



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**METÀSTASIS CEREBRAL EN EL CÁNCER DE MAMA:
BIOMARCADORES DE PREDICCIÓN Y PRONÓSTICO Y MODELOS
EXPERIMENTALES DE INVESTIGACIÓN PRECLÍNICA**

PROGRAMA DE DOCTORAT EN MEDICINA

DEPARTAMENT DE MEDICINA



Autor: ANTONIO MARTÍNEZ ARANDA
Directora: Dra. ÀNGELS SIERRA JIMÉNEZ
Tutor: Dr. JORDI GIRALT LÓPEZ DE SAGREDO

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

2021

DEDICATORIA

A mis padres (in memoriam), por haberme cuidado y querido tanto cuando era niño, por haber intentado transmitirme valores de honradez, generosidad y humanidad, y por haberme apoyado y ayudado a hacer realidad la ilusión y deseo que tenía, desde mi infancia, por ser médico. Les quiero mucho y siempre estarán conmigo.

A mi esposa Ángeles, por su cariño y comprensión, y por el gran apoyo e infinita paciencia que ha tenido conmigo durante estos largos años de trabajo y dedicación hasta finalizar esta Tesis. Mi reconocimiento público hacia ella y mi eterno agradecimiento. Te quiero muchísimo.

A mis hijos Alejandro y Álvaro, para que no pierdan nunca la motivación por explorar y aprender, para que luchen por sus objetivos siempre con honestidad, humanidad y respeto hacia los demás, con esfuerzo y autodisciplina, hasta conseguir las metas que les hagan felices en sus vidas. Os quiero muchísimo.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de Tesis, la Dra. Àngels Sierra, por haberme permitido trabajar en su grupo todos estos años y haberme dado la oportunidad de realizar mi Tesis, por la paciencia que ha tenido conmigo y por toda la ayuda y enseñanzas que he recibido de ella y de todas las personas que han formado parte de este grupo de investigación a lo largo de los años.

A la Dra. Àngels Fabra, antigua directora del Departament de Càncer i Metàstasi de lo que fue el antiguo Institut de Recerca Oncològica (IRO), por haberme permitido estar en este Departament en el inicio de mi andadura.

Al Dr. Jordi Giralt, Jefe del Servicio de Oncología Radioterápica del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona, por haber aceptado ser el tutor de mi Tesis.

A José, Obdulia, Estrella y Juan Carlos, por la ayuda recibida y soporte logístico en el entorno familiar desde el inicio.

A mis compañeras técnicas de laboratorio que han ido pasando durante todos estos años: Sandra, Laura, Berta, María, Patricia, Laia y Vanessa. Muchas gracias a todas ellas por su ayuda en cada momento que lo necesité y mi sincero reconocimiento a su trabajo.

A todos/as los/as profesionales veterinarios/as y técnicos/as del Estabulario del IDIBELL: David, Joana, Rosa, Mila, Blanca y Pablo. A todos ellos muchas gracias por su ayuda y colaboración durante todos estos años, ya que sin su trabajo y dedicación no hubiera sido posible realizar los experimentos con animales.

Al Dr. Ferràn Guedea, Jefe del Servicio de Oncología Radioterápica del “Institut Català d’Oncologia” (ICO) - Hospital Duran i Reynals de L’Hospitalet de Llobregat, por su consentimiento para que pudiera utilizar las instalaciones del Servicio en la realización de los experimentos de irradiación en los animales.

A la Sras. M^a Cruz Lizuaín y Cristina Picón, como ex-Jefa y Jefa actual, respectivamente, del Servicio de Física Médica y Protección Radiológica del “Institut Català d’Oncologia” (ICO) - Hospital Duran i Reynals de L’Hospitalet de Llobregat, por su consentimiento para que utilizara las instalaciones y pudiera realizar los experimentos de irradiación en los animales, así como por su ayuda logística.

Al Sr. Ignasi Modolell, físico del Servicio de Física Médica y Protección Radiológica del “Institut Català d’Oncologia” (ICO) - Hospital Duran i Reynals de L’Hospitalet de Llobregat, por su ayuda en la obtención de los datos dosimétricos en los animales.

A todos/as los/las técnicos/as de los Servicios de Oncología Radioterápica y de Física Médica y Protección Radiológica del “Institut Català d’Oncologia” (ICO) - Hospital Duran i Reynals de L’Hospitalet de Llobregat, por toda la ayuda y colaboración prestadas para que se pudieran realizar los experimentos de irradiación.

A los Dres. Carles Arús, Rui Simoes y Paula Candiotta, del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Biociències de la Universitat Autònoma de Barcelona, por los años en los que mantuvimos colaboración de proyecto y por la ayuda y enseñanzas recibidas para poner a punto las modificaciones en la técnica de inoculación intracarotídea y el análisis por RMN de los animales.

A los Dres. Miguel Gil y Ander Urruticoechea, médicos adjuntos de la Unidad de Mama del Servicio de Oncología Médica del “Institut Català d’Oncologia” (ICO) - Hospital Duran i Reynals de L’Hospitalet de Llobregat, por su permiso y facilidades para acceder a la base de datos de pacientes y, con ello, poder realizar el estudio clínico.

Al Dr. Ferràn Moreno, médico adjunto del Servicio de Oncología Radioterápica del “Institut Català d’Oncologia” (ICO) - Hospital Duran i Reynals de L’Hospitalet de Llobregat, por su gran ayuda y facilidades en la obtención de datos de las pacientes con cáncer de mama y metástasis cerebrales, datos que nos han ayudado a realizar el estudio clínico.

A los Dres. Antonio Arellano y Rosa Ballester, ex-Jefe y médica adjunta, respectivamente, del Servicio de Oncología Radioterápica del “Institut Català d’Oncologia” (ICO) - Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona, por su permiso y gran colaboración en la obtención de datos de las pacientes con cáncer de mama y metástasis cerebrales, datos que nos han ayudado a realizar el estudio clínico.

Al Dr. Miguel Ángel Seguí, del Servei d'Oncologia Mèdica del Consorci Hospitalari Parc Taulí de Sabadell, por su gran ayuda y facilidades en la obtención de datos de las pacientes con cáncer de mama.

A la Dras. Núria Baixeras y Noemí Vidal, del Servei d'Anatomia Patològica del Hospital Universitari de Bellvitge, por su colaboración en el análisis de las muestras de las pacientes.

A la Dra. Eva Castella, del Servei d'Anatomia Patològica del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona, por su colaboración en el análisis de las muestras de las pacientes.

Al Dr. Xavier Andreu, del Servei d'Anatomia Patològica del Consorci Hospitalari Parc Taulí de Sabadell, por su colaboración en el análisis de las muestras de las pacientes.

Al Sr. Daniel Cuadras, del Departament d’Estadística de Fundació de Investigación Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona, por su gran ayuda y colaboración prestada en el campo de la Estadística.

Supervivencia y libertad

Mientras que nuestra empatía, cuidado y respeto por el resto de seres vivos y por la Naturaleza en general puede evitar que nos autodestruyamos como especie, sólo seremos realmente libres cuando nuestro pensamiento, a través del estudio y del conocimiento, del respeto de nuestro entorno y del análisis de nuestras experiencias, adquiera una sólida capacidad crítica que nos permita empujar a la sociedad hacia el camino del equilibrio y del sentido común, evitando que caigamos en la autocomplacencia y en repetir errores del pasado. Sólo así podremos sobrevivir como especie, seremos verdaderamente libres como individuos y tendremos futuro como sociedad.

El Doctorando

ABREVIATURAS

ABAT:	GABA-Transaminasa
AIC:	5-amino-imidazol-4-carboxamida
Akt:	Proteína kinasa B o proteína kinasa específica serina-treonina
AQP4:	Proteína de la familia de acuaporinas
ARE:	“Adverse Radiation Effect”. Efecto Adverso a la Radiación
ASCO:	“American Society of Clinical Oncology”
ATP:	Adenosina-trifosfato
AUC:	Área bajo la curva
AvR:	“Average Radiance”
BED:	Dosis Efectiva Biológica
BGT:	“GABA-Betaine Transporter”
BHE:	Barrera hemato-encefálica
BRCA1:	“Breast Cancer 1 gene”
BTB:	“Blood-Tumor Barrier”. Barrera hemato-tumoral
CA 15.3:	Antígeno Carbohidratado 15.3
CADM1:	“Cell Adhesion Molecule-1”
cAMP:	Adenosina-Monofosfato cíclico
CCL2:	"C-C motif chemokine ligand 2"
CCR7:	"C-C motif chemokine receptor 7"
CEA:	Antígeno Carcinoembrionario
cGAMP:	Guanosina-Adenosina Monofosfato cíclico
CISH:	Hibridación in situ con cromógeno
CMF:	Ciclofosfamida+Metotrexate+5'Fluorouracilo
CMV:	Citomegalovirus
Co:	Cobalto
COX2:	“Cyclooxygenase-2”

Cs:	Cesio
CTCs:	"Circulating Tumor Cells". Células Tumorales Circulantes
CXCL12:	"C-X-C motif chemokine ligand 12"
CXCR4:	"C-X-C motif chemokine receptor 4"
DART:	"Decreased non-specific Adhesivity, Receptor-Targeted polymeric formulations" (nanopartículas)
DMEM:	"Dulbecco's Modification of Eagle's Medium"
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DNA:	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF:	"Epidermal Growth Factor"
eGFP:	"Enhanced Green Fluorescent Protein"
EGFR:	"Epidermal Growth Factor Receptor"
EMT:	"Epithelial to Mesenchymal Transition"
EORTC:	"European Organisation for Research and Treatment of Cancer"
FACS:	"Fluorescence-Activated Cell Sorting"
Fas:	Miembro de la superfamilia de receptores de TNF
Fas-L:	Ligando de Fas
FBS:	Suero Bovino Fetal
FDA:	"U.S. Food and Drug Administration"
FISH:	Hibridación in situ con fluorescencia
FN14:	"Fibroblast Growth Factor-Inducible Protein"
GABA:	Ácido γ -aminobutírico
GAD67:	Glutamato-Decarboxilasa 67
GAT 1-3:	"GABA-Transporter 1-3"
GFAP:	"Glial Fibrillary Acidic Protein"
GH:	Grado histológico
GLUT-1:	"Glucose-Transporter-1"
GM:	Gangliósidos
GPA:	"Graded Prognostic Assessment"
gp-P:	Glicoproteína-P
GRP94:	"Glucose-Regulated Protein 94kDa"
GRPs:	"Glucose-Regulated Proteins"

Gy:	Gray: Unidad Internacional de dosis de radiación absorbida (energía depositada por la radiación ionizante por unidad de masa: Joule/Kg)
H&E:	Hematoxilina-Eosina
HBEGF:	"Heparin-Binding EGF-like Growth Factor"
HBSS:	"Hank's Balanced Salt Solution"
Her2+:	Sobreexpresión de Her2
12(S)HETE:	Ácido 12S-Hidroieicosatetraenoico
HIF-1α:	"Hypoxia-Inducible Factor 1 α "
HR:	"Hazard Ratio"
HSP90:	"Heat Shock Protein 90kDa"
HSPs:	"Heat Shock Proteins"
5-HT:	5-Hidroxitriptamina (serotonina)
HT:	Hormonoterapia
HTR2A:	"5-Hydroxytryptamine receptor 2A"
HTR7:	"5-Hydroxytryptamine receptor 7"
ICAM-1:	"Intercelular Adhesion Molecule-1"
IFN-α:	Interferón- α
IHQ:	Inmunohistoquímica
IL:	Interleukina
ITGAM:	Subunidad α M de Integrina (CD11b)
JAM-B:	"Junctional Adhesion Molecule-B"
Ki-67:	Proteína nuclear asociada con la proliferación celular
KPS:	"Karnofsky Performance Status"
L1CAM:	"L1-Cell Adhesión Molecule"
LDH:	Lactato-Deshidrogenasa
LHRH:	"Luteinizing Hormone Releasing Hormone"
67LR:	"67 kD Laminin Receptor" ("Ribosomal Protein SA")
M1:	Metástasis a distancia
MALDI:	"Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization"
MAPK:	"Mitogen-Activated Protein Kinase"
MC:	Metástasis cerebral/es
MEC:	Matriz Extracelular
MET:	"Mesenchymal to Epithelial Transition"

MGMT:	O ⁶ -metilguanina-DNA-metiltransferasa
miR:	microRNA (miRNA)
MMP:	Metaloproteinasas
mRNA:	Ácido Ribonucléico mensajero
MRP:	Proteínas asociadas a resistencia a fármacos
MRT:	"Microbeam Radiation Therapy"
MTIC:	5-(3-metiltriazen-1-il) imidazol-4-carboxamida
mTOR:	"Mamalian Target of Rapamycin"
MV:	Megavolts
NADH:	Nicotinamida-Adenina Dinucleótido (forma reducida)
NCCN:	"National Comprehensive Cancer Network"
NCT#:	Número identificador del estudio clínico ("U.S. ClinicalTrials.gov")
NF-kB:	"Nuclear Factor kappa B"
NRG1:	Neuregulina-1
NTF-3:	Neurotrofina-3
OR:	"Odds Ratio"
PARP:	Poli-ADP-ribosa polimerasa
PBS:	"Phosphate Buffered Saline"
PDGF-A:	"Platelet-Derived Growth Factor-A"
PDGFR:	"Platelet-Derived Growth Factor Receptors"
p.e.:	por ejemplo
PECAM1:	"Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule-1" (CD31)
PET:	"Positron Emission Tomography"
PFA:	Paraformaldehído
PIANA:	"Protein Interactions and Network Analysis"
PI3K:	"Phosphatidylinositol 3-kinase"
PIK3CA:	Subunidad catalítica α de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato-3-kinasa
PKA:	"Protein Kinase-A"
PKI:	"Protein-Kinase Inhibitor/s"
PLuc:	Photinus Luciferasa
PPIN:	"Protein-Protein Interaction Networks"
PSN:	"Penicillin-Streptomycin-Neomycin"

PTEN:	"Phosphatase and Tensin homolog" Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato-3-fosfatasa
QLQ:	"Quality of Life Questionnaire"
QT:	Quimioterapia
RE:	Receptores de estrógenos
RMN:	Resonancia Magnética Nuclear
RNA:	Ácido Ribonucleico
ROC:	"Receiver Operating Characteristic"
RP:	Receptores de progesterona
RPA:	"Recursive Partitioning Analysis"
RT:	Radioterapia
RTOG:	"Radiation Therapy Oncology Group"
SARRP:	"Small Animal Radiation Research Platform"
SEAP:	Sociedad Española de Anatomía Patológica
SEOM:	Sociedad Española de Oncología Médica
sFas-L:	Forma soluble de Fas-L
SLPI:	Proteína Inhibidora de las Proteasas de Serina
SNC:	Sistema Nervioso Central
SPF:	"Specific Pathogen Free"
SRS:	"Stereotactic Radiosurgery". Radiocirugía Estereotáxica
SSD:	"Source Surface Distance". Distancia foco-superficie
ST6GALNAC5:	α -2,6-sialiltransferasa
TC:	Tomografía Computerizada
T-DM1:	Conjugado de Trastuzumab y emtansina
TGFβ1:	"Transforming Growth Factor β 1"
TKI:	"Tyrosine-kinase Inhibitors"
TMA:	"Tissue Microarrays"
TMZ:	Temozolomida
TN:	Triple-negativo
TNF:	"Tumor Necrosis Factor"
TNFR:	"Tumor Necrosis Factor Receptor"
TOF:	"Time-Of-Flight"; detector de iones que se acopla a MALDI
TPH:	Triptófano-Hidroxilasa

TRO:	Tasa de Respuesta Objetiva
TSP-1:	Trombospondina-1
TWEAK:	"Tumor Necrosis Factor-like Weak"
UM:	Unidades de Monitor
UV:	Ultravioleta
VEGF:	"Vascular Endothelial Growth Factor"
VEGFR:	"Vascular Endothelial Growth Factor Receptor"
VGAT:	"Vesicular GABA-Transporter"
VRK1:	"Vaccinia-Related Kinase 1; serine/threonine protein kinase" (kinasa nuclear pro-proliferativa)
vs.:	versus
WBRT:	"Whole Brain Radiotherapy". Radioterapia Holocraneal
ZO-1:	"Zonula Occludens"

ÍNDICE

	Página
RESUMEN / SUMMARY	25
1. INTRODUCCIÓN	31
1.1. METÁSTASIS CEREBRAL EN EL CÁNCER DE MAMA. ASPECTOS CLÍNICOS	33
1.1.1. RELEVANCIA DE LA METÁSTASIS CEREBRAL EN LOS DIFERENTES SUBTIPOS MOLECULARES DEL CARCINOMA DE MAMA	33
1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA	34
1.1.3. DIAGNÓSTICO	37
1.1.4. TRATAMIENTO	38
1.1.4.1. Tratamiento Local	38
1.1.4.1.1. Cirugía	38
1.1.4.1.2. Radioterapia Holocraneal (WBRT)	39
1.1.4.1.3. Radioterapia Local	39
1.1.4.1.4. Radiocirugía Estereotáxica (SRS)	40
1.1.4.2. Tratamiento Sistémico	41
1.1.4.2.1. Quimioterapia	41
1.1.4.2.2. Terapias Dirigidas	43
1.1.4.2.3. Terapias Combinadas	44

	Página
1.1.5. SUPERVIVENCIA, PRONÓSTICO Y CALIDAD DE VIDA	49
1.1.5.1. Supervivencia	49
1.1.5.2. Pronóstico	50
1.1.5.3. Calidad de vida	55
1.2. BIOLOGÍA DE LA METÁSTASIS CEREBRAL DE CÁNCER DE MAMA	56
1.2.1. BARRERA HEMATO-ENCEFÁLICA (BHE): ESTRUCTURA Y FUNCIÓN	56
1.2.1.1. Células Endoteliales	57
1.2.1.2. Membrana Basal	59
1.2.1.3. Pericitos	59
1.2.1.4. Astrocitos	60
1.2.2. PROGRESIÓN METASTÁSICA	61
1.2.2.1. Formación del nicho pre-metastásico en el SNC	62
1.2.2.2. Interacción de las CTCs con el endotelio de la BHE	65
1.2.2.3. Migración transendotelial: proceso de extravasación	66
1.2.2.4. Destinos biológicos de la célula metastásica en el SNC	67
1.2.2.4.1. Apoptosis	67
1.2.2.4.2. Interacción con el microentorno (nicho pre-metastásico) y formación del nicho metastásico	69
1.2.2.5. Interacción de la célula metastásica con células del SNC	69
1.2.2.5.1. Interacción con los Astrocitos	70
1.2.2.5.2. Interacción con la Microglía	73

	Página
1.2.2.6. Relación de las células metastásicas con los neurotransmisores	73
1.2.2.6.1. Serotonina (5-hidroxitriptamina)	73
1.2.2.6.2. GABA (Ácido γ -aminobutírico)	74
1.2.2.7. Quiescencia celular (“Dormancy”)	77
1.2.2.8. Formación de la metástasis cerebral	78
1.2.2.8.1. Transición Mesenquimal - Epitelial (MET)	79
1.2.2.8.2. Proliferación Celular y Neoangiogénesis	79
1.2.2.8.3. Formación de la Barrera Hemato-Tumoral (BTB)	80
1.2.3. ALTERACIONES GENÉTICAS Y EPIGENÉTICAS ASOCIADAS A LA METÁSTASIS CEREBRAL DE CÁNCER DE MAMA	84
1.2.3.1. Alteraciones genéticas	84
1.2.3.2. Alteraciones epigenéticas	89
1.3. ANTECEDENTES DEL GRUPO EN EL ESTUDIO DE LA METÁSTASIS CEREBRAL DEL CÁNCER DE MAMA	90
2. HIPÓTESIS	93
3. OBJETIVOS	97
4. MATERIAL Y MÉTODOS	101
4.1. DESARROLLO DEL MODELO EXPERIMENTAL DE METÁSTASIS CEREBRAL “IN VIVO”	103
4.1.1. CÉLULAS Y TRANSDUCCIÓN RETROVIRAL	103
4.1.2. CONDICIONES DE LOS CULTIVOS	104
4.1.2.1. Cultivos estándar	104
4.1.2.2. Cultivos primarios	104

	Página
4.1.3. PREPARACIÓN DEL INÓCULO CON LA SUSPENSIÓN CELULAR	104
4.1.4. PROCEDIMIENTO DE SELECCIÓN DE UNA POBLACIÓN CELULAR ALTAMENTE METASTÁSICA	105
4.1.5. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	106
4.1.5.1. Ratones hembra CD1 (non-nude)	108
4.1.5.1.1. Experimento piloto de tolerancia y supervivencia a la irradiación craneal	108
4.1.5.1.2. Experimentos piloto de inoculación intracarotídea	108
4.1.5.2. Ratones hembra Balb/c-nude	109
4.1.5.2.1. Experimento piloto de tolerancia y supervivencia a la irradiación craneal	109
4.1.5.2.2. Experimentos de evaluación por RMN craneal del crecimiento de la metástasis tras la inoculación intracarotídea	109
4.1.5.3. Ratones hembra Atímicos (Nude-Foxn1nu)	109
4.1.5.3.1. Experimento piloto de tolerancia y supervivencia a la irradiación craneal	109
4.1.5.3.2. Experimento piloto de evaluación por RMN craneal de la técnica optimizada de inoculación intracarotídea	110
4.1.5.3.3. Experimentos de selección celular y de tratamiento combinado	110
4.1.6. PROCEDIMIENTOS DE ANESTESIA	110
4.1.6.1. Inoculación intracardíaca (ventrículo izquierdo)	110
4.1.6.2. Inoculación en la arteria carótida interna (técnica optimizada)	111
4.1.6.3. Exploración del proceso metastásico mediante RMN	111
4.1.6.4. Tratamiento holocraneal con radiación ionizante	111
4.1.6.5. Análisis por Bioluminiscencia	111

	Página
4.1.7. PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS PARA INDUCIR LA METÁSTASIS CEREBRAL	112
4.1.7.1. Inoculación en ventrículo cardíaco izquierdo	112
4.1.7.2. Inoculación en arteria carótida interna (técnica optimizada)	113
4.1.8. ANÁLISIS POR RMN	116
4.1.9. ANÁLISIS DE BIOLUMINISCENCIA	117
4.1.10. PROCEDIMIENTOS DE SACRIFICIO, NECROPSIA Y PRESERVACIÓN DE CEREBRO	118
4.1.10.1. Sacrificio	118
4.1.10.2. Necropsia	118
4.1.10.3. Preservación de cerebro	119
4.1.11. ESTUDIO HISTOLÓGICO	120
4.1.11.1. Microscopía de fluorescencia	120
4.1.11.2. Tinción con hematoxilina-eosina	121
4.1.12. RADIOTERAPIA	122
4.1.12.1. Infraestructura	122
4.1.12.2. Diseño del Modelo	122
4.1.12.3. Cálculo Dosimétrico	123
4.1.12.4. Tratamiento	126
4.1.13. QUIMIOTERAPIA	126
4.1.13.1. Temozolomida	126
4.1.13.2. Preparación y administración	127

