma parte de las uniones adherentes, por lo que al romperse ella se traslada al núcleo, donde funciona como cofactor de la familia de los factores de transcripción Tcf o T-cell factor/lef (110). Estos activan a su vez la transcripción de genes, como el *c-myc*, que incrementa la proliferación celular (111).

La expresión de los filamentos intermedios cambia durante la EMT con la sustitución de la queratina por la vimentina (112), en tanto que las metaloproteinasas aumentan durante la EMT participando en la pérdida de las uniones célula-célula y en la degradación de la membrana basal (113). Varios factores transcripcionales que regulan la EMT inhiben la apoptosis por activación de las vías MAPK y PI3K (114). Durante la progresión tumoral, la E-cadherina puede ser inactivada por represión mediante la hipermetilación y deacetilación del promotor por la unión a represores transcripcionales (115). **Mediante el análisis sobre el promotor proximal de la E-cadherina en el ratón se**

identificaron las *cajas E*, secuencias cortas de seis nucleótidos -CACCTG o CAGGTG-, que determinan la expresión específica en las células epiteliales. La inactivación de estas secuencias activa la transcripción de la E-cadherina en células mesenquimales, que indica la presencia de represores que silencian la expresión de esta proteína en células no epiteliales (116). Los primeros represores identificados fueron los factores de transcripción con dominios Zinc fingers, Snail 1 y Snail 2 (slug) (117,118) y los factores de transcripción Zeb1 y Zeb2 (119,120), todos ellos capaces de unirse a las cajas E del promotor de la cadherina. Otros represores incluyen los factores de transcripción basic hélix-loop-helix E12/E47 (TCF3) y Twist (121,122). Estos represores reprimen la E-cadherina mediante el reclutamiento de algunos co-represores, como por ejemplo, en el caso de twist, activando la expresión de otros represores de la E-cadherina. Por otra parte, la sobreexpresión de estos factores en las células epiteliales no solo produce la represión de la E-cadherina, sino también la reprogramación de la célula a un estado mesenquimal. Durante la EMT estos represores también reprimen otras moléculas de las uniones adherentes e inducen características mesenquimales de una manera coordinada (123). También la expresión de Snail 1 induce la expresión de fibronectina o de vitronectina (124). En el caso de Twist, este regulador de la EMT induce la expresión de la quinasa Akt2, un efector de PI3K y un regulador importante en las vías de supervivencia durante la EMT (125).

Los *small non-coding RNA* o microRNAs también actúan como reguladores de la transición EMT, inhibiendo la expresión génica a nivel post-transcripcional con la consiguiente reducción de la estabilidad de los mRNAs, que son su diana (126). Los constituyentes del nicho metastásico, así como la remodelación de la ECM, se han asociado con la inducción de la EMT. La periostina o factor 2-específico de osteoblastos, OSF-2 promueve su inducción (127). La EMT es inducida por las metaloproteinasas, MMPs que se activan en el nicho metastásico (128). La hipoxia también induce la activación de la transición EMT (129). Otros estudios han demostrado que la inducción de EMT en las células MCF10A, con alta expresión de SNAIL contribuye a: a) la resistencia de fármacos antitumorales b) la adquisición del fenotipo de células madre por incremento en la expresión de los marcadores de superficie CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> c) la capacidad de formar mamíferas (130). En el caso de la resistencia a las drogas, desarrollada por las células madre, representa uno de los mayores retos de la quimioterapia contra el cáncer (131). Esta afecta principalmente a

las células tumorales de rápida proliferación, mientras que las células madre crecen lentamente y poseen un eficiente mecanismo de resistencia. Esta resistencia a la terapia conduce a un aumento en la tasa de proliferación de las células madre, lo que conlleva a una recurrencia del cáncer y la metástasis (132).

### ***Vías de señalización que activan la transición epitelial***

La interacción de las células tumorales con el microambiente local inducen la secreción autocrina o paracrina de factores de crecimiento, citosinas y compuestos de la matriz extracelular que pueden desencadenar el programa molecular de la transición EMT (133). Se han asociado un gran número de vías de señalización y factores de crecimiento con la transición EMT, como el factor de crecimiento epidérmico EGF, el factor de crecimiento fibroblástico FGF (134) y el factor de crecimiento hepático o HGF (135). La vía Wnt/ $\beta$ -catenina está relacionado con la transición EMT (136), siendo también el factor TGF- $\beta$  otro inductor de la EMT, ya que las señales activadas por este factor inhiben algunas proteínas epiteliales, tales como la E-cadherina y queratina. También activan la expresión de proteínas mesenquimales como la fibronectina y vimentina y en el caso de TGF- $\beta$ , actúa en la activación de la EMT a través de las proteínas Smad (137). Otra vía implicada en la inducción de EMT es la activada por NOTCH, que a su vez es inducida por la hipoxia (138). El factor NF- $\kappa$ B, actúa como un regulador de la EMT, el cual es importante para la protección contra la apoptosis y en la inducción de la metástasis (139).

### ***Las metaloproteinasas***

Las *metaloproteinasas* o *MMPs* pertenecen a una familia de *endopeptidasas zinc-dependientes* que intervienen tanto en los procesos fisiológicos de la organogénesis y la cicatrización como en diversas condiciones patológicas, destacando el cáncer. (140) Aunque la primera función bien estudiada de las *metaloproteinasas* es la degradación de la MEC, actualmente se considera que cumplen un papel importante en el procesamiento de moléculas bioactivas tales como factores de crecimiento, citosinas y quimosinas, así como en sus respectivos receptores (141). Las MMPs modulan a los mediadores de la inflamación como las citosinas y quimosinas, estableciendo los gradientes necesarios para la quimiotaxis de las células inflamatorias. Ellas facilitan la



migración de células epiteliales al interactuar entre éstas y las proteínas de la MEC mediante la proteólisis de la misma matriz o de las proteínas de adhesión tisular, como las E-cadherinas (142). En la red vascular influyen la migración de células tumorales, la liberación de citosinas y factores de crecimiento unidos a la membrana celular, como el *factor de crecimiento transformante alfa* TGF $\alpha$  y el factor de crecimiento epidérmico EGF (143). En diversos tumores malignos hay sobre-expresión de ADAMs, *desintegrin* y *metaloproteinase* donde su papel en el crecimiento y diseminación tumoral está relacionado con su actividad proteolítica (144). Varias MMPs y MT-MMPs ejercen una importante acción activadora sobre otras pro-MMPs, siendo ellas mismas activadas por otras proteasas. Estos procesos tienen lugar habitualmente en el espacio extracelular, pero existe un grupo de proteasas, las MT-MMPs, MMP-11, MMP-23 y MMP-28 que se activan dentro de la célula por medio de una pro-proteína convertasa del tipo furina (145). Las MMPs también actúan como moléculas de señalización y pueden modular a su vez otras moléculas de señalización celular. El *factor de crecimiento derivado de plaquetas*, PDGF, produce aumento de la expresión de MMP-1, que actúa conjuntamente con TGF- $\beta$ , produciendo sobreexpresión de MMP-3 y TIMP-1 (146). El *factor de crecimiento epidérmico* EGF induce la expresión de MMP-1 (147) y el *factor de crecimiento de endotelio vascular* VEGF más el *factor de crecimiento de fibroblastos* FGF-2 son factores angiogénicos que pueden inducir la expresión de las proteasas MMPs, facilitando la diseminación metastásica (148). El *factor de necrosis tumoral  $\alpha$* , TNF $\alpha$ , es una citosina pro-inflamatoria liberada por macrófagos, linfocitos T y mastocitos que inducen la sobreexpresión de algunas MMPs como las MMP-2, 3, 7 y 9 en el microambiente tumoral, que aumenta la capacidad invasora de las células malignas (149).

### ***Las metaloproteinasas y la progresión del cáncer***

Las MMPs son las principales mediadoras en las alteraciones observadas en el microambiente tumoral durante la progresión del cáncer (150), que juegan en el crecimiento tumoral un papel fundamental en la degradación del tejido conectivo y los componentes de la membrana basal, además de activar factores de crecimiento, receptores de superficie para moléculas de adhesión y de quimiosinas (151). Esta interacción con los componentes MEC altera la respuesta celular al microambiente, haciendo que las células tumorales sean menos adherentes y con más posibilidades de migrar y producir metástasis (152). Durante la carcinogénesis las células tumorales

interaccionan con los factores de crecimiento, las citosinas y distintas células como las endoteliales, fibroblastos, macrófagos, mastocitos y pericitos, presentes en el microambiente tumoral (153). Todo esto demuestra que la remodelación de la MEC es un evento activo durante la progresión tumoral que lleva a la formación de un nicho para la supervivencia y proliferación de las células tumorales (154).

