

CÁNCER Y SUSTRATO METASTÁSICO

Arvelo^{1,2} Francisco, Sojo¹ Felipe, Cotte² Carlos.

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

Resumen.- El noventa por ciento de las muertes por cáncer ocurren como consecuencia de las metástasis, detectándose las mismas en el sesenta por ciento de los pacientes en el momento de hacerse el diagnóstico. Esta realidad hace que las investigaciones sobre los mecanismos y procesos que originan y hacen posible las metástasis sean prioritarias, por lo que es necesario profundizar no solo sobre los mecanismos a nivel celular y molecular, sino también sobre los factores micro y macro ambientales, considerados siempre en un segundo plano. Esto último ha llevado a revisar la vieja teoría que considera que las metástasis dependen de las interacciones entre las *células cancerosas* sean vistas como “*semillas*” y el *sustrato* como el “*suelo*” de los órganos blanco. A un siglo de postularse esta hipótesis, la especificidad tisular observada en la colonización metastásica se comienza a ver como válida. Hoy se sabe que el potencial de una célula tumoral a la metástasis depende de las múltiples interacciones recíprocas entre el tumor primario y el ambiente en los sitios distantes, determinantes en la progresión tumoral. Estos estudios están permitiendo desarrollar tratamientos con enfoques terapéuticos eficaces, siempre considerando que algunos tipos de tumores metatizan frecuentemente a órganos blancos tales como hueso, pulmón, cerebro e hígado. El objetivo de esta revisión es describir las interacciones tanto a nivel celular y molecular como del ambiente tumoral en los órganos blanco, todo mediado por complejos mecanismos que hacen posible el desarrollo de las metástasis.

Palabras Claves: Cáncer, metástasis, microambiente tumoral, progresión tumoral, tropismo, exosomas, micrometástasis.

Introducción.

De acuerdo al paradigma genético del cáncer, los tumores derivan de una sola célula normal que mediante múltiples mutaciones cambia su genotipo transformándose en un fenotipo maligno (1). Este proceso ocurre en un tiempo muy variable, originando un

clon de células que en un período largo de crecimiento, de meses, años o décadas, forma un tumor primario (2). Hoy se acepta que la mutación, la iniciación y la transformación maligna solo pueden ocurrir en las células progenitoras llamadas *células madre* o *stem cells* (3). Si esto es así, ello revela que las mutaciones en las células somáticas no producen cáncer, ya que las células al diferenciarse y maduras cumplen su función y cierran su ciclo muriendo por la apoptosis, teniendo una vida media corta. En cuanto a la agresividad y el poder metastásico del tumor, ello va a depender de la etapa de maduración en que se produce la mutación de la célula madre. Los tumores derivados de una célula madre con maduración precoz tendrán un fenotipo más heterogéneo y metatizarán rápidamente, mientras que los tumores derivados de células en etapas más tardías serán de fenotipo más homogéneo y menos metastizantes (4). En las neoplasias malignas, al estar constituidas por poblaciones celulares con un rango amplio de heterogeneidad biológica, destacan las propiedades de la superficie celular, la antigenicidad, la inmunogenicidad, el índice proliferativo y la sensibilidad a los agentes antitumorales. A ello se suma la expresión de características fenotípicas, todo lo cual hace posible la invasión de otros tejidos.

La cascada metastásica se inicia en el tumor primario mediante la invasión local que se caracteriza **por la presión mecánica ejercida por el tejido proliferativo tumoral, la acción de enzimas proteolíticos que reducen la organización molecular de las barreras, disminuyendo así la resistencia a la invasión y por la capacidad de desplazamiento expresada por las células metastásicas** (5). Durante este proceso dinámico se produce una selección evolutiva darwiniana que hace que las células vayan adquiriendo cambios en su material genético, lo que les proporciona una ventaja, ya que con el tiempo van siendo seleccionadas y se hacen más numerosas en el tumor. La inestabilidad genética las caracteriza y las lleva a adquirir capacidad invasiva y metastásica (6). **La evolución y desarrollo de las metástasis, consecuencia de la diseminación y establecimiento de las células tumorales en órganos distantes, son determinantes no solo para el pronóstico y la expectativa de vida del paciente, sino que también determina clínicamente el final de la historia natural de la mayor parte de los tumores (7,8). De aquí la importancia y trascendencia de las investigaciones que actualmente se hacen a nivel celular y molecular, más aquellas que tienen ver con el ambiente celular, tisular, orgánico y ambiental. Todos aspectos fundamentales para poder entender al cáncer y de encontrar tratamientos mejores y más efectivos. .**

I.- Diseminación metastásica

Diseminación de las células tumorales.- Los tumores malignos se diseminan a través del sistema sanguíneo y linfático mediante la intravasación de las células tumorales. Ésta es facilitada por la angiogénesis, proceso que origina la formación de una microcirculación de vasos neo-formados que presentan un endotelio fenestrado, uniones intercelulares inestables, membrana basal discontinua o en algunos casos ausente (9). La progresión tumoral requiere que simultánea a la invasión ocurra un incremento de la vascularización que aporte nutrientes y factores necesarios para el crecimiento de las células tumorales. La neo-vascularización es un fenómeno temprano en la progresión tumoral que se puede detectar en una fase tan incipiente como la del carcinomas “*in situ*” (10). La proliferación de las células endoteliales y la formación de vasos son estimuladas por las células neoplásicas a través de diversos factores, siendo uno de los más conocidos es el *factor de crecimiento de endotelio vascular* o VEGF, pero también la IL-8 o el TNF- α . Por otra parte, las células endoteliales producen factores de crecimiento como el FGF, que a su vez promueve el crecimiento de las células tumorales (11).

Una vez que las células tumorales penetran en los vasos pueden alcanzar órganos distantes y allí proliferar. Aun cuando millones de células se pueden separar y migrar de un tumor, el proceso de metástasis es muy ineficiente porque solo una pequeña fracción de las células logra sobrevivir y formar un nuevo tumor. Este fenómeno paradójico de supervivencia no es ajeno en la naturaleza, ya que todas las especies usan un gran número de organismos o partes especializadas para sobrevivir. En el cáncer, el enorme número de células que migran del tumor primario asegura que algunas de ellas tengan la posibilidad de sobrevivir para formar nuevos tumores, lo cual es tan efectivo que hace que la causa principal de las muertes por esta patología sean las metástasis. Las células que migran pueden morir: a) debido a que las células normalmente se encuentran asociadas con otras células o con el medio ambiente que las rodea. Al desprenderse puede morir por un tipo de apoptosis conocido como *anoikis*; b) por el tamaño de las células tumorales, mayor al de las células de la sangre; c) por la alteración del citoesqueleto en las células tumorales; d) por la acción de los mecanismos inmunológico (12). Por otra parte cada vez se demuestra más la importancia de los mecanismos epigenéticos, que le dan más valor al entorno de las células y del medio

extracelular en la progresión tumoral (9). Por ello uno de los eventos distintivos y cruciales para la progresión tumoral y la malignidad del cáncer es la *angiogénesis*, (13).

Adhesividad entre la célula normal y tumoral.- Se ha estudiado la existencia de una adhesión específica entre las células tumorales y el endotelio micro-vascular en el órgano diana. Esto ocurre mediante moléculas de reconocimiento específicas localizadas en la superficie de ambos tipos celulares determinando la localización particular de la metástasis. Los datos indican que ciertas características específicas de las células tumorales circulantes y de los endotelios, mas los órganos diana y el microambiente de cada órgano, están implicados en la localización de los focos tumorales secundarios (14, 15,16). Las células tumorales extravasadas que se encuentran en estrecho contacto con los vasos sanguíneos son las que específicamente son capaces de formar metástasis. A esto se suman los factores solubles secretados por los tumores que aumentan la formación de focos tumorales a través de la activación endotelial, localizada de FAK y de E-selectina, lo que favorece la adherencia de las células tumorales al endotelio (17). Por otra parte, la activación del endotelio por IL-1 α , IL-1 β o TNF- α conduce a la expresión de E-selectina y P-selectina, así como de VCAM-1 e ICAM-1 en las superficies de las células endoteliales. La unión de estas moléculas a sus ligandos sobre las células tumorales puede promover el contacto y la adhesión de ellas a las células endoteliales (18). Las células malignas, cuyo blanco metastásico son los pulmones, expresan altos niveles de factores Angptl4 y VEGF-A, que impiden las uniones célula-célula endotelial y facilitan la extravasación (19) . Las moléculas EREG, COX2, MMP1 y MMP2 también promueven la extravasación y la metástasis (20). La extravasación también puede ocurrir a partir de la interacción entre las células tumorales y las plaquetas, en las cuales el TGF- β activa la vía TGF / Smad y NF-kB en las células cancerosas, que induce la transición epitelio-mesénquima en las células tumorales, estimulando la extravasación (21). Los monocitos/macrófagos reclutados por las células tumorales favorecen el establecimiento de las células tumorales del cáncer de mama metastásicas en el pulmón (22).

Los macrófagos asociados a la metástasis F4 / 80 +, CD11b + y Gr1 secretan VEGF-A la cual promueve la extravasación y el establecimiento y crecimiento de las células del tumor, posiblemente a través del aumento de la permeabilidad endotelial (23). Por otra parte, los factores solubles secretados por los tumores primarios inducen el

reclutamiento de las células derivadas de la médula ósea o BMDCs, como lo son las células mieloides inmaduras, neutrófilos, monocitos, etc., que ocurre en las áreas específicas del órgano lejano para formar el *nicho premetastásico*, que asegura la supervivencia y crecimiento de las células tumorales (24,25,26).

Patrón de distribución metastásico no aleatorio.- Se ha tratado de explicar la selectividad de la metástasis por parte de las células tumorales a través de las siguientes vías:

- I. *La mecanicista*, que está determinada por la posición hemodinámica relativa de cada órgano respecto a aquel que alberga el tumor primario. Esta hipótesis sostiene que las células tumorales siguen la ruta de drenaje circulatorio y/o linfático, y se detiene de forma no específica en el primer órgano que se encuentra en su recorrido. Por consiguiente, será el lugar donde se encontrarán el mayor número de metástasis. Esta hipótesis está apoyada por factores anatómicos y mecánicos que son importantes en la determinación de los patrones metastásicos de varios tipos de tumores. Por ejemplo, en los tumores gastrointestinales comienza como un tumor localizado en la mucosa del tubo digestivo, que va creciendo e invadiendo posteriormente las capas más profundas hasta alcanzar la serosa. Cuando el tumor traspasa la pared del intestino puede invadir cualquier órgano dentro del abdomen o fuera del mismo.
- II. *La diseminación linfática*, la cual ocurre al alcanzar las células la red de vasos linfáticos que rodean al colon que permiten el drenaje de la linfa a múltiples regiones ganglionares. La diseminación por esta vía se realiza de forma ordenada, afectando primero a los ganglios más próximos y posteriormente a los más alejados.
- III. *La diseminación hematológica* ocurre mediante las células tumorales que pasan al torrente circulatorio. Generalmente el primer sitio de diseminación es el hígado, seguido por los pulmones y los huesos, debido a que el drenaje venoso del tracto intestinal se produce a través del *sistema portal*. Sin embargo, los tumores que se originan en el recto distal pueden dar lugar a una metástasis inicial en los pulmones porque la vena rectal inferior drena en la vena cava inferior y no en el sistema venoso portal (27).