	Página
4.2. ESTUDIO CLÍNICO	128
4.2.1. PACIENTES	128
4.2.2. TEJIDOS	129
4.2.2.1. “Tissue Microarrays (TMAs)”	129
4.2.2.2. Desparafinización y tinción con hematoxilina-eosina	130
4.2.2.3. Inmunohistoquímica	130
4.3. ESTADÍSTICA	135
4.3.1. ANÁLISIS DE DATOS EXPERIMENTALES	135
4.3.2. ANÁLISIS DE DATOS CLÍNICOS	135
5. RESULTADOS	139
5.1. OBTENCIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE METÁSTASIS CEREBRAL	141
5.1.1. SELECCIÓN DE CÉLULAS ALTAMENTE METASTÁSICAS EN CEREBRO: BR-eGFP-CMV/LUC-V5	141
5.1.2. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA MODIFICADA DE INOCULACIÓN INTRACAROTÍDEA	145
5.2. OPTIMIZACIÓN DE LA RADIOTERAPIA EXPERIMENTAL	146
5.3. RADIO-QUIMIOTERAPIA EXPERIMENTAL Y SEGUIMIENTO “IN VIVO” POR BIOLUMINISCENCIA	150
5.4. ESTUDIO CLÍNICO	155
5.4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LAS PACIENTES	155
5.4.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS ATENDIENDO A LOS SUBTIPOS MOLECULARES	161

	Página
5.4.3. PROGRESIÓN METASTÁSICA: METÁSTASIS CEREBRAL VERSUS METÁSTASIS NO-CEREBRAL	165
5.4.3.1. Diferencias en la distribución de las metástasis	165
5.4.3.2. Supervivencia libre de metástasis	168
5.4.4. DESARROLLO DE BIOMARCADORES DE METÁSTASIS CEREBRAL EN CARCINOMAS INFILTRANTES DE MAMA	170
5.4.4.1. Validación de biomarcadores de predicción y pronóstico	170
5.4.4.2. Valor predictivo y pronóstico de los biomarcadores en nuestra serie	179
6. DISCUSIÓN	187
7. CONCLUSIONES	225
8. LÍNEAS DE FUTURO	229
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	233
10.ANEXOS	277
10.1. SISTEMAS DE VALORACIÓN DEL PRONÓSTICO EN PACIENTES CON METÁSTASIS CEREBRALES	279
10.2. SÍNTESIS EXPLICATIVA DEL MODELO LINEAL-CUADRÁTICO (L-Q) EN RADIOBIOLOGÍA	281
10.3. CÁLCULO DE LA BED PARA TEJIDOS CON DIFERENTE RESPUESTA A LA RADIACIÓN IONIZANTE SOMETIDOS A DIFERENTES ESQUEMAS DE TRATAMIENTO	287
10.4. PUBLICACIONES	289
10.4.1. ARTÍCULO 1	291
10.4.2. ARTÍCULO 2	307
10.4.3. ARTÍCULO 3	331
10.4.4. ARTÍCULO 4	353

RESUMEN / SUMMARY

RESUMEN

Este trabajo expone dos aspectos de la investigación translacional de la metástasis cerebral en cáncer de mama. Primero, el desarrollo de un modelo pre-clínico de tratamiento, demostrando su utilidad para investigar la efectividad de terapias contra la metástasis cerebral mediante experimentos que combinan radioterapia y quimioterapia. Y por otro lado, el desarrollo de la validación de biomarcadores predictivos de metástasis cerebral (GRP94 y FN14) en un estudio clínico multicéntrico con pacientes diagnosticadas de carcinoma infiltrante de mama. Este estudio muestra el valor de la determinación de la expresión de estas proteínas en el tumor primario para estratificar a las pacientes con un riesgo aumentado de desarrollar metástasis cerebrales en el curso de su enfermedad.

El estudio pre-clínico experimental está basado en el diseño de un modelo de irradiación craneal en ratones hembra atímicos previamente inoculados, vía intracarotídea, con células seleccionadas de adenocarcinoma de mama humana con capacidad para atravesar la barrera hemato-encefálica y desarrollar metástasis cerebrales. En este modelo terapéutico hemos optimizado tanto la técnica de inoculación intracarotídea como la dosis de radiación holocraneal combinada con quimioterapia vía oral. Es un modelo fácil de aplicar, reproducible, fiable y económicamente accesible a investigadores pre-clínicos en un entorno hospitalario con la infraestructura de un Servicio Clínico de Oncología Radioterápica.

El estudio clínico retrospectivo engloba pacientes de tres hospitales diagnosticadas entre 1989 y 2009 con un seguimiento clínico medio de 6 años. La serie incluye pacientes que no habían metastatizado, pacientes que habían metastatizado en otros órganos sin afectación cerebral y pacientes con metástasis cerebrales, y ha permitido establecer la sensibilidad y especificidad predictiva y el valor pronóstico de los biomarcadores al relacionarlos con la supervivencia libre de metástasis cerebral,

especialmente en pacientes con receptores hormonales positivos y con tumores triple-negativos.

Como conclusión, proponemos una nueva pauta de seguimiento clínico en cáncer de mama que nos ayude al diagnóstico precoz y a la prevención de la metástasis cerebral, teniendo en cuenta la relevancia que dichos marcadores tienen sobre la predicción de la misma y su posible valor en la toma de decisiones terapéuticas.

SUMMARY

This work exposes two aspects of the translational research of brain metastasis in breast cancer. First, the development of a preclinical model of treatment, proving its usefulness to research the effectiveness of therapies against the brain metastasis by means of experiments that combine radiotherapy and chemotherapy. And, on the other hand, the development of the validation of predictive biomarkers of brain metastasis (GRP94 and FN14) in a multicentric clinical study with patients diagnosed of breast infiltrating carcinoma. This study shows the value of determining the expression of these proteins in the primary tumour to stratify the patients with an increased risk to develop brain metastasis in the course of their disease.

The experimental preclinical study is based on the design of a cranial irradiation model on athymic female mice previously inoculated, via intracarotid, with selected cells of human breast adenocarcinoma with ability to cross the blood-brain barrier and to develop brain metastases. In this therapeutic model we have optimised both the intracarotid inoculation technique and the dose of whole cranial radiation combined with oral chemotherapy. It is a model easy to apply, reproducible, reliable and economically accessible to preclinical researchers in a Hospital environment with the infrastructure of a Clinical Department of Radiation Oncology.

The retrospective clinical study encompasses patients from three hospitals diagnosed between 1989 and 2009 with a mean clinical follow-up of six years. The serie includes patients who had not metastatised, patients who had metastatised in other organs without brain involvement and patients with brain metastases, and it has allowed to establish the sensitivity and predictive specificity and the prognostic value of the biomarkers when they relate to brain metastasis free survival, especially in patients with positive hormone receptors and with triple negative tumours.

In conclusion, we propose a new guideline of clinical follow-up in breast cancer that help us to an early diagnosis and prevention of the brain metastasis, keeping in mind the importance that such markers have on its prediction and its possible value on the therapeutic decision-making.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. METÁSTASIS CEREBRAL EN EL CÁNCER DE MAMA. ASPECTOS CLÍNICOS

La metástasis encefálica es un tumor maligno secundario que se desarrolla en el cerebro, cerebelo o tronco cerebral y cuyas células provienen, a través de la circulación sanguínea sistémica, de un tumor maligno primario originado en otro órgano, en nuestro caso en la mama. Gran parte de las metástasis encefálicas son cerebrales (MC).

1.1.1. RELEVANCIA DE LA METÁSTASIS CEREBRAL EN LOS DIFERENTES SUBTIPOS MOLECULARES DEL CARCINOMA DE MAMA

El cáncer de mama es una enfermedad altamente heterogénea y la progresión metastásica a cerebro varía con las características patológicas del tumor. Se consideran los criterios inmunohistoquímicos de valoración de los receptores estrogénicos (RE), receptores progestágenos (RP), Ki-67 y Her2 en el tumor primario de mama para definir los subtipos moleculares ^{1,2}, que sientan las bases de la estratificación clínica:

1. Luminal A: RE positivos, Ki-67 <14% y expresión normal de Her2.
2. Luminal B: RE positivos, Ki-67 ≥14% y expresión normal de Her2.
3. Luminal/Her2+: RE positivos y sobreexpresión de Her2 (Her2 positivo).
4. Her2-enriched: RE negativos y sobreexpresión de Her2 (Her2 positivo).
5. Triple-negativo (TN): RE negativos, RP negativos y expresión normal de Her2.

Así, la inmunotinción de los RE y RP se define como positiva cuando se detecta en el 1% o más de los núcleos de las células tumorales ^{3,4}. Por otro lado, el Ki-67 es un marcador nuclear de proliferación celular que tenía su punto de corte a partir del 14% de núcleos tumorales positivos ⁵ y que se estableció en el Consenso de St. Gallen 2013 en más del 20%, debido a la alta variabilidad que presenta este marcador según el observador ⁶. Se volvió a redefinir en el Consenso de St. Gallen del 2015, aceptándose en estos momentos un punto de corte de Ki-67 superior al 20-29% ⁷. La ausencia de estandarización junto con la presencia de un punto de

corte poco preciso para separar los subgrupos clínicos ha supuesto un problema para su evaluación, especialmente en casos de Ki-67 de carácter intermedio (superior al 14% e inferior al 25%) ^{8,9}.

Por lo que se refiere al grado de expresión de Her2 en la evaluación inmunohistoquímica, éste es catalogado como 0, 1+, 2+ y 3+, siendo considerado como no-sobreexpresado (Her2 negativo) cuando la tinción de membrana es de intensidad 0 ó 1+, y se considera sobreexpresado (Her2 positivo) cuando la tinción muestra intensidad 3+. Los tumores cuyo resultado de tinción muestran intensidad 2+ (“borderline”) necesitan una evaluación con técnicas de hibridación in situ, p.e. FISH, para evidenciar si hay amplificación del gen, alteración que subyace en los aumentos de expresión de Her2 ²⁻⁴.

1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA

En el cáncer de mama la aparición de MC ocurre entre el 10-20% de las pacientes, siendo el segundo órgano de procedencia después del cáncer de pulmón, con un 30-50%, y seguido del melanoma con un 10-20% ¹⁰. Otros cánceres que pueden originar MC en menor porcentaje son los de riñón, colon, páncreas, piel, ovario, cérvix, testículo y próstata.

Las metástasis del sistema nervioso central (SNC) suelen localizarse en los hemisferios cerebrales en un 80% de casos, en el cerebelo en el 15% y en los ganglios basales y tronco cerebral en el 5% ¹¹, preferentemente en las uniones entre sustancia blanca y sustancia gris, y en los límites de los territorios vasculares arteriales ^{12,13}.

En general, la incidencia de MC está aumentando debido al mejor control de la enfermedad sistémica, con el uso de esquemas de quimioterapia y terapias biológicas más eficaces, a la detección precoz de la enfermedad subclínica y a la presencia cada vez mayor de población longeva. En general, la MC se diagnostica entre el 10-30% de las pacientes con cáncer de mama, pudiendo ser la primera manifestación del cáncer y, además, puede presentarse junto con la enfermedad

INTRODUCCIÓN

sistémica de forma sincrónica, es decir, sin haberse diagnosticado previamente el tumor primario, en el 5-10% de casos, aunque la forma de presentación más frecuente, en más del 80% de los casos, es de forma metacrónica a la enfermedad neoplásica conocida, es decir, aparecer un tiempo después de haber sido diagnosticada la neoplasia primaria. Además, en el 20-30% de las pacientes la MC se presenta como un foco único, en alrededor del 20-30% presentan 2 ó 3 MC, pacientes denominadas oligometastásicas, y un tercio o más se presentan con 4 ó más MC, siendo estas pacientes consideradas polimetastásicas ¹⁴.

En relación con el fenotipo del tumor primario, las pacientes con los subtipos Luminal A y Luminal B presentan una incidencia de MC del 2.2 y 4.7%, respectivamente; en el subtipo Luminal/Her2+ es del 7.9%, mientras que en aquéllas con los subtipos Her2-enriched y triple-negativo (TN) la incidencia de MC es mayor ¹⁵, representando el 14.3 y el 18.1% de los casos, respectivamente ^{3,14}.

La MC ocurre con mayor frecuencia no sólo en las pacientes con tumores primarios que tengan RE negativos ^{16,17}, sino también en las que presentan Her2 positivo, lo cual podría asociarse a un mayor control de la enfermedad sistémica, con una mayor supervivencia debido al tratamiento sistémico, tanto con quimioterapia como con trastuzumab (anticuerpo monoclonal anti-Her2), con la consecuente aparición tardía de la MC entre el 30-55% de estas pacientes ¹⁸⁻²³.

En las pacientes con tumores del fenotipo TN la MC ocurre con frecuencia en el contexto de progresión de enfermedad extracraneal simultánea ¹⁸. Así, estudios recientes muestran que las pacientes con subtipo TN, al igual que sucede con las pacientes Her2-positivo que presentan diseminación metastásica extracraneal, como metástasis pulmonares, hepáticas y óseas, tienen una mayor incidencia de MC, siendo del 30.8% y 28%, respectivamente ²⁴.

La presencia en las pacientes de metástasis a distancia en el momento del diagnóstico conlleva también mayor probabilidad de desarrollar MC con respecto a aquéllas con enfermedad limitada, siendo esta probabilidad del 36% y 18%, respectivamente, y además la incidencia de MC es también alta en mujeres con

carcinoma de mama inflamatorio, asociándose a edades jóvenes (premenopáusicas) y a otras metástasis extracraneales ²⁵.

Debido al largo período de latencia que suele haber entre el diagnóstico del tumor primario y los síntomas clínicos de la MC, existe una creciente necesidad en el ámbito clínico de disponer de biomarcadores predictivos que nos permitan identificar subgrupos de pacientes con cáncer de mama y riesgo de desarrollar MC, con el fin de diseñar estrategias preventivas.

A este respecto, se han identificado diferentes factores de riesgo para el desarrollo de MC en las pacientes con cáncer de mama. Así, tenemos: la edad premenopáusica y la ausencia de receptores hormonales como los principales factores de riesgo ²⁶⁻²⁸, la presencia de metástasis a distancia ²⁵ y la sobreexpresión de Her2 y el fenotipo TN ¹⁸.

Rudat et al. ²⁹, en un estudio multivariado que analizaba los factores de riesgo de MC en pacientes con cáncer de mama, concluyó que el único factor de riesgo independiente significativo era la ausencia de receptores de estrógenos (RE-negativos), mostrando además que las pacientes con cáncer de mama con RE-negativos y metástasis sistémicas presentaban casi un 50% de riesgo de desarrollar MC en el transcurso de la enfermedad. También en el cáncer de mama avanzado Her2-positivo, la presencia de metástasis viscerales y la ausencia de administración de trastuzumab como tratamiento sistémico parece incrementar la probabilidad de MC precoz ³⁰. En este contexto, cabe destacar que, las pacientes pertenecientes al subtipo molecular Her2-enriched, Lum/Her2+ y TN tienen mayor riesgo de MC comparadas con las del subtipo Luminal A ³¹.

En definitiva, la valoración de la expresión de los receptores hormonales y de Her2 en el cáncer de mama se ha convertido en el estándar de marcadores para la predicción de la evolución metastásica y para la elección del tratamiento de las pacientes.

1.1.3. DIAGNÓSTICO

Las pacientes con cáncer de mama, independientemente del subtipo de tumor, pueden desarrollar MC clínicas, que se sospecharán por la presencia de signos y síntomas neurológicos, como p.e. cefalea, déficit focal neurológico, crisis convulsiva, ataxia, disfasia o afasia, desorientación, bradipsiquia, papiledema, síncope o alteraciones de conducta, o bien síntomas más inespecíficos, como astenia o vómitos ^{32,33}. El diagnóstico precoz de la afectación del SNC tiene, pues, su importancia, ya que cuando aparecen los síntomas éstos no se controlan fácilmente aunque haya respuesta al tratamiento.

La Tomografía Computerizada (TC) sin contraste es la prueba de imagen de elección para diagnosticar la MC en general en pacientes con clínica neurológica; y la TC con contraste o la resonancia magnética nuclear (RMN) pueden estar indicadas posteriormente en función de los primeros hallazgos ³⁴. La RMN con contraste de gadolinio tiene una sensibilidad y una especificidad mayores que la TC para detectar MC ³⁵, siendo actualmente la prueba estándar para el diagnóstico y valoración de las mismas y para monitorizar la respuesta a tratamiento. No obstante, la detección de MC de cáncer de mama suele estar infraestimada, siendo fundamentales los avances en las técnicas de imagen para desarrollar estrategias terapéuticas más eficientes ³⁶. Actualmente no se recomienda la RMN craneal de rutina para detectar MC, aunque debido a su alta incidencia entre las pacientes con cáncer de mama avanzado Her2-positivo, debería restringirse menos su indicación en estos casos ³⁷, ya que en este grupo concreto de pacientes estaría justificada su realización ³⁸.

Un problema clínico no excepcional es el desarrollo de MC en pacientes previamente tratadas con radiocirugía estereotáxica (SRS), que han tenido una respuesta variable de su MC a este tratamiento, y que progresan o recaen localmente en el SNC; en estas circunstancias, incluso con la RMN craneal podemos tener dificultades para diagnosticar con precisión la zona de recidiva y diferenciarla de una lesión cerebral yatrogénica (post-tratamiento), como podría ser la radionecrosis. En estos casos, se puede recurrir a pruebas diagnósticas de medicina

nuclear, como el PET con ^{11}C -Metionina, para poder diferenciar ambos diagnósticos y, si fuera el caso, para poder planificar otro nuevo tratamiento con SRS ³⁹, lo que puede conllevar un mayor riesgo de toxicidad cerebral.

1.1.4. TRATAMIENTO

La determinación del estado general (KPS o “Karnofsky Performance Sataus”), la evaluación de la clínica neurológica y de la extensión de la enfermedad fuera y dentro del SNC son aspectos fundamentales para un correcto manejo de las pacientes de cara a decidir el mejor tratamiento de la MC. Existe una gran heterogeneidad celular entre los carcinomas infiltrantes de mama, y los tratamientos sistémicos disponibles no atraviesan de forma eficiente la barrera hemato-encefálica (BHE), aun existiendo disrupción de la misma por la inflamación que provoca la invasión tumoral, por lo que la eficacia de un tratamiento sistémico para combatir la MC está condicionada ⁴⁰.

1.1.4.1. Tratamiento Local

Los pilares en los que se basa el tratamiento local de la MC incluyen: resección quirúrgica completa, radioterapia holocraneal (WBRT) y/o radiocirugía estereotáxica (SRS), independientemente del subtipo tumoral ^{37,41}.

1.1.4.1.1. Cirugía

La resección quirúrgica se recomienda, en general, para la MC única con un diámetro máximo superior a 2 cm o con un volumen superior a 8-10 ml, que sea sintomática o produzca efecto masa y sea operable ^{42,43}, especialmente en pacientes con un KPS mayor o igual al 70% (KPS favorable) y con la enfermedad primaria controlada ⁴⁴.

En estos casos, se puede indicar también la combinación de resección quirúrgica con WBRT si hay una única MC o si hay entre 1 y 3 MC, obteniéndose con esta combinación de tratamiento un aumento en la supervivencia mediana comparado

con la WBRT sola, siendo de 10 meses y de 3.7 meses, respectivamente, un aumento en el control local, siendo del 80% y del 48%, respectivamente, y un aumento en la calidad de vida ^{45,46}. Asimismo, la resección quirúrgica combinada con SRS en la MC única también disminuye la tasa de recurrencia local ⁴⁵.

1.1.4.1.2. Radioterapia Holocraneal (WBRT)

Tras un tratamiento local como la resección quirúrgica o la SRS, la WBRT administrada de forma adyuvante disminuye la recurrencia en el SNC. No obstante, ante la presencia de 1 a 3 MC en un paciente con KPS mayor o igual al 70% se debería plantear primero el tratamiento con cirugía o SRS y no administrar de entrada la WBRT.

Así, en pacientes con MC de reciente diagnóstico se administra WBRT sola en los siguientes casos: **1.** Pacientes con KPS inferior al 70% o con KPS mayor o igual al 70% pero que tengan más de 3 MC, independientemente de que la enfermedad primaria esté o no controlada ¹⁴. **2.** Pacientes con enfermedad diseminada y pocas posibilidades de tratamiento sistémico ⁴².

Se sigue un esquema de fraccionamiento clásico de 30 Gy en 10 fracciones o un esquema con dosis efectiva biológica (BED; con $\alpha/\beta=10$) de 39 Gy. Debido a la relación entre la aparición de toxicidad neurocognitiva y el aumento de la dosis total y dosis/fracción de WBRT, no se recomiendan dosis superiores a 30 Gy en 10 fracciones, es decir, dosis superiores a 3 Gy/fracción, ni esquemas con BED similar, excepto en pacientes con KPS desfavorable (inferior al 70%) o con predicción de corta supervivencia ⁴⁵.

1.1.4.1.3. Radioterapia Local

Tras la resección quirúrgica completa previa de la MC única, la radioterapia 3D conformacional local postoperatoria, con dosis entre 30 Gy en 10 fracciones y 50.4 Gy en 28 fracciones, sobre el lecho quirúrgico con márgenes, produce una excelente tasa de control local, siendo del 100% a los 2 años ⁴⁷.

1.1.4.1.4. Radiocirugía Estereotáxica (SRS)

Esta técnica de radioterapia se puede realizar: **1.** Como tratamiento inicial en pacientes con MC de reciente diagnóstico que presenten un KPS superior o igual al 70% (favorable), entre 1 y 3 MC, todas ellas inferiores a 3 cm de diámetro ⁴⁸ y con enfermedad primaria controlada o con opciones de tratamiento sistémico ⁴²; o bien de forma adyuvante a la WBRT si la enfermedad primaria no está controlada ¹⁴. **2.** En pacientes con KPS favorable que tengan más de 1 MC con un volumen acumulado inferior a 7 ml ^{42,45}, mejorando así el control local si tienen como máximo 4 MC, o la supervivencia mediana total si tienen más de 4 MC ⁴⁵. **3.** En MC con menos de 2 cm de diámetro máximo, profundas y asintomáticas ⁴². **4.** En la MC única de reciente aparición o recurrente como alternativa a la resección quirúrgica, para disminuir el riesgo de progresión local ⁴⁵. **5.** Como tratamiento paliativo en algunos pacientes con MC con el fin de mejorar síntomas focales y calidad de vida funcional ⁴⁵.

