

Mecanismos moleculares de la colonización metastática del cerebro

Manuel Valiente

CNIO

Melchor Fernández Almagro, 3

28029 - Madrid (Spain)

`mvaliente@cnio.es`

Premio a la Investigación de la Academia 2018. Sección de Naturales

Abstract

The microenvironment has emerged as a promising source of novel therapeutic applications in experimental models of brain metastasis. Our limited understanding of the complex brain ecosystem transformed by the presence of cancer cells includes key cell types that either promote or limit local progression of metastatic cells. Identification of the molecular networks regulating the crosstalk between cancer cells and the microenvironment, but also within different brain resident and non-resident cell types surrounding the tumor is crucial to decipher the biology of colonization and subsequently to target key nodes with innovative and effective therapies.

I will illustrate the importance of the brain metastasis microenvironment with our pioneering work discovering pSTAT3⁺ reactive astrocytes, a subpopulation of resident cells induced by the presence of cancer cells in the brain. pSTAT3⁺ reactive astrocytes are crucial to maintain the viability of brain metastases independently of their source of the primary tumor. The ability of these subpopulation of astrocytes to modulate both the innate and the acquired immune systems creates a pro-metastatic niche facilitating the growth of metastases. Targeting this altered molecular pattern has

proved to be safe and effective against brain metastasis in experimental model and in patients, suggesting that it is feasible to develop anti-metastasis therapies targeting the microenvironment.

Excelentísimo Sr. Presidente de la Real Academia de Ciencias de Zaragoza, Excelentísimos Sras. señoras y Sres. Académicos, Distinguidas autoridades, compañeros y amigos, Señoras y señores,

En primer lugar, quería agradecer la generosidad de la Academia por haberme concedido el Premio de Investigación 2018 en la Sección de Naturales. Es para mi un verdadero honor recibirlo. Es también un fuerte estímulo para seguir trabajando en un problema que me apasiona a la vez que me ha dado una de las lecciones más dolorosas de mi vida.

Muy especialmente también quiero agradecer a la Dra. Caridad Sánchez Acedo el ofrecimiento para poder estar aquí hoy. Desde que fui estudiante suyo he admirado a la Dra. Sánchez Acebo y ahora que he tenido la oportunidad de volverla a encontrar todavía me inspira mayor reconocimiento si cabe al darme cuenta de su excelente trayectoria llena de un verdadero carácter pionero. Por tanto, mi más sincero agradecimiento por haberme permitido compartir nuestras investigaciones a través de esta conferencia.

No quiero dejar pasar la ocasión para reconocer la gran labor docente de los profesores con los que compartí mis años universitarios. Fue en la Universidad donde, sin darme cuenta, mi interés por profundizar en diversas cuestiones relacionadas con la Medicina Veterinaria comenzaron. Este interés en conocer el por qué de diversas cuestiones ha sido lo que, poco a poco, en un camino que para nada fue planificado, me ha llevado a ser investigador. Así pues, les doy las gracias por haberme permitido aprender de todos los que están por aquí y de que ya no están. Con este agradecimiento a los profesores universitarios, espero contribuir a evidenciar la importancia de investigar y aprender. He creído pertinente reconocer vuestra labor en estos tiempos en los que la mediocridad de algunos ha podido transmitir una imagen que para nada se corresponde con la indispensable labor que desempeñáis para cualquier sociedad que crea en el progreso.

Finalmente quiero agradecer a mi familia el apoyo incansable. Muy especialmente a mis hermanos de los que estoy terriblemente orgulloso.

Para acabar con los agradecimientos, quiero dedicar este Premio a mi mujer por su apoyo, comprensión, empatía y guía durante estos ya casi 15 años.

El contenido de la conferencia pretende compartir con todos ustedes una revisión de

aquellos aspectos moleculares que nos están permitiendo profundizar en la biología de la colonización cerebral por las células cancerosas, centrándome en el papel del microambiente que rodea al tumor.

EPIDEMIOLOGÍA Y CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD

La metástasis cerebral corresponde a tumores secundarios de cerebro que tuvieron su origen, por tanto, en otro órgano siendo los más frecuentes el pulmón (48 % de las metástasis cerebrales tienen este origen), la mamá (15 % de las metástasis cerebrales) y la piel (10 %) [1].

Algunas células cancerígenas se diseminan desde el tumor primario alcanzando la sangre lo que les permite llegar a órganos distantes. Cuando estas células metastásicas alcanzan el cerebro y son capaces de crecer en él hablamos de metástasis cerebral.

Este tipo de metástasis afecta entre un 10 % y un 30 % de los pacientes con cáncer avanzado. Es el cáncer más común en el cerebro siendo su frecuencia diez veces superior a los tumores primarios en este órgano como, por ejemplo, el Glioblastoma. A pesar de estos datos, no hay un tratamiento efectivo para la metástasis cerebral y, aunque algunos pacientes puedan disfrutar de algunas terapias avanzadas, es un órgano en el que, con frecuencia, ocurren recaídas después de tratamientos oncológicos inicialmente exitosos contra el tumor primario o incluso otras metástasis.

A la complejidad de la situación terapéutica asociada a la metástasis en el cerebro se une el limitado conocimiento de su biología lo que ha impedido la generación de nuevas posibilidades para mejorar su pronóstico.

Las dos situaciones más frecuentes que se presentan en los hospitales incluyen a pacientes con cáncer de pulmón y con cáncer de mama. En los pacientes con cáncer de pulmón es frecuente un diagnóstico sincrónico del tumor primario y de la metástasis en cerebro, de hecho, la sintomatología que lleva al paciente al hospital puede ser de tipo neurocognitiva y no derivada del propio tumor primario. Una situación muy diferente se puede dar en el cáncer de mama, que genera el 20 % de los casos de metástasis cerebral. Concretamente, los tumores triple negativos o HER2 positivos son los principales subtipos en cuanto a tropismo cerebral. A diferencia del cáncer de pulmón, es frecuente que el diagnóstico de la metástasis cerebral no sea simultáneo al del tumor primario, sino que éste sea tratado inicialmente, quedando el paciente libre de enfermedad durante un tiempo, pero al cabo de meses o incluso años la sintomatología neurológica y la historia clínica de un cáncer

anterior llevan al diagnóstico de la metástasis cerebral.

Desde el momento en que se diagnostica la metástasis cerebral la supervivencia media es de 6 meses. Además de la escasa supervivencia, el diagnóstico lleva implícito en muchas ocasiones la incidencia de síntomas neurocognitivos y unas terapias de índole paliativo muy agresivas como son la neurocirugía, radioterapia holocraneal o radioterapia estereotáctica.

Así pues, la metástasis cerebral sigue siendo letal, pero es cierto que estamos viendo en los últimos años esfuerzos destinados a mejorar las terapias, su caracterización molecular, mejoras en los modelos de laboratorio, estrategias enfocadas a la prevención y al estudio microambiente, que creemos tienen grandes posibilidades. Discutiremos a continuación en más detalle algunos de estos aspectos.

MODELOS EXPERIMENTALES DE METÁSTASIS CEREBRAL

Los modelos de metástasis cerebral consisten en el uso de células derivadas de pacientes, frecuentemente derivadas de líquidos pleurales o nódulos linfáticos, que inicialmente se manipulan para permitir su seguimiento en el animal vivo o por histopatología gracias a marcadores de bioluminiscencia y fluorescencia, respectivamente. Este tipo de modelos existen para cáncer de pulmón, cáncer de mama y melanoma.

Para generar las metástasis una vez marcadas las células, las inyectamos en ratones inmunodeprimidos por vía intracardiaca, de manera que las células se diseminan por todo el organismo y acaban creciendo en algunos órganos de manera poco reproducible. Sin embargo, el aislamiento de células capaces de colonizar el cerebro, que pueden haberse manifestado en alguno de los ratones inyectados, y su posterior re-inyección en un nuevo grupo de ratones permitirá aumentar el tropismo del modelo experimental de manera que, después de unas tres rondas de selección en vivo, seremos capaces de establecer una línea celular metastática al cerebro, las células llamadas BrM [1].