Las MMPs pueden jugar distintos papeles durante la progresión del cáncer, dependiendo del estadio del tumor. En estadios tempranos, la proteólisis de las MMP 3 y 7, que unen factores de crecimiento, contribuyen a la proliferación celular, pero más adelante, el clivaje de la E-cadherina y la CD44 activan la motilidad de las células tumorales facilitando la metástasis (155). Contrariamente, MMP-8 tiene un efecto protector al disminuir el potencial metastásico de las células del cáncer de mama (156), pero en el caso de la sobre-expresión de MMP-2 y 9, lo que indica un pronóstico desfavorable al degradar el colágeno tipo IV, que localizado en las membranas basales, induce la expresión de factores angiogénicos (157).

La invasión local de los tumores depende de la degradación de las proteínas de las membranas basales, como colágeno tipo IV o V y proteólisis del colágeno intersticial tipo I, II o III, presentes en el tejido conjuntivo que rodea las células tumorales (158). Adicionalmente, las MMPs intervienen en la angiogénesis, promoviendo la migración de células endoteliales, liberando factor VEGF y otros factores proangiogénicos de la MEC, tales como FGF-2 y TGF $\beta$ , que también favorecen la proliferación y migración de estas células (159,154). En modelos animales se ha demostrado que las MMPs regulan la formación y maduración de nuevos vasos sanguíneos a través del control que ejercen sobre los factores de crecimiento y citosinas, que actúan en el reclutamiento de pericitos (160). Algunas MMPs pueden tener un efecto inhibitorio sobre la angiogénesis; por ejemplo, la hidrólisis del plasminógeno genera fragmentos de angioestatina y la proteólisis del colágeno XVIII da origen a la endostatina (161). La transcripción de las MMPs es inducida por citosinas inflamatorias como IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  y factores de crecimiento como EGF, HGF y TGF- $\beta$ , por lo que tienen un papel preponderante en la inflamación crónica presente en el microambiente tumoral. Otros factores, como TGF $\alpha$  e IL-4 inhiben su expresión, pudiendo ser considerados blancos terapéuticos en el cáncer (162).

## ***La angiogénesis***

Es un mecanismo crucial en el desarrollo del cáncer debido a una necesidad creciente del suministro de oxígeno y nutrientes, ya que su falta conduciría tanto a la latencia como a la muerte de las células tumorales (163). La angiogénesis tumoral depende tanto de *factores de crecimiento angiogénicos*, donde hay estimuladores como la angiogenina, angiopoyetina-1, ciclo-oxigenasa, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento tumoral, producido por las células tumorales y del hospedador, así como de *factores antiangiogénicos*, que son inhibidores, dentro de ellos destacan la angiopoyetina-2, angiotastina, endotastina interferon- $\alpha/\beta$ , vasostastina, los cuales mantienen a los vasos sanguíneos existentes en un estado de quiescencia (164).

La vascularización del tumor requiere la participación de múltiples tipos de células del microambiente tumoral, destacando las células endoteliales vasculares, los pericitos y las células precursoras de la médula ósea, cuya participación está regulada por la hipoxia (165,166). Sumado a ello están los macrófagos asociados a tumores, los fibroblastos asociados a tumores, y las células madres mesenquimales, que también contribuyen a la vascularización del tumor por la liberación de señales pro-angiogénicas en el microambiente tumoral. En pacientes con cáncer de mama avanzado y vascularizado, se encontró en la circulación una alta movilización de *células madre mesenquimales* que se asocia con la quimioresistencia, lo que nos señala que estas células tienen una participación activa en la progresión tumoral (167,168). La linfoangiogénesis es otra ruta de vascularización de los tumores, ya que a través de los vasos linfáticos se pueden también diseminar las células cancerosas (169). En cáncer cervical humano, los macrófagos activados pueden producir los factores VEGF-C y VEGF-D, lo cual se correlaciona con la linfoangiogénesis (170).

Para iniciar la neo-vascularización, un tumor avascular debe adquirir un fenotipo angiogénico que le permite "*encender*" el interruptor angiogénico (171). Obviamente, el mecanismo mediante el cual se "conecta" el interruptor angiogénico debería involucrar sensores de presiones parciales de oxígeno suficientemente sensibles para detectar rápidamente la hipoxia producida en el interior del tumor sólido avascular (172). La respuesta a la hipoxia es la inducción del gen que codifica la proteína VEGF, considerada como el más potente inductor angiogénico, siendo también muy probable que existan otros factores que pueden jugar un papel en la respuesta del tumor a la

hipoxia (173). Se admite que el interruptor angiogénico está "apagado" mientras el efecto de las moléculas pro-angiogénicas quede contrarrestado por las moléculas anti-angiogénicas, por lo que el interruptor se encenderá cuando el balance neto se desplace a favor de la angiogénesis. La actividad angiogénica neta de un tumor es el resultado del desequilibrio entre señales estimuladoras e inhibitoras (174).

### ***Latencia y progresión tumoral***

Los tumores pueden permanecer en estado latente durante años a causa de un equilibrio entre proliferación y apoptosis, fenómeno que se puede definir "como un estadio de latencia temporal de la detención del crecimiento tumoral" (175). Esta condición se puede dividir en tres categorías:

a) *Latencia celular.*- Componentes estructurales del nicho pueden promover la supervivencia de las células tumorales manteniéndolas en estado de *latencia* (176), tal es el caso del citoesqueleto, el cual puede reactivar estas células, lo que sugiere que la rigidez de la matriz extracelular presenta la propiedad de promover la salida de la latencia. En un modelo "in vitro", usando células de un carcinoma hepatocelular, el aumento de la rigidez del microambiente estaba vinculado al factor TGF $\beta$ , por inducción de las ciclinas D1 y D3 (177), mostrando que los microambientes menos rígidos favorecen la latencia de las células tumorales. En un modelo de cáncer de mama se demostró que TGF $\beta$ 1 inducía la fibrosis por la deposición de colágeno tipo I en el pulmón, lo cual favorecía el escape de la latencia (178). En el cáncer de mama, los fibroblastos asociados al cáncer pueden interactuar con proteínas de la matriz extracelular para modular las adherencias intracelulares, contractibilidad celular y fuerzas dentro del microambiente tumoral. Se ha demostrado que la caveolina-1, Cav-1, producido por los fibroblastos promueve la rigidez del microambiente del tumor a través de la activación de la GTPasa, estimulando así la progresión tumoral (179). La inducción de la EMT dentro del nicho hace que las células tumorales entren en estado de latencia debido al aumento en los niveles de p16INK4a (180), la represión de la ciclina D (181) y una sostenida expresión de twist (182). La latencia confiere resistencia a las células tumorales ante la acción de agentes antitumorales, bien sea por arresto del ciclo celular o por una lenta proliferación que hace ineficaces la acción de los agentes antitumorales (183). Por otra parte, las células en latencia necesitan ser reactivadas para crecer y formar una metástasis. Una vez que el nicho ha madurado, algunos de sus

componentes pueden actuar para liberar a las células de la latencia. Alteraciones de las citosinas pueden liberar las células latentes, inducidas por las células TCD4+ (184). También, la remodelación de la matriz extracelular, a través del colágeno tipo I, ha sido implicado en la liberación de la latencia, a través de la señalización de las integrinas mediada por FAK (185). El receptor de la urokinasa uPAR activa a la integrina  $\beta 1$ , que al interactuar con la fibronectina, permite la liberación de la célula tumoral de la latencia (186).