Según Brown et al. ⁴⁸, con SRS sola se administran 24 Gy en lesiones inferiores a 2 cm de diámetro y 20 Gy en lesiones de 2 a 2.9 cm de diámetro, a todas en dosis única y prescrita en la línea de isodosis más grande que englobe la metástasis, es decir, en la periferia de la MC, reduciéndose esta dosis a 22 Gy y 18 Gy respectivamente si se asocia la SRS con WBRT. Por otro lado, Prabhu et al. ⁴⁹ muestra que una dosis mediana de 15 Gy en fracción única con SRS preoperatoria comporta un menor riesgo de radionecrosis al no ser necesario irradiar un volumen mayor con márgenes. Hay otros autores como Yamamoto et al. ⁵⁰ que incluso han propuesto tratar inicialmente con SRS a los pacientes con KPS favorable que presenten MC múltiples, hasta en número de 10, que sean inferiores a 3 cm de diámetro máximo cada una y que presenten un volumen total acumulado máximo de 15 ml, ya que concluye que entre los pacientes con 2 a 4 MC y aquéllos con 5 a 10 MC no hay diferencias ni en la supervivencia total ni en la incidencia de efectos adversos por el tratamiento.

Cuando la SRS está indicada, añadir a este tratamiento la WBRT mejora el control local, pero no mejora la supervivencia total y hay mayor riesgo neurocognitivo a

corto plazo ⁴⁸. La SRS proporciona un excelente control local de las MC de cáncer de mama; no obstante, las pacientes Her2-positivo parecen mostrar tasas de recaída intracraneal mayores que las pacientes Her2-negativo, lo que sugiere la necesidad de tratamientos adyuvantes eficaces para prevenir y tratar las MC en las pacientes Her2-positivo ⁵¹.

En caso de recurrencia local en SNC se recomienda: **1.** Nueva resección total en bloque tras resección quirúrgica o SRS iniciales, aunque sigue siendo actualmente motivo de discusión ⁴⁵. **2.** Considerar cirugía, SRS, radioterapia estereotáxica fraccionada, WBRT o quimioterapia en función del tratamiento local previo recibido⁴². **3.** WBRT si previamente no fue administrada, o soporte paliativo si hay progresión sistémica con pocas opciones de tratamiento y/o KPS inferior al 70% ⁴².

Finalmente, en la actualidad no hay evidencia clínica suficiente para recomendar la braquiterapia intersticial u otros tratamientos como ultrasonidos de alta intensidad o la termoterapia intersticial con láser ⁴⁵.

1.1.4.2. Tratamiento Sistémico

1.1.4.2.1. Quimioterapia

Hasta el momento, el tratamiento sistémico es una opción para aquellas pacientes con MC que han progresado tras el tratamiento local, sea cirugía o radioterapia ⁴⁴, ya que su capacidad para atravesar la BHE es limitada ⁵², por lo que la administración rutinaria de quimioterapia para las MC, sola, o tras WBRT o SRS, no está recomendada ⁴⁵. No obstante, aunque actualmente no hay aprobados tratamientos sistémicos de forma específica para las MC por cáncer de mama, determinados esquemas de tratamiento sistémico parecen ser efectivos y se continúan estudiando^{44,53}. Fármacos que se han utilizado clásicamente como tratamiento sistémico para las MC del cáncer de mama son: cisplatino ^{54,55}, etopósido ⁵⁴, carboplatino ⁵⁶, lomustina ⁵⁶, topotecán ^{57,58}, temozolomida ^{55,59-61}, vinorelbina ^{56,60}, capecitabina ^{61,62} y metotrexate ⁶³, presentando todos ellos una respuesta variable. Por otro lado, los fármacos con base liposomal, como la doxorrubicina liposomal,

atraviesan la BHE, por lo que esquemas de quimioterapia con este tipo de compuestos se han probado en pacientes con cáncer de mama que presentan MC, habiendo o no recibido radioterapia previamente, obteniéndose una tasa de respuesta objetiva (TRO) en la MC del 50% y 41.4%, respectivamente ⁶⁴.

Pocos estudios han evaluado el papel del tratamiento sistémico en la MC de cáncer de mama, por lo que muchas recomendaciones se han basado en estudios de casos (Tabla 1).

Tabla 1. Quimioterapia utilizada en pacientes con metástasis cerebral de cáncer de mama

Tipos de Estudios	Quimioterapia*	TRO SNC**
Fase I Estudio de Casos	Capecitabina	18 - 43 %
Fase II Estudio de Casos Estudios Retrospectivos	Doxorrubicina clorhidrato liposomal pegilada	17 % 62 %
Fase II Estudio de Casos Estudios Prospectivos	Cisplatino	38 - 55 %
Fase II	Irinotecan	12%
Fase II	Temozolomida	0 - 4 %

Datos obtenidos de Lin NU et al. (Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2017), mostrando los fármacos utilizados para el tratamiento de las MC de cáncer de mama en los distintos estudios realizados entre los años 1986 - 2014. *Fármaco administrado solo o formando parte de esquemas quimioterápicos. **TRO SNC: Tasa de Respuesta Objetiva en el SNC, que contempla la suma de respuestas completas (desaparición total de lesiones) y de respuestas parciales (disminución mínima del 50% del tamaño total, o disminución según criterios RECIST).

Por otra parte, actualmente no se dispone de evidencia clínica suficiente para recomendar el uso de fármacos con finalidad radiosensibilizante, como p.e. la temozolomida (TMZ), junto con WBRT para tratar las MC por cáncer de mama ⁴⁵.

1.1.4.2.2. Terapias Dirigidas

Hasta el momento no hay consenso sobre la estrategia terapéutica a seguir en aquellas pacientes con progresión intracraneal ⁶⁵. Las terapias dirigidas a una diana que controlan la enfermedad sistémica tienen poca eficacia para combatir las lesiones cerebrales ⁶⁶. La mayoría de agentes terapéuticos desarrollados se han dirigido a las siguientes dianas:

Receptor Her2, una proteína de membrana de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que al unirse por su dominio extracelular a su ligando, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), produce su dimerización, activándose las tirosin-kinasas, las cuales a su vez activan las vías de señalización de la fosfatidilinositol-3-kinasa/serina-treonina kinasa (PI3K/Akt) y de la proteína-kinasa activada por mitógeno (MAPK), dando como resultado un aumento de la proliferación y supervivencia celulares. Para esta diana se desarrolló el trastuzumab, anticuerpo monoclonal que bloquea el receptor Her2 al unirse a su dominio extracelular, impidiendo su dimerización y bloqueando estas vías de señalización. Este mecanismo lo hace indicado para el tratamiento del carcinoma de mama en pacientes Her2-positivo. No obstante, al ser una molécula grande pasa con dificultad la BHE ⁶⁷.

Proteínas tirosin-kinasas, proteínas que se sitúan en el dominio intracelular de muchos receptores de membrana, entre ellos los EGFR, a los que pertenece el Her2, y que activan las vías de señalización PI3K/Akt y MAPK; se han utilizado para desarrollar los inhibidores de las tirosin-kinasas (TKI), como el neratinib o el lapatinib. Estos compuestos de molécula pequeña tienen mayor capacidad para atravesar la BHE, demostrándose en modelos pre-clínicos que son captados por las MC ⁶⁸, siendo eficaces para inhibir y reducir el número de MC Her2-positivo ⁶⁹.

Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), una proteína de membrana con un dominio extracelular e intracelular que actúa como ligando de su receptor (VEGFR), estimulando la angiogénesis y favoreciendo el crecimiento del tumor. El bevacizumab es un anticuerpo monoclonal que al unirse con el VEGF impide que

éste se una a su receptor y se inhibe así la angiogénesis del tumor. En modelos pre-clínicos, los agentes antiangiogénicos que actúan bloqueando el VEGF son eficaces para disminuir el crecimiento de las MC ¹⁸ y reducen el crecimiento de la MC en pacientes con cáncer de mama ⁷⁰.

1.1.4.2.3. Terapias Combinadas

Los tratamientos dirigidos con anticuerpos anti-Her2 o inhibidores de tirosin-kinasas (TKI), como lapatinib o neratinib, no producen respuestas completas en el SNC ⁷¹. No obstante, la combinación de diferentes modalidades terapéuticas puede aportar un beneficio para estas pacientes. En esta línea, se ha visto que el uso de SRS en combinación con TKI mejora la supervivencia total, la supervivencia libre de recidiva local, la supervivencia libre de recidiva a distancia y el periodo libre de WBRT al año de seguimiento ⁷².

Recientemente, se ha visto que la SRS combinada con lapatinib de forma concomitante en pacientes con MC de cáncer de mama Her2-positivo mejora, de forma significativa, el control local de la metástasis que tenga un volumen máximo de 1.10 cm³ con respecto a la tratada con SRS sola, observándose un 5.7% y un 15.1% de recidiva local al año, respectivamente; todo esto sin aumentar la tasa de radionecrosis y con un aumento significativo en la supervivencia mediana en las pacientes tratadas con esta terapia combinada, siendo de 27.3 meses vs. 19.5 meses ⁷³. Además, en las pacientes tratadas con esta combinación terapéutica la tasa de respuesta objetiva fue del 100% y en las que recibieron SRS sola fue del 70%, mientras que la tasa de respuesta completa fue del 35% y 11% respectivamente ⁷⁴.

En la Tabla 2 se recogen estudios clínicos cerrados y otros que todavía están en proceso, realizados con terapias dirigidas con o sin quimioterapia. La tasa de respuesta objetiva (TRO) que muestran los estudios ya evaluados se define como la tasa en la que aparece una reducción mínima del 50% en la suma de volúmenes de todas las MC evaluables en ausencia de nuevas, o de progresión o de incremento en el uso de corticoides; o bien como la suma de respuestas completas y parciales

INTRODUCCIÓN

según criterios de guías RECIST ("Response Evaluation Criteria In Solid Tumours", años 2000 y 2009) ^{75,76}. Así, según los criterios RECIST y evaluando las lesiones mesurables, la respuesta completa se define como la desaparición de todas las lesiones, y la respuesta parcial como una disminución mínima del 30% en la suma de los diámetros mayores de las lesiones mesurables teniendo como referencia esta suma en situación basal.

Tabla 2. Terapias sistémicas dirigidas en metástasis cerebral de cáncer de mama

Tratamiento	Estudio (Fase)	Subtipo Molecular	Estado del Estudio	TRO SNC*	Referencia o ID del estudio**
Lapatinib	II	Her2+	–	6 % (TP)	Lin NU et al., 2009
Lapatinib + Capecitabina	II	Her2+	–	38 % (TP)	Lin NU et al., 2011
Lapatinib + Capecitabina	II	Her2+	–	66 % (NTP)	Bachelot T et al., 2013
Tucatinib	I	Her2+	–	7 %	Metzger-Filho O et al., 2014
Afatinib	II	Her2+	–	0 % (TP)	Cortes J et al., 2015
Neratinib	II	Her2+	–	8 % (TP)	Freedman RA et al., 2016
Neratinib + Capecitabina	II	Her2+	–	49 %	Freedman RA et al., 2017
Buparlisib + Trastuzumab	II	Her2+	–	11 % (TP)	Pistilli B et al., 2018
Tucatinib ± Capecitabina o Trastuzumab	I	Her2+	–	42 %	Hamilton E et al., 2018
Everolimus + Trastuzumab + Vinorelbina	II	Her2+	–	4 % (TP)	van Swearingen AED et al., 2018
Neratinib + Capecitabina	II	Her2+	activo	–	NCT01494662
Tucatinib ± Capecitabina o Trastuzumab	II	Her2+	activo	–	NCT02614794
Trastuzumab + Pertuzumab (alta dosis)	II	Her2+	activo	–	NCT02536339
Trastuzumab + Pertuzumab intratecal	I	Her2+	finalizado	–	NCT02598427
Lapatinib + Capecitabina (alta dosis)	I	Her2+	activo	–	NCT02650752
Abemaciclib	II	RE+	activo	–	NCT02308020
Palbociclib	II	Her2+ ó TN	activo	–	NCT02774681
Palbociclib	II	Cualquiera	activo	–	NCT02896335
Cabozantinib ± Trastuzumab	II	Her2+ ó RE+	activo	–	NCT02260531
Pembrolizumab	II	Cualquiera	activo	–	NCT02886585
Durvalumab	II	Cualquiera	finalizado	–	NCT02669914
Etirinotecan pegol	II	Cualquiera	activo	–	NCT02312622
Etirinotecan pegol	III	Cualquiera	activo	–	NCT02915744
Cabazitaxel	II	Cualquiera	finalizado	–	NCT02166658

Datos obtenidos de Lin NU et al. (Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2017), Kabraji S et al. (Clin Cancer Res, 2018) y NIH ClinicalTrials.gov. *TRO: Tasa de Respuesta Objetiva, definida como la tasa en la que aparece una reducción del 50% o más en la suma de volúmenes de todas las MC evaluables, en ausencia de nuevas o de progresión o de incremento de uso de corticoides; o definida como la suma de respuestas completas y parciales según criterios de guías RECIST (v1.1). TP: ha recibido tratamientos previos como trastuzumab, o inhibidores de tirosin-kinasas, o quimioterapia, o radioterapia. NTP: No tratamientos previos. ** La identificación de los estudios que hay en marcha viene determinada por una cifra precedida de las siglas NCT. Se indica el estado en el que se encuentran dichos estudios (Fuente: NIH ClinicalTrials.gov; <https://Clinicaltrials.gov>, Febrero 2019).

INTRODUCCIÓN

El mejor resultado, considerando la duración de los períodos libres de progresión, se obtiene en general en aquellos estudios en los que se han combinado determinados agentes quimioterápicos, como la capecitabina, con la terapia dirigida (Tabla 3).

Tabla 3. Tiempo libre de progresión tras quimioterapia y/o terapia dirigida en pacientes con metástasis cerebral de cáncer de mama

Tratamiento	Mediana del tiempo libre de progresión (meses)	Referencias
Capecitabina*	3	Rivera E et al. Cancer, 2006.
	8	Ekenel M et al. J Neurooncol, 2007.
Doxorrubicina*	5.5	Caraglia M et al. Cancer Chemother Pharmacol, 2006.
Cisplatino*	2.9	Christodoulou C et al. J Neurooncol, 2005.
Irinotecan*	2.1	Anders C et al. Breast Cancer Res Treat, 2014.
Temozolomida*	1.9	Siena S et al. Ann Oncol, 2010.
Neratinib**	1.9	Freedman RA et al. J Clin Oncol, 2016.
Lapatinib**	2.4	Lin NU et al. Clin Cancer Res, 2009.
Lapatinib + Capecitabina**	3.6	Lin NU et al. Clin Cancer Res, 2009.
	5.5 (NTP)	Bachelot T et al. Lancet Oncol, 2013.
Tucatinib ± Capecitabina o Trastuzumab**	7.8	Hamilton E et al. Cancer Res, suppl, 2018.
Buparlisib + Trastuzumab**	4.2	Pistilli B et al. Breast Cancer Res Treat, 2018
Everolimus + Trastuzumab + Vinorelbina**	3.9	van Swearingen AED et al. Breast Cancer Res Treat, 2018.

*Datos obtenidos a partir de las referencias aportadas por Lin NU et al. (Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2017).

**Datos obtenidos a partir de las referencias aportadas por Kabraji S et al. (Clin Cancer Res, 2018). NTP: No tratamientos previos.

Clásicamente, el mal pronóstico de las pacientes con cáncer de mama que desarrollaban MC hacía que fueran excluidas de los ensayos clínicos con terapias sistémicas, por lo que hay carencia de estudios clínicos randomizados que comparen un tratamiento local estándar con uno sistémico, y las recomendaciones dependen de factores como el KPS, subtipo molecular del tumor, estado de la enfermedad extracraneal, tratamientos previos recibidos, comorbilidades asociadas y expectativa de vida, siendo preferible que la administración del agente quimioterápico sea en forma única secuencial en lugar de poliquimioterapia ⁴⁴.

En base, pues, a los datos disponibles, se han recomendado determinados tratamientos en función del subtipo molecular del tumor primario (Tabla 4).

Tabla 4. Recomendaciones de tratamiento sistémico en pacientes con metástasis cerebral de cáncer de mama

Subtipo tumoral	Tratamiento
Her2 +	Capecitabina + Lapatinib
	Antraciclina (Doxorrubicina liposomal pegilada) + Trastuzumab
	Platino ± Trastuzumab
Triple Negativo	Platino*
	Capecitabina
	Antraciclina
Luminal A / B	Hormonoterapia ± Palbociclib o Everolimus
	Capecitabina
	Antraciclina

Tabla adaptada con los datos obtenidos de Lin NU et al. (Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2017).

*Tratamiento recomendado en las pacientes con el subtipo Triple-Negativo sobre todo si presentan BRCA1/2 +.

INTRODUCCIÓN

En las pacientes con MC difusas el tratamiento clásico estaba basado en WBRT, con pocas opciones terapéuticas sistémicas disponibles. Así, el lapatinib se consideró que podría ser un fármaco activo para el tratamiento de las MC en el cáncer de mama Her2-positivo ⁷⁷, siendo actualmente la combinación de lapatinib con capecitabina la opción terapéutica sistémica mejor establecida para estas pacientes, considerándose un tratamiento de primera línea ⁷⁸, aunque hay otras menos estudiadas, como la utilización del compuesto trastuzumab-emtansina, basado en un conjugado de anticuerpo-fármaco citotóxico ⁷⁹.

En un estudio fase-III realizado en pacientes con cáncer de mama avanzado que progresaron después de ser tratadas con trastuzumab, se vió que la combinación de lapatinib con capecitabina era más efectiva que la capecitabina sola para prevenir que el SNC sea el primer órgano de recaída ⁸⁰. Otros trabajos han reflejado que las pacientes tratadas de forma secuencial con trastuzumab y con la combinación de lapatinib y capecitabina tenían una supervivencia significativamente más larga comparada con las pacientes tratadas sólo con trastuzumab ⁸¹. Además, parece que la administración de trastuzumab o lapatinib de forma concurrente con WBRT mejora la tasa de respuesta ^{82,83}.

Como hemos visto, los tratamientos anti-Her2, como trastuzumab y lapatinib, ofrecen un beneficio en la supervivencia tras el diagnóstico de MC de tumores Her2-positivo. También, el pertuzumab asociado a la combinación de trastuzumab con docetaxel parece un esquema efectivo para reducir las MC en pacientes Her2-positivo, aunque se necesitan más estudios para confirmar o no la ventaja de este tratamiento ⁸⁴.

En definitiva, conocer el estado de los RE y la expresión de Her2, así como los tratamientos sistémicos previos de las pacientes y el estado de la enfermedad extracraneal, es fundamental para determinar las opciones terapéuticas sistémicas. Finalmente, hay ensayos clínicos en curso que valoran la combinación de inmunoterapia y radioterapia en las MC ⁸⁵, aunque todavía no hay evidencia clínica sólida para su recomendación ⁴⁵.

1.1.5. SUPERVIVENCIA, PRONÓSTICO Y CALIDAD DE VIDA

1.1.5.1. Supervivencia

La supervivencia total de las pacientes con MC es mala. En las pacientes que no han recibido tratamiento oscila entre 1-2 meses, pudiendo llegar hasta 3-6 meses si reciben WBRT y sobreviviendo más de un año menos del 20% de las mismas ^{86,87}. Cuando el tumor está diseminado, la supervivencia depende también de un adecuado tratamiento de la enfermedad extracraneal. Según el estudio de Niwinska et al. ⁸⁷, en el que el 97% de las pacientes recibió WBRT y el 72% recibió tratamiento sistémico tras WBRT, la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama y MC depende del tipo biológico del tumor primario (Tabla 5) así como del tratamiento sistémico recibido tras WBRT (Tabla 6).

La quimioterapia (QT), la hormonoterapia (HT) y el tratamiento biológico dirigido han prolongado la supervivencia de las pacientes con MC del subtipo luminal y Her2-positivo, debiéndose aplicar dicho tratamiento sistémico tras la WBRT. En cambio, la carencia de beneficio del tratamiento sistémico en las pacientes TN con MC parece deberse al bajo KPS y a la no-respuesta a la QT. Una vez desarrollada la MC, las pacientes Her2-positivo tratadas con la combinación de trastuzumab y lapatinib tienen mayor supervivencia que las tratadas sólo con trastuzumab, sólo con lapatinib o sin ninguno de ellos ($p < 0.001$); y además, cuando las pacientes son Her2-positivo, independientemente del estado en el que estén los RE, la presencia de más de tres MC disminuye la supervivencia total ⁸⁸.

Por otra parte, no hay diferencia en la supervivencia entre pacientes con MC sincrónica y metacrónica, teniendo las pacientes TN un pronóstico desfavorable en ambos grupos, mientras que las que reciben tratamiento local, mejoran su supervivencia en los seis meses posteriores al tratamiento, pudiendo tener un beneficio adicional con tratamiento sistémico ⁸⁹. Finalmente, las pacientes del subtipo Lum/Her2+ que presentan MC aislada tienen, de forma significativa, una mayor supervivencia total ^{30,31}.

Tabla 5. Medianas de supervivencia en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo tumoral

Grupo biológico	Supervivencia total (años)	Supervivencia tras diagnóstico de MC (meses)
Triple - Negativo	2.8	3.7
Her2 +	4.3	9.0
Luminal	5.4	15.0
	(p= 0.025)	(p= 0.015)

Tabla adaptada de Niwinska A et al., 2010. MC: metástasis cerebrales. (n= 205 pacientes).

Tabla 6. Supervivencia mediana (meses) desde el diagnóstico de metástasis cerebral por cáncer de mama en función del tratamiento sistémico recibido tras WBRT

Subtipo molecular	Tratamiento sistémico después de WBRT			p-value
	Ninguno	QT / HT	QT / HT + Trastuzumab	
Triple Negativo	3	4	–	0.21
Her2 "enriched"	4	8	10	0.004
Lum/Her2+	2	8	13	0.0000
Luminal	3	14	–	0.006

Tabla adaptada de Niwinska A et al., 2010. WBRT: Radioterapia holocraneal. QT: Quimioterapia. HT: Hormonoterapia. (n= 205 pacientes).

1.1.5.2. Pronóstico

Para el manejo apropiado de las pacientes con MC de cáncer de mama es necesario una valoración de factores pronósticos independientes, con el fin de mejorar la

función neurológica y la supervivencia, evitando así tratamientos innecesarios. Estos factores estudiados han incluido: KPS, edad, número de MC, tipo histológico, grado histológico, receptores hormonales y control del tumor primario. De todos estos, el índice KPS ha sido, en muchos estudios, el mayor determinante de la supervivencia (Tabla 7), aunque la edad también es un factor pronóstico importante a considerar en cualquier decisión terapéutica que se plantee.