Además del uso de células de origen humano, la generación de células BrM a partir de células tumorales de modelos murinos de cáncer tiene la ventaja de poder estudiarlas en animales receptores con un sistema inmune intacto. Actualmente existen modelos BrM singénicos de cáncer de mama, pulmón y melanoma con los que adicionalmente se puede estudiar el papel de las células no cancerígenas del microambiente que rodea a la metástasis mediante el uso de modelos genéticamente modificados. Estos modelos murinos modificados genéticamente en los que se inyectan las células BrM tienen la particularidad de poseer

determinadas proteínas del microambiente cerebral ausentes o expresadas a niveles más altos, lo que permite sacar conclusiones respecto a su papel en la metástasis.

Sin embargo, lo ideal para estudiar la metástasis cerebral sería tener modelos que recapitularan todo el proceso cancerígeno desde la generación del tumor primario hasta la formación de la metástasis en cerebro. Desafortunadamente estos modelos no están actualmente disponibles. Aunque varios modelos han sido publicados [2, 3, 4] su uso no está extendido ya que ninguno posee reporteros en las células cancerígenas, lo que hace el análisis más complicado, y el crecimiento del tumor primario es muy agresivo, implicando que el tiempo disponible para el crecimiento de las metástasis está limitado y, como mucho, lo que se observa son micrometástasis. Una manera de mejorar esta situación sería a través del uso de terapias dirigidas hacia el tumor primario que permitirán controlarlo para dar más tiempo al desarrollo de la metástasis cerebral.

Finalmente, inspirados por los hallazgos de la alta complejidad genómica detectada en los estudios moleculares humanos se han hecho esfuerzos para obtener muestras de neurocirugías que son luego implantadas en ratones inmunodeprimidos [1].

Estos modelos llamados PDX (del inglés “*Patient Derived Xenograft*”) son los únicos capaces de recapitular la complejidad genómica de las metástasis cerebrales humanas. Su uso ha servido para evaluar la sensibilidad a baterías de medicamentos para analizar nuevas oportunidades terapéuticas [5, 6, 7, 8, 9].

De manera complementaria, las alteraciones encontradas en las muestras humanas pueden introducirse en células cancerígenas mediante la tecnología CRISPR/Cas9 para estudiar su papel inductor de la capacidad trópica a cerebro, o facilitadora de su supervivencia o agresividad en este órgano (Figura 1).

LA IMPORTANCIA DEL MICROAMBIENTE CEREBRAL EN LA BIOLOGÍA DE LA METÁSTASIS CEREBRAL

El microambiente ha emergido en modelos experimentales de metástasis cerebrales como una fuente prometedora de aplicaciones terapéuticas novedosas. Nuestra comprensión limitada del complejo ecosistema cerebral transformado por la presencia de células cancerosas incluye varios tipos celulares que o bien promueven o, por el contrario, limitan la progresión local de la metástasis. La identificación de los mecanismos moleculares que regulan la interacción entre las células cancerosas y el microambiente, pero también aquellas que se dan

entre los diferentes tipos de células que rodean el tumor, es crucial para descifrar la biología de la colonización y, posteriormente, para atacar nodos clave con terapias innovadoras y eficaces.

LOS ASTROCITOS

Los astrocitos son el tipo de célula glial más abundante en el cerebro. Este tipo celular interactúa con las células metastáticas durante todo el proceso de colonización cerebral. Cuando ocurre esta interacción, los astrocitos se vuelven reactivos, un estado celular asociado a la presencia de un daño o lesión [10]. La comunicación entre las células cancerígenas y los astrocitos reactivos incluye contacto físico directo, pero también interacciones mediadas por moléculas y vesículas secretadas (Figura 2). Todas estas interacciones pueden tener consecuencias anti o prometastáticas. El complejo comportamiento de los astrocitos que rodean las metástasis cerebrales podría derivarse de la heterogeneidad intrínseca a este tipo celular.

Comunicación a través de moléculas secretadas

De la célula cancerígena al astrocito reactivo

Las moléculas secretadas pueden actuar como señales paracrinas entre las células cancerosas y los astrocitos reactivos. Las células cancerígenas de las metástasis cerebrales derivadas del cáncer de mama producen IL-1 β debido a la activación de c-Met y MAPK [11]. La IL-1 β secretada por las células cancerígenas regula la expresión de Jagged1 en los astrocitos, que, a su vez, señala en las células metastáticas activando la vía Notch, que promueve la auto renovación de las células madre de la metástasis [12]. Además, la IL-1 β derivada de células cancerígenas induce la producción de HGF por los astrocitos reactivos, lo que a posteriori aumenta la activación de c-Met en células metastáticas [12]. Derivado de estos hallazgos, el compuesto E, inhibidor de Notch, y el pterostilbeno, inhibidor de c-Met, fueron evaluados como posibles aplicaciones terapéuticas demostrando su capacidad para disminuir la metástasis cerebral experimental del cáncer de mama [11, 12].

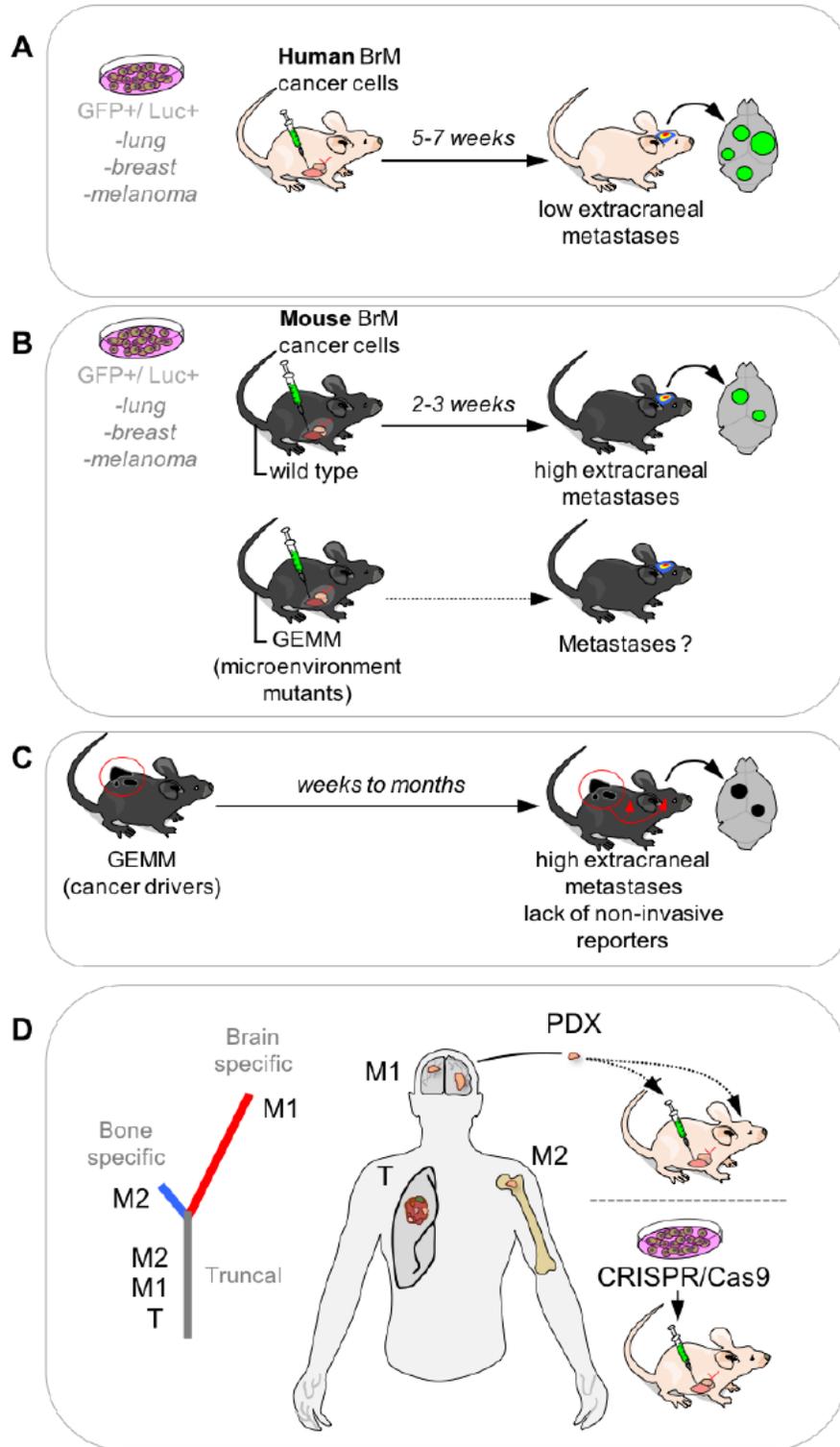


Figura 1: Modelos experimentales de la metástasis cerebral

Del astrocito reactivo a la célula cancerígena

Las moléculas secretadas por los astrocitos también son capaces de influir en las células metastáticas del cerebro. Algunos de los factores secretados son frecuentes en otros procesos neuroinflamatorios, lo que sugiere que las mismas vías moleculares que se inducen durante estos procesos podrían participar en la metástasis cerebral. Las células metastáticas cerebrales de cáncer de pulmón co-cultivadas con astrocitos producen IL-8, MIF y PAI-1. Los astrocitos activados responden al secretoma de células cancerosas produciendo IL-6, TNF- α IL-1 β que estimula la proliferación de células tumorales [13].