Tropismo de órgano.- En el año 1889 Stephen Paget (28), postuló su hipótesis conocida clásicamente como “*seed and soil*”, afirmando que la capacidad de colonización metastásica está determinada por las propiedades intrínsecas de las células tumorales homologando las *celulas* con las “*semillas*” y el lugar donde crecen con el “*suelo*”, que es el *sustrato tisular*. Paget examinó a 735 mujeres fallecidas por cáncer de mama, concluyendo que la distribución de las metástasis no fueron aleatorias porque las células no se distribuyeron al azar, sino preferentemente en un microambiente selecto particular: *el sustrato tisular*. Él concluye que el ambiente juega un rol importante en la formación y crecimiento de la metástasis. Esto fue respaldado experimentalmente en modelos animales mediante la inyección de células tumorales con afinidad por un órgano determinado, demostrando que la colonización se producía en particular en ese órgano (29,30). Este tropismo fue demostrado experimentalmente con los trabajos pioneros de Fidler y Nicolson (1976), quienes utilizaron dos variantes celulares del melanoma murino B16: uno con potencial de crecimiento bajo, el B16-F1; el otro con potencial alto, el B16-F10. Estas células fueron inyectadas en el bazo y el corazón de ratones, demostrando que las células B16-F10 formaron exclusivamente metástasis en los pulmones, mientras que las células B16-F1 formaron metástasis extrapulmonares. Estos resultados determinaron que las células no se acumulaban en el primer órgano que se encontraban en su recorrido, sino que las células se acumularon específicamente en los pulmones (31).

Preparación previa del nicho antes de que ocurra la metástasis.- La hipótesis de Paget dio lugar a la idea de que antes que ocurra la diseminación metastásica, las células del tumor primario liberan mediadores celulares, hoy llamados *exosomas*, que pueden viajar en la circulación y que favorecen la formación del nicho premetastásico para el crecimiento tumoral (32,33). A diferencia de factores solubles secretados por las células, los exosomas contienen grupos de moléculas funcionales que sirven de comunicadoras intercelulares no sólo a nivel local, sino también a nivel sistémico, aparte de servir también de protección a las moléculas transportadas. La mayoría de las células procariotas y eucariotas liberan exosomas, incluyendo las células de cáncer colorrectal (34), pulmón, mama, glioblastoma, ovario, y melanoma (35). Los exosomas son vesículas de membrana que se originan dentro de las células en compartimientos *endosomales* llamados *cuerpos vesiculares* (36). Igualmente los exosomas transfieren moléculas bioactivas a células receptoras tanto distantes como proximales, alterando la

señalización celular y el fenotipo. De ellas destacan el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (37,38) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (39), mas los receptores EGFR mutados (40,41) y HGFR (42). Se ha demostrado que los exosomas derivados tanto de células normales como cancerosas son mediadores del proceso metastásico, ya que pueden promover la angiogénesis (43,44), la invasión (45,46), y la proliferación de las células receptoras para apoyar el crecimiento del tumor (47,48). También se ha sugerido que los exosomas derivados del cáncer, debido a su carácter pleotrópico, podrían estar involucrado en el desarrollo y progresión tumoral a través de procesos que permiten: (a) el escape de las células tumorales del sistema inmunológico ayudando a iniciar la respuesta inflamatoria; (b) actuar en la diferenciación de los fibroblastos y las células mesenquimales; (c) mejorar la evolución metastásica del tumor mediante la promoción de la transición epitelial/mesénquima de las células tumorales, preparando el nicho de las células tumorales para su nueva ubicación anatómica (49,50).

Los exosomas de un melanoma altamente metastásico incrementaron la capacidad metastásica del tumor primario por influencia de las células progenitoras de la médula ósea a través del receptor de la tirosina quinasa MET. Estos exosomas indujeron un fenotipo vascular en el sitio pre-metastásico y reprogramaron las células progenitoras de la médula ósea que expresaban c-kit, el receptor tirosina quinasa Tie2 y MET. La reducción en la expresión de MET en los exosomas redujo la capacidad pro-metastásica de las células progenitoras de la médula ósea. Por otra parte, células progenitoras de la médula ósea de individuos con melanoma metastásico con fenotipo CD45 (-) C-KIT (Low/+) TIE2 (+) presentaron una elevada expresión de MET. Así mismo, los reguladores del transporte de membrana RAB1A, RAB5B, RAB7 y RAB27A (RAS-related GTP-binding proteins) y la formación de exosomas fueron altamente expresados por las células del melanoma (41). Las integrinas contenidas en los exosomas que participan en la formación del nicho premetastásico podrían ser utilizadas para predecir las metástasis órganos-específicas. Exosomas de pulmón, hígado y cerebro de ratón y humano se fusionaron con células residentes como las células epiteliales y fibroblastos de pulmón, células de Kupffer y células endoteliales cerebrales. Los exosomas con las integrinas $\alpha 6\beta 4$ and $\alpha 6\beta 1$ fueron asociadas con metástasis en el pulmón, mientras que la integrina $\alpha v\beta 5$ fue asociada con metástasis en el hígado. Así mismo, se demostró que la

captación de las integrinas por las células residentes activa la fosforilación de Src y la expresión del gen proinflamatorio S100 (51). Las Células madre del cáncer renal humano con un marcador fenotípico CD105 originaron microvesículas que confirieron un fenotipo angiogénico activado por las células endoteliales y promovieron la formación del nicho pre metastásico. Estas células del carcinoma renal inyectadas en los ratones con inmunodeficiencia severa SCID originaron la formación de metástasis en los pulmones (52). Un modelo de un adenocarcinoma pancreático BSp73ASML en rata fue utilizado para analizar el papel de la isoforma variante CD44v en la formación de un nicho pre-metastásico. El CD44v es un requisito para la formación de una matriz soluble, que en colaboración con los exosomas, promueve la acumulación de leucocitos, la activación de las células del endotelio y del estroma, siendo los exosomas los principales elementos de la preparación del nicho pre-metastásico. La fracción soluble del tumor sirve como portadores de los exosomas, los cuales son a la vez portadores de quimiocinas y proteasas necesarios para la preparación del nicho pre-metastásico. La isoforma variante CD44v se podría utilizar como un marcador en la progresión tumoral (53). El adenocarcinoma ductal pancreático es altamente metastásico y de pobre prognosis, cuyos exosomas indujeron la formación de nicho pre metastásico en el hígado con la consecuente formación de metástasis en ratones. La captación de exosomas derivados de este tumor por parte de las células de Kuffer indujo la secreción del factor de crecimiento transformante β y una sobrerregulación de la producción de fibronectina por las células de kuffer hepáticas. Inicialmente, se origino un microambiente fibrótico y un aumento en el reclutamiento de macrófagos procedente de la médula ósea. El factor inhibitorio de migración de macrófagos (MIF) fue altamente expresado por los exosomas del tumor pancreático y su bloqueo previene la formación del nicho pre metastásico y por consiguiente la metástasis. En pacientes cuyos tumores de páncreas no progresaron, MIF fue mayor en los exosomas de los pacientes con tumores de páncreas de etapa temprana que desarrollaron metástasis en el hígado. MIF puede ser utilizado como un marcador pronóstico en el desarrollo de metástasis en el hígado de pacientes con cáncer pancreático (54).

II. Metástasis en órganos blanco

A continuación se revisan aquellos órganos que son los blancos más frecuentes de las metástasis, considerando adicionalmente su tratamiento particular y específico que reafirma la complejidad de una enfermedad que no es lineal sino contextual.

Metástasis en hueso.- Los huesos son la partes del organismo que más son afectados por el cáncer al hacerse metastásico, siendo los tumores malignos de mama, próstata, pulmón, melanoma, mieloma, riñón y tiroides los que más tienen afinidad por el sistema óseo.

Tabla 1. Incidencia y pronóstico de las metástasis óseas de diversos tipos de cáncer

	Incidencia de enfermedad	Mediana de Supervivencia (meses)	Supervivencia a 5 años
Mieloma	95-100%	20	10%
Mama	65-75%	24	20%
Próstata	65-75%	40	25%
Pulmón	30-40%	<6	<5%
Riñón	20-25%	6	10%
Tiroides	60%	48	40%
Melanoma	15-45%	<6	<5%

Datos de Rubens y Coleman

La predisposición de algunos cánceres por producir metástasis en el hueso, específicamente en el compartimiento medular, se debe en parte a la estructura capilar de la médula y al flujo sanguíneo lento, lo cual facilita que las células puedan ser retenidas en los sinusoides vasculares, que son muy amplios (55). La médula ósea es una gran fuente de factores de crecimiento como el TGF- β , el IGF, el de fibroblastos FGF, el derivado de las plaquetas PDGF, las proteínas morfogenéticas óseas o BMPs, más el calcio, que aportan un ambiente apropiado para el crecimiento de las células tumorales (56). Se ha propuesto un nuevo modelo para explicar la preferencia de las células tumorales por producir metástasis en algunos órganos determinados, afirmándose que. no sólo es importante el microambiente óseo, sino que además el propio tumor primario produce los exosomas y ciertos factores que prepara al órgano diana con un *nicho pre-metastásico* para que pueda albergar a las células tumorales diseminadas (57). Como respuesta a los factores solubles liberados por las células precursoras hematopoyéticas y los macrófagos, presentes en el microambiente óseo, se crea un ambiente adecuado, un "*suelo fértil*" favorable para ser invadido por las células

metastásicas (58). Las células tumorales que producen metástasis en el hueso expresan el receptor de quimiocinas CXCR4, receptor tipo 4 de quimiocinas con motivo CXC en su membrana, el cual responde a las señales quimio-atractivas generadas por su ligando SDF-1, llamado también CXCL12. Este factor es secretado tanto en el microambiente del hueso por los osteoblastos, fibroblastos, las células madre hematopoyéticas, células endoteliales en la médula ósea, así como a niveles mayores en el nicho pre-metastásico. A su vez el ligando SDF-1 también atrae células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea y células progenitoras endoteliales al sitio metastásico (59). Adicionalmente, la expresión de la integrina $\alpha\beta3$ en las células metastásicas del carcinoma de próstata facilita la unión a proteínas de la matriz ósea - colágeno, fibronectina, vitronectina y osteopontina o OPN-, permitiendo a las células tumorales crecer dentro del hueso. En ello están implicados muchos factores del microambiente óseo, así como factores secretados por las propias células tumorales (60)

De acuerdo al tipo de tumor primario, se producirán distintos factores que estimulan la actividad de los osteoblastos o de los osteoclastos, dando lugar a la formación de metástasis óseas *osteolíticas* y *osteoblásticas*, pero también pueden desarrollarse metástasis mixtas contenidas de los dos componentes. En los distintos tipos de cáncer las lesiones pueden ser muy distintas (61), ya que las células metastásicas de tipo osteolítico se caracterizan por producir un aumento de la actividad de los osteoclastos del huésped, dando lugar a la destrucción del hueso. Histológicamente se caracteriza por la presencia de osteoclastos erosionando el hueso en la interfase tumor-hueso (62). El cáncer de mama, pulmón y riñón desencadenan preferentemente la activación de los osteoclastos, dando como resultado la aparición de lesiones osteolíticas (63). La proteína relacionada con la *hormona paratiroidea* o PTHrP, liberada por las células metastásicas, es el principal mediador de la activación de los osteoclastos en las metástasis osteolíticas. Esta proteína estimula a los osteoblastos para que expresen más el ligando del receptor activador del factor nuclear - κ B o RANK y menos la *osteoprotegerina* o OPG. El resultado es la activación de la osteoclastogénesis y el aumento de la resorción del hueso. La destrucción de hueso provoca la liberación de sus factores de crecimiento y el aumento de la concentración de calcio. Todos estos factores se unen a sus receptores en la membrana de las células tumorales estimulando su crecimiento y la síntesis de PTHrP, así como múltiples citocinas -como la IL-1, IL-6, IL-11, IL-8-, que inducen la osteólisis, a lo que se suma el *factor de crecimiento del*

endotelio vascular o VEGF. Esto crea un círculo vicioso que induce el crecimiento de las células tumorales y la actividad de los osteoclastos (64, 61,62). La metástasis al hueso del cáncer de mama afecta aproximadamente el 85% de los pacientes afectados de esta enfermedad. Se ha encontrado que la hipoxia está asociada con la metástasis al hueso en pacientes con cáncer de mama estrógeno negativo. Una alta expresión de la lisil oxidasa LOX está asociado a la metástasis al hueso originando una lesión osteolítica. Se identifico a LOX como un regulador de la osteoclastogenesis independiente de RANK que conduce a la formación de lesiones focales pre-metastásicas, las cuales proveen la plataforma para que las células tumorales circulantes colonicen y se establezcan como metástasis (65).