Tabla 7. Escala de valoración de actividad y estado general (KPS: "Karnofsky Performance Status")

Índice de Karnofsky (%)	Grado de actividad y estado general del paciente
100	Actividad normal. Sin molestias ni evidencia de enfermedad.
90	Actividad normal. Con signos o síntomas leves de enfermedad.
80	Actividad normal con esfuerzo. Algunos signos o síntomas de enfermedad.
70	Incapacidad para actividad normal o trabajo activo. Se cuida de sí mismo.
60	Requiere asistencia ocasional. Cuida de la mayoría de sus necesidades.
50	Requiere considerable asistencia y cuidados médicos frecuentes.
40	Incapacitado. Requiere asistencia y cuidados especiales.
30	Severamente incapacitado. Indicada la hospitalización, aunque la muerte no es inminente.
20	Muy enfermo. Hospitalización y tratamiento activo de soporte necesarios.
10	Moribundo. Proceso fatal en progreso rápido.
0	Muerte.

Fuente: Yates JW et al. Cancer, 1980. Schag CC et al. J Clin Oncol, 1984.

INTRODUCCIÓN

En general, para valorar mejor el pronóstico de las pacientes con MC, se han utilizado métodos estadísticos que analizan el significado que diversas variables clínicas tienen en la supervivencia o en el periodo libre de enfermedad cerebral (Tabla 8).

Así, tenemos el método estadístico RPA (“Recursive Partitioning Analysis”), el cual, en función del resultado de las variables que analiza, como son el KPS, la edad, el estado del tumor primario y la presencia de metástasis extracraneales, agrupa a los pacientes en tres clases pronósticas ⁹⁰: clase 1, clase 2 y clase 3 (ver Anexo 10.1.).

Posteriormente, se vió que el número de MC podría tener un valor pronóstico adicional ⁹¹, por lo que se propuso un nuevo sistema de valoración pronóstica, el GPA (“Graded Prognostic Assessment”), que incluía como variables el KPS, la edad, el número de MC y la presencia de metástasis extracraneales ⁹², siendo validado en estudios posteriores ⁹³. Con este sistema se pretendía tener más precisión en la estimación de la supervivencia para elegir el tratamiento potencialmente apropiado y estratificar los ensayos clínicos para pacientes con MC ⁹⁴ (ver Anexo 10.1.).

En el caso del cáncer de mama, el factor pronóstico más relevante del sistema GPA fue el KPS ⁹⁵. No obstante, para precisar más el pronóstico se analizaron, además del KPS y del número de MC, el estado de Her2 y de los receptores hormonales, configurándose así el GPA-específico de mama ⁹⁶ (ver Anexo 10.1.). Con posterioridad, otro índice, el Breast-GPA (“Breast Graded Prognostic Assessment”), cuyos factores pronósticos significativos incluyen el KPS, la edad y el subtipo tumoral o genético, se desarrolló para predecir la supervivencia total de las pacientes de cáncer de mama con MC que recibieron tratamiento local (Tabla 9), confirmando el efecto del subtipo sobre la supervivencia ⁹⁷ y sobre la mejora de la sensibilidad ⁹⁸. Por tanto, el índice Breast-GPA es significativamente más predictivo que el subtipo tumoral sólo en diferenciar pacientes con buen y mal pronóstico, pudiendo afectar en última instancia a la decisión clínica.

Tabla 8. Sistemas de valoración pronóstica utilizados en pacientes con metástasis cerebrales

Sistema de valoración	Variables clínicas evaluadas (factores pronósticos)	Categoría RPA / Puntuación Total en sistema GPA (*)	Supervivencia mediana (meses)		
			Todos los tumores	Carcinoma de mama	
RPA	KPS				
	Edad	1	7.1 ⁽¹⁾	8.1 ⁽²⁾	15.0 ⁽³⁾
	Control tumor primario	2	4.2 ⁽¹⁾	6.1 ⁽²⁾	11.0 ⁽³⁾
	Met. extracraneal	3	2.3 ⁽¹⁾	1.7 ⁽²⁾	3.0 ⁽³⁾
GPA	KPS	0.0 - 1.0	2.6 ⁽⁴⁾	6.1 ⁽⁵⁾	
	Edad	1.5 - 2.5	3.8 ⁽⁴⁾	9.4 ⁽⁵⁾	
	nº. MC	3.0	6.9 ⁽⁴⁾	16.9 ⁽⁵⁾	
	Met. extracraneal	3.5 - 4.0	11.0 ⁽⁴⁾	18.7 ⁽⁵⁾	
GPA-específico ⁽⁶⁾	KPS	0.0 - 1.0		4.2	
	Her2	1.5 - 2.0		10.1	
	RE / RP	2.5 - 3.0		22.9	
	nº. MC	3.5		32.3	

(*) La puntuación total obtenida en los sistemas de valoración GPA es el resultado de la suma de las puntuaciones parciales obtenidas de cada variable clínica analizada. RPA: "Recursive Partitioning Analysis". GPA: "Graded Prognostic Assessment". WBRT: radioterapia holocraneal. SRS: radiocirugía estereotáxica. KPS: Karnofsky Performance Status (Score). MC: metástasis cerebral. RE: receptores de estrógenos. RP: receptores de progesterona. (1): Datos obtenidos de Gaspar L et al., RTOG ("Radiation Therapy Oncology Group"), 1997; pacientes con diversos esquemas de fraccionamiento de WBRT con/sin sobreimpresión y con/sin radiosensibilización farmacológica; los tumores primarios incluyen: pulmón, melanoma, mama y otros. (2): Datos obtenidos de Mahmoud-Ahmed AS et al., 2002. (p=0.0147); pacientes tratadas únicamente con WBRT. (3): Datos obtenidos de Niwinska A et al., 2010. (p=0.0000); pacientes tratadas con WBRT con/sin tratamiento sistémico. (4): Datos obtenidos de Sperduto PW et al., 2008. (p< 0.0001); pacientes con diversos esquemas de fraccionamiento de WBRT con/sin SRS con/sin radiosensibilización farmacológica; los tumores primarios incluyen: pulmón, melanoma, mama y otros. (5): Datos obtenidos de Sperduto PW et al., 2010; pacientes con cáncer de mama (n=642) donde el único factor pronóstico significativo de los cuatro evaluados en el GPA original fue el KPS (p< 0.0001).; pacientes tratadas con WBRT sólo o combinada con cirugía y/o SRS. (6): GPA específico de cáncer de mama. Sperduto PW et al. ASCO Annual Meeting, 2010.(p< 0.0001).

Tabla 9. “Breast-GPA” . Pacientes con cáncer de mama y metástasis cerebral

Factor	Puntuación				
	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0
KPS	≤ 50	60	70 - 80	90 - 100	-
Subtipo genético	Basal	-	Luminal A	Her2	Luminal B
Edad (años)	≥ 60	< 60	-	-	-

La puntuación total obtenida en cada paciente será la suma de las puntuaciones parciales correspondientes a cada factor pronóstico, obteniéndose cuatro categorías pronósticas en función de la puntuación total obtenida: 0.0–1.0; 1.5–2.0; 2.5–3.0 y 3.5–4.0, y siendo la supervivencia mediana de 3.4, 7.7, 15.1 y 25.3 meses, respectivamente ($p < 0.0001$). Tabla adaptada de Sperduto PW et al. 2012.

En un estudio posterior se observó que dentro de los pacientes en general que son tratados de su MC, aquéllos con MC única presentan una mayor supervivencia mediana con respecto a los que tienen MC múltiples ⁹⁹. No obstante, la variable ‘número de MC’, aun siendo una variable de alta relevancia clínica, no se ha incorporado a menudo al modelo final, con lo que Subbiah et al. ¹⁰⁰ incorporó esta variable al Breast-GPA. Por tanto, este “Breast-GPA Modificado” (Tabla 10) incorpora cuatro parámetros clínicos de alta significancia pronóstica: KPS, edad, subtipo tumoral y número de MC.

Tabla 10. “Breast-GPA Modificado”. Pacientes con cáncer de mama y metástasis cerebral

Factor	Puntuación				
	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0
KPS	≤ 50	60	70 - 80	90 - 100	-
Subtipo	TNBC	RH+ / Her2-	RH- / Her2+	RH+ / Her2+	-
Edad (años)	> 50	≤ 50	-	-	-
Nº MC	> 3	1 - 3	-	-	-

La puntuación total obtenida en cada paciente será la suma de las puntuaciones parciales correspondientes a cada factor pronóstico, obteniéndose cuatro categorías pronósticas en función de la puntuación total obtenida: 0.0–1.0; 1.5–2.0; 2.5–3.0 y 3.5–4.0, TNBC: "Triple-negative breast cancer". Tabla adaptada de Subbiah IM et al. 2015.

En el estudio de la supervivencia total, ésta se ha comparado utilizando el índice “Breast-GPA” original y el “Breast-GPA Modificado”, concluyendo que menos del 50% de las pacientes con el mejor pronóstico, es decir, aquéllas con la puntuación total más alta, sobreviven 3 años, y menos del 10% de las pacientes con el peor pronóstico, que presentan la puntuación total más baja, sobrevive 1 año (Tabla 11). En definitiva, el objetivo de estos índices es precisar el pronóstico con el fin de definir mejor la estrategia terapéutica a seguir en cada grupo y de obtener grupos lo más homogéneos posible para diseñar futuros ensayos clínicos.

Tabla 11. Comparación de la supervivencia total entre el “Breast-GPA” original y el “Breast-GPA Modificado”.

Puntuación total	SM total (meses)		ST a 1 año (%)		ST a 2 años (%)		ST a 3 años (%)	
	Breast-GPA original	Breast-GPA modificado	Breast-GPA original	Breast-GPA modificado	Breast-GPA original	Breast-GPA modificado	Breast-GPA original	Breast-GPA modificado
0 - 1.0	3.1	2.6	9.7	4.4	3.5	0.6	1.3	0.0
1.5 - 2.0	6.3	9.2	31.5	39.2	12.2	16.0	7.4	8.8
2.5 - 3.0	15.5	19.9	60.2	72.8	35.0	45.0	19.9	27.5
3.5 - 4.0	26.0	28.8	82.3	84.1	56.9	61.3	38.6	40.9

SM: Supervivencia mediana. ST: Supervivencia total. ($p < 0.001$; CI 95%). Datos obtenidos de Subbiah IM et al., 2015.

Finalmente, si bien hay estudios que sugieren que el pronóstico en las pacientes con MC de cáncer de mama depende del subtipo ^{101,102}, otros sugieren que el pronóstico estaría en función de marcadores tumorales conocidos, como LDH, albúmina, CEA o CA15.3, aunque sin resultados concluyentes ¹⁰³.

1.1.5.3. Calidad de vida

Las pacientes, además de su mal pronóstico, presentan un gran deterioro de su calidad de vida, con síntomas neurológicos y menor autonomía. Por ello, se han utilizado cuestionarios con escalas objetivas de valoración de calidad de vida (QLQ) pre y post-tratamiento (p.e. el EORTC QLQ-BN20 o el FACT-Br ¹⁰⁴, el QLQ-C30 ¹⁰⁵, el BASIQ v1.0 ¹⁰⁶, etc.). Estos cuestionarios se basan, en general, en la valoración

mediante puntuación o escala de la presencia de determinados síntomas neurológicos, de funciones cognitivas y motoras, del estado general y del grado de autonomía personal del paciente.

1.2. BIOLOGÍA DE LA METÁSTASIS CEREBRAL DE CÁNCER DE MAMA

1.2.1. BARRERA HEMATO-ENCEFÁLICA (BHE): ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

La BHE es una estructura vascular especializada que separa los compartimentos vascular y neural (parénquima) del SNC. Está formada por: células endoteliales, membrana basal, pericitos y terminaciones finales de los astrocitos (Figura 1), y para su correcto funcionamiento se requiere de una intensa interacción entre sus componentes ^{107,108}.

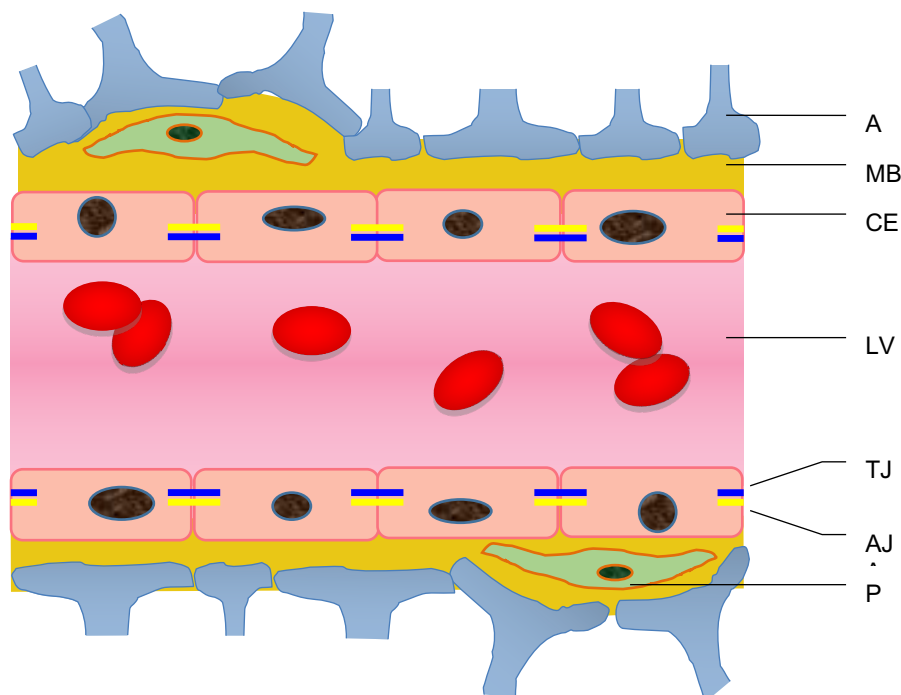


Figura 1. Esquema general de la estructura de la BHE. A: Terminaciones podocitarias de los Astrocitos. MB: Membrana Basal. CE: Célula Endotelial. LV: Luz Vascular. TJ: "Tight Junctions" o uniones estrechas. AJ: "Adherens Junctions" o uniones adherentes. P: Pericitos.

1.2.1.1. Células Endoteliales

Recubren la parte luminal del capilar y forman el endotelio vascular. Este endotelio presenta uniones estrechas intercelulares o “tight junctions” y uniones adherentes o “adherens junctions”, que limitan la difusión intercelular de sustancias metabólicas y otros solutos y están compuestas por diferentes complejos protéicos ^{107,109} (Figura 2).

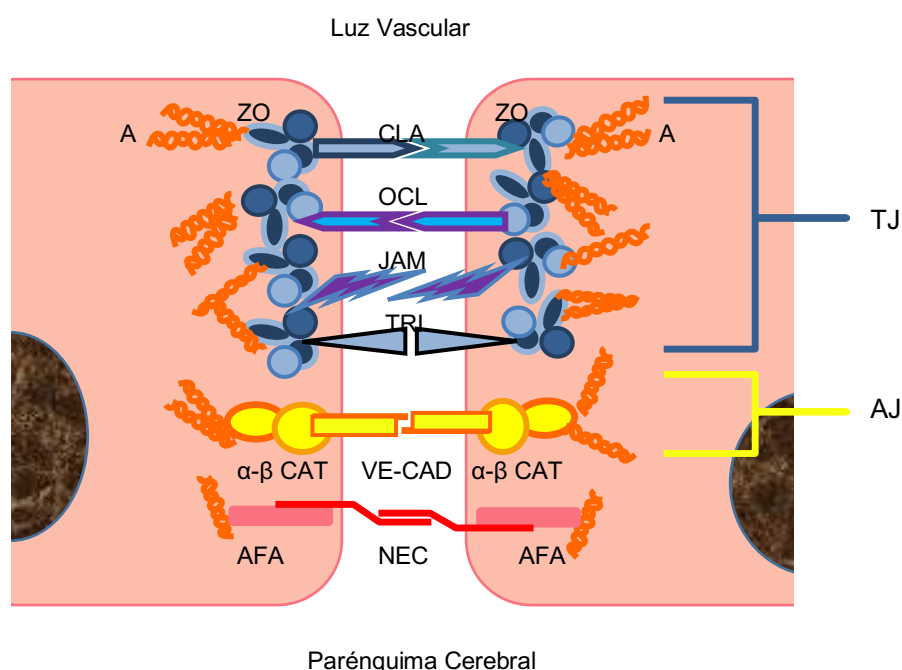


Figura 2. Estructura de las uniones intercelulares en el endotelio de la BHE. TJ: “Tight Junctions”. A: filamentos de Actina. ZO: “Zonula Occludens”. CLA: Claudina. OCL: Ocludina. JAM: “Junctional Adhesion Molecule”. TRI: Tricelulina. AJ: “Adherens Junctions”. α - β CAT: α y β Cateninas. VE-CAD: Cadherina de endotelio vascular. AFA: Afadina. NEC: Nectina. Datos obtenidos de Sá-Pereira I et al. Mol Neurobiol, 2012.

Comparado con las células endoteliales de otros órganos, las de la BHE tienen uniones estrechas más amplias, sistemas de transporte vesicular pinocítico disperso, no presentan fenestraciones, tienen una superficie con carga negativa y unos sistemas de receptores y transporte específico para la incorporación de nutrientes y hormonas necesarias para la función cerebral, como transportadores de glucosa (GLUT-1) y proteínas transportadoras dependientes de ATP, como p.e. la glicoproteína-P (gp-P) y las proteínas asociadas a resistencia a fármacos (MRP) ¹¹⁰. Por otro lado, la BHE no es completamente impermeable a grandes moléculas, siendo el transporte de vesículas por transcitosis mediada por receptor el

INTRODUCCIÓN

mecanismo por el que muchas proteínas la atraviesan (Figura 3). La transcitosis conlleva los siguientes pasos: **1.** Internalización, incorporación de macromoléculas u otros solutos al interior de la célula endotelial (endocitosis). **2.** Transporte de las moléculas en forma de vesículas a través del interior celular y posterior clasificación de las mismas en los endosomas. **3.** Expulsión al polo celular opuesto de las moléculas, ya clasificadas y seleccionadas (exocitosis).

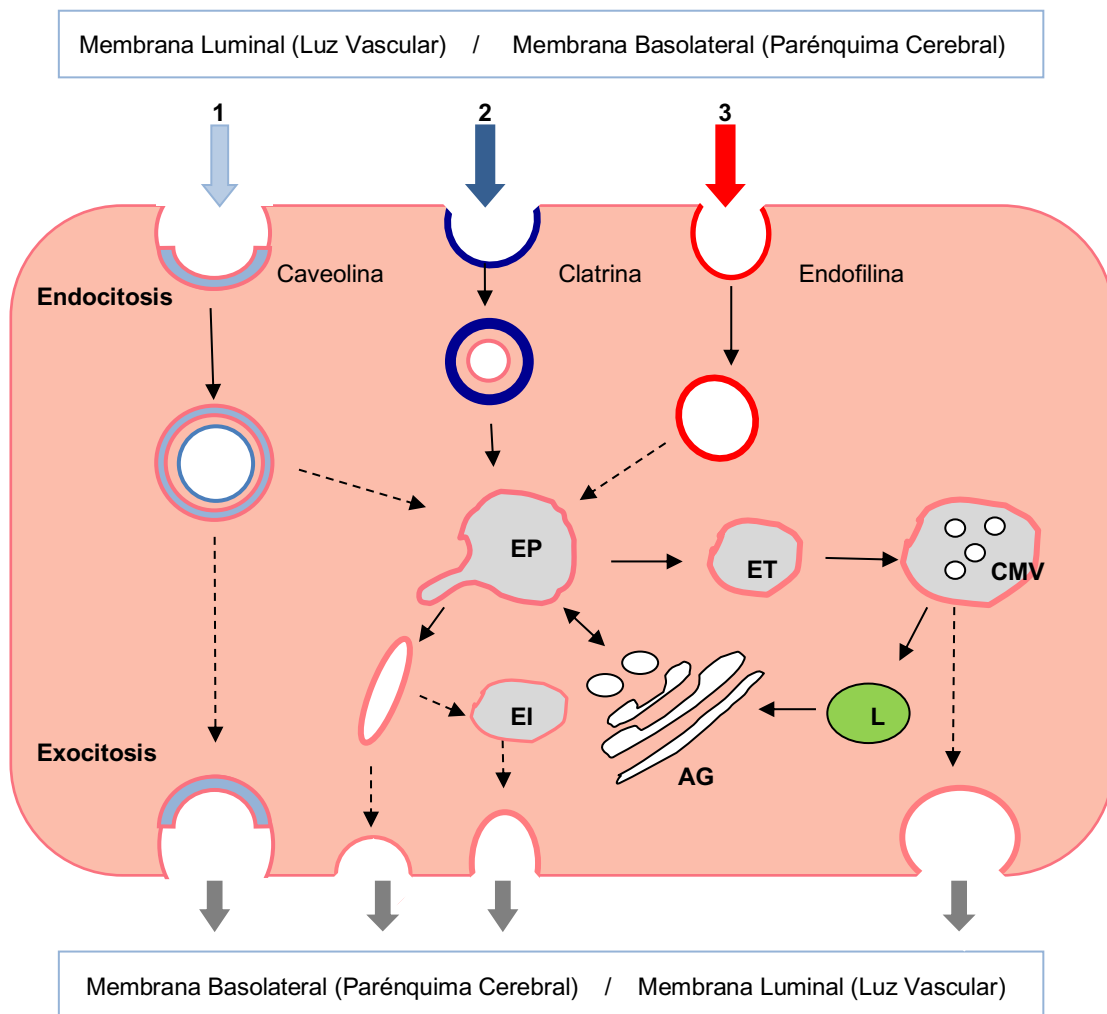


Figura 3. Mecanismos de transcitosis en la célula endotelial de la BHE. Vías de transporte intracelular en las células endoteliales de la BHE. Se admite que estos mecanismos de transcitosis ocurren en ambos sentidos dentro de la célula endotelial: luz vascular - parénquima y parénquima - luz vascular. Las flechas discontinuas muestran vías todavía no comprobadas experimentalmente.

1: Endocitosis dependiente de caveolina. **2:** Endocitosis dependiente de clatrina. **3:** Endocitosis dependiente de endofilina. **EP:** Endosoma Precoz o inicial. **ET:** Endosoma Tardío. **EI:** Endosoma Intermedio. **CMV:** Cuerpos Multi-Vesiculares. **L:** Lisosoma. **AG:** Aparato de Golgi.

Datos obtenidos de: Villaseñor R et al. Cell Mol Life Sci. 2018; y de www.ncbi.nlm.nih.gov/gene, 2019.