Además, los astrocitos producen la neurotrofina BDNF que se une al receptor TrkB en células cancerígenas HER2⁺ facilitando así la colonización del cerebro. Así, la inhibición combinada de HER2 con lapatinib y de TrkB con ciclotraxina B reduce la supervivencia de las células metastáticas de cáncer de mama HER2⁺ de manera más eficiente que cada compuesto de manera individual [14].

Otra señal protumorigénica producida por los astrocitos reactivos incluye la metaloproteasa MMP-9 que, por una parte, promueve la invasión de las células cancerígenas al degradar componentes no definidos de la matriz extracelular y, por otra, estimula la neoangiogénesis al liberar VEGF de la matriz que rodea al tumor [15].

Las células metastáticas cerebrales de melanoma inducen la expresión de diferentes factores proinflamatorios en los astrocitos reactivos, entre ellos la interleucina IL-23 [16, 17]. La interleucina IL-23 producida por astrocitos reactivos asociados a la metástasis cerebral induce la secreción de MMP2 en las células cancerígenas, lo que promueve sus capacidades migratorias e invasivas [16].

Otros tipos de interacciones

Contacto físico directo: uniones de tipo gap

Los astrocitos y las células cancerosas de melanoma, cáncer de pulmón y cáncer de mama forman uniones que se traducen en un apoyo para el crecimiento de la metástasis cerebral y contribuyen a su resistencia a diversas quimioterapias, todo ello debido a la inducción de genes clave para la supervivencia [18, 19]. Las células cancerígenas con tropismo cerebral tienen un enriquecimiento en PCDH7. Esta protocadherina interactúa con su homónima en los astrocitos para ensamblar uniones de tipo gap dependientes de Cx43. Las células

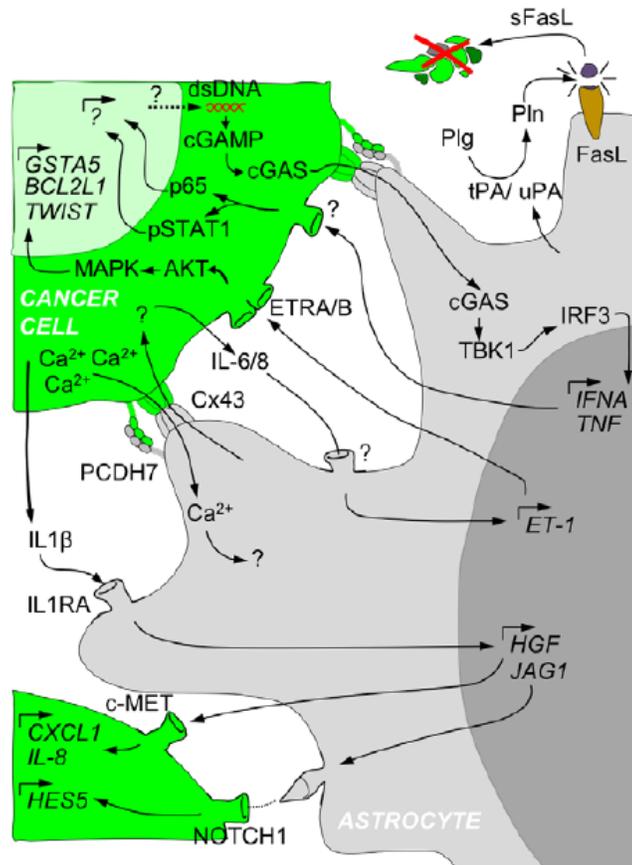


Figura 2: Interacción célula cancerígena-astrocito

metastáticas utilizan estos canales intercelulares para transferir a los astrocitos el ADN de cadena doble (dsDNA) y moléculas de cGAMP que se generan en altas cantidades en las células cancerígenas secundarias a estrés proliferativo o al estrés terapéutico. En los astrocitos reactivos cGAMP se une a STING, lo que desencadena la expresión de las citoquinas inflamatorias IFN α y TNF de una manera dependiente de TBK1/ IRF3. Las citoquinas secretadas activan las vías STAT1 y NF- κ B en las células metastáticas del cerebro aumentando así su resistencia a la quimioterapia [20]. El uso de los inhibidores de las uniones gap tonabersat o meclofenamato sensibiliza la metástasis cerebral a la quimioterapia.

Vesículas extracelulares

La naturaleza secretora de los astrocitos reactivos incluye la producción de vesículas extracelulares. Los exosomas derivados de los astrocitos reactivos contienen miRNAs que son incorporados por las células tumorales. Los miRNAs pertenecientes al grupo miR-17~92 regulan a la baja la expresión de PTEN en las células metastáticas del cerebro, lo que lleva a una desregulación de NF- κ B que induce la producción de CCL2. CCL2 derivado de células cancerígenas recluta células Iba1⁺, que promueven la proliferación y reducen la apoptosis de las células metastáticas [21].

¿Los astrocitos reactivos son solo prometastáticos?

Los astrocitos reactivos también pueden desempeñar un papel antitumoral que compromete la viabilidad de las células iniciadoras de metástasis cerebrales de cáncer de pulmón y de mama [22] (Figura 2). Los activadores de Plasminógeno (PA) secretados por astrocitos reactivos que rodean la micrometástasis convierten el Plasminógeno derivado de neuronas en Plasmina. La Plasmina es letal para las células cancerosas no adaptadas a este microambiente ya que la proteasa solubiliza FASL, generando una señal de muerte paracrina para las células cancerosas, y, además, elimina la actividad de L1CAM, una molécula de adhesión celular necesaria para la cooptación vascular de las células cancerígenas. Las serpinas, especialmente Neuroserpin y SerpinB2, se expresan en algunas células metastáticas. Gracias a ellas, estas células metastáticas bloquean el PA derivado de los astrocitos, protegiendo así a las células cancerígenas de la muerte mediada por Plasmina [22].

Evidencias de la heterogeneidad de los astrocitos reactivos

La heterogeneidad de los astrocitos no se limita únicamente a los aspectos funcionales discutidos anteriormente, sino también a diferentes perfiles moleculares. Por ejemplo, la Nestina sólo está presente en algunos astrocitos reactivos asociados a las células metastáticas del cerebro [15]. De manera similar, los astrocitos reactivos PDGFR β^+ se encuentran entremezclados con los PDGFR β^- en la metástasis cerebral de cáncer de mama [23].

La importancia de diseccionar la heterogeneidad de los astrocitos para comprender la biología de la metástasis cerebral ha sido confirmada por el factor de transcripción STAT3. STAT3 está presente en una subpoblación de astrocitos reactivos asociados a las metástasis

cerebrales de diferentes orígenes primarios. Esta subpoblación de astrocitos reactivos es clave para la viabilidad de la metástasis en modelos experimentales y en pacientes [24].

De manera interesante, medicamentos dirigidos a subpoblaciones de células gliales reactivas han resultado en estrategias efectivas para reducir las metástasis cerebrales [23, 24].

DISECCIÓN DE LA HETEROGENEIDAD DEL MICROAMBIENTE CEREBRAL: LOS ASTROCITOS REACTIVOS pSTAT3⁺

Consideraciones previas

En el Grupo de Metástasis Cerebral de CNIO estudiamos los mecanismos de la etapa más avanzada de la metástasis que equivale a la colonización del órgano diana.

Quizás uno podría estar tentado a pensar que la mera llegada de una célula cancerígena al cerebro después de haber completado todas las etapas anteriores ya implica el desarrollo de una metástasis, sin embargo, esto no es así. De hecho, la colonización del órgano diana, incluso una vez que las células cancerígenas han cruzado la barrera hematoencefálica, impone muchas dificultades y una presión selectiva muy elevada sobre las células cancerígenas que tienen que ser capaces de sortear para finalmente generar una metástasis.