*b) Latencia angiogénica.-* Al igual que los tejidos normales, los tumores le suministran nutrientes a las células, por lo que una ineficiente vascularización hace que la masa del tumor se mantenga constante debido a un equilibrio entre las células en división y las células que mueren. Esta es la razón por la cual las células tumorales, al formar una micrometástasis, tienen que vascularizarla para sobrevivir, ya que de no ocurrir, puede desaparecer o entrar en estado de latencia (187), condición en la cual permanecerá hasta que señales genéticas, epigenéticas y microambientales puedan activar la angiogénesis. En un estudio con ratones inmunodeficientes, portadores de un liposarcoma que es capaz de permanecer latentes por más de 90 días, se demostró altos niveles de trombospondina (TSP) y angiomotina (188). La trombospondina o TSP es una glicoproteína de la matriz celular que en condiciones fisiológicas es segregada por los fibroblastos y otras células, como las células endoteliales (189). Por otra parte, se encontró la TSP en células tumorales de cáncer de mama en latencia en contacto con la microvasculatura de los órganos en los que habrían hecho metástasis. En un modelo “*in vitro*” en tres dimensiones, las células endoteliales que forman parte de la red vascular producen la TSP que actúa como una supresora de la angiogénesis, lo que hace que mantengan a las células tumorales en estado de latencia. Esto puede explicar el efecto de la TSP en la latencia de las células tumorales (190). La TSP es una proteína supresora de la angiogénesis, sin embargo, con la formación de nuevos vasos las células endoteliales producen TGF $\beta 1$  y periostina (POSTN), lo cual va a permitir que las células en estado de latencia puedan iniciar su proliferación (191). La sobreexpresión de Notch- delta 4 (*DLL4*), en células endoteliales, puede promover la salida de las células T-ALL del estado de latencia por la unión al receptor Notch 3. Esta sobreexpresión de *DLL4* puede ser inducida por el *factor de crecimiento vascular endotelial* VEGF, con la consiguiente salida del estado de latencia (192).

c) *Latencia inmunológica.*- Un paso crítico en la progresión de los tumores es la evasión y supresión del sistema inmunológico del huésped (193), lo cual se puede lograr a través de la inhibición de las células inmunológicas efectoras o por la estimulación de las células inmunosupresoras. Uno de los mecanismos más frecuentes de evasión inmune en los pacientes es debida a la actividad de las células supresoras de origen mieloide MDSCs, las cuales se definen como células mieloides inmaduras inmunosupresoras que mantienen la homeostasis del tejido normal en respuesta a situaciones adversas tales como infecciones, estrés postraumático, etc (194). Durante la tumorigénesis, las células MDSCs se infiltran en el tumor promoviendo su vascularización (195) y perturbando los mecanismos inmunológicos tales como: la presentación de antígenos por parte de las células dendríticas DCs (196), la activación de las células T (197), la polarización de los macrófagos M1 (198) y la inhibición de las células NK citotóxicas (199). Las células MDSCs promueven la progresión tumoral, lo cual ha sido demostrado en modelos animales, siendo respaldado por el elevado número de estas células encontradas en pacientes con cáncer, lo que se correlaciona con lo avanzado de la enfermedad y el fracaso terapéutico (200).

### ***Estroma y crecimiento de las células tumorales: estudios preclínicos***

Como se ha visto, en un tumor las diferentes células del estroma pueden interactuar directamente entre si a través del contacto directo o por vía paracrina. En el caso particular de las células tumorales ellas pueden inducir alteraciones en las células del estroma y la matriz extracelular por diversos mecanismos. También pueden alterar el estroma por contacto célula-célula, modificar la matriz extracelular o liberar factores solubles. Con frecuencia secretan citosinas, quimiocitosinas, factores de crecimiento, metaloproteinasas y mediadores inflamatorios que pueden promover la invasividad. Sin embargo, no se conocen los mecanismos por los cuales las células del estroma facilitan el crecimiento de las células tumorales, siendo necesarios mayores estudios para comprender los mecanismos implicados entre las células y el microambiente tumoral para el diseño de nuevas estrategias contra el cáncer y mejorar los tratamientos existentes. Estudios preclínicos han ensayado tratamientos bloqueando los mecanismos que desarrollan las células tumorales para evadir la respuesta inmune. El *Ipilimumab*, un anticuerpo que activa las células T promoviendo la actividad antitumoral, fue ensayado en pacientes portadores de melanoma metastásico, incrementado con ello la sobrevida en comparación a pacientes no tratados con este anticuerpo (201). El anticuerpo CD40

reverte la supresión inmune activando las células presentadoras de antígenos y promocionando la respuesta antitumoral de las células T (202). En el cáncer se produce una elevada expresión de la *proteína de muerte celular programada 1*, PD-1. Habiéndose demostrado que el *Pembrolizumab* o MK-3475 bloquea la PD-1 y su ligando PD-L1 expresado en células tumorales en el microambiente tumoral, tanto en melanomas como en otros tipos de tumores (203). El *Dasatinib*, un inhibidor del gen Src, dificulta la supervivencia de las células tumorales de melanomas (204) en tanto que el CSF-1R, un regulador de los macrófagos asociados a tumores, inhibe la apoptosis, la migración e invasión en las células de la mama en caninos (205). El *Nintedanib* es un inhibidor simultáneo de VEGFR, PDGFR y FGFR, que muestra actividad inhibitoria antiangiogénica y antineoplásica en el cáncer de pulmón, impidiendo el crecimiento de las células tumorales (206). Por otra parte, se han utilizado para la terapia productos que impiden la degradación del hueso para evitar su colonización por parte de las células tumorales, como es el caso del cáncer de próstata. El micro ARN, miR-34<sup>a</sup>, actúa como un supresor de la osteoclastogénesis, resorción de hueso y formación de nicho metastásico impidiendo el establecimiento de las células metastásicas (207). El *Resveratrol* inhibe la transición EMT en la línea celular de cáncer de colon LoVo a través de la inhibición de la vía de TGF- $\beta$ 1/Smads mediado por la expresión de Snail/E-cadherina, impidiendo la invasión y metástasis (208). La *Curcumina* inhibe la transición EMT e induce la apoptosis en células de páncreas PANC-1 a través de la vía Shh-GLI1 (209).

## **Conclusión.**

El cáncer no es sólo la transformación de células individuales hacia un estado de proliferación celular, sino que es una disrupción en las formas en que los tejidos regulan sus procesos y afectan las interacciones sistémicas con el organismo afectado. En la actualidad los tratamientos fundamentales contra el cáncer siguen siendo la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, que usualmente destruye el tumor primario, pero cuya acción es muy limitada frente a la metástasis. Por ello es necesario seguir investigando para encontrar nuevos marcadores de pronósticos y nuevas dianas terapéuticas para la metástasis antes de que ocurra esta, ya que la detección temprana de estos marcadores podría determinar los casos en los que fuera necesario un tratamiento y evitarlo en aquellos pacientes sin riesgo de sufrir metástasis. Así, por ejemplo, el monitoreo de factores de crecimiento y de citosinas en la sangre que induzcan la formación del nicho

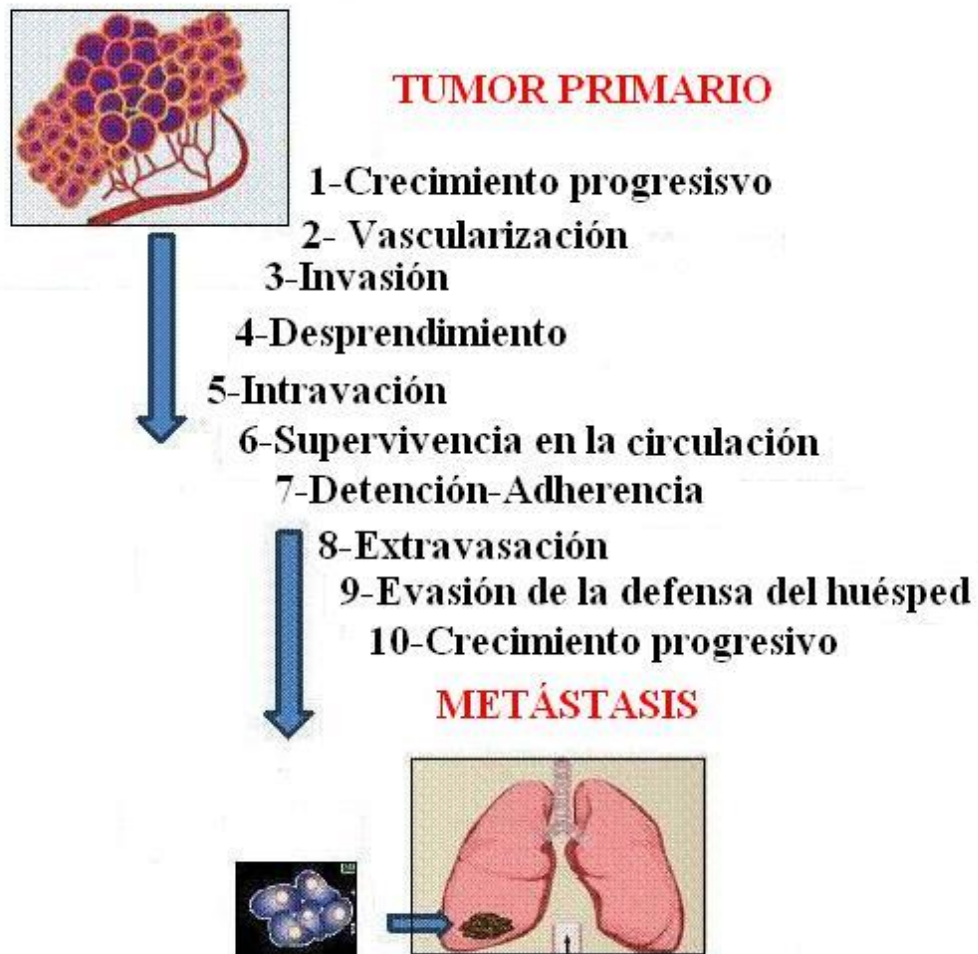
premetastásico, sería fundamental. Igualmente, determinar los niveles en sangre de componentes del nicho metastásico, tales como la proteína VEGFR1 circulantes o interfiriendo con la formación de componentes inflamatorios como las células mieloides tipo CD11b<sup>+</sup> que son indispensable para ello.