En el caso de la metástasis osteoblástica, esta es distintivo del cáncer de próstata, cuyas células malignas se caracterizan por producir un aumento en la actividad de los osteoblastos, lo que lleva a un incremento en la formación de hueso ectópico. En esta clase de metástasis se observa la presencia de un gran número de osteoblastos cercanos a las células tumorales (66). El principal modulador de estas metástasis es la proteína Endotelina-1 o Et-1, liberada por las células metastásicas, la cual estimula la proliferación de los osteoblastos mediante un inhibidor de la vía Wnt de señalización celular encargada de la diferenciación y activación de los osteoblastos. Esta inhibición es llamada *dickkopf* o DKK1 (67). Las células tumorales también producen otros factores activadores de osteoclastos como BMPs y PDGF. Una vez diferenciados, los osteoblastos comienzan a formar nueva matriz no mineralizada sobre el hueso ya existente, la cual contiene factores de crecimiento y otras proteínas que atraen a las células tumorales y les permiten sobrevivir y proliferar. El TGF- β 1 es otro factor que participa en la progresión y el desarrollo de las metástasis del carcinoma de próstata, favoreciendo la metástasis ósea osteoblástica, lo cual ha sido demostrado experimentalmente (68). También se ha comprobado la eficacia anti-tumoral de un inhibidor específico de la quinasa del receptor-1 de TGF- β 1, que es capaz de controlar el crecimiento de las células del carcinoma de próstata en el hueso (69). La uroquinasa uPA participa en la metástasis osteoblástica teniendo la capacidad de clivar y activar a TGF- β , lo que permite regular tanto la diferenciación de osteoblastos y osteoclastos como también el crecimiento de las células malignas (70). El *antígeno específico de la próstata* PSA, también cliva y activa a TGF- β y a PTHrP en el extremo N-terminal. De esta manera, no solo impide la resorción mediada por PTHrP, sino que lo convierte en

un factor estimulante para la deposición de hueso (71). Así mismo el antígeno PSA puede clivar a IGFBP-3, que es la proteína de unión a IGF-1, lo cual induce un aumento en los niveles de IGF-1 libre, aumentando así la actividad de los osteoblastos (72).

En el tratamiento del carcinoma de próstata existe una relación estrecha con los andrógenos, razón por la cual su neutralización o privación por medios químicos o quirúrgicos se convirtió en el tratamiento para las etapas avanzadas de la enfermedad. La respuesta inicial al tratamiento fue satisfactoria al producir una regresión clínica significativa de la enfermedad (73), sin embargo, a pesar de una buena respuesta al tratamiento, usualmente suele ocurrir recidiva después de la castración (74), lo que hace que la enfermedad progrese a una fase insensible a la neutralización de las hormonas, llamada *cáncer de próstata resistente a la castración* o CRPC, determinando un pronóstico grave, con una supervivencia de 16 a 18 meses. La otra opción para estos pacientes es la quimioterapia, la cual se aplicará según las células hacia las cuales se dirige el tratamiento, existiendo tres categorías: 1) las células epiteliales, cuyo tratamiento se basa en la utilización de agentes citotóxicos, como el docetaxel y el cabazitaxel (75,76); 2) células del estroma, que incluye las células endoteliales, osteoblastos y osteoclastos. Los citotóxicos utilizados son la talidomida, que es antiangiogénica (77); el bevacizumab, anticuerpo monoclonal contra VEGF-A (78); el antrasentan, inhibidor de la proliferación de los osteoblastos (79); la denosumab, anticuerpo monoclonal contra el RANKL; el ligando de receptor activador para el *factor nuclear* κ B (80); el ácido zoledrónico, que pertenece al grupo de los bifosfonatos, el cual inhibe la acción de los osteoclastos y favoreciendo al aumento de la densidad ósea (81,82); 3) bloquear la activación del receptor de andrógenos o AR que se expresa tanto en las células del carcinoma de próstata como en las células del microambiente. Para ello se usa el abiraterone, que suprime la producción de testosterona (83) y el MDV3100 o enzalutamide, un antagonista del receptor de andrógenos o AR, que bloquea su señalización al inhibir su translocación al núcleo e impidiendo su unión al ADN (84).

Metástasis en el pulmón.- La especificidad de los órganos tiene un papel preponderante en el desarrollo de la lesión metastásica, ya que las células tumorales son más capaces de desarrollar focos de crecimiento si tienen un microambiente propicio. Esta especificidad viene determinada por factores de crecimiento local de hormonas o citocinas secretadas por los órganos diana, por interacciones adhesivas del endotelio con

las células tumorales o por una susceptibilidad del tejido que facilita la adherencia de las células tumorales (85). Lo más posible es que exista una combinación del papel anatómico y el tisular específico para la tendencia de las metástasis hacia los pulmones (86). Los tumores que tienen su origen en mama, vejiga, colon, riñón, cabeza-cuello y los melanomas tienen tendencia a originar metástasis en el pulmón. Según la teoría de Paget, el pulmón es un buen *sustrato* para desarrollar metástasis debido a que es un tejido altamente vascularizado, bien oxigenado y nutrido, además de ser un tejido rico en macrófagos alveolares (87). Las células mieloides BMDC son la primera barrera de defensa contra los patógenos respiratorios, las cuales actúan contra las infecciones y secretan citocinas pro-inflamatorias, tales como interleucina 6 y *factor de necrosis tumoral-alfa* o TNF- α . Ambos pueden aumentar la permeabilidad y la angiogénesis tumoral y su expresión puede ser estimulada por tumores a distancia (88). Las células mieloides también pueden expresar VEGFR1 de forma similar a como lo hacen las células endoteliales y algunas células cancerosas, secretando además enzimas proteolíticas como la MMP-9 en respuesta a la activación VEGFR1 por sus ligandos. En ratones *knockout* se demostró que MMP-9 y el TNF- α son críticos para la metástasis en el pulmón, ya que en su presencia las células cancerosas puedan establecerse por la abundante vascularización pulmonar y crecer como nódulos tumorales (88). Hiratsuka y col. proponen el concepto de preparación previa del tejido pulmonar antes de que ocurra la metástasis. En un modelo experimental para estudiar la metástasis, se demostró que la activación de las células endoteliales y macrófagos de pulmón, provocadas por las células del tumor primario de Lewis o LLC (Lewis lung carcinoma) favorecen la formación de la metástasis en el pulmón. Por otra parte, la supresión por VEGFR1 o MMP-9 reducen la metástasis en el pulmón (89). Así mismo, en el modelo de cáncer de pulmón de Lewis, se describieron áreas de acumulación de conglomerados de VEGFR1 y BMDC así como de fibronectina, originando un nicho premetastásico. Estos sitios alojaron preferentemente a las células LLC, observándose que el bloqueo de VEGFR1 impidió la formación de la metástasis (24, 90,91). Miembros de la familia del VEGF y el factor de crecimiento placentario PlGF han sido caracterizados como moduladores de la angiogénesis en muchos tumores (92). Estos factores de crecimiento se unen a los receptores VEGF en las células endoteliales promoviendo la proliferación, supervivencia y la migración. El VEGF se une a VEGFR1, VEGFR2 y PNR (neuropilins), mientras que PlGF se une únicamente a VEGFR1 y NRP-1 NRP-2 (93).

La expresión de VEGFR1 puede ser constitutiva o puede ser inducida por la expresión de VEGF y PlGF causada por hipoxia, lo cual se acompaña de crecimiento tumoral (94). Por otra parte, la lisil-oxidasa, inducida por la hipoxia media el reclutamiento de las *células mieloides derivadas de la médula ósea* o BMDC a los pulmones, fenómeno que ocurre durante la formación de la metástasis. Esto apoya la idea de que la formación de la metástasis en el pulmón depende de las vías inflamatorias, que incluye la acumulación o activación de las células BMDC en el tejido pulmonar (95). Usando un melanoma en un modelo experimental se observó un incremento de metástasis en el pulmón debido a una alta expresión de la molécula de adhesión vascular VCAM-1 en la microvasculatura del pulmón. En este modelo se ha observado un incremento de la frecuencia de metástasis pulmonar cuando los animales han sido inoculados con células tumorales, previamente tratados con citocinas pro-inflamatorias (96).

El tratamiento de los pacientes con metástasis en el pulmón se basa en tres modalidades: a) radioterapia profiláctica usada a dosis bajas en tumores con alto riesgo de producir metástasis en el pulmón, así como en las lesiones pulmonares previas al tratamiento quirúrgico; b) la resección de metástasis pulmonares por cirugía, que se hacen solo si no hay metástasis extrapulmonares. Es un tratamiento adecuado para la neoplasia primaria y si hay tolerancia por parte del paciente, se hace una resección completa de todas las metástasis pulmonares; c) la quimioterapia es el tratamiento estándar para la metástasis pulmonar múltiple, especialmente en tumores de alto índice de proliferación (97). En un modelo murino de tumor mamario el uso combinado de la ciclofosfamida o CP, más el etexilato de dabigatrán, un inhibidor directo de la trombina mostró un efecto sinérgico notable. Los tumores fueron significativamente más pequeños y se produjeron menos metástasis de pulmón al compararlos con los ratones tratados solamente con una sola de las drogas (98). Los pacientes con cáncer de mama triple negativo para ER⁻, PR⁻ y HER2⁻ tienen un mal pronóstico, ya que a menudo desarrollan metástasis. Las células de este cáncer, tratadas con selumetinib, un inhibidor de MEK, mostraron una inhibición del crecimiento y en los ratones se pudo constatar que se formaron, significativamente menos metástasis pulmonares, como lo demostraron los ratones control. Este inhibidor de MEK representa por tanto una alternativa potencial para la prevención de la metástasis (99). La *eribulina*, un inhibidor de la polimerización de los microtúbulos, fue utilizado para medir la actividad metastásica de las células de un cáncer mamario ER⁻, PR⁻,HER2⁻ en un modelo experimental “*in vivo*” con metástasis de pulmón. El

pretratamiento “*in vitro*” con este inhibidor ocasionó una inversión de EMT y una inducción de MET con la consiguiente disminución del número de metástasis pulmonares (100). Los “micro-ARN” son ARN conservados que regulan diversos procesos celulares cuya disfunción está involucrada en el desarrollo y progresión del cáncer de mama. El receptor de quimiocina CXCR7 está implicado en diversos procesos biológicos como la supervivencia celular, la adherencia y la movilidad, cuya sobreexpresión se ha observado en diferentes cánceres, como el de mama, pulmón y próstata. Los resultados obtenidos tanto “*in vitro*” como en un modelo de metástasis de pulmón “*in vivo*”, confirmaron que miR-101 es un inhibidor de crecimiento y de la invasión de las células del cáncer de mama a través de la inhibición de la vía CXCR7-STAT3. Estos resultados muestran el papel potencial de miR-101 como una alternativa terapéutica para el cáncer de mama (101).