Dentro de el proceso de colonización del órgano diana podemos diferenciar dos etapas: las etapas más iniciales, que corresponderían al estado de la micrometástasis y en el que no hay signos clínicos de la enfermedad manifestados por el paciente, y unas etapas avanzadas, donde la metástasis cerebral ya ha adquirido un determinado tamaño lo que la hace detectable con los métodos de imagen actualmente disponibles.

Nuestro interés para entender cómo unas células cancerígenas se adaptan a un órgano diferente de aquel en el que fueron generadas se canaliza a través del estudio de la interacción de las células metastáticas con los diferentes componentes del cerebro. Tratamos de evaluar cuál es la importancia de estas interacciones para el desarrollo de la metástasis cerebral.

Concretamente les voy a hablar de un tipo celular llamado astrocito. Esta célula cerebral tiene una función fascinante ya que juega un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis cerebral [25] pero cuando ocurre un daño en el cerebro cambia completamente su comportamiento y función para limitar la extensión del mismo [25]. Cuando el astrocito está en este último estadio se denomina astrocito reactivo y su presencia ha sido validada en múltiples patologías que afectan al Sistema Nervioso Central [25].

Dado el carácter patológico de la metástasis cerebral, el astrocito reactivo también se ha descrito en ella.

De manera interesante su papel en esta patología tiene una gran complejidad ya que conocemos de su diferente comportamiento en los estadios iniciales del proceso metastático, donde el astrocito es capaz de detectar a las células cancerígenas que acaban de cruzar la barrera hematoencefálica como una amenaza frente a la que reacciona eliminando muchas de estas células potencialmente iniciadoras de metástasis cerebral [22]. A pesar de esta defensa tan eficiente en la que participa el astrocito reactivo, hay algunas células cancerígenas que son capaces de sortear esta respuesta del ambiente cerebral para seguir proliferando hasta llegar a desarrollarse como una metástasis establecida o macrometástasis.

Sorprendentemente, el mismo astrocito reactivo en estos estadios más avanzados de la enfermedad parece que no sólo no limita la supervivencia de las células cancerígenas, sino que incluso la promueve [20].

Así pues, la misma célula del ambiente cerebral que inicialmente posee un carácter anti-metastático luego parece convertirse en un componente pro-metastático [25]. La pregunta a responder era por tanto como es posible que se de este cambio del comportamiento en los astrocitos reactivos asociados a la metástasis cerebral.

Hallazgo de patrones moleculares alterados en el microambiente cerebral asociado a la metástasis cerebral

Nuestra hipótesis de partida proponía que cuando un mismo tipo celular, el astrocito reactivo, muestra caracteres fenotípicos tan diferentes, anti-metastático inicialmente y pro-metastático en las etapas más avanzadas, debería existir diferencias moleculares subyacentes entre ambas poblaciones que aparecerían en paralelo a la progresión local de la metástasis.

Nuestro interés fundamental era buscar evidencias de alteraciones moleculares que específicamente ocurrieran en los estadios más avanzados, ya que éstas podrían ser responsables del carácter pro-metastático.

Su estudio, además de permitirnos entender la biología de la interacción entre las células cancerígenas y su microambiente, tiene el potencial de generar nuevas dianas terapéuticas.

Estas potenciales nuevas dianas terapéuticas presentes en el microambiente son interesantes por varias razones: menor toxicidad asociada a sus inhibidores, ya que van dirigidas contra unas alteraciones del ambiente cerebral es decir no tendrían ningún efecto sobre el

cerebro normal; independencia del origen de la célula cancerígena, podría ser aplicada a la metástasis cerebrales independientemente del tipo de tumor primario; menor resistencia asociada al tratamiento, es previsible que las terapias contra el microambiente tengan menor incidencia de resistencia debido a su mayor estabilidad genómica en comparación con la alta heterogeneidad y plasticidad de las células cancerígenas; posibilidad de combinación con terapias actualmente en uso, dado el carácter dirigido contra el ambiente cerebral sería compatible con terapias dirigidas de manera directa contra las células cancerígenas.

Nuestro hallazgo inicial implica el descubrimiento de uno de estos patrones moleculares alterados asociados con la metástasis cerebral. Así observamos como en una zona donde no hay una metástasis no se observan los cambios que vemos en una zona afectada por la metástasis. Concretamente nuestro hallazgo implica la activación de la vía de señalización de STAT3, determinado por la fosforilación en la tirosina 705, que indicaremos en el texto como pSTAT3⁺. Esta activación es específica de las inmediaciones donde está localizada la metástasis.

Estos hallazgos sugieren que es necesaria una reprogramación del microambiente cerebral durante la colonización del órgano diana para poder explicar cómo se transita de un ambiente anti-metastático a otro pro-metastático.

En relación a este hallazgo mostraré el tipo celular al que afecta dicho patrón molecular, la influencia que tiene en la colonización metastática, así como la aproximación terapéutica que hemos desarrollado no solo en modelos experimentales sino también en pacientes. Estos resultados han sido recientemente publicados en la revista “*Nature Medicine*” [24].

El astrocito reactivo activa la vía de STAT3

Asociado a la metástasis cerebral establecida, hay una fuerte acumulación de astrocitos reactivos que identificamos con la proteína GFAP (ésta identifica cambios que se dan en el citoesqueleto típicos de los astrocitos en este estadio).

El análisis de la activación de STAT3 claramente indicaba su presencia específica en este tipo celular. Es posible observar como no todos los astrocitos reactivos muestran este patrón de activación, sino que encontramos otros también próximos a la lesión tumoral que se mantienen como STAT3 negativos (pSTAT3⁻).

Así pues, en el microambiente cerebral hay una heterogeneidad celular que se debe tener en cuenta además de la más habitualmente descrita que afecta las células cancerígenas.

Actualmente estamos tratando de entender cuál es el origen de dicha heterogeneidad en los astrocitos reactivos y nos debatimos entre dos posibilidades. Una de ellas nos lleva a evaluar el diferente origen durante el desarrollo de los astrocitos en el que diferentes progenitores podrían implicar la capacidad a posteriori de activar o no el programa de STAT3. La otra opción tiene que ver con la posibilidad de que el daño celular inducido por la metástasis cerebral o su mera presencia, active células madre quiescentes que se diferenciarían en estos astrocitos, tal como ha sido descrito en otras patologías cerebrales [26].

Nuestra hipótesis predice que los patrones alterados del microambiente son independientes del tipo de tumor primario que generó la metástasis en cerebro. Evaluamos múltiples modelos disponibles en nuestro laboratorio derivados de metástasis cerebrales de cáncer de mama, de melanoma y de pulmón. Nuestra amplia colección de modelos experimentales incluye tanto células cancerígenas humanas como de ratón que poseen perfiles oncogenómicos diferentes representativos de los subtipos más frecuentes como, por ejemplo, el HER2 positivo y el triple negativo en la mama, o los tumores de pulmón con mutaciones en *KRAS*, *EGFR*, *P53*. De manera interesante, en todos estos modelos de metástasis cerebral encontramos exactamente el mismo patrón en el que una metástasis establecida está rodeada de una fuerte acumulación de astrocitos reactivos entre los cuales hay algunos que activan la vía de señalización de STAT3.

Una vez ampliamente validado nuestro hallazgo en modelos experimentales, tratamos de ver si era reproducible en muestras humanas de metástasis cerebral.

Este estudio comparativo es muy necesario, no solo porque nos interesa el estudio de modelos experimentales para luego tener un impacto en la enfermedad humana, sino porque existen grandes diferencias entre las células del ratón y las células humanas respecto a la expresión de genes en los astrocitos tal y como ha sido publicado por el laboratorio del recientemente desaparecido Ben Barres [27]. En este estudio se muestra que, a pesar de haber patrones de expresión transcripcional comunes entre los astrocitos humanos y ratón, existe también un porcentaje significativo que responde a patrones de expresión especie-específicos.

Para abordar la validación del patrón molecular establecimos una colaboración con los hospitales 12 de Octubre, Vall d'Hebron y Hospital Universitario de Turín. Gracias a ellos contamos con 91 metástasis cerebrales generadas por cánceres de pulmón, mamá y de melanoma. Estas muestras además tenían que contar con una parte de ambiente cerebral

rodeando a la metástasis para poder evaluar la presencia de los astrocitos pSTAT3⁺.