Los estudios tanto genéticos, de biología celular y molecular, más los del contexto ambiental interno y externo, indican que el crecimiento tumoral no solo está determinado solo por sus células, sino también el microambiente del tumor y todo el contexto en que se desarrolla el organismo. De esta forma la progresión del cáncer es el resultado de una relación muy compleja entre los diferentes tipos celulares malignos y no malignos, componentes del estroma y todo el conjunto del organismo.

Debido a la implicación de la metástasis en la mortalidad por cáncer, es necesario también buscar nuevos caminos donde se integren los dos enfoques que dominan la ciencia actual: la visión reduccionista y la visión sistémica sostenida por la ciencia de la complejidad.

FIGURA 1.





**Fig 1.-** Se muestran los pasos secuenciales en la patogénesis de las metástasis, donde cada paso es regulado por cambios transitorios o permanentes en el ADN, el ARN o por proteínas. También la mayoría de las células tumorales fallan en cumplir todos los pasos y las “pocas” células con competencia metastásica “vencen” los múltiples mecanismos que impiden la formación de metástasis.

FIGURA 2

## *Metástasis, Tiempo y Factores de Fracaso en el Tratamiento del Cáncer*

### ❖ Diagnóstico tardío debido a:

- ✓ *Tumores no operables*
- ✓ *Diseminación precoz*
- ✓ *Metástasis de primario oculto*

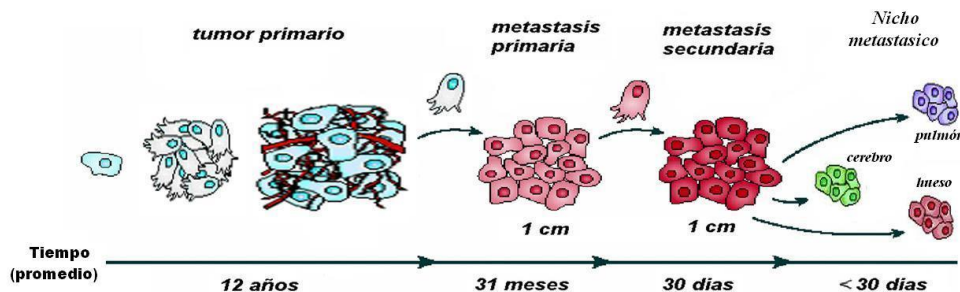
### ❖ Localización del tumor y/o metástasis en órganos vitales

### ❖ Daños por: compresión, invasión local o pérdida de función

### ❖ Toxicidad de los tratamientos

### ❖ Heterogeneidad tumoral

- ✓ *Inestabilidad génica y generación de células más malignas*
- ✓ *La progresión metastásica y la respuesta a los tratamientos pueden provocar cambios en las células del tumor primario y las metástasis, haciendo que puedan diferir entre sí*



**Fig 2.-** En la progresión metastásica el tiempo y los factores de fracaso que aquí se señalan juegan un papel crucial en el pronóstico y el tratamiento del paciente con cáncer, como se muestra en el modelo de progresión lineal de un tumor. En el tiempo, las células van incrementando su malignidad. Se incluye el concepto de metástasis de metástasis, cada vez más malignas, hasta la muerte del paciente, de no poderse controlar la enfermedad

## BIBLIOGRAFIA.

1. Lugassy C, Escande JP (1997) **The haematogenous theory of metastasis: Récamier did not propose it.** *Virchows Arch*; **431(5)**, 371.
2. Valastyan S, Weinberg RA (2011) **Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms.** *Cell*; **147**, 275-292.
3. Arvelo F and Poupon MF (2001) **Aspectos Moleculares y Celulares de la Metástasis Cancerosa** *Acta Cient Venez*; **52**, 304-312.
4. Langley RR, Fidler IJ. (2007) **Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis.** *Endocr Rev*; **28**:297-321.
5. Talmadge JE, Benedict K, Madsen J, Fidler IJ (1984) **Development of biological diversity and susceptibility to chemotherapy in murine cancer metastases.** *Cancer Res*; **44**:3801-3805.
6. Arvelo F (2013) **Micrometástasis: estrategias para su detección.** *Invest Clínic*; **54**:206-225.
7. Psaila B, Lyden D (2009) **The metastatic niche: adapting the foreign soil.** *Nature Reviews Cancer*; **9**: 285-293.
8. Folkman J (1971) **Tumor angiogenesis: therapeutic implications.** *N Engl J Med*; **285**: 1182-1186.
9. Fidler IJ (1970) **Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine.** *J Natl Cancer Inst*; **45**:773-782.
10. Hill RP, Young SD, Cillo C and Ling V (1986) **Metastatic cell phenotypes: quantitative studies using the experimental metástasis assay.** *Cancer Rev*; **5**: 118-151.
11. Ruddon, RW (1995) **Cancer Biology.** Oxford University Press, NY.
12. Vizoso M, Ferreira HJ, Lopez-Serra P, Carmona FJ, Martínez-Cardús A, Girotti MR. et al (2015) **Epigenetic activation of a cryptic TBC1D16 transcript enhances melanoma progression by targeting EGFR.** *Nat Med.* doi: 10.1038/nm.3863.
13. De Vita VT, Hellman S, Rosemberg SA (2004) **Cancer, Principles & Practice of Oncology.** Lippincott & Wilkins, NY.
14. Ghajar CM, Peinado H, Mori H, Matei IR, Evason KJ, Brazier, H et al (2013) **The perivascular niche regulates breast tumour dormancy.** *Nat Cell Biol*; **15**:807-817.

15. Oskarsson T, Acharyya S, Zhang XH, Vanharanta S, Tavazoie SF, Morris PG, et al (2011) **Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs.** *Nature Medicine*; **17**: 867-874.
16. Moller HD, Ralfkjaer U, Cremers N, Frankel M, Pedersen RT, Klingelhofer J et al (2011) **Role of fibulin-5 in metastatic organ colonization.** *Molecular Cancer Research*; **9**: 553-563.
17. Wong CC, Gilkes DM, Zhang H, Chen J, Wei H, Chaturvedi P et al. (2011) **Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; **108**: 16369-16374.
18. Kaplan RN, Riba R, Zacharoulis S, Bramley A, Vicent L, Costa C. et al. (2005) **VEGFR-1 positive haemopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche.** *Nature*; **438**: 820-827.
19. Kaplan RN, Rafiis S, Lyden D (2006). **Preparing the “soil” the premetastatic niche.** *Cancer Res*; **66**: 11089-11093.
20. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M (2010) **Immunity, inflammation, and cancer.** *Cell*; **140**:883-899.
21. Borregaard N, Cowland JB (1997) **Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte.** *Blood*; **89**:3503-3521.
22. Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA (2000) **The neutrophil as a cellular source of chemokines.** *Immunol Rev*; **177**:195–203.
23. Strieter RM, Burdick MD, Gomperts BN, Belperio JA, Keane MP (2005) **CXC chemokines in angiogenesis.** *Cytokine Growth Factor Rev*; **16**:593-609.
24. Hanahan D, Coussens LM (2012) **Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment.** *Cancer Cell*; **21**:309-322.
25. Balkwill F (2006) **TNF-alpha in promotion and progression of cancer.** *Cancer Metastasis Rev*; **25**:409-416.
26. Liu K, Nussenzweig MC (2010) **Origin and development of dendritic cells.** *Immunol Rev*; **234**:45-54.
27. Gabrilovich D (2004) **Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects.** *Nat Rev Immunol*; **4**:941-952.