Metástasis en el cerebro.- Este tipo de metástasis es muy común, siendo el 80% de ellas producidas por los tumores primarios de pulmón, cáncer de mama y los melanoma (102). Debido a la alta incidencia de metástasis cerebral asintomática es difícil estimar la verdadera prevalencia, pero diversos estudios estiman que entre del 15 al 25% de los pacientes con cáncer desarrollan metástasis en el cerebro (103,104). La media de supervivencia de los pacientes con metástasis cerebral no tratada es de 2 meses que podría ser extendido a 6 meses con tratamiento convencional de radioterapia y quimioterapia (105). Numerosos estudios han evidenciado los mecanismos que participan activamente en el reclutamiento de las células tumorales en el cerebro, habiéndose determinado también que el desarrollo de las metástasis cerebrales no es aleatorio. Es fundamentalmente una acumulación coordinada de mutaciones que permiten a las células del cáncer de mama establecerse dentro del *sistema nervioso central*. Los carcinomas que hacen metástasis en el cerebro tienen predilección por algunas regiones del cerebro: el 80% en los hemisferios cerebrales; el 15% en el cerebelo y el 5% en el tronco cerebral (106). En el caso del cáncer de mama, la aparición de la metástasis cerebral usualmente ocurre después de haberse extirpado quirúrgicamente el tumor primario y transcurrir un período de latencia de dos a tres años (107). Adicionalmente hay características diferentes entre la metástasis cerebral del cáncer de mama y el sitio del tumor primario, expresándose un aumento de la Ki67, una mayor densidad microvascular y la expresión de micro-ARN (108,109). En los tumores de mama HER2+ aumenta la probabilidad de desarrollar metástasis en el

cerebro, ya que posiblemente tiene afinidad por el tejido neural, lo cual ocurre en una media del 20% de los cánceres de mama (110). La diferencia existente entre el tumor primario del carcinoma de mama, negativo para HER2 pero positivo en la metástasis cerebral, ha sido constatada en el 24% de los casos, los cuales muestran una menor supervivencia (111). El aumento de la tasa de metástasis cerebral en el cáncer de mama HER2+, destaca el tropismo de las células HER2-positivo por el parénquima cerebral (112,113).

En experimentos con líneas celulares, la sobreexpresión de HER2 incrementa la producción de TGF- β , conduciendo a la activación de TGF/Smad y la expresión de E-caderina, incluyendo snail, slug y ZEB-1. La inhibición de HER2 por *curcubitacin 2* conduce a la inhibición de la metástasis cerebral “*in vivo*” (114). Por otra parte, HER2 contribuye a la transición epitelio/mesenquima TEM a través de la producción de TGF β , el cual es su regulador (115). La *barrera hematoencefálica*, denominada por sus siglas “*bhe*”, es un obstáculo para la infiltración de las células tumorales debido a las estrechas uniones endoteliales. En estudios con un modelo animal y usando resonancia magnética, se mostró que aproximadamente el 1.5% de las células malignas inyectadas formaban metástasis en el cerebro. El 95% de ellas se dispusieron a lo largo de los vasos sanguíneos cerebrales, en tanto que las colonias que se establecieron lo hicieron en el parénquima cerebral. Este resultado sugiere que la membrana basal vascular representa un “suelo” fértil para la formación de metástasis (116, 117,118). La extravasación de las células tumorales es facilitada por la expresión de COX-2 por parte de las células endoteliales, las cuales a su vez inducen la expresión de metaloproteinasas por parte de las células tumorales (119). La sobre-expresión de α B-crystallin, por parte de las células metastásicas de cáncer de mama, induce un aumento de la adhesión sobre las células endoteliales de la microvasculatura del cerebro (120).

La molécula de adhesión de unión A o JAM-A, es una proteína transmembrana que pertenece a la súper familia de las *inmunoglobulinas*, Ig, la cual se encuentra desregulada en las células del cáncer de mama metastásicas en el cerebro. Su expresión se asocia con la evolución de los pacientes y como un indicador de pronóstico (121). La *alfa 2,6-sialiltransferasa* o ST6GALNAC5 media, específicamente, la metástasis cerebral y su expresión en las células del cáncer de mama, aumenta su adhesión a las células endoteliales del cerebro en su paso a través de la barrera *bhe*. La participación

de esta sialiltransferasa en el cerebro resalta el papel de la glicosilación en las superficies celulares de las interacciones que ocurren en la metástasis órgano-específicas (122). Por otra parte hay que destacar el papel de los *astrocitos* en la sobrevivencia de las células tumorales de mama en el cerebro. Una vez que han atravesado la *bhe* son rodeadas y localizados por los astrocitos reactivos a través de la sobreexpresión de las *metaloproteinasas* o MMP, tales como MMP-2 y MMP-9 (123). También los astrocitos favorecen el crecimiento tumoral por secreción de las citocinas, la heparanasa, factores neurotróficos, TNF α , TGF β , IL6, etc (124). Los astrocitos reactivos se defienden de la invasión metastásica por la sobreexpresión de la *plasmina*, ya que su efecto anticoagulante estimula la secreción paracrina del *factor de muerte celular* FasL y de la inactivación de L1CAM secretada por las células tumorales. Esto impide el establecimiento de las células tumorales a lo largo de los vasos sanguíneos. Sin embargo, las células tumorales sobreviven en el parénquima cerebral protegidas de la plasmina por la expresión, en las células tumorales de la serpina, una serina proteasa (125). También los astrocitos pueden promover la supervivencia y crecimiento de las células tumorales metastásicas a partir del *neurotransmisor γ -aminobutírico* o GABA. A ellos se unen los receptores de GABA presentes en las células del cáncer de mama, que luego se catabolizan para conferir una ventaja metabólica para el crecimiento de las células metastásicas (126). Se propone que el parénquima cerebral suministra algún tipo de factor nutriente o de crecimiento que vitaliza el tumor metastásico (127). La alteración del metabolismo es característica en las células cancerosas, las cuales desarrollan una estrategia que permite a las células metastásicas cerebrales sobrevivir y proliferar. Las células metastásicas lo hacen por un proceso de glicolisis anaeróbica, en tanto que las células normales lo hacen por la oxidación aeróbica del piruvato (128). Por otra parte, la agresividad de los tumores de cáncer de mama triple negativo (TN) se asocia con una alta tasa de metástasis al sistema nervioso central (129). Se ha sugerido que los andrógenos activan los astrocitos del parénquima cerebral para facilitar el establecimiento de las células TN del cáncer de mama. Esto explicaría por qué los pacientes jóvenes con TN que presentan altos niveles de estrógeno, tienen un mayor riesgo de sufrir metástasis cerebral. Posiblemente, el desarrollo de estas metástasis dependerá más del perfil hormonal de la paciente que de factores intrínsecos de la célula tumoral (130).

La resistencia a la terapia sistémica por los tumores cerebrales metastásicos se ha atribuido a la barrera *bhe*. Se suponía ésta estaba intacta en los vasos de la lesión metastásica, lo que impedía la distribución de las drogas. No obstante, ahora se sabe que la presencia de una metástasis intracraneal modifica la integridad vascular y la *bhe* ya no presenta las características normales, por lo que la misma se denomina como la *barrera sangre-tumoral* o “*bst*” (131). Esta barrera presenta un aumento de la permeabilidad, reducción del flujo sanguíneo y una expresión aumentada o disminuida de afluencia de transportadores de eflujo (132,133). La estructura de la red vascular dentro de los tumores cerebrales es anatómica y funcionalmente diferente. Anatómicamente los tumores promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos deformados que carecen de la estructura clásica de la *bhe*. Los nuevos vasos sanguíneos deformados no tienen un contacto adecuado con los astrocitos, y además presentan fenestraciones o poros que permiten el paso libre de moléculas al cerebro (134,135). A nivel funcional, la red vascular dentro del tumor cerebral reduce la expresión de proteínas de las uniones estrechas, como la ZO-1. Estas uniones sirven de anclaje a la unión de la *occludina* con la membrana endotelial, con su consecuente aumento de la permeabilidad vascular (136,137). En los adultos las metástasis cerebrales clínicamente constituyen más de la mitad de todos los tumores cerebrales. Sus opciones actuales de tratamiento incluyen: la resección quirúrgica, la radioterapia y la quimioterapia. Aunque curativas en una baja proporción, como tratamientos paliativos mejora la supervivencia y calidad de vida de los pacientes. En el caso de la quimioterapia, ésta ha mostrado una actividad limitada en la metástasis cerebral de la mayoría de los tipos de tumores. Sobre todo considerando que muchos agentes quimioterapéuticos usados sistémicamente no atraviesan la barrera *bhe* y que otros pueden debilitarla al permitir la extravasación de las células tumorales de la circulación al parénquima cerebral (138).

El cáncer de mama es la segunda neoplasia sólida más común que hace metástasis en el cerebro. Los estudios epidemiológicos estiman que la incidencia de estas metástasis son del 10 al 16%, pero los informes de autopsia sugiere tasas de hasta el 30% (139,140). El gen HER2 es sobre expresado en un 20-25% de todos los canceres de mama y constituye un factor de riesgo bien establecido para las metástasis al cerebro (141). El uso de la quimioterapia en el tratamiento de estas metástasis no solo está limitado por la falta de penetración del fármaco a través de la *bhe*, sino también por el flujo de salida de las drogas por la alta expresión de la P-glicoproteína en las células endoteliales de los

capilares cerebrales (142). Sin embargo, varios agentes han demostrado tener actividad en este tipo de metástasis debido a un aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos deformados por las metástasis y los efectos de la radiación (143,144). La *temozolomida*, aunque es permeable, ha mostrado limitada actividad en la metástasis cerebral (145), pero el *cisplatino* ha mostrado actividad clínica en esta metástasis asociado al cáncer de mama como agente único y en combinación con la radioterapia (146). La *capecitabina* tiene buena eficacia en el cáncer de mama, ya que atraviesa la barrera *bhe* con ayuda de un transportador de nucleosidos, el hCNT (147). Otros agentes quimioterapéuticos utilizados en la terapia contra la metástasis cerebral de cáncer de mama, que expresan actividad Anti-HER2, son el *Trastuzumab* (148), el *Lapatinib* (149), el *Neratinib* (150), el *Afatinib* (151), el *Pertuzumab* (152) y el *sagopilone* (153). Por otra parte, proteínas asociadas a la hipoxia y la angiogénesis se han utilizado como indicadores tempranos en la evolución de pacientes con cáncer de mama metastásicos y tratados previamente con *bevacizumab*. En este esquema de tratamiento, los cambios en los niveles de IL8 y VEGFR2 pueden ser utilizados para pronosticar la respuesta en estos pacientes (154).