Por su parte, tal como se muestra en la Figura 3, en el proceso de internalización o endocitosis se pueden formar diferentes tipos de vesículas: **1.** Vesículas caveolares o caveolas, formadas mediante endocitosis dependiente de caveolina, que es una proteína integral de membrana plasmática que interviene en el transporte de moléculas independiente de receptor. **2.** Vesículas recubiertas, formadas mediante endocitosis dependiente de clatrina, que es una proteína formada por tres cadenas ligeras y tres pesadas que está localizada en la cara citoplasmática de las organelas intracelulares y que interviene en el transporte de macromoléculas, envolviendo la cara citoplasmática de las vesículas. **3.** Vesículas no-recubiertas, formadas mediante endocitosis dependiente de endofilina, que es una proteína con actividad enzimática que interviene en el transporte de ligandos extracelulares, receptores y patógenos.

Las vesículas recubiertas de clatrina se fusionan con los endosomas precoces o iniciales, que son el compartimento intracelular donde se clasifican las moléculas que llegan por endocitosis. Desde aquí, o bien se forman vesículas o túbulos de transcitosis, o bien los endosomas precoces maduran hacia endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares, los cuales se fusionan con los lisosomas para la degradación de la carga molecular que transportan. Esta carga también puede ser enviada desde los lisosomas al aparato de Golgi y a los endosomas precoces (transporte retrógrado), produciéndose la exocitosis cuando las vesículas se fusionan con la membrana plasmática ¹⁰⁸.

1.2.1.2. Membrana Basal

Las células endoteliales y los pericitos están envueltos por una membrana basal, que las separa de las terminaciones de los astrocitos y está constituida por: proteínas estructurales, como colágeno y elastina; proteínas especializadas, como fibronectina y laminina; y proteoglicanos. Su función de anclaje juega un importante papel en la integridad, estabilidad y propiedades de la BHE ¹¹⁰.

1.2.1.3. Pericitos

Los pericitos cubren el 60-70% de la superficie endotelial extraluminal y rodean el

endotelio de los capilares y de las vénulas post-capilares. Están rodeados por un desdoblamiento de la membrana basal, que los separa de las células endoteliales y de los podocitos astrocitarios ¹¹⁰.

Los pericitos regulan la BHE facilitando la formación de las “tight junctions” y reduciendo el transporte de vesículas en las células endoteliales, por lo que su disminución podría conllevar un aumento de la permeabilidad, con extravasación de macromoléculas por aumento del transporte transcelular. Además, la interacción entre las células endoteliales y los pericitos está sostenida por la lámina basal, siendo importante para la regulación, de forma recíproca y por vía paracrina, de la adhesión celular, proliferación y diferenciación ¹⁰⁸.

Por otro lado, hay otros procesos biológicos en los que también intervienen los pericitos ¹¹⁰ : **1.** Intervienen en la angiogénesis, aumentando la producción de VEGF en condiciones de hipoxia e hipoglucemia. **2.** Presentan propiedades contráctiles, ya que poseen algunas características de células musculares lisas, pudiendo contribuir a la regulación del flujo sanguíneo. **3.** Intervienen en la homeostasis vascular, participando en la formación de trombina por la vía extrínseca de la coagulación ante una lesión vascular y disminuyendo el activador tisular del plasminógeno endotelial, produciendo así una acción procoagulante, aunque también han presentado actividad antitrombina, es decir, acción anticoagulante, “in vitro”. **4.** Intervienen en mecanismos inmunológicos, como en la presentación de antígenos a los linfocitos T, producción de citokinas inmunorreguladoras, como el TGF- β e interleukinas (IL-1 β , IL-6) y presentan función fagocítica de pequeñas moléculas solubles provenientes de la luz vascular, fluído intersticial o incluso de células. **5.** Presentan propiedades de células pluripotentes, es decir, capacidad de diferenciarse en otros tipos celulares.

1.2.1.4. Astrocitos

Los astrocitos son esenciales para el correcto funcionamiento neuronal y sus terminaciones finales o podocitos establecen contacto con las dendritas de muchas neuronas y además contribuyen a cubrir diferentes vasos sanguíneos próximos,

pudiendo enviar señales a las células musculares lisas vasculares para regular el flujo sanguíneo cerebral en respuesta a la actividad neuronal local ¹¹⁰. Los astrocitos liberan factores de crecimiento importantes para el buen funcionamiento de la BHE a través del control de la homeostasis cerebral, y sus terminaciones podocitarias, que cubren casi el 100% del endotelio extraluminal y cubren también a los pericitos ¹⁰⁸, contribuyen a restringir la permeabilidad de la BHE ¹⁰⁹.

Una correcta función de la BHE depende del contacto entre los elementos que la forman, como el endotelio, la membrana basal endotelial-astroglial, los pericitos y el lecho de podocitos astrocitarios interconectados, el cual forma una segunda barrera llamada "glia limitans", que es clave en la regulación neurovascular ¹⁰⁷. Además, la formación de "tight junctions" en la "glia limitans" es un proceso astroglial inducido en respuesta a inflamación y limita la infiltración de células inflamatorias como los leucocitos en el SNC ¹¹¹.

1.2.2. PROGRESIÓN METASTÁSICA

Las células de carcinoma de mama necesitan superar diferentes etapas desde el tumor primario hasta llegar a colonizar y crecer en el órgano diana ^{112,113}. Este proceso sólo lo completan unas pocas células y se puede llegar a interrumpir por un mecanismo de apoptosis en cualquier momento ^{114,115}, por lo que las alteraciones asociadas a la inhibición de apoptosis favorecerán la progresión metastásica ¹¹⁶. En el tejido de origen, las células cancerosas participan en una serie de procesos o fases antes de llegar al torrente circulatorio; estos procesos son la selección clonal, la evasión inmune, proliferación, neoangiogénesis y la transición epitelial-mesenquimal (EMT) ^{107,109}.

El proceso de EMT es aquel mediante el cual las células malignas epiteliales van perdiendo el fenotipo epitelial, que es proliferativo y no-invasivo, y van adquiriendo un fenotipo mesenquimal, caracterizado por ser no-proliferativo e invasivo, por lo que estas células sobreviven al fenómeno apoptótico de "anoikis" ¹¹⁷. Posteriormente, estas células cancerosas que adquieren el fenotipo mesenquimal migran y realizan la intravasación o migración transendotelial, bien penetrando entre las uniones de

las células endoteliales, proceso conocido como migración paracelular, o bien penetrando dentro de las propias células endoteliales y atravesándolas desde su polo abluminal hasta su polo luminal, proceso denominado migración transcelular. En la intravasación la mayoría de mecanismos que aumentan la permeabilidad endotelial son provocados por células inmunes y estromales, y cuando las células cancerosas logran entrar en la luz vascular y pasan a ser células tumorales circulantes (CTCs) la mayoría sufrirán apoptosis, y sólo una minoría con alto potencial metastásico y adaptación a estas condiciones sobrevivirá. Tanto el proceso de intravasación como el de extravasación en el órgano diana requieren la adhesión de las células cancerosas al endotelio vascular y la disrupción transitoria de las uniones intercelulares endoteliales, por lo que estos dos procesos pueden considerarse pasos limitantes del proceso metastásico, ya que sólo un número reducido de células malignas consigue superarlos ¹⁰⁹.

Por otro lado, según la teoría patogénica de la metástasis "Self-seeding", las CTCs pueden moverse de forma multidireccional, implantándose no sólo en lugares distantes sino también en sus tumores de origen ^{118,119}, por lo que un tumor no sólo crecería por sí mismo sino también por autoimplante, es decir, por el retorno de células tumorales circulantes que originalmente salieron de él y fueron a la circulación ¹²⁰. Las células que migren, logren sobrevivir en el torrente circulatorio y consigan extravasarse en el órgano diana podrán formar la metástasis. Incluso a partir de esta metástasis, podrían volver a reintroducirse en el torrente circulatorio e invadir otras localizaciones, formándose la metástasis secundaria ("metástasis de la metástasis") ¹¹⁵. La variabilidad y heterogeneidad celular se encuentran dentro de la metástasis y entre diferentes metástasis ¹²¹.

1.2.2.1. Formación del nicho pre-metastásico en el SNC

La teoría patogénica de la metástasis "Seed and Soil" asume que el éxito en el crecimiento de las células metastásicas depende de propiedades e interacciones entre las células tumorales seleccionadas ("seeds") y su microambiente en los órganos diana potenciales ("soil") ^{122,123}. Para la formación de la metástasis es necesario que el tumor primario produzca determinados factores que, al ser

liberados, promuevan en el órgano diana la formación de un microentorno celular adecuado que facilite la implantación de las células metastásicas ^{124,125}. Este nuevo microentorno es conocido como nicho pre-metastásico (Figura 4).

Un aspecto esencial en todo proceso oncogénico y metastásico es, por tanto, la comunicación entre las poblaciones celulares implicadas. A este respecto, adquieren especial importancia dos componentes celulares: los exosomas y los microRNAs (miR).

Los exosomas son pequeñas vesículas de 30-100 nm rodeadas de membrana que son secretados al espacio extracelular por muchos tipos de células, como p.e. las células cancerosas y gliales, pudiendo contener diferentes proteínas y material genético como miR ^{126,127}. El intercambio celular de proteínas y material genético a través de los exosomas es un medio potencialmente eficaz para la comunicación intercelular y para la supervivencia del tumor y la metástasis ¹²⁷. Así, los exosomas tumorales transportan moléculas como p.e. TGF- β , HIF1 α y β -catenina, que favorecerán el proceso de EMT y, por tanto, la migración e invasividad en las células receptoras ¹²⁸.

Por su parte, los miR son pequeños fragmentos de RNA no-codificante que interactúan con regiones no-traducidas de los mRNAs codificadores de proteínas, produciendo desestabilización del mRNA y/o inhibición de la traducción. Intervienen en la migración celular, en la rotura de las uniones estrechas endoteliales, en la angiogénesis, en la remodelación de la MEC y en la regulación de la expresión génica de las células receptoras, por lo que la desregulación en su producción está asociada a oncogénesis. Además, podemos encontrarlos en el medio extracelular, unidos a proteínas, a lípidos o como componentes principales de los exosomas, se pueden detectar tanto en el tumor primario como en la circulación en estadio precoz o pre-metastásico y pueden actuar como ligandos en las células inmunes, contribuyendo a la preparación del nicho ¹²⁶.

INTRODUCCIÓN

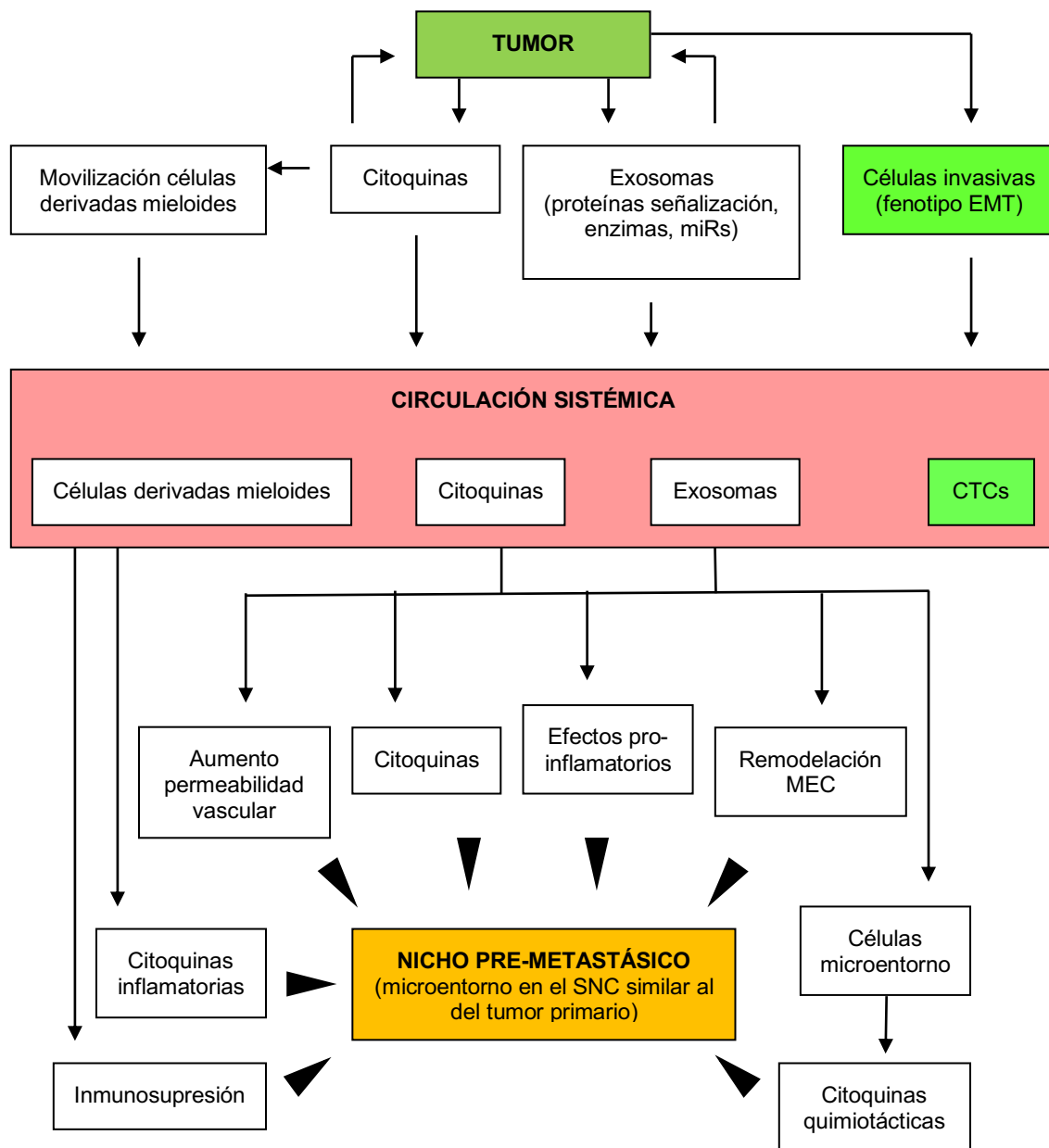


Figura 4. Proceso de formación del nicho pre-metastásico. Diagrama con datos obtenidos de: Zhou W et al. *Cancer Cell*, 2014; Syn N et al. *Trends Pharmacol Sci*, 2016; Camacho L et al. *PLoS One*, 2013; Custodio-Santos T et al. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2017; Celià-Terrassa T et al. *Nat Cell Biol*, 2018.

Además, la movilización y reclutamiento hacia el SNC de células inmunes-inflamatorias, así como las células y citoquinas del propio SNC aportarían también condiciones óptimas para el desarrollo y crecimiento de las células metastásicas^{109,129,130}. En el parénquima cerebral las células mieloides derivadas de médula ósea se acumularían y expresarían altas cantidades de quimioquinas inflamatorias, atrayendo a más células mieloides y a CTCs¹⁰⁹. La mayoría de las

citoquinas quimiotácticas interactuarían con múltiples receptores ^{131,132} y los componentes de la MEC y las metaloproteinasas (MMP) contribuirían al establecimiento y mantenimiento del nicho pre-metastásico ¹³³ (Figura 4).

Por otro lado, cuando las CTCs de cáncer de mama que han sido viables en el torrente circulatorio llegan, de forma aislada o formando agregados, a los pequeños capilares cerebrales, se inician los siguientes pasos: **1º** interacción de las CTCs con el endotelio de la BHE y, **2º** migración transendotelial o extravasación.

1.2.2.2. Interacción de las CTCs con el endotelio de la BHE

Las CTCs de cáncer de mama que han sobrevivido y llegan a los capilares vasculares de la BHE interactúan molecularmente con las células endoteliales, produciéndose dos procesos antes de iniciar la migración transendotelial o extravasación: **1º**. Rodadura de las células malignas por la superficie luminal de las células endoteliales. **2º**. Adhesión de las células malignas a la membrana de las células endoteliales ¹⁰⁹ (Figura 5).

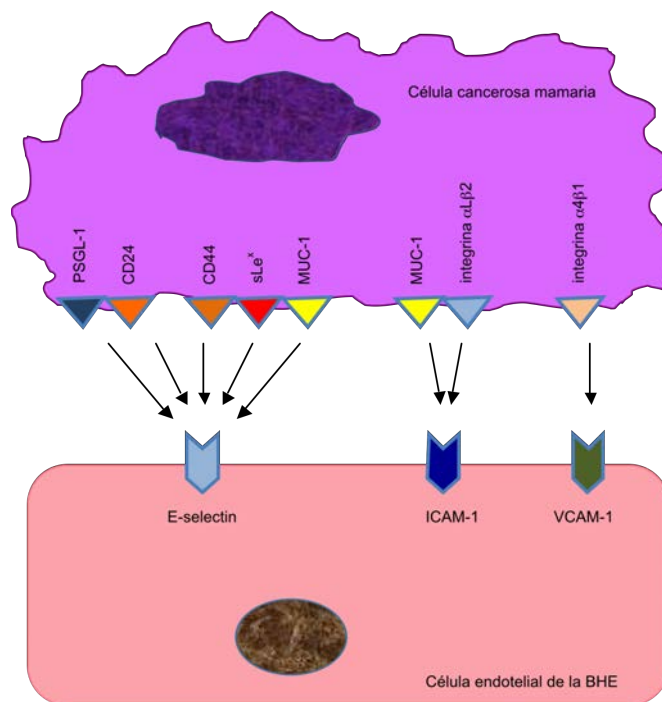


Figura 5. Interacción de las CTCs con las células endoteliales de la BHE. PSGL-1: Platelet selecting glycoprotein ligand-1; sLe^x: Sialyl-Lewis X; MUC-1: Mucin-1; ICAM-1: Intercelular adhesion molecule-1; VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule-1. Datos obtenidos de Custódio-Santos T et al., Biochim Biophys Acta Rev Cancer. 2017.

En estos procesos están implicadas proteínas de membrana, como E-selectina y sus ligandos (PSGL-1, sLeX, Mucin-1, CD24 y CD44), moléculas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1) e integrinas (Figura 5).

1.2.2.3. Migración transendotelial: proceso de extravasación

El proceso de extravasación hacia el parénquima cerebral está mediado por proteasas y moléculas de adhesión, y sólo una fracción de las CTCs lo realizan con éxito ¹⁰⁷.

Tanto las células metastásicas como las endoteliales pueden expresar y secretar moléculas que favorecen la migración transendotelial paracelular. Así, por un lado, las células metastásicas que logran adherirse a las células endoteliales inducen el reordenamiento de sus uniones intercelulares y provocan la disrupción de sus complejos protéicos mediante la producción y secreción de determinadas moléculas: **1.** Cathepsina-S, enzima proteolítico que actúa sobre la unión JAM-B. **2.** Ácido 12S-hidroieicosatetraenoico (12S-HETE), que promueve la retracción de las células endoteliales. **3.** miR-105, que rompe las uniones estrechas intercelulares endoteliales. **4.** Metaloproteinasas de la MEC (MMP-1, 2 y 9), que producen disrupción de los complejos protéicos de las uniones intercelulares y degradación de la membrana basal de la BHE. **5.** TGF β 1, que favorece la transición endotelial-mesenquimal, en la que se produce pérdida de marcadores endoteliales y de conexiones intercelulares, facilitando la migración transendotelial. **6.** Disrupción del complejo E-cadherin/catenin de las uniones adherentes. No obstante, el grado de afectación de la BHE depende del grado de agresividad de las células de cáncer de mama, ya que las células del subtipo TN, de comportamiento más agresivo, tienen la capacidad de producir disrupción en la misma, mientras que las células Her2-positivo tienen la habilidad de migrar a través de las células endoteliales conservando las características de esta BHE. Y por otro lado, las células endoteliales sobreexpresan VEGF y angiopoyetina-2, que favorece la disrupción de las uniones intercelulares y el aumento de la permeabilidad, y presentan disminución del marcador vascular CD105, que favorece también la transición endotelial-mesenquimal, la cual sucede tanto en la extravasación como en la

intravasación^{109,126,134}. Por otro lado, las propiedades de las células metastásicas también están muy relacionadas con la expresión en su membrana de receptores de quimioquinas, como p.e. el CXCR4, receptor que se activa cuando interacciona con su ligando soluble del entorno, la quimioquina CXCL12, que es sintetizada por las células endoteliales, siendo esta interacción CXCR4/CXCL12 la que activa la vía de señalización PI3K/Akt, la cual es necesaria para el proceso de migración^{135,136}, ya que el ligando CXCL12 produce aumento de la permeabilidad y estimula la quimiotaxis de las células cancerosas que expresan CXCR4^{109,137}.

Finalmente, cuando las células metastásicas completan la extravasación, su capacidad para interactuar de forma recíproca con el nuevo microentorno en el SNC puede determinar su destino o futuro¹³⁸.

1.2.2.4. Destinos biológicos de la célula metastásica en el SNC

Las células de cáncer de mama que logran atravesar la BHE pueden seguir diferentes caminos (Figura 6): **1.** Apoptosis. **2.** Interacción con el microentorno (nicho pre-metastásico) y formación del nicho metastásico.