28. Yu H, Pardoll D, Jove R (2009) **STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3.** *Nat Rev Cancer*; **9**:798-809.
29. Braumuller H, Wieder T, Brenner E, Assmann S, Hahn M, Alkhaled M, et al (2013) **T-helper-1-cell cytokines drive cancer in to senescence.** *Nature*; **494**:361-365.
30. Shinohara ML, Lu L, Bu J, Werneck MB, Kobayashi KS, Glimcher LH, et al (2006) **Osteopontin expression is essential for interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells.** *Nat Immunol*; **7**:498-506.
31. Scimone ML, Lutzky VP, Zittermann SI, Maffia P, Jancic C, Buzzola F, et al (2005) **Migration of polymorphonuclear leucocytes is influenced by dendritic cells.** *Immunology*; **114**:375-385.
32. Albini A, Brigati C, Ventura A, Lorusso G, Pinter M, Morini M, et al (2009) **Angiostatin anti- angiogenesis requires IL-12: the innate immune system as a key target.** *J Transl Med*; **7**:5-13.
33. Peranzoni E, Zilio S, Marigo I, Dolcetti L, Zanovello P, Mandruzzato S, et al (2010) **Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition.** *Curr Opin Immunol*; **22**:238-244.
34. Bunt SK, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S (2006) **Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression.** *J Immunol*; **176**:284-290.
35. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE (2008) **The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis.** *Nat Rev Cancer*; **8**:618-631.
36. Platonova S, Cherfils-Vicini J, Damotte D, Crozet L, Vieillard V, Validire P, et al (2011) **Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma.** *Cancer Res*; **71**:5412-5422.
37. Bruno A, Focaccetti C, Pagani A, Imperatori AS, Spagnoletti M, Rotolo N, et al (2013) **The proangiogenic phenotype of natural killer cells in patients with non-small cell lung cancer.** *Neoplasia*; **15**:133-142.
38. Sceneay J, Chow MT, Chen A, Halse HM, Wong CS, Andrews DM, et al (2012) **Primary tumor hypoxia recruits CD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>med</sup>/Ly6G<sup>+</sup> immune suppressor cells and compromises NK cell cytotoxicity in the premetastatic niche.** *Cancer Res*; **72**(16):3906-11 .doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3873.
39. Motz GT, Coukos G (2011) **The parallel lives of angiogenesis and immunosuppression: cancer and other tales.** *Nat Rev Immunol*; **11**:702-711.

40. Hoechst B, Gamrekelashvili J, Manns MP, Greten TF, Korangy F (2011) **Plasticity of human Th17 cells and iTregs is orchestrated by different subsets of myeloid cells.** *Blood*; **117**:6532-6541.
41. Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, Balint K, Barchetti A, Wang LP, et al (2011) **Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T (reg) cells.** *Nature*; **475**:226-230.
42. Pillai S, Mattoo H, Cariappa A (2011) **B cells and autoimmunity.** *Curr Opin Immunol*; **23**:721-731.
43. Bernatsky S, Ramsey-Goldman R, Clarke A (2006) **Malignancy and autoimmunity.** *Curr Opin Rheumatol*; **18**:129-134.
44. Gunderson AJ, Coussens LM (2013) **B cells and their mediators as targets for therapy in solid tumors.** *Exp Cell Res*; **319**:1644-1649.
45. Lu H, Goodell V, Disis ML (2008) **Humoral immunity directed against tumor-associated antigens as potential biomarkers for the early diagnosis of cancer.** *J Proteome Res*; **7**:1388-1394.
46. De Visser KE, Korets LV, Coussens LM (2005) **De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent.** *Cancer Cell*; **7**:411-423.
47. Mauri C, Bosma A (2012). **Immune regulatory function of B cells.** *Annu Rev Immunol*; **30**:221-41.
48. Nico B, Mangieri D, Crivellato E, Vacca A, Ribatti D (2008) **Mast cells contribute to vasculogenic mimicry in multiple myeloma.** *Stem Cells Dev*; **17**:19-22.
49. Marichal T, Tsai M, Galli SJ (2013) **Mast cells: potential positive and negative roles in tumor biology.** *Cancer Immunol Res*; **1**:269-279.
50. de Souza DA Jr, Toso VD, Campos MR, Lara VS, Oliver C, Jamur MC (2012) **Expression of mast cell proteases correlates with mast cell maturation and angiogenesis during tumor progression.** *PLoS One*; **7**(7):e40790. doi: 10.1371/journal.pone.0040790. Epub 2012 Jul 18.
51. Ammendola M, Sacco R, Sammarco G, Donato G, Montemurro S, Ruggieri E et al (2014) **Correlation between serum tryptase, mast cells positive to tryptase and microvascular density in colo-rectal cancer patients: possible biological-clinical significance.** *PLoS One*. Jun 10;9(6):e99512. doi: 10.1371/journal.pone.0099512. eCollection 2014.

52. Qian BZ, Pollard JW (2010) **Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis.** *Cell*; **141**:39-51.
53. Shree T, Olson OC, Elie BT, Kester JC, Garfall AL, Simpson K et al (2011) **Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer.** *Genes & development*; **25**:2465-2479.
54. Mosser DM, Edwards JP (2008) **Exploring the full spectrum of macrophage activation.** *Nature reviews Immunology*; **8**:958-969.
55. Biswas SK, Mantovani A (2010) **Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm.** *Nat Immunol*; **11**:889-896.
56. Escribese MM, Casas M, Corbi AL (2012) **Influence of low oxygen tensions on macrophage polarization.** *Immunobiology*; **217**:1233-1240.
57. Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR et al (2011) **CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis.** *Nature*; **475**:222-225.
58. Gil-Bernabe AM, Ferjancic S, Tlalka M, Zhao L, Allen PD, Im JH et al (2012) **Recruitment of monocytes/macrophages by tissue factor-mediated coagulation is essential for metastatic cell survival and premetastatic niche establishment in mice.** *Blood*; **119**:3164-3175
59. Kalluri R, Zeisberg M. (2006) **Fibroblasts in cancer.** *Nature reviews. Cancer*; **6**:392-401.
60. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR (1999) **Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium.** *Cancer research*; **59**:5002-5011.
61. Dumont N, Liu B, Defilippis RA, Chang H, Rabban JT, Karnezis AN et al (2013) **Breast fibroblasts modulate early dissemination, tumorigenesis, and metastasis through alteration of extracellular matrix characteristics.** *Neoplasia*; **15**:249-262.
62. Marsh T, Pietras K, McAllister SS (2013) **Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis.** *Biochimica et Biophysica Acta*; **1832**:1070-1078.
63. Potenta S, Zeisberg E, Kalluri R (2008) **The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression.** *Br J Cancer*; **99**:1375-1379.
64. Orr B, Riddick AC, Stewart GD, Anderson RA, Franco OE, Hayward SW et al (2012) **Identification of stromally expressed molecules in the prostate by**

- tag-profiling of cancer-associated fibroblasts, normal fibroblasts and fetal prostate.** *Oncogene*; **31**:1130-1142.
- 65.** Erez N, Truitt M, Olson P, Arron ST, Hanahan D (2010) **Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner.** *Cancer Cell*; **17**:135-47.
  - 66.** Tan W, Zhang W, Strasner A, Grivennikov S, Cheng JQ, Hoffman RM, et al (2011) **Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling.** *Nature*; **470**:548-53.
  - 67.** Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al (2007) **Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis.** *Nature*; **449**:557-63.
  - 68.** Orimo A, Gupta PB, SgROI DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al (2005) **Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion.** *Cell*; **121**: 335-348.
  - 69.** Marsh T, Pietras K, McAllister SS (2013) **Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis.** *Biochimica et Biophysica Acta*; **1832**:1070-1078.
  - 70.** Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, Selig M et al (1998) **Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells.** *Cell*; **94**:715-725.
  - 71.** Chowdhury R, Webber JP, Gurney M, Mason MD, Tabi Z, Clayton A (2015) **Cancer exosomes trigger mesenchymal stem cell differentiation into pro-angiogenic and pro-invasive myofibroblasts.** *Oncotarget*; **6**(2):715-731.
  - 72.** Dore-Duffy P, and Cleary K (2011) **Morphology and properties of pericytes.** *Methods Mol Biol*; **686**, 49-68.
  - 73.** Heldin CH, Westermark B (1999) **Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor.** *Physiol Rev*; **79**:1283-1316.
  - 74.** Sundberg, C, Kowanetz, M, Brown, LF., Detmar, M, Dvorak, HF (2002) **Stable expression of angiopoietin-1 and other markers by cultured pericytes: phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis in vivo.** *Lab Invest*; **82**:387-401.
  - 75.** Falcón B L, Hashizume H, Koumoutsakos P, Chou J, Bready JV, Coxon A et al (2009) **Contrasting actions of selective inhibitors of angiopoietin-1 and**