Metástasis en el hígado.- En el hígado las metástasis son el proceso maligno más frecuente, ya que todos los tumores pueden producirlas. Las más frecuentes son las que proceden del tracto gastrointestinal, especialmente del colon y el páncreas, siendo también usuales las de la mama y el pulmón. En los pacientes con cáncer de colon, el 40% padecen primero metástasis en el hígado y posteriormente en el pulmón. Las células llegan al hígado por varias vías: el sistema portal, la arteria hepática, los vasos linfáticos del hilio o por extensión directa de órganos vecinos. (155). Antes de detectarse las metástasis hay condiciones que las hacen posible: tamaño de las células tumorales, un endotelio fenestrado del hígado más la falta de una membrana basal sub-endotelial. Las células cancerosas extienden proyecciones a través del endotelio fenestrado en el *espacio de Disse*, estableciendo un contacto directo con los hepatocitos (156). Los mecanismos que permiten a las células malignas del colon formar metástasis hepáticas y pulmonares son poco conocidos, pero las evidencias clínicas señalan que diferentes vías de señalización MAPK están implicadas en este proceso. La activación ERK2 proporciona a las células la capacidad de colonizar el hígado, mientras la reducción de la señalización de MAPK p38 confiere a las células la capacidad de formar metástasis de pulmón a partir de lesiones hepáticas previamente establecidas. La

disminución de la señalización de MAPK p38 y el aumento en la expresión de PTHLH contribuye con la extravasación de las células para llegar al pulmón. La alta actividad de PTHLH hace a los vasos sanguíneos del pulmón permeables para ser atravesadas por las células tumorales para que puedan colonizar los pulmones. (157,158). También se ha demostrado que la respuesta inflamatoria se correlaciona con el potencial metastásico de algunos tumores en el hígado (155).

El hígado es el tercer sitio más común para las metástasis que produce el cáncer de mama, que de no ser tratadas hacen que el tiempo de supervivencia de los pacientes sea solo de 4 a 8 meses. En este cáncer el factor TNF- α puede desencadenar la expresión de E-selectina, lo cual aumenta la adhesividad del endotelio sinusoidal hepático, similar a lo reportado para el cáncer colorrectal y del pulmón (159). En líneas celulares de cáncer de mama la inducción de IL-6 causa una disminución de la adhesión celular que se asocia a una reducción en la expresión de la E-cadherina. Esto se correlaciona con lo observado en los pacientes con metástasis hepática de carcinoma de mama, que expresan altos niveles de IL-6. Las células de este cáncer crean un microambiente proinflamatorio por secreción de citocinas que favorecen la adherencia e invasividad en el hígado (160). Estas células también expresan receptores de quimiocinas, tal como CXCR4, mientras que en el hígado expresa su ligando CXCL12, lo que indica que la interacción CXCL12/CXCR4 contribuye a la metástasis en el hígado. También, CXCR4 participa en la modulación de la metástasis en el hígado a través de su interacción con las integrinas (161). Por otra parte, las células malignas de mama expresan altos niveles de CD44, habiéndose encontrado que la expresión más alta ocurrió en las células que hacen metástasis en el hígado (162). Igualmente altos niveles de expresión de Claudina-2 se detectaron en las células metastásicas de mama que se establecieron en el hígado. Esto ocurre mediante su adhesión a proteínas de la matriz extracelular, tales como la fibronectina y el colágeno tipo IV, que son abundantes en el hígado (163).

En los tumores primarios del colon la expresión aberrante de TGF α /EGFR contribuye a la propagación de las células tumorales a los nódulos linfáticos y al hígado (164). Las células del cáncer de colon sobreexpresan TGF α en respuesta a la hipoxia, así como de una alta expresión de EGFR, lo que inicia una secuencia en la cascada de señalización para su supervivencia. De esta manera, en la proliferación celular, están involucrados Ras / MAPK y la actividad anti-apoptótica (fosfatidilinositol 3-quinasa [PI3K] / Akt), lo

cual finalmente se correlaciona con la metástasis y resistencia a la quimioterapia (165,166). La condición de ER, PR y HER-2 es esencial para determinar la respuesta a cualquier tipo de tratamiento, bien sea terapia hormonal adyuvante, terapia molecular dirigida o quimioterapia. La relación ER, PR y HER-2 en el cáncer primario de mama y el cáncer metastásico en órganos específicos ha sido evaluada y determinada (167). El aumento en la fosforilación de HER-2 es un factor muy importante para el establecimiento de las metástasis hepáticas del cáncer de mama (168).

La quimioterapia y las hormonas siguen siendo las alternativas en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico. Adicionalmente la cirugía puede usarse para paliar las complicaciones de la metástasis, ya que si está limitada a segmentos individuales del hígado, la extirpación parcial de este órgano ofrece una posibilidad de curación. En pacientes con carcinoma ductal invasivo HER-2+ y con metástasis hepática, el tratamiento con docetaxel y dos agentes anti HER-2, el trastuzumab y el pertuzumab, más la resección de la parte del hígado con metástasis, han producido una respuesta completa (169). Otra opción en el tratamiento de pacientes con metástasis hepática es la utilización, por infusión arterial hepática HAI, de las combinaciones de irinotecan y bevacizumab y de oxiplatino combinado con bevacizumab o el cetuximab (170). En pacientes con metástasis de cáncer colorrectal en el hígado y los pulmones, la resección completa de las metástasis en ambos órganos ofrece los mejores resultados de supervivencia. Un estudio retrospectivo comparó las tasas de supervivencia general a 3 y 5 años en pacientes con metástasis de hígado y pulmón de cáncer colorrectal. Los pacientes que recibieron quimioterapia y resección solamente de la metástasis hepáticas presentaron mayores tasas de supervivencia que aquellos que sólo recibieron quimioterapia, pero menores tasas de supervivencia que los pacientes que recibieron quimioterapia más resección de ambas metástasis, tanto las pulmonares como las hepáticas (171,172). En un modelo experimental, el *receptor de la laminina* o LRP/LR ha sido implicado en la progresión del cáncer, determinándose su papel en la adhesión e invasión en las células de cáncer de hígado HUH-7. Estas células mostraron altos niveles de LRP/LR en comparación con las células leucémicas K562 y las células de mama MCF-7. El tratamiento de las células hepáticas con el anticuerpo específico anti LRP/LR, el IgG1-iS18, redujo significativamente tanto el potencial de adhesividad a la laminina-1 de las células del hígado como el potencial invasivo. Este resultado sugiere la utilización del anticuerpo IgG1-iS18 como una alternativa terapéutica en la metástasis

hepática (173). En un modelo animal se estudió el efecto combinado de SiARN dirigido contra el receptor de la hormona de crecimiento hGHR y el 5- fluorouracilo sobre la metástasis del cáncer de colon. Los resultados mostraron que esta combinación redujo la incidencia de la metástasis hepática de éste cáncer (174). En un amplio estudio se analizaron los patrones metastásicos de distribución de los cánceres de colon y recto de 46.027 pacientes. Se determinó que el cáncer de colon tenía una tasa de incidencia de metástasis al hígado del 13,8%, en tanto que la del cáncer de recto fue del 12,3%. Por otra parte el cáncer de recto presentó una tasa de incidencia en el pulmón del 5,6% en tanto que la del cáncer de colon fue del 3,7%. El cáncer de recto mostró una incidencia de metástasis en hueso del 1,2% en comparación al 0,8% señalado por el cáncer de colon. Los pacientes con cáncer colorrectal con metástasis de pulmón tenían un mayor riesgo de presentar metástasis en el hueso, 10,0% vs 4,5%; metástasis cerebral 3,1% vs 0,1% al contraponerlos con los pacientes que no presentaban metástasis en los pulmones. Esta distribución de los patrones metastásico puede ayudar para una mejor aplicación del tratamiento quimioterapéutico y también necesario para una eventual intervención quirúrgica. (175). Igualmente se estudió el beneficio de la resección quirúrgica en pacientes con cáncer de colon metastásico en el estadio IV. Los pacientes recibieron varios ciclos de quimioterapias neoadyuvantes, tales como ácido folínico, fluorouracilo (5-FU) y oxaliplatino (FOLFOX); ácido folínico, (5-FU) y irinotecan (FOLFIRI) y ácido folínico, (5-FU), oxaliplatino e irinotecan (FOLFOXIRI), así como bevacizumab, panitumumab y cetuximab. Los pacientes candidatos a una cirugía inmediata no se beneficiaron del tratamiento, mientras que los pacientes que no eran candidatos a la cirugía presentaron un beneficio de supervivencia al tratamiento con quimioterapia (176). Así mismo, en pacientes con metástasis hepática de cáncer de colon se evaluó la eficacia del tratamiento con ondas electromagnéticas, el cual fue efectivo al prolongar el tiempo de supervivencia de los pacientes y el control de la metástasis hepática con un tamaño igual o menor a 3 cm (177).

Actualmente se están utilizando modelos que buscan remedar las estructuras morfológicas y las relaciones que se establecen en los sistemas vivos. Para ello se realizan estudios con modelos tridimensionales que se acercan a la composición celular y molecular de los tumores, destacando el cultivo de *esferoides humanos multicelulares* o MTS (178); b) la siembra sobre soportes porosos (179); c) versiones miniaturizadas de los diferentes órganos conectados por medio de canales vasculares denominados “Chip”

(180). Modelos como estos permitirán desarrollar terapias que actúen más allá de células y moléculas, lo cual hará más eficientes las investigaciones y la práctica clínica, lo cual hará posible optimizar alcanzar la prevención y lograr tratamiento más efectivos.

Conclusiones.- A la luz de las nuevas investigaciones, la hipótesis “*seed and soil*” ha ayudado a redimensionar y darle un nuevo marco a las metástasis, contribuyendo a tener una visión más ajustada y real de una enfermedad que es compleja y multifactorial. Esta nueva visión ayuda a ver mejor que el cáncer y su malignidad no son solamente el resultado exclusivo de mutaciones génicas específicas de las células tumorales, sino también mostrar la necesidad de considerar que el macroambiente tumoral crea un nuevo marco que hace necesario que sea priorizado para tener también una visión integral y poder alcanzar la plena comprensión de sus fenómenos y la solución clínica de la enfermedad. Al enfocarse toda la atención sobre las células y los genes, todo estudio es incompleto, más si se considera que no todos los individuos que portan genes alterados desarrollan cáncer. Por ello los resultados de los tratamientos actuales aceptados, basados en los protocolos convencionales presentan una baja eficacia, al estar basados en destruir el tumor sin una evaluación integral del paciente con cáncer. Por otra parte los tratamientos se aplican de forma igual a todo paciente con el mismo tipo de tumor histológico, sin tomar en cuenta que la progresión tumoral es diferente en cada paciente. Es importante destacar que el tejido circundante, con sus células no cancerosas, incluyendo vasos sanguíneos y células del sistema inmune, juegan un papel importante en el cáncer, por lo que se deberían utilizar tratamientos enfocados también en el medio para desarrollar terapias de prevención del cáncer basadas en convertir el ambiente en un entorno adverso para las células tumorales. Por ello es importante conocer y determinar el entorno tumoral, ya que daría una visión más completa de la enfermedad y usar más racionalmente la terapia.