El análisis de estas muestras validó el patrón observado en los modelos experimentales, por el que una gran cantidad de astrocitos reactivos rodeando la metástasis cerebral activaban la vía de STAT3. De la misma manera, también encontramos que no todos los astrocitos tienen activación de STAT3 y, por tanto, pudimos concluir acerca de la similitud entre los fenotipos humanos y de ratón.

Un 89 % de las muestras humanas presentan astrocitos pSTAT3⁺. De ellas, el 50 % tenía unos valores más altos que el resto respecto al número de astrocitos y a la intensidad de la activación de STAT3. Al correlacionar la historia clínica asociada a las muestras clínicas pudimos ver que la supervivencia asociada al diagnóstico de la metástasis cerebral era más limitada cuanto más numerosos y más activados estaban los astrocitos reactivos, lo que sugería acerca del potencial carácter pro-metastático de los astrocitos pSTAT3⁺.

Implicaciones funcionales del astrocito reactivo pSTAT3⁺ en la metástasis cerebral

Para valorar si los astrocitos pSTAT3⁺ eran necesarios para la metástasis cerebral generamos aproximaciones experimentales que nos permitieron bloquearlos.

Desarrollamos dos estrategias una genética y otra farmacológica. La primera implicaba el desarrollo de un modelo genéticamente modificado de ratón que expresaba la recombinasa Cre sensible a tamoxifeno (tmx) bajo el promotor del gen *Gfap*. La administración de tmx en este ratón induce la activación de la recombinasa Cre sólo en los astrocitos reactivos donde se delecciona el gen *Stat3* al estar floxeado en homocigosis.

Para evaluar el impacto de la estrategia genética en la metástasis cerebral, este modelo se inyectó con células BrM y se evaluó la incidencia de metástasis en el cerebro.

Los experimentos de colonización metastática los evaluamos mediante sistemas de imagen no invasiva basados en la emisión de bioluminiscencia por las células cancerígenas que expresan el gen que codifica para la proteína Luciferasa. Estos análisis permiten el seguimiento de la metástasis a lo largo del tiempo.

Observamos que la ausencia de los astrocitos pSTAT3⁺ impide el desarrollo de la metástasis cerebral, consiguiendo así la primera evidencia de que los patrones alterados del microambiente cerebral pueden jugar un papel pro-metastático muy relevante.

Confirmamos este hallazgo mediante técnicas complementarias de histología obteniendo

los cerebros de estos ratones y realizando tinciones para detectar las metástasis cerebrales basándonos en su expresión del reportero fluorescente GFP. Los hallazgos histológicos confirmaron el menor número y tamaño de las metástasis cerebrales y la falta de activación de STAT3 en los astrocitos reactivos.

Este fenotipo no solo se obtuvo con un modelo de melanoma sino también con un modelo de cáncer de pulmón.

Aunque este hallazgo ya era muy informativo acerca del papel de los astrocitos pSTAT3⁺, para poder evaluar su potencial trascendencia clínica teníamos que evaluar si la dependencia de la metástasis cerebral de los astrocitos pSTAT3⁺ era reproducible cuando se evaluaba en metástasis una vez que ya estaban establecidas.

Para ello usamos un método que nos permitía obtener los cerebros con metástasis ya desarrolladas y ponerlos en cultivo. Estos cultivos organotípicos nos permiten añadir el tmx ex vivo para inducir la eliminación del gen de *Stat3* y en paralelo, de manera complementaria, añadir inhibidores de la vía de STAT3 como el WP1066.

Estos experimentos mostraron como este sistema de cultivos organotípicos permite, a través de aproximaciones genéticas y farmacológicas, probar que los astrocitos pSTAT3⁺ son necesarios para mantener la viabilidad de las metástasis cerebrales establecidas tanto de melanoma como de cáncer de pulmón.

Para obtener la prueba definitiva de la implicación de los astrocitos pSTAT3⁺ en la metástasis cerebral ya establecida realizamos el mismo experimento al expuesto anteriormente usando el ratón genéticamente modificado, pero inoculando de manera intracraneal las células metastáticas directamente en el cerebro.

La inyección intracraneal nos permite en muy poco tiempo generar un tumor más grande de manera que tenemos más tiempo para conseguir la eliminación de *Stat3* con tmx, algo muy importante en los modelos singénicos en los que la enfermedad progresa más rápido que en los modelos basados en células humanas [1].

Esta aproximación también validó el carácter pro-metastático de los astrocitos reactivos pSTAT3⁺.

Activación de la vía de STAT3 e implicaciones funcionales asociadas

Dada la demostrada importancia de los astrocitos pSTAT3⁺ en la metástasis cerebral comenzamos a analizar la biología subyacente.

Debido a nuestra hipótesis de partida predecíamos que el patrón pro-metastático correspondiente a la activación de STAT3 sería específico de los estadios más avanzados de la metástasis cerebral.

El análisis histológico de muestras de metástasis cerebrales experimentales obtenidas durante los estadios de micrometástasis confirmaron que los astrocitos pSTAT3⁺ no están presente en los estadios más iniciales, sino que aparecen cuando la metástasis cerebral ha adquirido un cierto tamaño.

Para continuar en el aprendizaje de la biología de estos astrocitos nos preguntamos por qué se activa esta vía de señalización asociada a la presencia de metástasis cerebrales.

Dado que la vía de STAT3 es muy sensible a la presencia de múltiples citoquinas y factores de crecimiento extracelulares, realizamos experimentos para evaluar si las células metastáticas a cerebro tenían la capacidad de producir algunos de estos activadores y si, por el contrario, esto no ocurría en aquellas células que no tienen tropismo por este órgano. Analizamos la expresión de múltiples citoquinas y factores de crecimiento en las células trópicas a cerebro (BrM) con las células que no lo son (células parentales, P).

Los resultados usando ocho modelos de células P y BrM indicaron que la mayoría de estas citoquinas y factores de crecimiento incluyendo EGF, TGF α , MIF además de, en menor medida, CNTF y IL-6 están aumentados en la mayoría de las células BrM respecto a las P.

De hecho, al añadir sobre astrocitos primarios el medio condicionado de las células BrM o directamente un cóctel con varias de estas citoquinas éramos capaces de inducir la activación de STAT3.

Además de que estos experimentos nos permitían explicar que la acción de las células metastática es necesaria para la aparición de los astrocitos pSTAT3⁺ y que, seguramente, es necesario que éstas alcancen unos números elevados en el microambiente cerebral para que la cantidad de citoquinas y factores de crecimiento sea la suficiente para tener un efecto dominante sobre los astrocitos, lo más interesante de este hallazgo in vitro es que lo podíamos explotar para evaluar la diferente funcionalidad entre los pSTAT3⁺ y los pSTAT3⁻.

Así, mediante esta preparación in vitro, dimos con un hallazgo muy interesante. Sólo los astrocitos primarios en la condición donde STAT3 era activado, eran capaces de crecer formando esferas cuando se cultivaban en placas de baja adherencia. Estas astroesferas son dependientes de la activación de STAT3 ya que el uso de inhibidores específicos bloqueaba

completamente este fenotipo.

Dado que la formación de esferas tiene relación con la adquisición de características asociadas a las células madre, realizamos ensayos que permiten evaluarlas.

La generación de nuevas esferas a partir de esferas pre-existentes implica la presencia de células con la capacidad de auto-renovación, característica intrínseca de la célula madre. Sólo las astrosferas pSTAT3⁺ eran capaces de auto-renovarse.

Además, observamos la presencia de marcadores típicos de células madre del Sistema Nervioso, Nestina, sólo en las astrosferas pSTAT3⁺. Este marcador también pudo ser encontrado en aquellos astrocitos reactivos que rodean la metástasis cerebral y poseen la vía de STAT3 activada.

Finalmente, y como prueba más concluyente de la adquisición de características típicas de las células madre por parte de las astrosferas pSTAT3⁺, evaluamos su potencial para generar otros tipos celulares no pertenecientes a la estirpe glial. Para ello aplicamos un protocolo de diferenciación sobre las astrosferas. De manera muy interesante, fuimos capaces de observar que las astrosferas pSTAT3⁺ eran capaces de generar tipos celulares que incluyen los oligodendrocitos, analizado mediante el marcador Olig2, e incluso neuronas inmaduras, analizado mediante el marcador Tuj1.