1.2.2.4.1. Apoptosis

Este proceso podría producirse de las siguientes maneras: **1.** Que las señales que provengan de la MEC no activen las vías de señalización de supervivencia celular, como p.e. las vías PI3K-AKT, MAPK y NF- κ B, no permitiéndose la implantación de las células cancerosas en el nicho. **2.** Que las células metastásicas no expresen la molécula de adhesión celular L1 (L1CAM) y no produzcan serpinas, por lo que no se inhibe la formación de plasmina y se produce la forma soluble de Fas-L (sFas-L) por parte de los astrocitos. **3.** Que los astrocitos no activen la vía de señalización de NF- κ B en las células cancerosas. **4.** Que no se produzca transferencia de miR-19a desde los exosomas astrocitarios a las células metastásicas, con lo que no se disminuye la expresión del gen supresor tumoral PTEN, se disminuye la señalización de NF- κ B y la secreción de la quimioquina CCL2, no produciéndose el reclutamiento

INTRODUCCIÓN

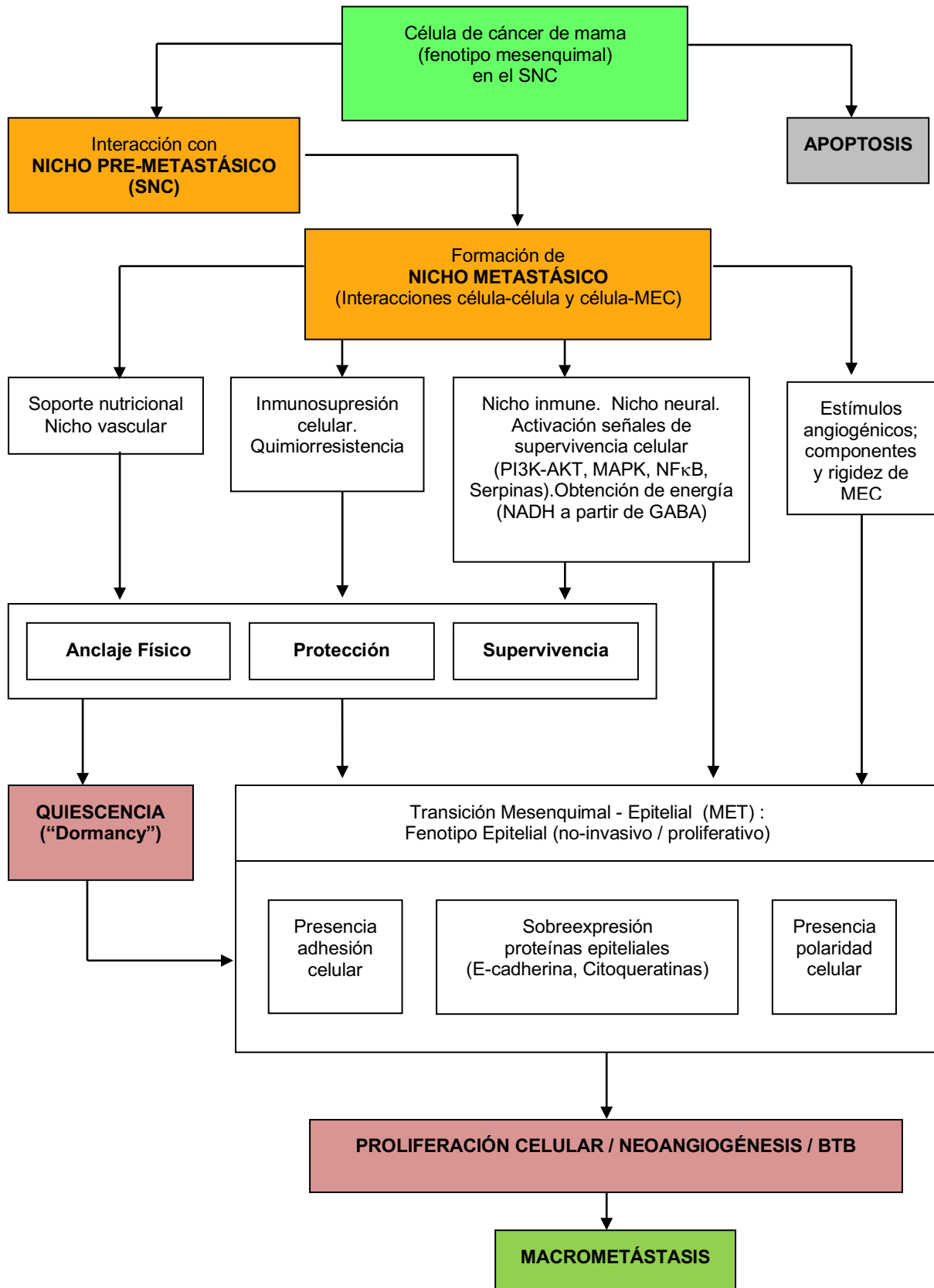


Figura 6. Destinos biológicos de las células metastásicas en el SNC. BTB: Barrera Hemato-Tumoral. Diagrama con datos obtenidos de Custódio-Santos T et al. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2017; Celià-Terrassa T et al. *Nat Cell Biol*, 2018.

de células mieloides que estimulen la proliferación de las células metastásicas ¹²⁵.

1.2.2.4.2. Interacción con el microentorno (nicho pre-metastásico) y formación del nicho metastásico

La interacción de las células cancerosas con el nuevo microentorno o nicho pre-metastásico formará el nicho metastásico.

Hay una gran variedad de interacciones, identificándose cuatro funciones comunes en los nichos metastásicos: **1.** favorecer el anclaje físico de la célula metastásica, gracias en parte al soporte nutricional; **2.** proteger la célula metastásica frente al sistema inmune y otros agentes; **3.** favorecer la supervivencia celular, gracias a la activación de señales de supervivencia y obtención de energía y, en última instancia, **4.** favorecer la proliferación de la célula metastásica ¹²⁵.

En general, la capacidad de implantación es necesaria pero no suficiente para crear colonias en los tejidos diana ¹³⁹. Así, una vez conformado el nicho metastásico, las señales que provienen de las células del parénquima cerebral o de la MEC pueden facilitar la proliferación de las células metastásicas, dando lugar a la formación de la macrometástasis, o bien facilitar su entrada en un estado silente, como es la fase G0 del ciclo celular, durante décadas en estos "foci", estado denominado de quiescencia ("Dormancy") ^{133,140,141}.

1.2.2.5. Interacción de la célula metastásica con células del SNC

La MC suele desarrollarse años después del diagnóstico del tumor primario, ya que las células cancerosas deben interactuar y adaptarse al microentorno del SNC, adquiriendo un fenotipo que les permita obtener energía y sobrevivir ^{130,142} (Figura 7).

El SNC posee un microentorno único, formado por neuronas, astrocitos, microglía, oligodendrocitos y pericitos, formando la unión neuro-vascular, así como también un alto contenido en ácido hialurónico, el cual es el ligando de la proteína de superficie

CD44 presente en las células metastásicas, lo que podría facilitar la colonización y crecimiento de la MC ^{18,143}.

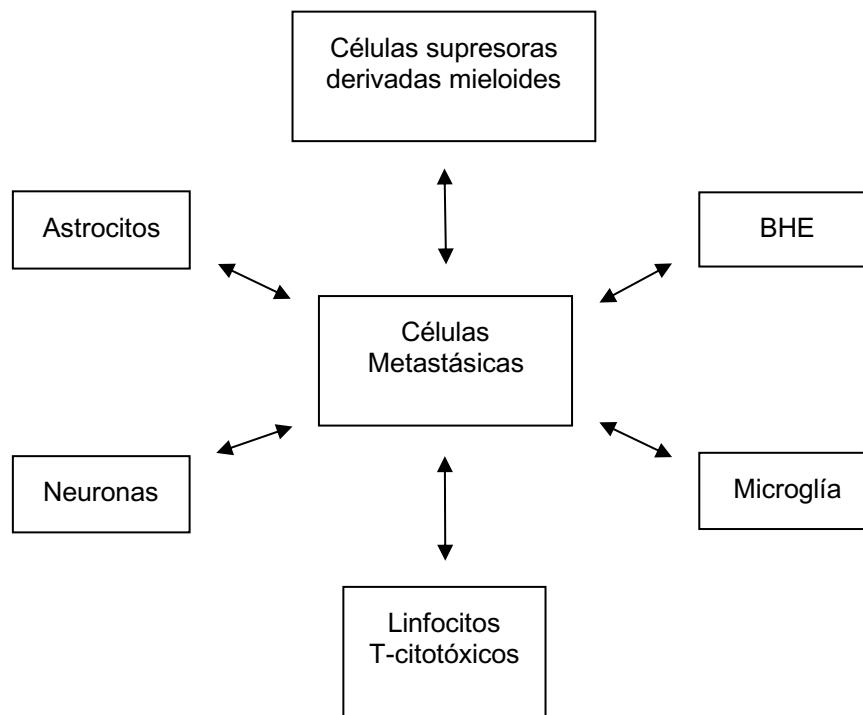


Figura 7. Interacciones de la célula metastásica en el parénquima del SNC. Diagrama basado en datos obtenidos de Hoshida R et al., Clin Exp Metastasis, 2017.

Dos tipos de células adquieren una especial importancia en su interacción con las células metastásicas: **1.** los astrocitos y **2.** las células microgliales.

1.2.2.5.1. Interacción con los Astrocitos

Las células cancerosas que llegan al parénquima cerebral pueden producir una reacción astrocitaria en las fases iniciales, actuando los astrocitos reactivos como primera línea de defensa ⁷¹ y como un protector frente a fármacos citotóxicos ¹⁴⁴. Estos astrocitos reactivos secretan una variedad de moléculas que actúan sobre las células metastásicas (Tabla 12). Los astrocitos reactivos, al secretar estas moléculas, limitan la progresión metastásica durante las primeras fases de la

colonización, pero una vez instaurada la MC actúan promoviendo el crecimiento y la autorrenovación de las células cancerosas ^{145,146}.

Tabla 12. Moléculas secretadas por los astrocitos reactivos asociados a metástasis cerebral de cáncer de mama

Moléculas	Función*	Fenotipo en las células metastásicas
END1	Tumorigénesis.	Crecimiento celular (activación MAPK y Akt).
HGF	Tumorigénesis. Angiogénesis.	Inducción de citoquinas proangiogénicas.
BDNF	Crecimiento nervioso y supervivencia neuronal.	Crecimiento celular (vía activación NTRK2 y Her2).
CCL7	Quimiotaxis de macrófagos. Sustrato de MMP2 (degradación de MEC).	Inducción del potencial tumorigénico.
MMP2 / MMP9	Degradación de componentes de la MEC (colágeno IV y V).	Aumento de capacidad invasiva.
miR-19a	Regulación post-transcripcional de la expresión génica.	Crecimiento celular. Disminución de expresión de PTEN (gen supresor tumoral).
IFN α / TNF α	Citoquinas inflamatorias.	Crecimiento celular y quimiorresistencia (vía Stat-1 y NF κ B).
tPA / uPA	Activadores del plasminógeno para formar plasmina (proteasa).	Eliminación celular (apoptosis).
sFas-L	Activación de Fas (vía apoptótica).	Eliminación celular (apoptosis).

Datos adoptados de Wasilewski D et al. Front Oncol, 2017. (*) Fuente: www.ncbi.nlm.nih.gov/gene (año 2019). **END1**: Endotelin-1; **HGF**: hepatocyte growth factor; **BDNF**: brain derived neurotrophic factor; **CCL7**: C-C motif chemokine ligand 7; **MMP2**: matrix metalloproteinase 2; **MMP9**: matrix metalloproteinase 9; **miR-19a**: microRNA-19a; **IFN α** : Interferon α ; **TNF α** : tumor necrosis factor α ; **tPA/uPA**: activadores del plasminógeno; **sFas-L**: Fas-L soluble; **NTRK2**: neurotrophic receptor tyrosine kinase 2; **PTEN**: Phosphatase and tensin homolog (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa); **MEC**: matriz extracelular.

Los astrocitos reactivos presentan alteraciones en su fenotipo, como son: **1.** la sobreexpresión de una proteína de los filamentos intermedios, la proteína glial fibrilar (GFAP), siendo ésta una característica diferencial del microentorno metastásico^{145,147}; **2.** la secreción de citoquinas y proteasas; y **3.** la secreción de exosomas con miR-19a, que induce la disminución o pérdida de la expresión de la

proteína supresora de tumor PTEN en la célula metastásica, aumentando su agresividad ⁷¹.

Por otra parte, los astrocitos reactivos activarían la formación de plasmina y de sFas-L, lo que produciría una reducción por apoptosis en el número de células iniciadoras de metástasis; en cambio, la formación de plasmina se inhibiría si las células metastásicas expresaran moléculas de adhesión (p.e. L1CAM) y serpinas, por lo que la interacción inicial de las células metastásicas con los vasos depende de que éstas expresen moléculas de adhesión, como L1CAM y β 1-integrina ^{71,148}, en cuyo caso estas células sobrevivirían en el nicho perivascular, interactuando con los vasos ya existentes a través del mecanismo de “vascular co-option”, que implica el acoplamiento de estas células cancerosas alrededor de los pequeños vasos, obteniendo así un aporte de nutrientes y oxígeno suficientes para sobrevivir sin necesidad de activar mecanismos de angiogénesis, mientras que aquellas células que fracasasen en el proceso de “vascular co-option” morirían a pesar de haber sido capaces de atravesar la BHE ^{148,149}. Por tanto, el nicho perivascular se convertiría, pues, en un punto crítico para la supervivencia de las células cancerosas, ya que la mayoría no son capaces de resistir la reacción neuroinflamatoria provocada por los astrocitos y la microglía ¹⁰⁷. Además, los astrocitos expresan también RE en grado variable y cuando son expuestos a la acción de los estrógenos "in vitro" producen un incremento en los ligandos del EGFR, activándose este receptor en las células malignas y aumentando la proliferación, migración e invasividad de las células TN que metastatizan en SNC ¹⁵⁰.

Por otro lado, las células malignas supervivientes expresan también protocadherin-7, que promueve la unión de estas células con los astrocitos reactivos mediante “GAP-junctions”. Esto favorece el paso de mediadores como el Ca^{2+} y la guanosina-adenosina monofosfato cíclico (cGAMP) a los astrocitos, activando sus vías de señalización para la secreción de TNF- α e IFN- α , que inducirán a su vez la proliferación de las células cancerosas ⁷¹. Además, en un entorno hipóxico, las células metastásicas sobreexpresan y secretan el factor 1α -inducible por hipoxia (HIF- 1α), el cual puede producir: **1.** activación de la transcripción de genes implicados en el metabolismo energético, angiogénesis y apoptosis, y **2.** liberación

de neuregulina-1 (NRG-1) al entorno por parte de astrocitos, microglía y neuronas¹⁴³, la cual actuaría como ligando de los receptores Her3¹⁵¹. La interacción entre el dímero Her3-Her2 y NRG1 induciría migración transendotelial¹⁵².

1.2.2.5.2. Interacción con la Microglía

La microglía, compuesta por células macrofágicas del SNC, regula la respuesta inflamatoria, sintetizando citoquinas pro-inflamatorias que afectan la permeabilidad de la BHE¹⁰⁸. Su morfología puede ser ramificada, cuando se encuentra en situación de reposo y vigilancia, o fagocítica, cuando se encuentra en situación de activación¹¹⁰. Su interacción con las células de cáncer de mama conlleva el aumento de expresión del receptor-4 de quimioquina (CXCR4), del factor-A de crecimiento plaquetario (PDGF-A), del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y de otras citoquinas, regulando la proliferación, angiogénesis y respuesta inmune. Las células de microglía son atraídas y migran hacia la zona donde se localizan las células metastásicas, situándose en su zona de infiltración. La microglía contacta estrechamente con las células metastásicas, favoreciendo la colonización e invasión y actuando como transportadoras de las células malignas a través del parénquima cerebral¹⁵³. Además, las células cancerosas expresan neurotrofina-3 (NTF-3), que disminuye la citotoxicidad microglial¹⁵⁴.

1.2.2.6. Relación de las células metastásicas con los neurotransmisores

Los astrocitos también intervienen en la síntesis de determinados neurotransmisores, como la serotonina, y en el equilibrio homeostático del metabolismo de la glutamina, facilitando este metabolito a las neuronas para la síntesis de glutamato y GABA¹⁵⁵.

1.2.2.6.1. Serotonina (5-hidroxitriptamina)

La serotonina (5-hidroxitriptamina ó 5-HT) es una amina biológica que se distribuye ampliamente por diferentes órganos y que en el SNC actúa como neurotransmisor, siendo sintetizada a partir del aminoácido triptófano. Sobre el triptófano actúa el

enzima triptófano-hidroxilasa (TPH), formándose 5-hidroxitriptófano y sobre el cual actuaría el enzima descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos, formándose así la 5-hidroxitriptamina o serotonina ^{156,157}.

Las células de carcinoma de mama TN muestran, con respecto a la 5-HT, un efecto autocrino, ya que estas células expresan más triptófano-hidroxilasa 1 (TPH-1) que las que tienen receptores hormonales y presentan receptores HTR7 de 5-HT, los cuales, al ser estimulados activarían la vía de señalización PI3K/Akt, produciendo un aumento en su proliferación y capacidad invasiva ^{158,159}.

Además, la 5-HT también promueve la angiogénesis por un mecanismo parecido al del VEGF ¹⁵⁹. También se ha observado que, por un lado, la triptófano-hidroxilasa 2 (TPH-2) está muy expresada en los astrocitos, aumentando la producción de 5-HT y favoreciendo también la proliferación "in vivo" de las células Her2-positivo en el SNC; y por otro, que existe una relación entre el receptor serotoninérgico HTR2A y el CXCR4, sugiriendo la hipótesis de que la 5-HT liberada por los astrocitos reactivos podría también interactuar con las células de cáncer de mama metastásicas que expresan CXCR4 ¹³⁷.

1.2.2.6.2. GABA (Ácido γ -aminobutírico)

La glutamina es el precursor en la síntesis de dos neurotransmisores importantes en el SNC: el glutamato, neurotransmisor estimulador, y el GABA, neurotransmisor inhibidor (Figura 8).

Los astrocitos, que expresan de forma exclusiva la enzima glutamina-sintetasa, sintetizan la glutamina a partir del glutamato, por lo que proveen de glutamina a las neuronas glutamato-érgicas para que sinteticen glutamato, y a las neuronas GABA-érgicas para que sinteticen GABA ¹⁵⁵.

INTRODUCCIÓN

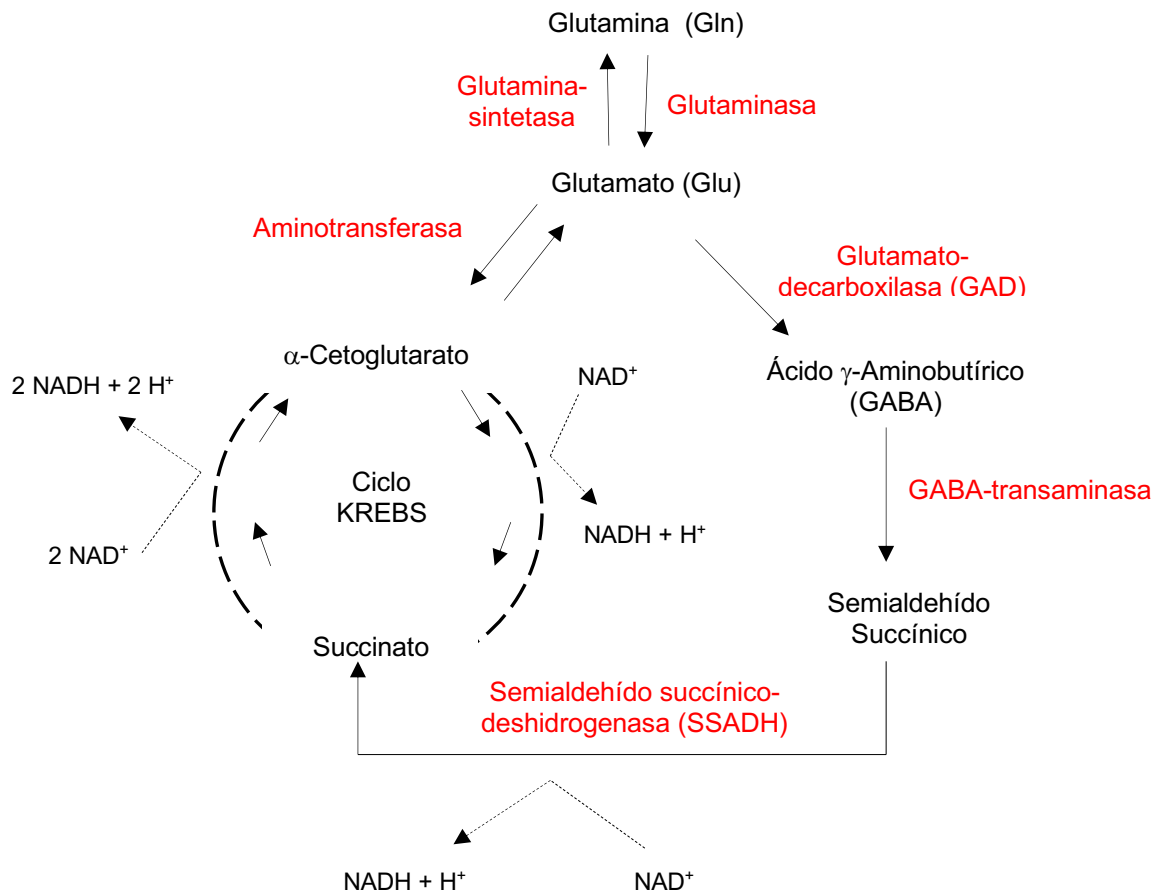


Figura 8. Vías metabólicas en la síntesis de glutamato y GABA. Datos adoptados de Schousboe A, et al. (2013), Mehler AH (Bioquímica. Cap 12. TM Devlin, tomo I, 1988) y Olson MS (Bioquímica. Cap 6. TM Devlin, tomo I, 1988).

Las células de cáncer de mama que formarán la MC sobreexpresan un fenotipo GABA-érgico, metabolizando este neurotransmisor para obtener energía. En las células de la MC este fenotipo GABA-érgico se expresaría en diferentes niveles moleculares: **1. Receptores. 2. Proteínas transportadoras. 3. Vías metabólicas y enzimas. 4. Proteínas específicas de interneuronas GABA-érgicas** ¹⁴².

1. Receptores GABA-érgicos. El GABA induce aumento de la proliferación celular en células Her2-positivo y TN, y aunque los receptores de GABA están significativamente aumentados con respecto a sus tumores primarios, la proliferación no parece estar mediada por estos receptores, aunque la alteración de los mismos podría afectar su capacidad migratoria e invasiva. Así, la estimulación de los

receptores produce el paso de Ca^{2+} a través de la membrana celular, produciendo una cascada de señalización intracelular con activación de proteínas-quinasas ¹⁶⁰.

2. Proteínas transportadoras de GABA. Incorporan el GABA desde el microentorno al interior de la célula metastásica. Estas proteínas son: “Vesicular GABA transporter” (VGAT), “GABA transporter 1-3” (GAT1-3) y “GABA-betaine transporter” (BGT), pudiendo sobreexpresarlas las células Her2-positivo y TN que metastatizan en SNC.

3. Vías Metabólicas y Enzimas. Las células metastásicas y las neuronas GABA-érgicas expresan glutamato-decarboxilasa 67 (GAD67), que convierte el glutamato en GABA. Las células metastásicas Her2-positivo y TN, los astrocitos y las neuronas expresan GABA-transaminasa (ABAT), que facilitará el paso de GABA a succinato, con formación de NADH como fuente de energía. Por tanto, a partir del glutamato se obtendría energía a través de la formación del NADH, tanto por la vía de catabolismo del GABA como por la vía oxidativa del ciclo de Krebs ^{155,157,161} (Figura 8).

4. Proteínas Específicas de Interneuronas GABA-érgicas: parvalbúmina y reelina. La parvalbúmina, proteína de unión al Ca^{2+} moduladora de la plasticidad sináptica en neuronas GABA-érgicas, está sobreexpresada en las células metastásicas Her2-positivo y TN con respecto a su tumor primario. Por otro lado, la reelina, glicoproteína de secreción de la MEC, está implicada en la arquitectura celular cerebral y en la capacidad migratoria de las células tumorales.

Existe una relación de co-localización espacial, es decir, de asociación molecular, entre la reelina y el Her2, por lo que la reelina está sobreexpresada en las células Her2-positivo.

Los carcinomas de mama TN podrían tener hasta un 30% de células con tinción de membrana para Her2, aunque estuvieran catalogados como Her2-negativo, por lo que dentro del subtipo TN esta presencia de Her2 se asocia con la expresión de reelina.