Bibliografía

1. Varmus H, Weiberg RA (1993) **Genes and the Biology of Cancer** *Scientific American Library*, A división of HPHLP, New York.
2. Nowell PC (1976) **The clonal evolution of tumor cell populations.** *Science* **194**:23-28.
3. Arvelo F, Cotte C, Sojo F (2014) **Células Madre y Cáncer.** *Investigación Clínica*, **55**: 371-391

4. Sell S, Pierce GB (1994) **Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers** *Lab Invest* **70**:6-22.
5. Arvelo F y Poupon MF (2001) **Aspectos Moleculares y Celulares de la Metástasis Cancerosa** *Act Científ Venezol* **52**(4): 304-312.
6. De Vita VT, Hellman S and Rosemberg SA (2004) **Cancer, Principles & Practice of Oncology**. Lippincott & Wilkins.
7. Nguyen DX, Bos PD, Massagué J (2009) **Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization** *Nat Rev Cancer* **9**:274-284.
8. Nguyen DX (2001) **Tracing the origins of metastasis** *J Pathol* **223**:195-204.
9. Hanahan D, Weinberg RA (2011) **Hallmarks of cancer: the next generation** *Cell* **144**:646-674.
10. Arvelo F, Sojo F, Cotte C. (2016) **Tumour progression and metastasis.** *ecancermedicalscience* 10:617 DOI: 10.3332/ecancer.2016.617. Review.
11. Ferrarra N, Hans-Peter G, LeCouter J (2003) **The biology of VEGF and its receptors** *Nature Medicine* **9**:669-676.
12. Guadamillas MC, Cerezo A, del Pozo MA (2011) **Overcoming anoikis – pathways to anchorage-independent growth in cancer** *Journal of Cell Science* **124**: 3189-3197.
13. Carmeliet P (2005) **Angiogenesis in life, Disease and Medicine** *Nature* **438**: 932-936.
14. Greene HS, Harvey EK (1964) **The relationship between the dissemination of tumor cells and the distribution of metastases** *Cancer Res* **24**:799–811.
15. Auerbach R, Lu WC, Pardon E, et al (1987) **Specificity of adhesion between murine tumor cells and capillary endothelium: an in vitro correlate of preferential metastasis in vivo** *Cancer Res* **47**:1492–1496.
16. Willmott N, Newton, J. (1987) **Demonstration of site-specific tumor growth by a 50% end point assay** *Invasion & Metastasis* **70**:30-40.
17. Hiratsuka S, Goel S, Kamoun WS, et al (2011) **Endothelial focal adhesion kinase mediates cancer cell homing to discrete regions of the lungs via E-selectin upregulation** *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:3725–3730.
18. Ki YJ, Borsig L, Han HL, et al (1999) **Distinct selectin ligands on colon carcinoma mucins can mediate pathological interactions among platelets, leukocytes, and endothelium** *Am J Pathol* **155**:461–472.
19. Padua D, Zhang XH, Wang Q et al (2008) **TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4** *Cell* **133**:66–77.
20. Gupta GP, Nguyen DX, Chiang AC et al (2007) **Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis** *Nature* **446**:765–770.
21. 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.

22. Gil-Bernabe AM, Ferjancic S, Tlalka M 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.
23. Qian B, Deng Y, Im JH et al (2009) **A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth** *PLoS One* **4**:e6562.
24. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S et al (2005) **VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche** *Nature* **438**:820–827
25. Deng J, Liu Y, Lee H et al (2012) **S1PR1-STAT3 Signaling Is Crucial for Myeloid Cell Colonization at Future Metastatic Sites** *Cancer Cell* **21**:642–654.
26. Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, Maru Y (2006) **Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis** *Nat Cell Biol* **8**:1369–1375.
27. Ewing J (1928) **Neoplastic diseases**. 3rd ed.. WB Saunders; Philadelphia.
28. Paget S (1989) **The distribution of secondary growths in cancer of the breast.** *Cancer Metastasis Rev* **8**:98–101.
29. Sugarbaker EV, Cohen AM and Ketcham AS (1971) **Do metastases metastasize?** *Ann Surg* **174**:161-166.
30. Hart IR and Fidler IJ (1980) **Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 Melanoma** *Cancer Res* **40**:2281-2287.
31. Fidler IJ, Nicolson GL. (1976) **Organ selectivity for implantation survival and growth of B16 melanoma variant tumor lines.** *J Natl Cancer Inst*; **57**:1199-1202.
32. Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D’Souza-Schorey C. (2010) **Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression** *J Cell Sci* **123**:1603–1611.
33. Martins VR, Dias MS, Hainaut P (2013) **Tumor-cell-derived microvesicles as carriers of molecular information in cancer** *Curr Opin Oncol* **25**:66-75.
34. Ji H, Greening DW, Barnes TW et al (2013) **Proteome profiling of exosomes derived from human primary and metastatic colorectal cancer cells reveal differential expression of key metastatic factors and signal transduction components** *Proteomics* **13**(10–11):1672–86.doi:10.1002/pmic. 201200562.
35. Zhang HG, Grizzle WE (2014) **Exosomes: a novel pathway of local and distant intercellular communication that facilitates the growth and metastasis of neoplastic lesions** *Am J Pathol* **184**:28–41. doi:10.1016/j.ajpath.2013.09.027.
36. Lai RC, Chen TS, Lim SK (2011) **Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease** *Regen Med* **6**:481-492.

37. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S et al (2008) **Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers** *Nat Cell Biol* **10**(12):1470–1476. doi:10.1038/ncb1800.
38. Thompson CA, Purushothaman A, Ramani VC (2013) **Heparanase regulates secretion, composition and function of tumor cell-derived exosomes** *J Biol Chem* **288**:10093–10099. doi:10.1074/jbc.C112.444562.
39. Cho JA, Park H, Lim EH et al (2011) **Exosomes from ovarian cancer cells induce adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to acquire the physical and functional characteristics of tumor-supporting myofibroblasts** *Gynecol Oncol* **123**(2):379–86. doi:10.1016/j.ygyno.2011.08.005.
40. Al-Nedawi K, Meehan B, Kerbel RS (2009) **Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR** *Proc Natl Acad Sci USA* **106**(10):3794–9. doi:10.1073/pnas.0804543106.
41. Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S et al (2012) **Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET** *Nat Med* **18**:883–891. doi:10.1038/nm.2753.
42. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J et al (2008) **Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells** *Nat Cell Biol* **10**:619–624. doi:10.1038/ncb1725.
43. Grange C, Tapparo M, Collino F, et al (2011) **Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche** *Cancer Res* **71**:5346–5356. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0241.
44. Liu Y, Zhu XJ, Zeng C et al (2014) **Microvesicles secreted from human multiple myeloma cells promote angiogenesis** *Acta Pharmacol Sin* **35**:230–238. doi:10.1038/aps.2013.141.
45. Aga M, Bentz GL, Raffa S et al (2014) **Exosomal HIF1 alpha supports invasive potential of nasopharyngeal carcinoma associated LMP1-positive exosomes** *Oncogene* **33**:4613–4622. doi:10.1038/onc.2014.66.
46. Kobayashi M, Salomon C, Tapia J (2014) **Ovarian cancer cell invasiveness is associated with discordant exosomal sequestration of Let-7 miRNA and miR-200** *J Transl Med* **12**:4. doi:10.1186/1479-5876-12-4.
47. Soldevilla B, Rodriguez M, SanMillan C et al (2014) **Tumor-derived exosomes are enriched in DeltaNp73, which promotes oncogenic potential in acceptor cells and correlates with patient survival** *Hum Mol Genet* **23**:467–4678. doi:10.1093/hmg/ddt437.
48. Wang J, Hendrix A, Hernot S et al (2014) **Bone marrow stromal cell-derived exosomes as communicators in drug resistance in multiple myeloma cells** *Blood* **124**:555–566. doi:10.1182/blood-2014-03-562439.
49. Castellana D, Zobairi F, Martinez MC et al (2009) **Membrane microvesicles as actors in the establishment of a favorable prostatic tumoral niche: a role for activated fibroblasts and CX3CL1-CX3CR1 axis** *Cancer Res* **69**:785–793.

50. Vella LJ (2014) **The emerging role of exosomes in epithelial–mesenchymal-transition in cancer** *Frontiers in Oncology* doi: 10.3389/fonc.2014.00361.
51. Hoshino A (2015) **Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis.** *Nature.* 2015 Nov 19; **527**(7578):329-335. doi: 10.1038/nature15756. Epub 2015 Oct 28.
52. Grange C (2011) **Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche.** *Cancer Res* 2011 Aug 1; **71**(15):5346-5356.
53. Jung T (2009) **CD44v6 dependence of premetastatic niche preparation by exosomes.** *Neoplasia* **11**:1093-1105.
54. Costa-Silva B (2015) **Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver.** *Nat Cell Biol.* Jun; **17**(6):816-826. doi: 10.1038/ncb3169. Epub 2015 May 18
55. Coleman RE (2006) **Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity.** *Clin Cancer Res* **12**: 6243s–6249s.
56. Huang Q and Ouyang X (2012) **Biochemical-markers for the diagnosis of bone metastasis: a clinical review** *Cancer Epidemiol* **36**: 94–98.
57. Shiao SL, Chu GC and Chung LW (2016) **Regulation of prostate cancer progression by the tumor microenvironment** *Cancer Lett* Jan 28. pii: S0304-3835(15)00773-9. doi: 10.1016/j.canlet.2015.12.022.
58. Psaila B and Lyden D (2009) **The metastatic niche: adapting the foreign soil** *Nat Rev Cancer* **9**:285–293.
59. Kaplan RN, Rafii S y Lyden D (2006) **"Preparing the "soil": the premetastatic niche."** *Cancer Res* **66**: 11089-11093.
60. Sun YX, Fang M, Wang J et al (2007). **"Expression and activation of alpha v beta 3 integrins by SDF-1/CXC12 increases the aggressiveness of prostate cancer cells"** *Prostate* **67**(1): 61-73.
61. Roodman GD (2004) **Mechanisms of bone metastasis** *N Engl J Med* **350**:1655–1664.
62. Käkönen SM and Mundy GR (2003) **Mechanisms of osteolytic bone metastases in breast carcinoma** *Cancer* **97**:834–839.
63. Buijs JT and van Der Pluijm G (2009) **Osteotropic cancers: from primary tumor to bone** *Cancer Lett* **273**:177–193.
64. Bendre MS, Gaddy-Kurten D, Mon-Foote T, et al (2002) **Expression of interleukin 8 and not parathyroid hormone-related protein by human breast cancer cells correlates with bone metastasis in vivo** *Cancer Res* **62**:5571–5579.
65. Cox TR (2015) **The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase.** *Nature* **522**:106-110
66. Ibrahim T, Flamini E, Mercatali L et al (2010) **Pathogenesis of osteoblastic bone metastases from prostate cancer** *Cancer* **116**:1406–18.
67. Theriault RL (2012) **Biology of bone metastases** *Cancer Control* **19**:92–101.