Así pues, concluimos que los astrocitos pSTAT3⁺ que se asocian a la metástasis cerebral podrían adquirir capacidades de células madre lo que, presumiblemente, les dotaría de unas nuevas capacidades funcionales.

Sin embargo, estos hallazgos todavía no son suficientes para dar respuesta a nuestro principal interés que radica en explicar el por qué del carácter pro-metastático de estos astrocitos.

La influencia de los astrocitos pSTAT3⁺ en el sistema inmune asociado a la metástasis cerebral

Para tratar de responder a esta pregunta consideramos nuestros hallazgos más importantes.

Por una parte, la adquisición de características de células madre y por otra parte la activación de la vía de STAT3 confluyen en esta subpoblación de astrocitos reactivos.

Tanto la vía de STAT3 como las células madre son capaces de bloquear el sistema inmunitario y promover inmunosupresión.

STAT3 es una molécula inmunosupresora ampliamente caracterizada [28, 29] y las cé-

lulas madres son capaces de evitar el sistema inmune para no ser reconocidas y eliminadas por él dada su importancia para mantener la homeostasis tisular [30, 31, 32].

Además, detectamos que los astrocitos reactivos coexisten físicamente en la misma localización que las células T CD8⁺ positivas que rodean la metástasis cerebral.

Los astrocitos reactivos son células con una altísima capacidad secretora [25].

Con todas estas consideraciones y hallazgos lanzamos la hipótesis de que los astrocitos pSTAT3⁺ pudieran ejercer un carácter pro-metastático dadas su influencia inmunosupresora.

Los análisis proteómicos del secretoma de los astrocitos pSTAT3⁺ y pSTAT3⁻ indicaron la presencia de una firma molecular diferencial entre ambas poblaciones de astrocitos. En ella encontramos moléculas de demostrado carácter inmunosupresor como son VEGF, Lipocalin-2, TIMP-1 [33, 34, 35] enriquecidas en la población pSTAT3⁺ así como un enriquecimiento muy notable de la matriz extracelular, que sugerimos podría implicar una barrera física al acceso de los linfocitos al tumor.

El análisis del transcriptoma de ambas poblaciones de astrocitos también muestra cambios de expresión génica que correlacionan con una capacidad de bloquear el sistema inmunitario por parte de los pSTAT3⁺.

Para analizar esta posibilidad realizamos unos experimentos usando el medio condicionado de las astrosferas pSTAT3⁺ que se incubó con linfocitos T CD8⁺, obtenidos a partir de esplenocitos y activados in vitro mediante diversas citoquinas. Estos experimentos nos permitieron evaluar el grado de activación de los linfocitos, así como su capacidad de matar a las células metastáticas in vitro.

El medio condicionado de los astrocitos pSTAT3⁺ indujo una disminución de marcadores de activación de los linfocitos CD44 y CD25. Además, los linfocitos previamente incubados con el secretoma de las astrosferas pSTAT3⁺ perdían capacidad de eliminar a las células metastáticas en comparación con los que fueron incubados con los astrocitos que no tenían activación de la vía de STAT3.

Por tanto, estos experimentos iniciales nos han permitido sugerir que el papel pro-metastático de los astrocitos reactivos pSTAT3⁺ en la metástasis cerebral podría derivarse de su capacidad para bloquear linfocitos T CD8⁺ que pudieran llegar a las inmediaciones de la metástasis.

A pesar de este hallazgo tan interesante, la función de los astrocitos pSTAT3⁺ no podía

ser exclusiva de su potencial papel sobre el sistema inmune adquirido ya que nuestras evidencias experimentales sugerían de su papel pro-metastático también en modelos de metástasis cerebral en los que las células humanas BrM se inyectan en ratones donde las poblaciones de linfocitos T y B están casi totalmente mermadas.

Empezamos por tanto a evaluar la relación entre los astrocitos pSTAT3⁺ y sistema inmune innato.

Además de la notable presencia de los astrocitos rodeando a la metástasis cerebral, la microglía y los macrófagos también están muy presentes.

Sin embargo, a diferencia de los astrocitos, la microglía y los macrófagos pueden infiltrarse dentro de las lesiones metastáticas.

Concretamente, encontramos una población de microglía o macrófagos (no tenemos datos para poder diferenciar ambos tipos de macrófagos) que se localiza preferiblemente dentro de la metástasis y que se caracteriza por la presencia de los marcadores CD11b y CD74. Esta población se enriquece muy significativamente en el cerebro en presencia de metástasis cerebrales.

La detección de CD74 en este tipo celular es interesante ya que su ligando, MIF [36], es producido a niveles elevados por los astrocitos pSTAT3⁺.

El receptor CD74 sufre un procesamiento una vez unido a su ligando MIF. La parte intracelular de CD74 una vez procesada se importa al núcleo donde se comporta como un factor de transcripción [37, 38].

Debido a la presencia del ligando producido por los astrocitos pSTAT3⁺ y el receptor presente en esta población del sistema inmune innato, nos planteamos la posibilidad de que los astrocitos pudieran desarrollar su papel pro-metastático a través de su interacción con esta población de la microglía o macrófagos.

Mediante el uso del ratón modificado genéticamente que nos permitía eliminar *Stat3* de los astrocitos reactivos, analizamos la influencia sobre la población CD74⁺.

La eliminación del factor de transcripción STAT3 y por tanto de la expresión de sus genes dependientes, entre ellos *Mif*, correlacionaba con una disminución en la abundancia de las células CD74⁺ que también eran Iba1⁺.

Iba1 es un marcador fundamentalmente enriquecido en la microglía si bien recientemente se ha concluido que no es específico de este tipo de macrófago [39], lo que nos impide poder concluir acerca del origen de la población CD74⁺.

Como experimento complementario, incubamos rodajas de cerebro normales en cultivo ex vivo por tres días en presencia del medio condicionado de las astrosferas pSTAT3⁺. En esta preparación observamos un aumento relativo del número de las células CD74⁺/ Iba1⁺.

La señalización de MIF a través de CD74 puede inhibirse farmacológicamente mediante el inhibidor ibudilast, que además posee una excelente capacidad de penetrar en el Sistema Nervioso Central [40].

El uso de ibudilast en cultivos organotípicos de cerebro que contienen metástasis cerebrales establecidas mostró la capacidad de disminuir la bioluminiscencia de las células cancerígenas en un periodo de incubación de tres días, lo que demostraba la capacidad anti-metastática de este compuesto y sugería la importancia de la interacción del ligando MIF, producido por los astrocitos pSTAT3⁺, con las células de la microglía/ macrófagos CD74⁺ en el mantenimiento de la viabilidad de la metástasis.

Como mencionaba anteriormente, la unión de MIF a CD74 induce la activación de un programa transcripcional. Entre los genes inducidos por el dominio intracelular se encuentra el factor secretable Midkine [41]. Dado el probado carácter inductor de crecimiento tumoral por parte de esta proteína, que se acumula en el espacio extracelular, evaluamos su presencia en el contexto de la metástasis cerebral.

La presencia de Midkine es fácilmente detectable en el interior de la metástasis colocalizando con las células CD74⁺ y también acumulándose entre las células tumorales.

Este hallazgo nos permitía imaginar que la función pro-metastática de los astrocitos pSTAT3⁺ podría implicar la promoción de una población de microglía/ macrófagos CD74⁺ a través de la producción de MIF. Estas células del sistema inmune innato serían capaces de producir el factor inductor de crecimiento Midkine que, al acumularse en el interior de la metástasis, podría promover el crecimiento de las células cancerígenas.

Nuestra hipótesis predecía que la falta de STAT3 en los astrocitos perjudicaría el crecimiento de la metástasis en parte debido a la disminución de la producción del factor Midkine y, por tanto, la adición exógena de este factor debería ser capaz de rescatar la ausencia de STAT3.

Para testar esta hipótesis usamos el ratón “*knockout*” condicional de *Stat3* que usamos para preparar cultivos organotípicos de cerebro que contienen metástasis cerebrales establecidas. En el cultivo ex vivo inducimos la pérdida de *Stat3* mediante la adición de tmx y a la vez añadimos Midkine. Mediante el análisis de la bioluminiscencia por parte de las

células cancerígenas al final del periodo de incubación pudimos comprobar la importancia de Midkine dada su capacidad de rescatar la falta de función del STAT3 en los astrocitos reactivos.