1.2.2.7. Quiescencia celular (“Dormancy”)

En el proceso de quiescencia las células metastásicas entran en fase G0 del ciclo celular, con disminución del factor nuclear de proliferación Ki67, estando este proceso ligado a la capacidad de adaptación e interacción de las células metastásicas con el microambiente del órgano diana, pudiendo reanudar el ciclo celular en caso de presentarse un microentorno favorable para su crecimiento ^{140,162}.

En este fenómeno de quiescencia adquieren importancia la composición y remodelación de la MEC y el reordenamiento del citoesqueleto celular ¹⁶³, así como las vías de señalización que intervienen en la estimulación o inhibición de la proliferación celular, la alteración de las vías metabólicas y los mecanismos de reparación del DNA e inestabilidad genómica (Figura 9). En este sentido, tenemos que las vías de señalización PI3K-AKT, ERK y Wnt presentan disminución de su actividad y la vía p38-MAPK presenta actividad aumentada, lo que conlleva al final a la disminución de la producción de ciclinas, con aumento de p53, p21 y p27 e inhibición del complejo de ciclina CDK4, lo que desemboca en una disminución de la capacidad proliferativa y en una parada del ciclo celular ¹⁴⁰.

Las células quiescentes se localizan, de forma solitaria o en pequeños grupos, en situación perivascular, estableciendo “GAP-junctions” con la cara abluminal de las células endoteliales, con lo que de esta manera obtienen oxígeno y nutrientes para sobrevivir indefinidamente. En este nicho perivascular, además de las interacciones célula metastásica-endotelio, las interacciones entre pericitos-endotelio también favorecerían la supervivencia celular y la quiescencia ¹⁰⁷.

Por otro lado, cuando las células metastásicas entran en fase G1 y completan el ciclo celular formarán la micrometástasis. Los factores que influyen en la estabilización o estancamiento del crecimiento de la micrometástasis resultan del equilibrio entre los mecanismos de proliferación y los de muerte celular. Entre estos últimos, destacan las señales que disminuyen el aporte vascular o angiogénesis, como la disminución de VEGF y el aumento del inhibidor angiogénico

trombospondina-1 (TSP-1), además de la presencia de células inmunológicas que intervienen en la inmunovigilancia, como CD4, CD8 y NK ¹⁴⁰ (Figura 9).

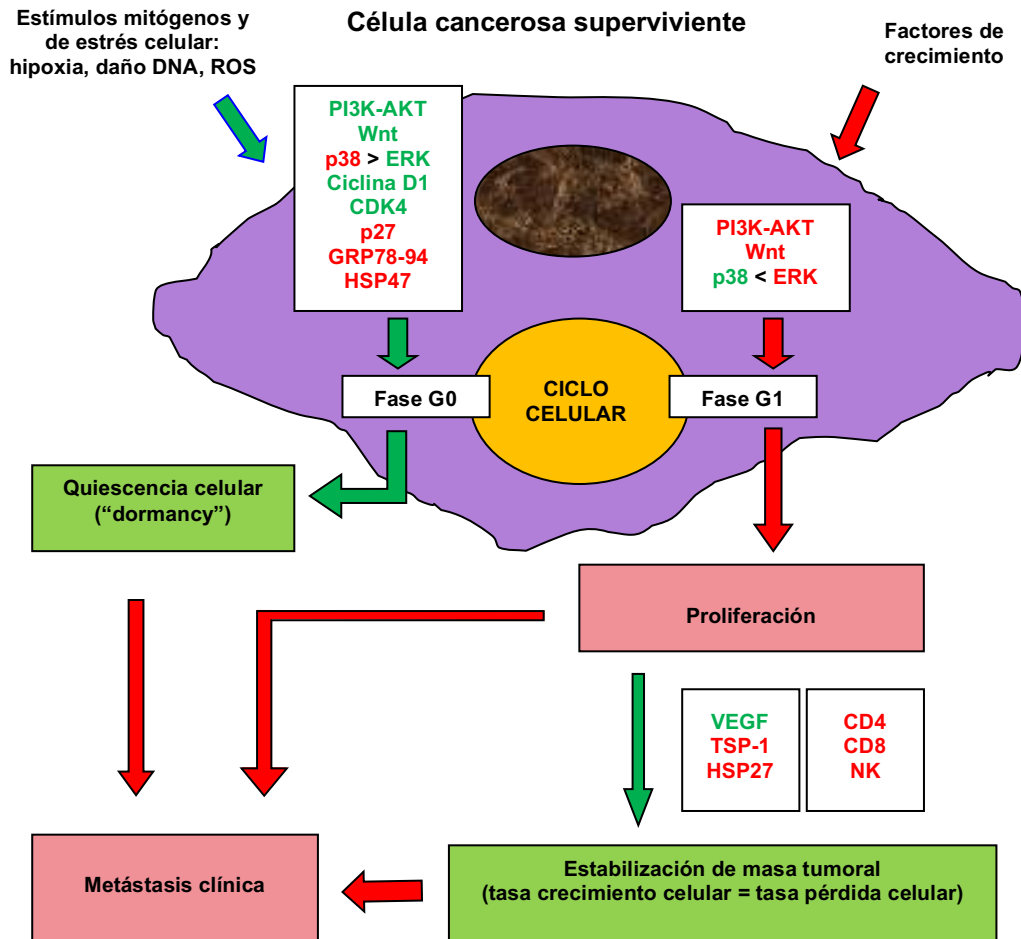


Figura 9. Mecanismos generales que influyen en el estado de quiescencia y proliferación de las células cancerosas . Texto en color verde: moléculas / vías señalización en estado de baja expresión / inactivación. Texto en color rojo: moléculas / vías señalización en estado de mayor expresión / activación. Datos adoptados de Yadav AS et al. Front Oncol, 2018.

1.2.2.8. Formación de la metástasis cerebral

En el nicho perivascular y con los estímulos adecuados la célula metastásica puede adaptarse al nuevo microentorno a través de: **1.** La adquisición de un fenotipo epitelial, completando la transición mesenquimal-epitelial (MET). **2.** Reactivando la proliferación celular y la neoangiogénesis. **3.** Contribuyendo en la formación de una

Barrera Hemato-Tumoral (“Blood-Tumor Barrier” o BTB). Todo ello dará como resultado la formación de la macrometástasis.

1.2.2.8.1. Transición Mesenquimal - Epitelial (MET)

El nicho metastásico modularía la transición del fenotipo mesenquimal (EMT) al fenotipo epitelial (MET) de las células con habilidad metastásica a cerebro ¹²⁵. En el proceso de MET participaría el adenosina-monofosfato cíclico (cAMP) intracelular como segundo mensajero, regulando múltiples efectores en la cascada de señalización, como p.e. la proteína-quinasa A (PKA). El cAMP y la PKA determinan el equilibrio “epitelial versus mesenquimal” de las células epiteliales, siendo el aumento del cAMP intracelular el que mantiene el fenotipo epitelial ¹⁶⁴. La sobreexpresión de la proteína-quinasa nuclear pro-proliferativa VRK1 disminuye los marcadores y el fenotipo mesenquimal e incrementa los marcadores epiteliales, promoviendo la MET¹⁶⁵. La neurotrofina-3 (NTF-3), secretada por las células cancerosas y que produce disminución de la capacidad migratoria, las conexinas, que son proteínas de las “GAP-junctions”, y la pérdida de expresión del factor de transcripción BNC1 también contribuirían a este proceso de MET ^{109,166}.

1.2.2.8.2. Proliferación Celular y Neoangiogénesis

En la activación de la proliferación de las células metastásicas están implicados:

- 1.** La interacción con la MEC.
- 2.** La reorganización de las proteínas del citoesqueleto.
- 3.** La participación de las integrinas, como la integrina $\beta 1$, que interaccionan con las células endoteliales ¹⁶³.
- 4.** Los cambios genéticos y epigenéticos en las células metastásicas.
- 5.** La activación de la angiogénesis ¹⁴¹.
- 6.** La infraexpresión de antígenos asociados a tumor y evasión inmune ¹³⁸.

Las células de carcinoma de mama interaccionan en la MEC con la glicoproteína laminina de la membrana basal a través de su receptor de superficie celular (67LR), participando no sólo en la migración, adhesión e invasión, sino también en la proliferación celular y angiogénesis, produciendo un desequilibrio entre las vías de

señalización apoptóticas y las vías que promueven el crecimiento, la migración y la invasión ¹⁶⁷⁻¹⁶⁹.

Por su parte, la neovascularización crea un microentorno que favorece la reactivación metastásica a través de factores de crecimiento secretados por el endotelio y proteínas de la MEC ¹⁴⁰. En el inicio de la micrometástasis cerebral, la contribución de los mecanismos de angiogénesis y “vascular co-option” dependerá del número de células y del aporte vascular local. Así, cuando la metástasis alcance un tamaño macroscópico se estimulará la angiogénesis por aumento de VEGF-A y angiopoyetina-2 por parte de las células cancerosas. Las células pueden proliferar a nivel perivascular e intravascular, provocando disrupción de la BHE y pequeñas lesiones similares a infartos trombóticos en el parénquima cerebral ¹⁷⁰.

Además, las células cancerosas pueden ser capaces de formar redes tubulares similares a las vasculares pero sin endotelio, proceso denominado 'mimetismo vasculogénico', que es independiente de angiogénesis, aportando un suplemento sanguíneo para el crecimiento. Estas redes estarían compuestas por membrana basal y células cancerosas con diferenciación “endotelial-like”, existiendo uniones entre estas estructuras y los vasos propiamente dichos, por lo que se formaría una interfase vascular-extravascular. Las células de cáncer de mama más agresivas expresan Serpina-2 y secretan la proteína inhibidora de las proteasas de serina (SLPI), que serían las responsables del mimetismo vasculogénico ^{171,172}.

1.2.2.8.3. Formación de la Barrera Hemato-Tumoral (BTB)

El tamaño de las moléculas solubles, su carga eléctrica y su grado de liposolubilidad influyen en su capacidad para atravesar la BHE desde el torrente sanguíneo. En condiciones normales, moléculas de masa superior a 400 Da no suelen ser capaces de pasar por difusión pasiva a través de las uniones intercelulares de las células endoteliales. No obstante, cuando se desarrolla la MC el tejido normal de la BHE va adquiriendo unas diferencias fisiológicas que conllevarán a un aumento en su permeabilidad, transformándose entonces la BHE en BTB. Además, dentro de una misma MC, la integridad vascular y el grado de permeabilidad de la BTB son muy

heterogéneos ¹⁷³, por lo que una parte de esta MC seguiría teniendo la barrera intacta, y en consecuencia, el paso de moléculas a su través seguiría siendo muy reducido ^{107,174}.

Los factores que pueden influir en el grado de permeabilidad de la barrera en la MC serían: **1.** El tamaño de la MC, siendo aquellas de tamaño inferior a 0.25 mm las que presentan una barrera intacta, sin disrupciones ¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. **2.** El grado de necrosis, más evidente en su parte central que en su parte periférica invasiva, aunque tampoco sería suficiente como para permitir una difusión eficiente de fármacos ¹⁴⁷. **3.** La activación de la vía TNF-TNFR1 y la presencia de angiopoyetina-2, que provocaría el aumento del tamaño de las fenestraciones capilares y la disrupción de las uniones estrechas intercelulares del endotelio, respectivamente ¹⁷³. **4.** El fenotipo de los pericitos ¹⁷³.

También, a nivel experimental sobre modelos de MC de cáncer de mama, podemos ver alteraciones en los componentes que conformarían la BTB: **1.** Respuesta neuroinflamatoria en el parénquima circundante. **2.** Alteraciones en los podocitos de los astrocitos. **3.** Alteraciones en las células endoteliales. **4.** Alteraciones en los componentes de la membrana basal del parénquima. **5.** Alteraciones en las subpoblaciones de pericitos ¹⁴⁷ (Tabla 13).

1. Respuesta neuroinflamatoria. Esta respuesta, con presencia de astrocitos reactivos y de células microgliales activadas, parece ser fundamental en la constitución de la BTB. Así, los astrocitos reactivos sobreexpresarían GFAP y las células microgliales activadas sobreexpresarían la molécula CD11b o ITGAM, que es la subunidad α -M de integrina y que interviene en la adherencia de células fagocitarias al endotelio, y la molécula CD45, que es una proteína reguladora de la señalización en los linfocitos T y B. Todas estas proteínas estarían sobreexpresadas en las MC de los subtipos Her2-positivo y TN, aunque no se correlacionarían con el grado de permeabilidad de las metástasis.

Tabla 13. Alteraciones observadas en la BTB con respecto a la BHE y su relación con la permeabilidad

	BTB	Alteración de permeabilidad
Respuesta neuroinflamatoria	sí	
Astrocitos reactivos		
GFAP	↑	no
Microglía reactiva		
CD11b	↑	no
CD45	↑	no
Astrocitos		
Podocitos	↓	no
AQP4	↓	no
Células endoteliales		
Dilatación vascular	sí	no
CD31	↑	no
ZO-1	↓	no
VEGF	↑	no
Membrana basal		
Colágeno IV	↑	no
Laminina-α2	↓	↑
Pericitos		
PDGFR-β	↓	no
Subpoblación Desmina +	↑	↑
Subpoblación CD13 +	↓	↑

Hallazgos observados en la BTB de la MC comparados con la BHE del tejido cerebral normal. Flecha roja: parámetros aumentados / sobreexpresados. Flecha verde: parámetros disminuídos / infraexpresados. Datos obtenidos de Lyle LT et al., 2016.

2. Alteraciones en los podocitos astrocitarios. Los astrocitos pueden alterar la capacidad de difusión de la BHE ¹⁷³. Las terminaciones finales podocitarias de los

astrocitos asociados a la BTB se encuentran disminuídas, al igual que la proteína acuaporina (AQP4), que funciona como canal selectivo de agua en las membranas plasmáticas y es importante en la homeostasis hídrica en el SNC. En las MC la AQP4 no parece estar uniformemente localizada en las terminaciones podocitarias de los astrocitos que rodean los vasos, aunque no se relacionaría con diferencias significativas en la permeabilidad de la BTB.

3. Alteraciones en las células endoteliales. El endotelio de los capilares intactos expresa la molécula CD31 o PECAM1 (“Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule-1”), que está implicada en la migración de leucocitos, angiogénesis y activación de integrinas. En la BTB de las MC los capilares son más extensos y menos densos, presentando su endotelio sobreexpresión tanto de CD31 como de VEGF y disminución de la proteína “zonula occludens” (ZO-1), aunque estos hallazgos no se correlacionarían con el grado de permeabilidad.

4. Alteraciones en la membrana basal del parénquima. El colágeno IV, que forma parte de la membrana basal de células endoteliales y astrocitos, podría estar aumentado en la BTB de algunas MC, aunque sin relacionarse con el grado de permeabilidad de la barrera. En cambio, la laminina- α 2, que es una proteína de la membrana basal producida por los astrocitos que controla o previene la diferenciación de los pericitos a un estado contráctil, aparece disminuída en la BTB, lo que sí se correlaciona con un aumento de su permeabilidad.

5. Alteraciones en las subpoblaciones de pericitos. Los pericitos, que expresan el receptor β del factor de crecimiento plaquetario (PDGFR- β), están disminuídos en la BTB. Dentro de los pericitos, hay dos subpoblaciones que también expresan otros marcadores, como la desmina, proteína estructural de los filamentos intermedios tipo III, y el CD13, aminopeptidasa de membrana implicada en el metabolismo de péptidos reguladores. En las MC Her2-positivo y TN los pericitos desmina-positivo estarían aumentados y los CD13-positivo estarían disminuídos, relacionándose ambos hallazgos con un aumento en la permeabilidad de su BTB.

En definitiva, la BTB presenta cambios en muchos de sus componentes celulares, que, en general, no suponen modificaciones significativas en la permeabilidad. No obstante, las alteraciones fenotípicas encontradas en las subpoblaciones de pericitos, así como la disminución de la laminina- α 2 en la membrana basal, sí parecen estar asociados con una mayor permeabilidad de la BTB.

1.2.3. ALTERACIONES GENÉTICAS Y EPIGENÉTICAS ASOCIADAS A LA METÁSTASIS CEREBRAL DE CÁNCER DE MAMA

La capacidad de metastatizar en el SNC está “codificada” genética o epigenéticamente en el tumor primario e influenciada por factores ambientales ¹⁰⁷.
















1.2.3.1. Alteraciones genéticas

Las alteraciones genéticas encontradas frecuentemente en el cáncer primario de mama suelen también ser detectadas en las MC, aunque determinadas vías de señalización no presentan el mismo grado de alteración que en el tumor primario ¹⁰⁷. La expresión genética puede verse afectada por: **1.** Alteraciones en la regulación. **2.** Mutaciones genéticas. **3.** Alteraciones cromosómicas.

1. La alteración en el grado de expresión génica, ya sea por sobreexpresión o por infraexpresión, aparece en muchos genes que están implicados en diversos procesos celulares: proliferación, diferenciación, adhesión celular, migración^{143,148,151,177-182} y quimiotaxis ^{136,137}, supresión tumoral y reparación del DNA ^{183,184}, regulación de la transcripción ^{107,185}, traducción y vías de transducción de señal como las vías AKT y MAPK ¹⁴³, mecanismos antioxidantes ¹⁸⁶, de inflamación, resistencia a apoptosis, evasión inmune o angiogénesis ^{18,187-189}, procesos metabólicos como gluconeogénesis ¹⁹⁰, remodelación de la MEC ¹⁹¹ o interacción con membrana basal ¹⁶⁹ y los que intervienen en la reversión al estado epitelial ¹⁵⁴, permiten la interacción con astrocitos ¹⁹² o están implicados en la inducción de un fenotipo GABA-érgico ¹⁴² (Tabla 14).

INTRODUCCIÓN

Tabla 14. Características moleculares asociadas a las metástasis cerebrales de cáncer de mama.

Gen / Proteína	Función/es	Estado de Expresión	Referencia
ABAT	Catabolismo del GABA.		Neman J et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2014
ATAD2	Proliferación celular inducida por estrógenos. Chaperona.		Salhia B et al., PloSOne. 2014
ATM	Control del ciclo celular y estabilidad genómica.		Salhia B et al., PloSOne. 2014
AURKB	Intervención en la mitosis asociándose con microtúbulos.		Salhia B et al., PloSOne. 2014
BARD1	Interacción con BRCA1		Woditschka S et al., J Natl Cancer Inst. 2014
BGT	Transporte de GABA.		Neman J et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2014
BNC1 **	Regulación de la proliferación y del rRNA.		Pangeni RP et al., Clin Epigenetics. 2015
BRAF	Regulación de la vía MAPK/ERK, afectando a la división y diferenciación celulares.		Salhia B et al., PloSOne. 2014
BRCA1 *	Mantenimiento de estabilidad genómica y supresión tumoral. Reparación del DNA.		McMullin RP et al., Breast Cancer Res. 2014
CADM1 **	Adhesión celular. Citotoxicidad mediada por células NK y CD8+.		Wikman H et al., Oncotarget. 2014
CAT	Antioxidante.		Kim HM et al., Int J Clin Exp Pathol. 2014
CCDC8 **	Apoptosis mediada por p53.		Pangeni RP et al., Clin Epigenetics. 2015
CD44	Interacción célula-célula, adhesión celular y migración. Crecimiento tumoral y progresión.		Da Silva L et al., Breast Cancer Res. 2010
COX-2	Inflamación, proliferación, adhesión celular, motilidad, resistencia a apoptosis y angiogénesis.		Bos PD et al., Nature. 2009 Lin NU et al., Clin Cancer Res. 2013
CRYAB	Actividad "chaperone-like". Arquitectura intracelular.		Salhia B et al., PloSOne. 2014

INTRODUCCIÓN

Tabla 14. (continuación)

Gen / Proteína	Función/es	Estado de Expresión	Referencia
CTNNB1	Regulación del crecimiento celular y adhesión. Anclaje del citoesqueleto de actina.	↑	Bollig-Fisher A et al., Oncotarget. 2015
CXCR4	Receptor de quimioquina. Quimiotaxis y migración celular.	↑	Sato R et al., Biomed Res Int. 2017 Cabioglu N et al., Ann Oncol. 2009
DERL1	Respuesta de degradación de proteínas con alteraciones en su plegamiento.	↑	Salhia B et al., PloSOne. 2014
EDN3 ***	Péptido vasoactivo derivado del endotelio.	↓	Salhia B et al., PloSOne. 2014
EGFR	Proliferación celular.	↑	Da Silva L et al., Breast Cancer Res. 2010
FGFR1	Proliferación y diferenciación celulares.	↑	Bollig-Fisher A et al., Oncotarget. 2015
FBP1	Gluconeogénesis.	↑	Chen J et al., Cancer Res. 2015
FOXM1	Proliferación celular y reparación del DNA.	↑	Salhia B et al., PloSOne. 2014
GABAAR	Receptor de GABA.	↑	Neman J et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2014
GAD67	Síntesis de GABA.	↑	Neman J et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2014
GALNT9 **	Glicosilación de proteínas.	↓	Pangeni RP et al., Clin Epigenetics. 2015
GAT1-3	Transportadores de GABA.	↑	Neman J et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2014
GNAS	Estimulación de vías de transducción de señal intracelular (cAMP).	↑	Bollig-Fisher A et al., Oncotarget. 2015
HBEGF	Proliferación celular.	↑	Bos PD et al., Nature. 2009
HER2	Proliferación celular.	↑	Da Silva L et al., Breast Cancer Res. 2010

INTRODUCCIÓN

Tabla 14. (continuación)

Gen / Proteína	Función/es	Estado de Expresión	Referencia
HER3	Proliferación y diferenciación celulares.		Da Silva L et al., Breast Cancer Res. 2010
HER4	Proliferación y diferenciación celulares.		Da Silva L et al., Breast Cancer Res. 2010
HPSE	Remodelación de matriz extracelular.		Zhang L et al., Cancer Res. 2011
HSPB2	Metabolismo celular dependiente de mitocondria.		Salhia B et al., PloSOne. 2014
ITGAM ***	Adherencia de leucocitos al endotelio y fagocitosis.		Salhia B et al., PloSOne. 2014
KRT8 ****	Integridad estructural celular y diferenciación.		Salhia B et al., PloSOne. 2014
L1CAM	Adhesión, migración, proliferación y diferenciación.		Schröder C et al., Oncol Rep. 2009 Valiente M et al., Cell. 2014
MIAT	Proliferación.		Sato R et al., Biomed Res Int. 2017
NEK2A	Regulación mitótica y división celular.		Salhia B et al., PloSOne. 2014
NRG1	Proliferación y diferenciación.		Saunus JM et al., J Pathol. 2015
NTF-3	Proliferación. Facilita reversión al estado epitelial (MET).		Louie E et al., Oncogene. 2013
NTRK1	Diferenciación celular.		Bollig-Fisher A et al., Oncotarget. 2015
PCDH7	Ensamblaje de astrocitos con células metastásicas a través de "gap-junctions".		Chen Q et al., Nature. 2016
PENK ***	Apoptosis y respuesta a estrés (?)		Salhia B et al., PloSOne. 2014
PIK3CA	Proliferación, supervivencia y motilidad.		Bollig-Fisher A et al., Oncotarget. 2015