68. Mishra S, Tang Y, Wang L et al. (2011) **Blockade of transforming growth factor-beta (TGF- β) signaling inhibits osteoblastic tumorigenesis by a novel human prostate cancer cell line** *Prostate* **71**: 1441-1454.
69. Wan X, Li ZG, Yingling JM et al (2012) **Effect of transforming growth factor beta (TGF-beta) receptor I kinase inhibitor on prostate cancer bone growth** *Bone* **50**: 695-703.
70. Festuccia C, Angelucci A, Gravina GL (2000) **Osteoblast-derived TGF-beta1 modulates matrix degrading protease expression and activity in prostate cancer cells** *Int J Cancer* **85**:407-415.
71. Guise TA, Mohammad KS, Clines G et al (2006) **Basic mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic bone metastases** *Clin Cancer Res* Oct 15; **12**(20 Pt 2):6213s-6216s.
72. Bensalah K, Lotan Y, Karam JA and Shariat SF (2008) **New circulating biomarkers for prostate cancer** *Prostate Cancer Prostatic Dis* **11**:112-120.
73. Marques RB, Dits NF, Erkens-Schulze S et al (2010) **"Bypass mechanisms of the androgen receptor pathway in therapy-resistant prostate cancer cell models"** *PLoS One* **5**(10): e135009.
74. Watson PA, Chen YF, Balbas MD et al (2010) **Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor** *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 16759-16765.
75. Body JJ, Casimiro S and Costa L (2015) **Targeting bone metastases in prostate cancer: improving clinical outcome** *Nat Rev Urol* Jun; **12**(6):340-356. doi: 10.1038/nrurol.2015.90. Epub 2015 May 5.
76. Zhang G, Liu X, Li J et al (2015) **Androgen receptor splice variants circumvent AR blockade by microtubule-targeting agents** *Oncotarget* 2015 Jun 22. [Epub ahead of print.
77. Arichi N, Mitsui Y, Hiraki M et al (2015) **Versican is a potential therapeutic target in docetaxel-resistant prostate cancer** *Oncoscience* 2015 Mar 2; **2**(2):193-204. eCollection 2015.
78. Ning YM, Gulley JL, Arlen PM et al (2010) **Phase II trial of bevacizumab, thalidomide, docetaxel, and prednisone in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer** *J Clin Oncol* **28**:2070-2076.
79. Qi P, Chen M, Zhang LX et al (2015) **A Meta-Analysis and Indirect Comparison of Endothelin A Receptor Antagonist for Castration-Resistant Prostate Cancer** *PLoS One* Jul 20; **10**(7):e0133803. doi: 10.1371/journal.pone.0133803. eCollection 2015.
80. Smith MR, Coleman RE, Klotz L et al (2015) **Denosumab for the prevention of skeletal complications in metastatic castration-resistant prostate cancer: comparison of skeletal-related events and symptomatic skeletal events** *Ann Oncol* **26**:368-374.

81. 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
82. Ide H, Lu Y, Tanaka T et al (2014) **Circulating tumor cell count during zoledronic acid treatment in men with metastatic prostate cancer: a pilot study** *Prostate Int* **2**:147-151.
83. Hoy SM (2013) **Abiraterone acetate: a review of its use in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer** *Drugs* **73**(18):2077-2091.
84. Wen SM, Quan CY, Jiang N (2015) **What is the next generation therapeutic strategy for castration-resistant prostate cancer** *Asian J Androl* **17**:223-224.
85. Li XX, Li RJ, Zhao LJ et al (2015) **Expression of molecular factors correlated with metastasis in small cell lung cancer and their significance** *Int J Clin Exp Pathol* **8**:14676-14684.
86. Nicolson GL (1988) **Organ specificity of tumor metastasis. Rote of preferential adhesion, invasion and growth of malignant cells specific secondary sites** *Cancer Metastasis Rev* **7**:1432-1435.
87. Duda DG and Jain RK (2010) **Premetastatic lung "niche": is vascular endothelial growth factor receptor 1 activation required?** *Cancer Res* **70**:5670-5673.
88. Kim S, Takahashi H, Lin WW et al (2009) **Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis** *Nature* **457**:102–106.
89. Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S et al (2002) **MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis** *Cancer Cell* **2**:289–300.
90. Dawson MR, Duda DG, Chae SS et al (2009) **VEGFR1 activity modulates myeloid cell infiltration in growing lung metastases but is not required for spontaneous metastasis formation** *PLoS One* 2009 Sep 18;4(9):e6525. doi: 10.1371/journal.pone.0006525.
91. Fischer C, Mazzone M, Jonckx B and Carmeliet P (2008) **FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy?** *Nat Rev Cancer* **8**:942–956.
92. Ferrara N, Gerber HP and LeCouter J (2003) **The biology of VEGF and its receptors** *Nat Med* **9**:669–676.
93. Miao HQ and Klagsbrun M (2000) **Neuropilin is a mediator of angiogenesis** *Cancer Metastasis Rev* **19**:29–37.
94. Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, Carmeliet P (2008) **FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy?** *Nat Rev Cancer* **8**:942–956.
95. Erler JT, Bennewith KL, Cox TR et al (2009) **Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche** *Cancer Cell* **15**:35–44.

96. Langley RR, Carlisle R, Ma L et al (2001) **Endothelial expression of vascular cell adhesion molecule-1 correlates with metastatic pattern in spontaneous melanoma** *Microcirculation* **8**(5):335-345.
97. De Vita VT, Hellman S and Rosemberg SA (2004) **Cancer, Principles & Practice of Oncology** *Lippincott & Wilkins*.
98. Alexander ET, Minton AR, Hayes CS et al (2015) **Thrombin Inhibition and Cyclophosphamide Synergistically Block Tumor Progression and Metastasis** *Cancer Biol Ther* **18**:0. [Epub ahead of print].
99. Bartholomeusz C, Xie X, Pitner MK et al (2015) **MEK inhibitor selumetinib (AZD6244; ARRY-142886) prevents lung metastasis in a triple-negative breast cancer xenograft model** *Mol Cancer Ther.* 2015 Sep 17. pii: molcanther.0243.2015. [Epub ahead of print].
100. Yoshida T, Ozawa Y, Kimura T et al (2014) **Eribulin mesilate suppresses experimental metastasis of breast cancer cells by reversing phenotype from epithelial-mesenchymal transition (EMT) to mesenchymal-epithelial transition (MET) states** *Br J Cancer* **110**(6):1497-505. doi: 10.1038/bjc.2014.80. Epub 2014 Feb 25.
101. Li JT, Jia LT, Liu NN et al (2015) **MiRNA-101 inhibits breast cancer growth and metastasis by targeting CX chemokine receptor 7** *Oncotarget* 2015 Sep 1. [Epub ahead of print].
102. Nayak L, Lee EQ and Wen PY (2012) **Epidemiology of brain metastases** *Curr Oncol Rep* **14**:48-54.
103. Brastianos HC, Cahill DP and Brastianos PK (2015) **Systemic therapy of brain metastases** *Curr Neurol Neurosci Rep* **15**:518. doi: 10.1007/s11910-014-0518-9.
104. Fox BD, Cheung VJ, Patel AJ, et al (2011) **Epidemiology of metastatic brain tumors** *Neurosurg Clin N Am* **22**:1-6.
105. Sperduto PW, Kased N, Roberge D et al (2012) **Summary report on the graded prognostic assessment: an accurate and facile diagnosis-specific tool to estimate survival for patients with brain metastases** *J Clin Oncol* **30**:419-425.
106. Delattre JY, Krol G, Thaler HT and Posner JB (1988) **Distribution of brain metastases** *Arch Neurol* **45**:741-744.
107. Weil RJ, Palmieri DC, Bronder JL et al (2005) **Breast cancer metastasis to the central nervous system** *Am J Pathol* **167**:913-920.
108. Ahmad A, Sethi S, Chen W et al (2014) **Up-regulation of microRNA-10b is associated with the development of breast cancer brain metastasis** *Am J Transl Res* **6**:384-390.
109. Berghoff AS, Ilhan-Mutlu A, Dinhof C et al (2014) **Differential role of angiogenesis and tumor cell proliferation in brain metastases according to primary tumor type: Analysis of 639 cases** *Neuropathol Appl Neurobiol* epub ahead of print. 10.1111/nan.12185.

110. Pinhel I, Hills M, Drury S et al (2012) **NCRI Adjuvant Breast Cancer Trial Management Group: ER and HER2 expression are positively correlated in HER2 non-overexpressing breast cancer** *Breast Cancer Res* **14**:R46.
111. Niikura N, Liu J, Hayashi N et al (2012) **Loss of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression in metastatic sites of HER2-overexpressing primary breast tumors** *J Clin Oncol* **30**:593-9.
112. Montagna E, Canello G, D'Agostino D et al (2009) **Central nervous system metastases in a cohort of metastatic breastcancer patients treated with trastuzumab** *Cancer Chemother Pharmacol* **63**:275-280.
113. Medress Z and Gephart MH (2015) **Molecular and genetic predictors of breast-to-brain metástasis: Review and case Presentation** *Cureus* **7**:e246.DOI 10.7759/cureus.246.
114. Gupta P and Srivastava SK (2014) **HER2 mediated de novo production of TGF β leads to SNAIL driven epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of breast cancer** *Mol Oncol* **8**:1532-1547.
115. Kalluri R and Weinberg RA (2009) **The basics of epithelial-mesenchymal transition** *J Clin Invest* **119**:1420-1428.
116. Heyn C, Ronald JA, Ramadan SS et al (2006) **In vivo MRI of cancer cell fate at the single-cell level in a mouse model of breast cancer metastasis to the brain** *Magn Reson Med* **56**:1001-1010.
117. Carbonell WS, Ansorge O, Sibson N and Muschel R (2009) **The vascular basement membrane as "soil" in brain metastasis** *PLoS One* **10**;4(6):e5857. doi: 10.1371/journal.pone.0005857.
118. Fidler IJ, Balasubramanian K, Lin Q et al (2010) **The brain microenvironment and cancer metastasis** *Mol Cells* **30**:93-98.
119. Lee KY, Kim YJ, Yoo H et al (2011) **Human brain endothelial cell-derived COX-2 facilitates extravasation of breast cancer cells across the blood-brain barrier** *Anticancer Res* **31**(12):4307-13.
120. Malin D, Strelakova E, Petrovic V et al (2014) **α B-crystallin: a novel regulator of breast cancer metastasis to the brain** *Clin Cancer Res* **20**:56-67.
121. Zhao C, Lu F, Chen H et al (2014) **Dysregulation of JAM-A plays an important role in human tumor progression** *Int J Clin Exp Pathol* **7**:7242-7248.
122. Bos PD, Zhang XH, Nadal C et al (2009) **Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain** *Nature* **459**:1005-1009.
123. Wang L, Cossette SM, Rarick KR et al (2013) **Astrocytes directly influence tumor cell invasion and metastasis in vivo** *PLoS One* **4**; **8**(12):e80933. doi: 10.1371/journal.pone.0080933. eCollection 2013.
124. Sofroniew MV and Vinters HV (2010) **Astrocytes: biology and pathology** *Acta Neuropathol* **119**:7–35.
125. Valiente M, Obenauf AC, Jin X et al (2014) **Serpins promote cancer cell survival and vascular co-option in brain metastasis** *Cell* **156**:1002-1016.