- angiopoietin-2 on the normalization of tumor blood vessels.** *Am J Pathol*; **175**: 2159-2170.
76. Goumans MJ., Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, Ten Dijke, P (2002) **Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors.** *EMBO J*; **21**:1743-1753.
77. Barlow KD, Sanders AM, Soker S, Ergun S, Metheny-Barlow LJ (2013) **Pericytes on the tumor vasculature: jekyll or hyde?** *Cancer Microenviron*; **6**:1-17.
78. Raza A, Franklin MJ, and Dudek AZ (2010) **Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis.** *American Journal of Hematology*; **85**: 593-598.
79. Darland DC, Massingham LJ, Smith SR, Piek E, Saint-Geniez M, D'Amore PA (2003) **Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival.** *Dev Biol*; **264**: 275-288.
80. Yonenaga Y, Mori A, Onodera H, Yasuda S, Oe H, Fujimoto A, et al (2005) **Absence of smooth muscle actin-positive pericyte coverage of tumor vessels correlates with hematogenous metastasis and prognosis of colorectal cancer patients.** *Oncology*; **69**:159-166.
81. Muller AJ, Scherle P (2006) **Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with small-molecules inhibitors.** *Nature Rev*; **6**: 611-625.
82. Le NT, Xue M, Castelnoble LA, Jackson CJ (2007) **The dual personalities of matrix metalloproteinases in inflammation.** *Front Biosci*; **12**: 1475-1487.
83. Nelson D, Ganss R (2006) **Tumor growth or regression: powered by inflammation.** *J Leukoc Biol*; **80**: 685-690.
84. Lukanidin E, Sleeman JP (2012) **Building the niche: the role of the S100 proteins in metastatic growth.** *Seminars in Cancer Biology*; **22**: 216-225.
85. Badolato R, Wang JM, Murphy WJ, Lloyd A R, Michiel DF, Bausserman LL, et al (1994) **Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes.** *The Journal of Experimental Medicine*; **180**: 203-209.
86. Malle E, Sodin-Semrl S, Kovacevic A (2009) **Serum amyloid A: an acute-phase protein involved in tumour pathogenesis.** *Cell Mol Life Sci*; **66**:9-26.

87. Grivennikov SI, Karin M (2011) **Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage.** *Annals of the Rheumatic Diseases*; **70** Suppl 1:104-108.
88. Yan HH, Pickup M, Pang Y, Gorska AE, Li Z, Chytil A, et al (2010) **Gr-1+ CD11b+ myeloid cells tip the balance of immune protection to tumor promotion in the premetastatic lung.** *Cancer Research*; **70**: 6139-6149.
89. Whiteside TL, Schuler P, Schilling B (2012) **Induced and natural regulatory T cells in human cancer.** *Expert Opinion on Biological Therapy*; **12**:1383-1397.
90. Gasteiger G, Hemmers S, Firth MA, Le Floc'h A, Huse M, Sun JC et al (2013) **IL-2-dependent tuning of NK cell sensitivity for target cells is controlled by regulatory T cells.** *J Exp Med*; **210**:1179-1187.
91. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, et al (2006) **Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse.** *J Clin Oncol*; **24**:5373-5380.
92. Frey DM, Drosler RA, Viehl CT, Zlobec I, Lugli A, Zingg U, et al (2010) **High frequency of tumor-infiltrating FOXP3(+) regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients.** *International Journal of cancer*; **126**:2635-2643.
93. von Boehmer H, Daniel C (2013) **Therapeutic opportunities for manipulating T (Reg) cells in autoimmunity and cancer.** *Nature Reviews. Drug Discovery*; **12**:51-63.
94. Hiratsuka S, Watanabe A, Sakura Y, Akashi-Takamura S, Ishibashi S, Miyake K et al. (2013) **The S100A8 serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes premetastatic phase.** *Nat Cell Biol*; **10**: 1349-1355
95. Hiratsuka S, Ishibashi S, Tomita T, Watanabe A, Akashi-Takamura S, Murakami M et al. (2013) **Primary tumours modulate innate immune signalling to create pre-metastatic vascular hyperpermeability foci.** *Nat Commu*,**4**: 1853.doi:10.1083/n communs 2856.
96. Hanahan D, Weinberg RA (2000) **The hallmarks of cancer.** *Cell*; **100**:57-70.
97. Thiery JP, Sleeman JP (2006) **Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions.** *Nat Rev Mol Cell Biol*; **7**:131-42.

98. Hay ED (1995) **An overview of epithelio-mesenchymal transformation.** *Acta Anat (Basel)*; **154**:8-20.
99. Gabilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V (2012) **Coordinated regulation of myeloid cells by tumours.** *Nature reviews. Immunology*; **12**:253-268.
100. Condeelis J, Pollard JW (2006) **Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis.** *Cell*; **124**:263-266.
101. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA (2009) **Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease.** *Cell*; **139**:871-890.
102. Bonde AK, Tischler V, Kumar S, Soltermann A, Schwendener RA (2012) **Intratumoral macrophages contribute to epithelial-mesenchymal transition in solid tumors.** *BMC Cancer*; **12**:35. doi: 10.1186/1471-2407-12-35.
103. Labelle M, Begum S, Hynes RO (2011) **Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis.** *Cancer Cell*; **20**:576-590.
104. Gocheva V, Wang HW, Gadea BB, Shree T, Hunter KE, Garfall AL et al (2010) **IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion.** *Genes & Development*; **24**:241-255.
105. Huber MA, Kraut N, Beug H (2005) **Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression.** *Curr Opin Cell Biol*; **17**:548-558.
106. Thiery JP (2002) **Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression.** *Nat Rev Cancer*; **2**:442-54.
107. Tsai JH, Yang J (2013) **Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis.** *Genes Dev*; **27**:2192-2206.
108. Bullock MD, Sayan AE, Packham GK, Mirnezami AH (2012) **MicroRNAs: critical regulators of epithelial to mesenchymal (EMT) and mesenchymal to epithelial transition (MET) in cancer progression.** *Biol Cell*; **104**:3-12.
109. De Wever O, Pauwels P, De Craene B, Sabbah M, Emami S, Redeuilh G et al (2008) **Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front.** *Histochem Cell Biol*; **130**:481-94.

110. Kim K, Lu Z, Hay ED (2002) **Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT.** *Cell Biol Int*; 26:463-476.
111. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT et al (1998) **Identification of c-MYC as a target of the APC pathway.** *Science*; 281:1509-1512.
112. Omary MB, Coulombe PA, McLean WH (2004) **Intermediate filament proteins and their associated diseases.** *N Engl J Med*; 351:2087-2100.
113. Tania M, Khan MA, Fu J (2014) **Epithelial to mesenchymal transition inducing transcription factors and metastatic cancer.** *Tumour Biol*; 35:7335-7342.
114. Kajita M, McClinic KN, Wade PA (2004) **Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress.** *Mol Cell Biol*; 24:7559-7566.
115. Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, Ishi H, Beppu T, Nakamori S et al (2010) **Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance.** *Cancer Sci*; 101:293-299.
116. **Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, García De Herreros A (2000) The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells.** *Nat Cell Biol.*; 2:84-89.
117. **Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression.** *Nat Cell Biol.*; 2:76-83.
118. **Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, Berx G, Cano A, Beug H, Foisner R. (2005) DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells.** *Oncogene*; 24:2375-2385.
119. **Perez-Moreno MA, Locascio A, Rodrigo I, Dhondt G, Portillo F, Nieto MA, Cano A (2001) A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions.** *J Biol Chem*; 276:27424-27431.
120. **Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D, van Roy F (2001).The two-handed E box binding**

- zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion.**  
*Mol Cell*; **7**:1267-1278.
121. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg (2004) **RATwist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis.** *Cell*; **117**:927-939.
  122. Oda H, Tsukita S, Takeichi M. (1998) **Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during Drosophila gastrulation.** *Dev Biol.*; **203**:435-450.
  123. Thiery JP, Sleeman JP (2006). **Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions.** *Nat Rev Mol Cell Biol*; **7**:131-142 buscar numero anterior
  124. Cheng GZ, Chan J, Wang Q, Zhang W, Sun CD, Wang LH (2007). **Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel.** *Cancer Res*; **67**:1979-1987.
  125. Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME (2008). **The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2.** *Genes Dev*; **22**:894-907
  126. Creighton CJ, Gibbons DL, Kurie JM (2013) **The role of epithelial mesenchymal transition programming in invasion and metastasis: a clinical perspective.** *Cancer Manag Res*; **5**:187-195.
  127. Ruan K, Bao S, Ouyang G (2009) **The multifaceted role of periostin in tumorigenesis.** *Cell Mol Life Sci.* 2009; **66**:2219-2230.
  128. Cichon MA, Nelson CM, Radisky DC (2015) **Regulation of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells by cell contact and adhesion.** *Cancer Inform*; **9**;14(Suppl 3):1-13.
  129. Liu ZJ, Semenza GL, Zhang HF (2015) **Hypoxia-inducible factor 1 and breast cancer metastasis.** *J Zhejiang Univ Sci B.*; **16**:32-43.
  130. Lim S, Becker A, Zimmar A, Lu J, Buettner R, Kirfel J (2013). **SNAIL1 mediated epithelial mesenchymal transition confers chemoresistance.** *PLoS One*; **8**: e66558. Doi. 10.1371/journal.pon 0066558.print 2013.
  131. Li L, Bathia R. (2011) **Stem Cell Quiescence.** *Clin Cancer Res*; **17**: 4936-4941.

132. Mallini P, Lennard T, Kirby J, Meeson A (2014) **Epithelial-to-mesenchymal transition: what is the impact breast cancer stem cell and drug resistance.** *Cancer Treat Rev*; **40**:341-348.
133. Ribeiro AS, Paredes J.P (2015) **Cadherin Linking Breast Cancer Stem Cells and Invasion: A Promising Marker to Identify an "Intermediate/Metastable" EMT State.** *Front Oncol*; **4**:371. doi: 10.3389/fonc.2014.00371. eCollection 2014.
134. Shirakihara T, Horiguchi K, Miyazawa K, Ehata S, Shibata T, Morita I et al (2011) **TGF- $\beta$  regulates isoform switching of FGF receptors and epithelial-mesenchymal transition.** *EMBO J.*; **30**(4):783-795.
135. Lee JK, Joo KM, Lee J, Yoon Y, Nam DH (2014) **Targeting the epithelial to mesenchymal transition in glioblastoma: the emerging role of MET signaling.** *Oncotargets Ther*; **7**:1933-1944.
136. Jing Y, Han Z, Zhang S, Liu Y, Wei L (2011) **Epithelial-Mesenchymal Transition in tumor microenvironment.** *Cell Biosci*; **1**:29. doi: 10.1186/2045-3701-1-29.
137. Katsuno Y, Lamouille S, Derynck R (2013) **TGF- $\beta$  signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression.** *Curr Opin Oncol*; **25**:76-84.
138. Sahlgren C, Gustafsson MV, Jin S, Poellinger L, Lendahl U (2008) **Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion.** *Proc Natl Acad Sci U S A*; **105**:6392-6397.
139. Lindsey S, Langhans SA (2014) **Crosstalk of Oncogenic Signaling Pathways during Epithelial-Mesenchymal Transition.** *Front Oncol*; **4**:358. doi: 10.3389/fonc.2014.00358. eCollection 2014.
140. Felibert P, Quintana J, Arvelo F (2009) **Metaloproteasas. Propiedades, Funciones y sus usos como blancos terapéuticos en el tratamiento antineoplásico.** *Acta Científica Venezolana*; **60**: 11-21.
141. Gill SE, Parks WC (2008) **Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing.** *Int J Biochem Cell Biol*; **40**:1334-1347.
142. Manicone AM, Mc Guire JK (2008) **Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation.** *Semin Cell Dev Biol*; **19**:34- 41.
143. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z (2010) **Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment.** *Cell*; **141**:52-67.

144. Xiao LJ, Lin P, Lin F, et al (2012) **ADAM17 targets MMP-2 and MMP-9 via EGFR-MEK-ERK pathway activation to promote prostate cancer cell invasion.** *Int J Oncol*; **40**:1714-1724.
145. Visse R, Nagase H (2003) **Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry.** *Circ Res*; **92**: 827-839.
146. Ito I, Fixman ED, Asai K, Yoshida M, Gounni AS, Martin et al (2009) **Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta modulate the expression of matrix metalloproteinases and migratory function of human airway smooth muscle cells.** *Clin Exp Allergy*; **39**: 1370-1380.
147. Park CH, Chung JH (2011) **Epidermal growth factor-induced matrix metalloproteinase-1 expression is negatively regulated by p38 MAPK in human skin fibroblasts.** *J Dermatol Sci*; **64**:134-141.
148. Stetler-Stevenson WG (2008) **The tumor microenvironment: regulation by MMP-independent effects of tissue inhibitor of metalloproteinases-2.** *Cancer Metastasis Rev*; **27**: 57-66.
149. Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, Trümper L, Balkwill FR, Binder C (2004) **Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases.** *Carcinogenesis*; **25**:1543-1549.
150. Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK (2011) **Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting.** *FEBS J*; **278**:16-27.
151. Van Damme J, Struyf S, Opdenakker G (2004) **Chemokineprotease interaccions in cancer.** *Semin Cancer Biol*; **14**:201-208.
152. Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG (2010) **Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion.** *Semin Cancer Biol*; **20**:161-168.
153. Noël A, Jost M, Maquoi E (2008) **Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface.** *Semin Cell Dev Biol*; **19**:52-60.
154. Hua H, Li M, Luo T, Yin Y, Jiang Y (2011) **Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm.** *Cell Mol Life Sci*; **68**:3853-3868.

155. Chabottaux V, Noel A (2007) **Breast cancer progression: insights into multifaceted matrix metalloproteinases.** *Clin Exp Metastasis*; **24**:647-656.
156. Decock J, Hendrickx W, Vanleeuw U, Van Belle V, Van Huffel S, Christiaens MR, et al (2008) **Plasma MMP1 and MMP8 expression in breast cancer: protective role of MMP8 against lymph node metastasis.** *BMC Cancer*; **8**:77. doi: 10.1186/1471-2407-8-77.
157. Gonzalez LO, Corte MD, Vazquez J, Junquera S, Sanchez R, Viña A, et al (2008) **Study of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in ductal in situ carcinomas of the breast.** *Histopathology*; **53**:403-415.
158. Rucci N, Sanità P, Angelucci A (2011) **Expanding View of the Role of Matrix Metalloproteases in Metastatic Growth.** *Curr Mol Med*; **11**:609-622.
159. Hua H, Li M, Luo T, Yin Y, Jiang Y (2011) **Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm.** *Cell Mol Life Sci*; **68**:3853-3868.
160. Sounni NE, Paye A, Host L, Noël A (2011) **MT-MMPS as regulators of vessel stability associated with angiogenesis.** *Front Pharmacol*; **2**:111- doi: 10.3389/fphar.2011.00111. eCollection 2011.
161. Lin HC, Chang JH, Jain S, Gabison EE, Kure T, Kato T et al (2001) **Matrilysin cleavage of corneal collagen type XVIII NC1 domain and generation of a 28-kDa fragment.** *Invest Ophthalmol Vis Sci*; **42**: 2517-2524.
162. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z (2010) **Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment.** *Cell*; **141**:52-67.
163. Hanahan D, Weinberg RA (2011) **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell*; **144**:646-674.
164. Ferrara N (2005) **The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis.** *EXS* **94**:209-231.
165. Weis SM, Cheresh DA (2011) **Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets.** *Nature medicine*; **17**:1359-1370.
166. Semenza GL (2013) **Cancer-stromal cell interactions mediated by hypoxia-inducible factors promote angiogenesis, lymphangiogenesis, and metastasis.** *Oncogene*; **32**:4057-4063.
167. CuiFFo BG, Karnoub AE (2012) **Mesenchymal stem cells in tumor development: emerging roles and concepts.** *Cell adhesion & migration*; **6**:220-230.