Este hallazgo fue también reproducido con la inhibición farmacológica de la vía de STAT3.

Nuestros hallazgos del papel pro-metastático de los astrocitos pSTAT3⁺ sugieren su capacidad de comportarse como un componente central en la modulación del sistema inmune local promoviendo un fenotipo inmunosupresor, tanto a través de su influencia en el sistema inmune adquirido, así como en el innato (Figura 3).

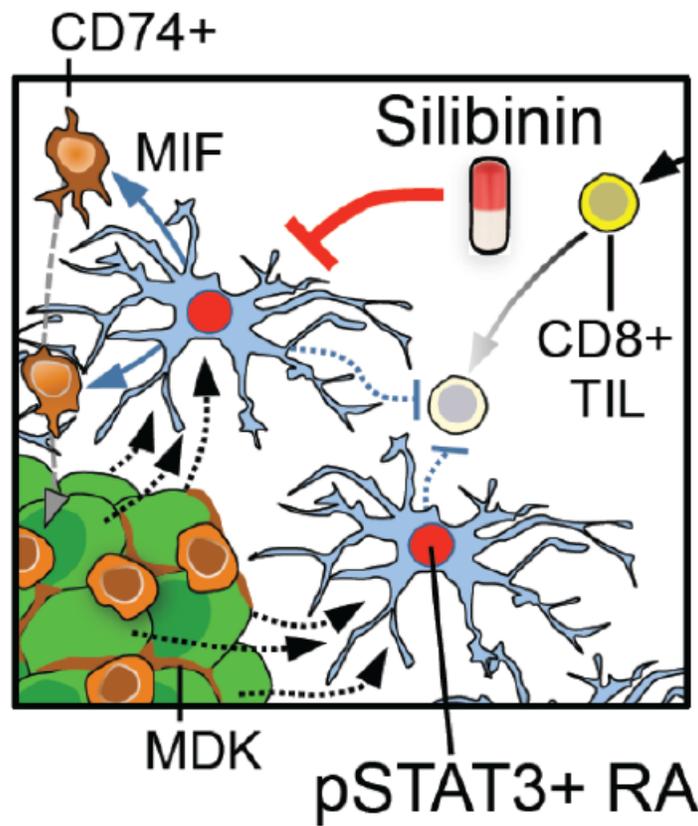


Figura 3: Los astrocitos pSTAT3⁺ en la metástasis cerebral

Aplicación de los hallazgos experimentales a pacientes con metástasis cerebrales

Nuestro interés fundamental en el laboratorio es generar nuevas oportunidades terapéuticas para los pacientes con metástasis cerebrales.

Nuestro hallazgo implica una potencial diana terapéutica en la metástasis cerebral para la que existen inhibidores.

Por ejemplo, el inhibidor de la activación de STAT3 WP1066, que posee una buena capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica. Este y otros inhibidores de STAT3 existentes fueron evaluados como candidatos para ser usados en nuestros modelos primero y, eventualmente, en pacientes después. Sin embargo, los problemas detectados en la biodisponibilidad de varios de ellos y concretamente de WP1066 nos llevaron a buscar nuevas alternativas.

La silibinina es un producto natural derivado del cardo mariano que modificado a través procesos químicos y concentrado genera un compuesto con una biodisponibilidad mayor que no produce toxicidad en humanos [42], cruza la barrera hematoencefálica [43] y se comporta como un potente inhibidor directo de STAT3 [44].

Datos preliminares del Dr. Joaquim Bosch-Barrera (Instituto Catalán de Oncología, Girona) demostraron en dos pacientes la eficacia específica en la metástasis cerebral, sin que hubiera, en ese momento una explicación al respecto [42].

Con todos estos datos existentes decidimos evaluar la silibinina como una potencial nueva terapia de la metástasis cerebral a través de su efecto en los astrocitos pSTAT3⁺.

En primer lugar, caracterizamos desde el punto de vista molecular la capacidad de la silibinina para inhibir STAT3.

La silibinina se une al dominio SH2 de STAT3 inhibiendo su activación. Mediante mutación dirigida probamos que el fenotipo inhibiendo las astrosferas pSTAT3⁺ era dependiente de la inhibición de esta vía de señalización y no derivado de otros potenciales efectos de silibinina en otras dianas.

Usamos a continuación silibinina en cultivos organotípicos de cerebro con metástasis establecidas donde pudimos observar el mismo fenotipo que la inhibición genética anteriormente realizada y que correlacionaba con un bloqueo de la señal de pSTAT3 en los astrocitos reactivos que rodeaban la metástasis cerebral.

El siguiente paso fue aplicar silibinina en los modelos experimentales de metástasis cerebral in vivo. La administración de silibinina inhibió significativamente la metástasis

cerebral en el modelo de melanoma B16/F10-BM tanto al tratar durante los estadios más iniciales de la colonización como también cuando el tratamiento se aplicó una vez que la metástasis estaba formada. Estos fenotipos fueron validados tanto mediante bioluminiscencia como por histología, donde se comprobó la disminución de la activación de STAT3 en los astrocitos reactivos.

Con los resultados pre-clínicos nos planteamos junto al Dr. Bosch-Barrera trasladar estos descubrimientos a una cohorte de pacientes para usar el producto que contiene el principio activo (Legasil®) como una terapia de uso compasivo.

Finalmente 18 pacientes de cáncer de pulmón en estadio IV con metástasis cerebrales fueron incluidos.

El uso compasivo implica que los pacientes reciben la terapia experimental en el contexto de las terapias recomendadas y aprobadas. Por ello este tipo de ensayos tiene muchas limitaciones y precisan finalmente de un estudio clínico más controlado posterior para poder certificar la contribución clínica.

Independientemente de esta consideración, esta prueba de concepto resultó un gran éxito ya que las respuestas clínicas a nivel cerebral se detectaron en más del 75 % de los pacientes que incluían silibinina en su tratamiento. Incluso hubo tres pacientes que desarrollaron una respuesta completa cerebral.

Dada la inclusión en el estudio de tres pacientes que estaban en cuidados paliativos, sabemos que la silibinina per se, independientemente de las otras terapias que estaban recibiendo el resto de pacientes, tiene un efecto ya que estos pacientes también generaron respuestas locales.

Acorde con nuestros datos experimentales, las respuestas locales en el cerebro no se acompañaban de las mismas respuestas a nivel pulmonar en el tumor primario ni en otras metástasis. Creemos que estos resultados se deben al papel tan fundamental de los astrocitos pSTAT3⁺ en la metástasis cerebral.

Debido a la alta morbilidad y mortalidad que implica metástasis cerebral evaluamos si las respuestas clínicas observadas se traducían en una mejora en la supervivencia comparando la cohorte con otra que incluía 38 pacientes con el mismo tipo de características clínicas y tratados en el mismo hospital durante el mismo periodo de tiempo pero que no recibieron silibinina. La supervivencia de los pacientes con silibinina resultó en un aumento de 4 a 17 meses tras el diagnóstico de la metástasis cerebral.

CONCLUSIONES

A través de mi ponencia he tratado de exponer una visión actual de la situación clínica y de los aspectos más prometedores en la investigación de la metástasis cerebral.

A pesar de que este tipo de metástasis sigue siendo letal, he tratado de transmitir un mensaje optimista, todavía tímido dada la gravedad del tema que nos compete, basado en recientes descubrimientos con el potencial de mejorar el manejo clínico actual e incluso con opciones de, en el futuro, ser capaces de prevenirla.

Concretamente he hecho hincapié en las posibilidades de desarrollar nuevas aproximaciones para el tratamiento de la metástasis cerebral que se basan en las particularidades de este tipo de metástasis y que podrían ser combinadas con los tratamientos que se aplican acorde al tumor primario.

Uno de las causas fundamentales de que pueda haber aspectos específicos trascendentes en la metástasis cerebral, podría deberse al microambiente particular del cerebro, que claramente participa de la evolución de la metástasis.

Nuestros datos implican de manera directa al astrocito reactivo como un factor clave en la colonización dada su presencia e interacción con las células cancerígenas desde su llegada hasta el momento en que éstas comprometen la funcionalidad del órgano.

El hallazgo fundamental implica que el tumor metastático es capaz de modificar el cerebro, específicamente hemos descubierto cambios moleculares en los astrocitos.