126. Neman J, Termini J, Wilczynski S et al (2014) **Human breast cancer metastases to the brain display GABAergic properties in the neural niche** *Proc Natl Acad Sci USA* **111**:984-9.
127. Winkler F (2014) **The brain microenvironment: friend or foe for metastatic tumor cells?** *Neuro Oncol* **16**:1565-6.
128. Chen J, Lee HJ, Wu X et al (2015) **Gain of glucose-independent growth upon metastasis of breast cancer cells to the brain** *Cancer Res* **75**:554-565.
129. Rojas Laimito K, Gámez-Pozo A, Sepúlveda J, Manso L, López-Vacas R, Pascual T et al.(2016) **Characterization of the triple negative breast cancer phenotype associated with the development of central nervous system metastases.** *ecancer* **10**:632 DOI: 10.3332/ecancer.2016.632.
130. Sartorius CA, Hanna CT, Grill B et al (2015) **Estrogen promotes the brain metastatic colonization of triple negative breast cancer cells via an astrocyte-mediated paracrine mechanism** *Oncogene* **28** 1–12 DOI:10.1038/onc.2015.353 PMID: 26411365.
131. Lockman PR, Mittapalli RK, Taskar KS et al (2010) **Heterogeneous blood-tumor barrier permeability determines drug efficacy in experimental brain metastases of breast cancer** *Clin Cancer Res* **16**(23):5664–5678.
132. Gerstner ER and Fine RL (2007) **Increased permeability of the blood-brain barrier to chemotherapy in metastatic brain tumors: establishing a treatment paradigm** *J Clin Oncol* **25**(16):2306–2312.
133. Bronger H, Konig J, Kopplow K et al (2005) **ABCC drug efflux pumps and organic anion uptake transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier** *Cancer Res* **65**(24):11419–11428.
134. Bertossi M, Virgintino D, Maiorano E et al (1997) **Ultrastructural and morphometric investigation of human brain capillaries in normal and peritumoral tissues** *Ultrastruct Pathol* **21**(1):41–49.
135. Hasegawa H, Ushio Y, Hayakawa T (1983) **Changes of the blood-brain barrier in experimental metastatic brain tumors** *J Neurosurg* **59**(2):304–310.
136. Liu LB, Xue YX, Liu YH and Wang YB (2008) **Bradykinin increases blood-tumor barrier permeability by down-regulating the expression levels of ZO-1, occludin, and claudin-5 and rearranging actin cytoskeleton** *J Neurosci Res* **86**(5):1153–1168.
137. Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE et al (2010) **Structure and function of the blood-brain barrier** *Neurobiol Dis* **37**(1):13–25.
138. Blecharz KG, Colla R, Rohde V and Vajkoczy P (2015) **Control of the blood-brain barrier function in cancer cell metastasis** *Biol Cell* May 29. doi: 10.1111/boc.201500011. [Epub ahead of print].
139. Patanaphan V, Salazar OM and Risco R (1988) **Breast cancer: metastatic patterns and their prognosis** *South Med J* **81**:1109–1112.
140. Lee YT (1983) **Breast carcinoma: pattern of metastasis at autopsy** *J Surg Oncol* **23**:175–180.

141. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA et al (1989) **Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer** *Science* **244**:707–712.
142. Tosoni A, Franceschi E and Brandes AA (2008) **Chemotherapy in breast cancer patients with brain metastases: have new chemotherapeutic agents changed the clinical outcome?** *Crit Rev Oncol Hematol* **68**:212–221.
143. van Vulpen M, Kal HB, Taphoorn MJ and El-Sharouni SY (2002) **Changes in blood-brain barrier permeability induced by radiotherapy: implications for timing of chemotherapy?** *Oncol Rep* **9**:683–688.
144. Fidler IJ (2011) **The role of the organ microenvironment in brain metastasis** *Semin Cancer Biol* **21**:107–112.
145. Siena S, Crino L, Danova M et al. (2010) **Dose-dense temozolomide regimen for the treatment of brain metastases from melanoma, breast cancer, or lung cancer not amenable to surgery or radiosurgery: a multicenter phase II study** *Ann Oncol* **21**:655–661.
146. Cassier PA, Ray-Coquard I, Sunyach MP et al (2008) **A phase 2 trial of whole-brain radiotherapy combined with intravenous chemotherapy in patients with brain metastases from breast cancer** *Cancer* **113**:2532–2538.
147. Chargari C, Kirova YM, Dieras V et al. (2009) **Concurrent capecitabine and whole-brain radiotherapy for treatment of brain metastases in breast cancer patients** *J Neurooncol* **93**:379–384.
148. Dijkers EC, Oude Munnink TH, Kosterink JG et al (2010) **Biodistribution of ⁸⁹Zr-trastuzumab and PET imaging of HER2-positive lesions in patients with metastatic breast cancer** *Clin Pharmacol Ther* **87**:586–592.
149. Metro G, Foglietta J, Russillo M et al. (2011) **Clinical outcome of patients with brain metastases from HER2-positive breast cancer treated with lapatinib and capecitabine** *Ann Oncol* **22**:625–630.
150. Burstein HJ, Sun Y, Dirix LY et al (2010) **Neratinib, an irreversible ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced ErbB2-positive breast cancer** *J Clin Oncol* **28**:1301–1307.
151. Lin NU, Winer EP, Wheatley D et al. (2012) **A phase II study of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker, in patients with HER2-positive metastatic breast cancer progressing after trastuzumab** *Breast Cancer Res Treat* **133**:1057–1065.
152. Moya-Horno I and Cortés J (2015) **The expanding role of pertuzumab in the treatment of HER2-positive breast cancer** *Breast Cancer* (Dove Med Press). **7**:125-132.
153. Freedman RA, Bullitt E, Sun L et al. (2011) **A phase II study of sagopilone (ZK 219477; ZK-EPO) in patients with breast cancer and brain metastases** *Clin Breast Cancer* **11**:376–383.
154. Lam SW, Nota NM, Jager et al (2016) **Angiogenesis- and Hypoxia-Associated Proteins as Early Indicators of the Outcome in Patients with Metastatic Breast Cancer Given First-Line Bevacizumab-Based Therapy** *Clin Cancer Res* 2016 Jan 28.

155. Ma R, Feng Y, Lin S et al (2015) **Mechanisms involved in breast cancer liver metastasis** *J Transl Med* 2015 Feb 15; **13**:64. doi: 10.1186/s12967-015-0425-0.
156. Martin MD, Kremers GJ, Short KW et al (2010) **Rapid extravasation and establishment of breast cancer micrometastases in the liver microenvironment** *Mol Cancer Res* **8**:1319–1327.
157. Urosevic J, Garcia-Albéniz X, Planet E, Real S, Céspedes MV, Guiu M et al. **Colon cancer cells colonize the lung from established liver metastases through p38 MAPK signalling and PTHLH.** *Nat Cell Biol.* 2014; **16**:685-694.
158. del Barco Barrantes I, Nebreda AR (2012) **Roles of p38 MAPKs in invasion and metastasis.** *Biochem Soc Trans* **40**:79-84
159. St Hill CA (2011) **Interactions between endothelial selectins and cancer cells regulate metastasis** *Front Biosci* **16**:3233–3251.
160. Asgeirsson KS, Olafsdottir K, Jonasson JG and Ogmundsdottir HM (1998) **The effects of IL-6 on cell adhesion and e-cadherin expression in breast cancer.** *Cytokine* **10**:720–728.
161. Furusato B, Mohamed A, Uhlen M and Rhim JS (2010) **CXCR4 and cancer** *Pathol Int* **60**:497–505.
162. Erin N, Kale S, Tanriover G et al (2013) **Differential characteristics of heart, liver, and brain metastatic subsets of murine breast carcinoma** *Breast Cancer Res Treat* **139**:677–689.
163. Tabaries S, Dupuy F, Dong Z et al (2012) **Claudin-2 promotes breast cancer liver metastasis by facilitating tumor cell interactions with hepatocytes** *Mol Cell Biol* **32**:2979–2991.
164. Sasaki T, Hiroki K and Yamashita Y (2013) **The role of epidermal growth factor receptor in cancer metastasis and microenvironment** *Biomed Res Int* 2013:546318. doi: 10.1155/2013/546318. Epub 2013 Aug 7.
165. Herbst RS (2004) **Review of epidermal growth factor receptor biology** *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **59**: 21–26.
166. Groenen LC, Nice EC and Burgess AW (1994) **Structure-function relationships for the EGF/TGF- α family of mitogens** *Growth Factors* **11**: 235–257.
167. Koo JS, Jung W and Jeong J (2010) **Metastatic breast cancer shows different immunohistochemical phenotype according to metastatic site** *Tumori* **96**:424–432.
168. Liu J, Deng H, Jia W et al (2012) **Comparison of ER/PR and HER2 status in primary and paired liver metastatic sites of breast carcinoma in patients with or without treatment** *J Cancer Res Clin Oncol* **31**: 837-842
169. Schoellhammer HF, Hsu F, Vito C et al (2014) **Complete pathologic response of HER2-positive breast cancer liver metastasis with dual anti-HER2 antagonism** *BMC Cancer* Apr 4;**14**:242. doi: 10.1186/1471-2407-14-242.

170. Said R, Kurzrock R, Naing A et al (2015) **Dose-finding study of hepatic arterial infusion of irinotecan-based treatment in patients with advanced cancers metastatic to the liver** *Invest New Drugs* Aug; **33**(4):911-20. doi: 10.1007/s10637-015-0251-5. Epub 2015 May 21.
171. Brouquet A, Vauthey JN, Contreras CM et al (2011) **Improved survival after resection of liver and lung colorectal metastases compared with liver-only metastases: a study of 112 patients with limited lung metastatic disease** *J Am Coll Surg* **213**:62-69.
172. Mise Y, Mehran RJ, Aloia TA and Vauthey JN (2014) **Simultaneous lung resection via a transdiaphragmatic approach in patients undergoing liver resection for synchronous liver and lung metastases** *Surgery* **156**:1197-1203.
173. Chetty C, Khumalo T, Da Costa Dias B et al (2014) **Anti-LRP/LR specific antibody IgG1-iS18 impedes adhesion and invasion of liver cancer cells** *PLoS One* **5**; **9**(5):e96268. doi: 10.1371/journal.pone.0096268. eCollection 2014.
174. Zhou D, Zhang YI, Liang D et al (2015) **Effect of combination therapy of siRNA targeting growth hormone receptor and 5-fluorouracil in hepatic metastasis of colon cancer** *Oncol Lett* **10**:3505-3509.
175. Qiu M, Hu J, Yang D et al (2015) **Cosgrove DP, Xu R. Pattern of distant metastases in colorectal cancer: a SEER based study** *Oncotarget* **6**:38658-38666. doi: 10.18632/oncotarget.6130.
176. Al-Hajeili M, Marshall J and Smaglo B (2016) **Neoadjuvant treatment for surgically resectable metastatic colorectal cancer** *Oncology* (Williston Park). Jan **15**; **30**(1). pii: 215235.
177. Xu C, Huang XE, Lv PH et al (2015) **Radiofrequency ablation in treating colorectal cancer patients with liver metastases** *Asian Pac J Cancer Prev* **16**:8559-8561.
178. Privalova AM, Uglanova SV, Kuznetsova NR et al (2015) **Microencapsulated multicellular tumor spheroids as a tool to test novel anticancer nanosized drug delivery systems *in vitro*** *J Nanosci Nanotechnol* **15**(7):4806-4814.
179. Hidalgo IA, Sojo F, Arvelo F and Sabino MA (2013) **Functional electrospun poly (lactic acid) scaffolds for biomedical applications. Experimental conditions, degradation and biocompatibility study** *Molecular & Cellular Biomechanics* **10**: 85-105.
180. Del Nero P, Song YH and Fischbach C (2013) **Microengineered tumor models: insights & opportunities from a physical sciences-oncology perspective** *Biomed Microdevices* **15**(4):583-593. doi: 10.1007/s10544-013-9763-y.