168. Alitalo A, Detmar M (2012) **Interaction of tumor cells and lymphatic vessels in cancer progression.** *Oncogene*; **31**:4499-4508.
169. Arvelo F, Cotte Carlos, Sojo Felipe (2014) **Células Madre y Cáncer.** *Invest Clin*; **55**: 371-391
170. Schoppmann SF, Birner P, Stöckl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C et al (2002) **Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis.** *The American Journal of Pathology*; **161**:947-956.
171. Hanahan D, Folkman J (1996) **Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis.** *Cell*; **86**:353-64.
172. Arvelo F (2009) **Hipoxia en la malignidad del cáncer.** *Invest Clin* **50**:529-546.
173. Goodsell D (2003) **The molecular perspective: VEGF and angiogenesis.** *Stem Cells*; **21**:118-119.
174. North S, Moenner M, Bikfalvi A (2005) **Recent developments in the regulation of the angiogenic switch by cellular stress factors in tumors.** *Cancer Lett*; **218**:1-14.
175. Klein CA (2010) **Framework models of tumor dormancy from patient-derived observations.** *Curr Opin Genet Dev*; **21**:42-49.
176. Kienast Y, von Baumgarten L, Fuhrmann M, Klinkert WE, Goldbrunner R, Herms J, et al (2010) **Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation.** *Nature Medicine*; **16**(1):116-122.
177. Schrader J, Gordon-Walker TT, Aucott RL, van Deemter M, Quaas A, Walsh S, et al (2011) **Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells.** *Hepatology*; **53**:1192-1205.
178. Barkan D, El Touny LH, Michalowski AM, Smith JA, Chu I, Davis AS et al (2010) **Metastatic growth from dormant cells induced by a col-I-enriched fibrotic environment.** *Cancer Res*; **70**:5706-5716.
179. Goetz JG, Minguet S, Navarro-Lerida I, Lazcano JJ, Samaniego R, Calvo E, et al (2011) **Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis.** *Cell*; **146**:148-163.

- 180.** Fischer AN, Fuchs E, Mikula M, Huber H, Beug H., Mikulits W (2007) **PDGF essentially links TGF-beta signaling to nuclear beta-catenin accumulation in hepatocellular carcinoma progression.** *Oncogene*; **26**: 3395-3405.
- 181.** Barkan D, El Touny LH, Michalowski AM, Smith J A, Chu I, Davis AS, et al (2010). **Metastatic growth from dormant cells induced by a col-I-enriched fibrotic environment.***Cancer Research*; **70**:5706-5716.
- 182.** Barkan D, Green JE, Chambers A F (2010) **Extracellular matrix: a gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth.** *European Journal of Cancer*; **46**:1181-1188.
- 183.** Mejlvang J, Kriajevska M, Vandewalle C, Chernova T, Sayan AE, Berx G, et al (2007) **Direct repression of cyclin D1 by SIP1 attenuates cell cycle progression in cells undergoing an epithelial mesenchymal transition.** *Molecular Biology of the Cell*; **18**:4615-4624.
- 184.** Muller-Hermelink N, Braumuller H, Pichler B, Wieder T, Mailhammer R, Schaak K, et al (2008) **TNFR1 signaling and IFN-gamma signaling determine whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis.** *Cancer Cell*; **13**(6): 507-518.
- 185.** Tran DD, Corsa CA, Biswas H, Aft RL, & Longmore GD (2011) **Temporal and spatial cooperation of Snail1 and Twist1 during epithelial–mesenchymal transition predicts for human breast cancer recurrence.** *Molecular Cancer Research*; **9**:1644-1657.
- 186.** Vega S, Morales AV, Ocana OH, Valdes F, Fabregat I, & Nieto MA (2004) **Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death.** *Genes & Development*; **18**(10):1131-1143.
- 187.** Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J (1995) **Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression.** *Nature Med*; **1**:149-153.
- 188.** Almog N, Henke V, Flores L, Hlatky L, Kung AL, Wright RD et al (2006) **Prolonged dormancy of human liposarcoma is associated with impaired tumor angiogenesis.** *FASEB J*; **20**:947-949.
- 189.** Dameron K, Volpert O, Tainsky M, Bouck (1994) **Control of angiogenesis in fibroblast by p53 regulation of trombospondin-1.** *Science*; **265**:1582-1584.
- 190.** Weinstat-Saslow DL, Zabrenetzky VS, VanHoutte K, Frazier WA, Roberts DD, Steeg PS (1994) **Transfection of thrombospondin 1 complementary**

- DNA into a human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic potential, and angiogenesis.** *Cancer Res*; **54**:6504-6511.
- 191.** Ghajar CM, Peinado H, Mori H, Matei IR, Evason KJ, Brazier H, et al (2013) **The perivascular niche regulates breast tumour dormancy.** *Nature Cell Biol*; **15**:807–817.
- 192.** Indraccolo S, Minuzzo S, Masiero M, Pusceddu I, Persano L, Moserle L, et al (2009) **Cross-talk between tumor and endothelial cells involving the Notch3-Dll4 interaction marks escape from tumor dormancy.** *Cancer Res*; **69**:1314-1323.
- 193.** Lindau D, Gielen P, Kroesen M, Wesseling P, Adema GJ (2013) **The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells.** *Immunology*; **138**:105-115.
- 194.** Almand B, Clark JI, Nikitina E, van Beynen J, English NR, Knight SC et al (2001) **Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer.** *Journal of Immunology*; **166**:678-689.
- 195.** Talmadge JE, Gabrilovich DI (2013) **History of myeloid-derived suppressor cells.** *Nature reviews Cancer*; **13**:739-752.
- 196.** Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V (2012) **Coordinated regulation of myeloid cells by tumours.** *Nature reviews. Immunology*; **12**:253-268.
- 197.** Gabrilovich DI, Velders MP, Sotomayor EM, Kast WM (2005) **Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells.** *Journal of immunology*; **166**:5398-5406.
- 198.** Sinha P, Clements VK, Ostrand-Rosenberg S (2005) **Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease.** *Journal of immunology*; **174**:636-645.
- 199.** Liu C, Yu S, Kappes J, Wang J, Grizzle WE, Zinn KR et al (2007) **Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor bearing host.** *Blood*; **109**:4336-4342.
- 200.** Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ (2009) **Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and**

- doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy.** *Cancer Immunol Immunother*; **58**:49-59.
- 201.** Hwu P (2010) **Treating cancer by targeting the immune system.** *The New England Journal of Medicine*; **363**:779-781.
- 202.** Vonderheide RH, Glennie MJ (2013) **Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy.** *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for cancer research*; **19**:1035-1043.
- 203.** McDermott J, Jimeno A (2015) **Pembrolizumab: PD-1 inhibition as a therapeutic strategy in cancer.** *Drugs Today (Barc)*; **51**:7-20. doi: 10.1358/dot.2015.51.1.2250387)
- 204.** Eustace AJ, Kennedy S, Larkin AM, Mahgoub T, Tryfonopoulos D, O'Driscoll L, Clynes M, Crown J, O'Donovan N (2014) **Predictive biomarkers for dasatinib treatment in melanoma.** *Oncoscience*; **1**:158-166.
- 205.** Król M, Majchrzak K, Mucha J, Homa A, Bulkowska M, Jakubowska A, Karwicka M, Pawłowski KM, Motyl T (2013) **CSF-1R as an inhibitor of apoptosis and promoter of proliferation, migration and invasion of canine mammary cancer cells.** *BMC Vet Res*; **5**:9:65. doi: 10.1186/1746-6148-9-65.
- 206.** Rashdan S, Hanna N (2014) **Nintedanib for the treatment of non-small-cell lung cancer.** *Expert Opin Pharmacother*; **15**(5):729-39. doi: 10.1517/14656566.2014.897695. Epub 2014 Mar 5.
- 207.** Krzeszinski JY, Wei W, Huynh H, Jin Z, Wang X, Chang TC, Xie XJ, He L, Mangala LS, Lopez-Berestein G, Sood AK, Mendell JT, Wan Y (2014) **miR-34a blocks osteoporosis and bone metastasis by inhibiting osteoclastogenesis and Tgif2.** *Nature*; **28**:512(7515):431-435. doi: 10.1038/nature13375. Epub 2014 Jun 25.
- 208.** Ji Q, Liu X, Han Z, Zhou L, Sui H, Yan L, Jiang H, Ren J, Cai J, Li Q (2015) **Resveratrol suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer through TGF- $\beta$ 1/Smads signaling pathway mediated Snail/E-cadherin expression.** *BMC Cancer*. **5**; **15**:97. doi: 10.1186/s12885-015-1119-y.
- 209.** Sun XD, Liu XE, Huang DS (2013) **Curcumin reverses the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells by inhibiting the Hedgehog signaling pathway.** *Oncol Rep*; **29**:2401-2407.