Los astrocitos reactivos son reprogramados y desarrollan funciones pro-tumorales que contribuyen al crecimiento de la metástasis.

Por ello, estos componentes alterados del cerebro derivados de la presencia de las células metastáticas se convierten en nuevas dianas terapéuticas para las que se podrían desarrollar terapias específicas como la que he mostrado.

Para finalizar quiero agradecer a mi grupo de investigación y a mis colaboradores la ayuda para desarrollar nuestros proyectos, así como a las fuentes de financiación.

Referencias

- [1] Valiente, M. *et al.* Transgenic mouse model for skin malignant melanoma. *Trends Cancer*. **4**, pp. 176–196 (2018).

- [2] Kato, M. *et al.* The evolving landscape of brain metastasis. *Oncogene* **17**, pp. 1885–1888 (1998).
- [3] Cho, J.H. *et al.* AKT1 Activation Promotes Development of Melanoma Metastases. *Cell Rep.* **13**, pp. 898–905 (2015).
- [4] Meuwissen, R. *et al.* Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model. *Cancer Cell.* **4**, 181–189 (2003).
- [5] Lee, H. W. *et al.* Patient-derived xenografts from non-small cell lung cancer brain metastases are valuable translational platforms for the development of personalized targeted therapy. *Clin. Cancer Res.* **21**, 1172–1182 (2015).
- [6] Ni, J. *et al.* Combination inhibition of PI3K and mTORC1 yields durable remissions in mice bearing orthotopic patient-derived xenografts of HER2-positive breast cancer brain metastases. *Nat. Med.* **22**, 723–726 (2016).
- [7] Wall, B. A. *et al.* Riluzole is a radio-sensitizing agent in an in vivo model of brain metastasis derived from GRM1 expressing human melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res* **28**, 105–109 (2015).
- [8] Ding, L. *et al.* Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature* **464**, 999–1005 (2010).
- [9] Contreras-Zárate, M. J. *et al.* Development of Novel Patient-Derived Xenografts from Breast Cancer Brain Metastases. *Front. Oncol.* **7**, 252 (2017).
- [10] Sofroniew, M. V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* **32**, 638–647 (2009).
- [11] Xing, F. *et al.* Activation of the c-Met Pathway Mobilizes an Inflammatory Network in the Brain Microenvironment to Promote Brain Metastasis of Breast Cancer. *Cancer Res.* **76**, 4970–4980 (2016).
- [12] Xing, F. *et al.* Reactive astrocytes promote the metastatic growth of breast cancer stem-like cells by activating Notch signalling in brain. *EMBO Mol. Med.* **5**, 384–396 (2013).
- [13] Seike, T. *et al.* Interaction between lung cancer cells and astrocytes via specific inflammatory cytokines in the microenvironment of brain metastasis. *Clin Exp Metastasis* **28**, 13–25 (2011).

- [14] Choy, C. *et al.* Cooperation of neurotrophin receptor TrkB and Her2 in breast cancer cells facilitates brain metastases. *Breast Cancer Res.* **19**, 51 (2017).
- [15] Lorger, M. & Felding-Habermann, B. Capturing changes in the brain microenvironment during initial steps of breast cancer brain metastasis. *Am. J. Pathol.* **176**, 2958–2971 (2010).
- [16] Klein, A. *et al.* Astrocytes facilitate melanoma brain metastasis via secretion of IL-23. *J. Pathol.* **236**, 116–127 (2015).
- [17] Schwartz, H. *et al.* Incipient Melanoma Brain Metastases Instigate Astrogliosis and Neuroinflammation. *Cancer Res.* **76**, 4359–4371 (2016).
- [18] Lin, Q. *et al.* Reactive astrocytes protect melanoma cells from chemotherapy by sequestering intracellular calcium through gap junction communication channels. *Neoplasia* **12**, 748–754 (2010).
- [19] Kim, S.-J. *et al.* Astrocytes upregulate survival genes in tumor cells and induce protection from chemotherapy. *Neoplasia* **13**, 286–298 (2011).
- [20] Chen, Q. *et al.* Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. *Nature* **533**, 493–498 (2016).
- [21] Zhang, L. *et al.* Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth. *Nature* **527**, 100–104 (2015).
- [22] Valiente, M. *et al.* Serpins promote cancer cell survival and vascular co-option in brain metastasis. *Cell* **156**, 1002–1016 (2014).
- [23] Gril, B. *et al.* Pazopanib reveals a role for tumor cell B-Raf in the prevention of HER2+ breast cancer brain metastasis. *Clin. Cancer Res.* **17**, 142–153 (2011).
- [24] Priego, N. *et al.* STAT3 labels a subpopulation of reactive astrocytes required for brain metastasis. *Nat. Med.* **24**, 1024–1035 (2018).
- [25] Wasilewski, D., Priego, N., Fustero-Torre, C. & Valiente, M. Reactive astrocytes in brain metastasis. *Front. Oncol.* **7**, 298 (2017).
- [26] Benner, E. J. *et al.* Protective astrogenesis from the SVZ niche after injury is controlled by Notch modulator Thbs4. *Nature* **497**, 369–373 (2013).

- [27] Zhang, Y. *et al.* Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. *Neuron* **89**, 37–53 (2016).
- [28] Jones, L. M. *et al.* STAT3 Establishes an Immunosuppressive Microenvironment during the Early Stages of Breast Carcinogenesis to Promote Tumor Growth and Metastasis. *Cancer Res.* **76**, 1416–1428 (2016).
- [29] Wang, T. *et al.* Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat. Med.* **10**, 48–54 (2004).
- [30] Drukker, M. & Benvenisty, N. The immunogenicity of human embryonic stem-derived cells. *Trends Biotechnol.* **22**, 136–141 (2004).
- [31] Aurora, A. B. & Olson, E. N. Immune modulation of stem cells and regeneration. *Cell Stem Cell* **15**, 14–25 (2014).
- [32] Dubeykovskaya, Z. *et al.* Neural innervation stimulates splenic TFF2 to arrest myeloid cell expansion and cancer. *Nat. Commun.* **7**, 10517 (2016).
- [33] Thorne, M., Moore, C. S. & Robertson, G. S. Lack of TIMP-1 increases severity of experimental autoimmune encephalomyelitis: Effects of darbepoetin alfa on TIMP-1 null and wild-type mice. *J. Neuroimmunol.* **211**, 92–100 (2009).
- [34] Kaur, S. *et al.* CD47 signaling regulates the immunosuppressive activity of VEGF in T cells. *J. Immunol.* **193**, 3914–3924 (2014).
- [35] Ashraf, M. I. *et al.* Exogenous lipocalin 2 ameliorates acute rejection in a mouse model of renal transplantation. *Am. J. Transplant.* **16**, 808–820 (2016).
- [36] Leng, L. *et al.* MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J. Exp. Med.* **197**, 1467–1476 (2003).
- [37] Becker-Herman, S., Arie, G., Medvedovsky, H., Kerem, A. & Shachar, I. CD74 is a member of the regulated intramembrane proteolysis-processed protein family. *Mol. Biol. Cell* **16**, 5061–5069 (2005).
- [38] Gil-Yarom, N. *et al.* CD74 is a novel transcription regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, 562–567 (2017).

- [39] Bowman, R. L. *et al.* Macrophage Ontogeny Underlies Differences in Tumor-Specific Education in Brain Malignancies. *Cell Rep.* **17**, 2445–2459 (2016).
- [40] Cho, Y. *et al.* Allosteric inhibition of macrophage migration inhibitory factor revealed by ibudilast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 11313–11318 (2010).
- [41] Cohen, S. *et al.* The cytokine midkine and its receptor RPTP ζ regulate B cell survival in a pathway induced by CD74. *J. Immunol.* **188**, 259–269 (2012).
- [42] Bosch-Barrera, J. *et al.* Response of brain metastasis from lung cancer patients to an oral nutraceutical product containing silibinin. *Oncotarget* **7**, 32006–32014 (2016).
- [43] Lee, Y., Park, H. R., Chun, H. J. & Lee, J. Silibinin prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson’s disease via mitochondrial stabilization. *J. Neurosci. Res.* **93**, 755–765 (2015).
- [44] Verdura, S. *et al.* Silibinin is a direct inhibitor of STAT3. *Food Chem. Toxicol.* **116**, 161–172 (2018).