INTRODUCCIÓN

Tabla 14. (continuación)

Gen / Proteína	Función/es	Estado de Expresión	Referencia
PLLP	Transporte iónico en membranas.		Sato R et al., Biomed Res Int. 2017
PTEN	Regulación negativa de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR. Supresor tumoral.		Wikman H et al., Breast Cancer Res. 2012
PVALB	Regulación del calcio del citosol.		Neman J et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2014
RAD51	Reparación del DNA.		Woditschka S et al., J Natl Cancer Inst. 2014
RELN	Regulación de migración.		Neman J et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2014
RPSA/67LR	Adhesión, migración, angiogénesis, proliferación.		Martín B et al., J Proteome Res. 2008
SERPIN-B2	Inhibición de activación del plasminógeno. Inhibición de apoptosis.		Valiente M et al., Cell. 2014
SERPIN-I1	Inhibición de activación del plasminógeno. Inhibición de apoptosis.		Valiente M et al., Cell. 2014
SLC7A11	Transporte de aminoácidos.		Sato R et al., Biomed Res Int. 2017
SLC8A2	Homeostasis celular del calcio.		Sato R et al., Biomed Res Int. 2017
SOX11	Regulación de transcripción.		Saunus JM et al., Int J Mol Sci. 2017
SOX2	Regulación de transcripción. Mantenimiento de células madre en el SNC.		Bollig-Fisher A et al., Oncotarget. 2015
STAT3	Activación de transcripción. Progresión del ciclo celular. Proliferación celular.		Lee HT et al., Oncotarget. 2015
ST6GALNAC5	Modulación de la interacción célula-célula.		Bos PD et al., Nature. 2009 Lin NU et al., Clin Cancer Res. 2013
TMEM65	Respiración mitocondrial. Regulación de comunicación de "gap-junctions" (?).		Saunus JM et al., Int J Mol Sci. 2017

Tabla 14. (continuación)

Gen / Proteína	Función/es	Estado de Expresión	Referencia
TNFSF4	Interacción entre células inmunes.	↑	Sato R et al., Biomed Res Int. 2017
TUBB3	Formación de microtúbulos.	↑	Kanojia D et al., Mol Cancer Ther. 2015
TxNIP	Acumulación de ROS.	↑	Kim HM et al., Int J Clin Exp Pathol. 2014
VCAM1	Adhesión celular entre endotelio y leucocitos.	↑	Sato R et al., Biomed Res Int. 2017
VEGF	Angiogénesis. Aumento de permeabilidad vascular. Inhibición de apoptosis.	↑	Kim LS et al., Clin Exp Metastasis. 2004
VGAT	Transporte del GABA.	↑	Neman J et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2014

Flecha verde: inactivación / infraexpresión. Flecha roja: amplificación / sobreexpresión. (*) "Deficient-like" (no mutación). (**) Metilación. (***) Hipermetilación. (****) Hipometilación. MC: Metástasis Cerebral. La valoración de la expresión de estos genes se realizó sobre muestras de MC de carcinoma de mama humana, comparando o no con sus respectivos tumores primarios, o bien sobre líneas celulares de carcinoma de mama o de MC humanas. Las funciones relacionadas con las diferentes proteínas y genes han sido obtenidas en las siguientes fuentes: GeneCards® Human Gene Database. Copyright © 1996-2019; Weizmann Institute of Science. <https://www.genecards.org/>; National Center for Biotechnology Information (NCBI). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>.

2. Las mutaciones genéticas se han detectado en proteínas implicadas en la reparación del DNA ¹⁹³, en genes de la familia RAS y EGFR ¹⁴³ y en proteínas o genes supresores de tumor, como p.e. PTEN ¹⁹⁴.

3. Se han observado alteraciones cromosómicas, como ganancias en 1q, 5p, 8q, 11q y 20q, y deleciones en 8p, 17p, 21p y Xq que facilitarían la progresión ¹⁷⁸.

1.2.3.2. Alteraciones epigenéticas

Las alteraciones en el material genético que modifican la expresión génica pero sin producir cambios en la secuencia de codificación del DNA se denominan epigenéticas, pudiendo influir en ellas factores ambientales y son heredables. En las

MC de cáncer de mama pueden producirse por: **1.** Alteraciones en el grado de metilación del DNA. **2.** Alteraciones en el grado de expresión de microRNAs (miR).

1. La metilación e hipermetilación del DNA implican silenciación del gen; en cambio, la hipometilación provocaría un aumento en su expresión. El grado de metilación del DNA está generalmente incrementado, con lo que habría silenciación de genes que intervienen en la regulación de la proliferación y de la glicosilación protéica, en la adhesión celular y en la apoptosis ^{166,178}, así como en la citotoxicidad mediada por inmunidad celular ¹⁹⁵. Esto facilitaría la supervivencia, proliferación y evasión inmune de las células cancerosas.

2. Por lo que se refiere a la expresión de microRNA (miR), se ha observado un aumento de miR-20b en la MC ¹⁹⁶ y de miR-10b en el tumor primario de pacientes que desarrollan MC ¹⁹⁷, aumentando ambos la capacidad invasiva celular "in vitro". El miR-181c, secretado por las células metastásicas, produciría ruptura de la BHE, lo que promovería la formación de la MC "in vivo" ¹⁹⁸. Por otra parte, la disminución de miR-7 en células "in vitro" se asocia a un aumento de la capacidad metastásica cerebral ¹⁹⁹; la disminución de miR-1258 se relaciona con la sobreexpresión de la heparanasa, enzima que excinde el heparán-sulfato en la MEC formando fragmentos con actividad tumorigénica, proangiogénica y prometastásica, y con la presencia de MC ¹⁹¹; y la disminución de miR-509 se relaciona "in vivo" con el aumento de la capacidad invasiva celular y de la permeabilidad de la BHE, favoreciendo la formación de la MC ²⁰⁰.

1.3. ANTECEDENTES DEL GRUPO EN EL ESTUDIO DE LA METÁSTASIS CEREBRAL DEL CÁNCER DE MAMA

La patogénesis de la metástasis cerebral del cáncer de mama ha sido una línea de investigación prioritaria utilizando varios modelos celulares y modelos experimentales "in vivo". Se utilizaron técnicas proteómicas, transcriptómicas y bioinformáticas para estudiar en un modelo experimental de cáncer de mama el fenotipo de las células que "in vivo" metastatizaban en cerebro, con el fin de definir

perfiles de expresión génica que ocasionaran la organoespecificidad de la metástasis.

Mediante electroforesis bidimensional se analizó la expresión diferencial entre las células de adenocarcinoma TN de mama humana MDA-MB-435 y su variante metastásica en cerebro 435-Br1. El análisis de MALDI-TOF proporcionó la identidad de 19 proteínas, la mayoría estructurales, chaperonas, proteínas de estrés, reguladoras del estado redox y del transporte intracelular. Con el programa bioinformático PIANA se analizó cómo estas proteínas se conectaban entre sí formando redes de interacción, deduciéndose funciones celulares que luego se validaron experimentalmente. Las GRPs, entre ellas la GRP94, aparecieron en nodos con funciones de regulación metabólica y de estrés. Posteriormente, se validó la expresión en tejidos de MC humanas emparejadas con el tumor primario mediante IHQ, encontrándose un paralelismo en la expresión citoplasmática de las parejas de muestras de un mismo paciente, tanto en células metastásicas como en los astrocitos reactivos, y de forma similar a las células de los tumores primarios¹⁶⁹.

El análisis transcriptómico se realizó en 23 muestras de metástasis de cáncer de mama: metástasis pulmonares, hepáticas, cutáneas, óseas y cerebrales. Al compararlas entre sí permitió identificar 1193 genes, que constituían el perfil organoespecífico de los tumores que metastatizan a cerebro. El análisis proteómico previo del modelo experimental se utilizó para nutrir con datos experimentales las redes de interacción predichas a través de la herramienta bioinformática PPIN, obteniéndose fenotipos tumorales que podrían favorecer la aparición de MC en aquellos cánceres de mama que los sobreexpresaran. Posteriormente se validó, en una serie de pacientes, que la sobreexpresión en el tumor primario de las proteínas GRP94, proteína de 94 kDa regulada por glucosa, y FN14, proteína de membrana miembro de la familia del TNFR, se asociaba de forma significativa con la progresión metastásica a cerebro, permitiendo discriminar entre las pacientes con más riesgo de desarrollar la enfermedad ²⁰¹.

INTRODUCCIÓN

2. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

El aumento de la incidencia de metástasis cerebral en cáncer de mama, debido a los avances en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad sistémica, hace necesario disponer de herramientas diagnósticas que nos permitan predecir esta complicación antes de que se desarrolle, y poder proponer a las pacientes tratamientos para prevenirla.

Para ello, además del conocimiento de las características fenotípicas de los tumores, se necesitan modelos experimentales que reproduzcan con fidelidad la enfermedad metastásica y nos ayuden a desarrollar terapias específicas para combatirla. Es por eso que el desarrollo de modelos pre-clínicos es de gran importancia para estudiar los efectos de las terapias, de forma aislada o combinada, sobre los diferentes aspectos patogénicos de la metástasis cerebral y poder acelerar la traslación a la clínica de nuevos esquemas terapéuticos.

HIPÓTESIS

3. OBJETIVOS

1. OBJETIVO PRINCIPAL

El trabajo se engloba en un objetivo general de estudio patogénico de la metástasis cerebral en cáncer de mama utilizando el análisis de muestras de tumores primarios provenientes de pacientes para generar hipótesis que luego se validan en modelos experimentales "in vitro" e "in vivo".

2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

2.1. Validar en un estudio multicéntrico amplio marcadores de predicción y pronóstico de metástasis cerebral, previamente descritos, utilizando muestras de carcinoma infiltrante de mama de pacientes con un seguimiento clínico medio de seis años.

2.2. Desarrollar un modelo experimental de metástasis cerebral que permita estudios pre-clínicos de tratamiento basados en pautas que combinen quimio y radioterapia.

OBJETIVOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. DESARROLLO DEL MODELO EXPERIMENTAL DE METÁSTASIS CEREBRAL “IN VIVO”

4.1.1. CÉLULAS Y TRANSDUCCIÓN RETROVIRAL

Se utilizaron las células de procedencia humana 435-Br1, amablemente cedidas por la Dra. Àngels Fabra (Institut d'Investigació de Bellvitge-IDIBELL). Estas células se obtuvieron originalmente de una metástasis cerebral inducida en un ratón inmunodeprimido al que se le inoculó, ortotópicamente en la mama, la línea celular MDA-MB-435, derivada de una paciente caucasiana con cáncer de mama triple-negativo (TN). Estas células son un modelo útil de carcinoma de mama muy indiferenciado que expresan marcadores epiteliales y melanocíticos ²⁰².

Para nuestros experimentos, las células 435-Br1 se infectaron con el vector retroviral preGFP-CMV-PLuc, el cual contiene el gen de la proteína verde fluorescente eGFP, bajo el control del promotor 5'LTR, y el gen de la photinus luciferasa PLuc, bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV). La preparación del vector y el empaquetamiento de las partículas virales se realizó tal como lo describe Román et al. ²⁰³. Una población celular que expresaba uniformemente altas concentraciones de eGFP se seleccionó mediante FACS (“Fluorescence-Activated Cell Sorting”; MoFlo, Cytomation, Dako, Denmark). Dichas células se utilizaron para los experimentos posteriores bajo el nombre de células BR-eGFP-CMV/Luc (Figura 10).

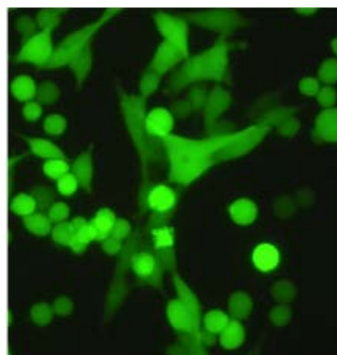


Figura 10. Células BR-eGFP-CMV/Luc. Cultivo visto bajo microscopio de fluorescencia (20X). Martínez-Aranda A et al. *Int J Mol Sci*, 2013.

4.1.2. CONDICIONES DE LOS CULTIVOS

4.1.2.1. Cultivos estándar

Las condiciones de cultivo de las células BR-eGFP-CMV/Luc y su mantenimiento eran estándares en una mezcla de medio DMEM y Ham F12 (DMEM/F-12, Life Technologies, Inc. Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), en proporción 1:1 (v/v), suplementada con suero bovino fetal (FBS) al 10%, 1 mM de piruvato y 2 mM de L-glutamina. Las células se mantenían en un incubador humidificado, en un ambiente del 5% de CO₂ a 37°C.

4.1.2.2. Cultivos primarios

La obtención de células de cultivos primarios de tejido tumoral se realizaba utilizando medio DMEM/F-12 con el 50% (v/v) de FBS, una solución de L-glutamina y piruvato al 2% (v/v), una solución antibiótica PSN 100X (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) formada por penicilina 1 mg/ml, estreptomycin 1 mg/ml y neomicina 2 mg/ml, añadiendo además gentamicina a 0.2 mg/ml y anfotericina-B (Fungizone) a 2.5 µg/ml. Las células se mantenían en un incubador humidificado, en un ambiente del 5% de CO₂ a 37°C. Tras el establecimiento del cultivo, si las células mostraban un crecimiento óptimo, reducíamos el FBS al 20% y retirábamos gradualmente la solución antibiótica, para obviar cualquier contaminación larvada. Finalmente, pasábamos a mantenerlas con el medio estándar DMEM/F-12 al 10% FBS con L-glutamina y piruvato. Una vez que se comprobaba que el cultivo estaba libre de mycoplasma, se congelaban unas alícuotas, se expandían las células y se preparaba una suspensión celular para inocular en los ratones.

4.1.3. PREPARACIÓN DEL INÓCULO CON LA SUSPENSIÓN CELULAR

El cultivo de células BR-eGFP-CMV/Luc se dividía al llegar a la fase de crecimiento exponencial. Una solución de Tripsina-EDTA (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) durante 1 minuto a temperatura ambiente era suficiente para resuspenderlas. Posteriormente se lavaban dos veces en solución salina tamponada HBSS ("Hanks'

Buffer Saline Solution”) y se contaban utilizando una cámara de Neubauer. La viabilidad, cuantificada por exclusión con tinción "Trypan-Blue", se encontraba siempre entre el 90-97%. Posteriormente se resuspendían nuevamente en HBSS para obtener una concentración final de inoculación en el animal de experimentación de 1×10^6 células/100 μ l en cualquiera de las técnicas utilizadas, bien en ventrículo izquierdo o bien en la arteria carótida interna de los ratones.

4.1.4. PROCEDIMIENTO DE SELECCIÓN DE UNA POBLACIÓN CELULAR ALTAMENTE METASTÁSICA

Con las células BR-eGFP-CMV/Luc recogidas del tejido cerebral de los animales pasadas 4-6 semanas desde la inoculación en el ventrículo izquierdo (ver sección 4.1.7.1.), se volvía a establecer un nuevo cultivo primario, hasta llegar a obtener un cultivo en fase de crecimiento estabilizado, el cual, cuando presentaba un aspecto subconfluyente, que era signo de crecimiento exponencial, se volvía a reinyectar en el ventrículo izquierdo de nuevos animales. Este ciclo se repitió cinco veces. Las células obtenidas del cerebro tras la primera inoculación en el ventrículo izquierdo las denominamos BR-eGFP-CMV/Luc V1 (BRV1), y así sucesivamente hasta obtener del cerebro las células correspondientes a la quinta inoculación en el ventrículo, las células BRV5 (Figura 11).

Las células BR-eGFP-CMV/Luc V5 (BRV5), una vez aisladas del cerebro y crecidas en cultivo primario se preservaron para los diferentes experimentos y se procesaron para inocularlas en la arteria carótida (CA) interna (ver sección 4.1.7.2.), siguiendo un método que disminuía el tiempo de latencia en la inducción de la MC. Posteriormente, las células obtenidas por cultivo primario de estas MC se pasaron a denominar BR-eGFP-CMV/Luc V5CA (Figura 11). Estas fueron las células que se utilizaron en los sucesivos experimentos de MC para establecer el modelo de tratamiento con radio-quimioterapia.

MATERIAL Y MÉTODOS

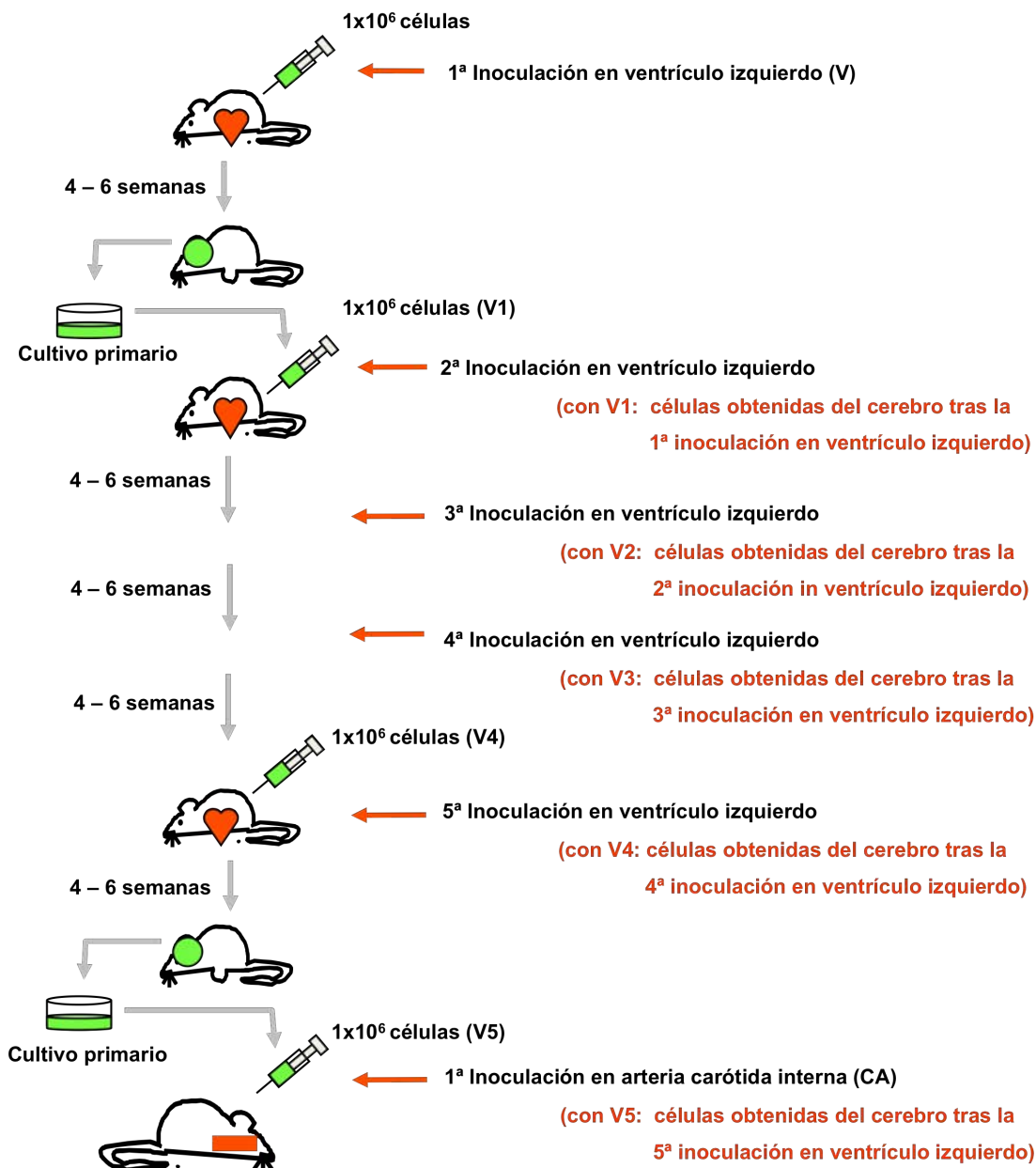


Figura 11. Procedimiento de selección celular. Esquema representativo de los diferentes pases realizados con las células tras las inoculaciones en ventrículo izquierdo, desde V1 hasta V5, así como la primera inoculación en arteria carótida interna. Basado en el esquema de Martínez-Aranda A et al. Int J Mol Sci. 2013.

4.1.5. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron distintas cepas de ratón para la optimización del modelo en las diferentes fases del estudio. Así, se utilizaron ratones hembra CD1 (non-nude), ratones hembra Balb-c-nude y ratones hembra atímicos Nude-Foxn1nu (Tabla 15).

Tabla 15. Características de los ratones utilizados y su aplicación para el desarrollo final del modelo experimental

	CD1 (non-nude)	BALB / C nude	Atímicos (Nude-Foxn1nu)
Características *			
Consanguinidad	No ("Outbred")	Sí ("Inbred")	No ("Outbred")
Inmunodeficiencia	No	Sí (No timo ni células T)	Sí (No timo ni células T)
Pelo	Sí (blanco)	No	No
Utilidad de estudio	Variada (modelo general, fármacos, cirugía, pseudo-embarazo)	Biología tumoral y xenotrasplantes	Biología tumoral y xenotrasplantes
Aplicación a nuestro modelo:			
Sexo elegido	Hembra	Hembra	Hembra
Finalidad y tipo de experimento **	Tolerancia y supervivencia a RX craneal (3 Gy/fx x 10) (exp. piloto)	Tolerancia y supervivencia a RX craneal (3 Gy/fx x 10) (exp. piloto)	Tolerancia y supervivencia a RX craneal (5.5 Gy/fx x 3) (exp. piloto)
	Optimización inoculación intracarotídea (exp. piloto)	Demostración desarrollo y progresión de MC por RMN (exp. finalista)***	Demostración desarrollo de MC por RMN (exp. piloto) Selección celular y Tratamiento combinado (exp. finalista)****

(*) Fuente: Charles River Laboratories, Inc. USA. <https://www.criver.com/>

(**) Los tipos de experimentos realizados durante todo el desarrollo del modelo hasta su obtención final han sido: experimentos "piloto", aquéllos realizados para comprobar la validez y reproducibilidad del modelo y esquema de irradiación diseñados, del modelo de inoculación intracarotídea con sus modificaciones, y para comprobar el desarrollo de MC por imagen de RMN; y experimentos "finalistas", aquéllos realizados para conseguir una finalidad, un resultado que apoye o rechace la hipótesis planteada en cada caso.

(***) Simoes RV et al. (2008)

(****) Martínez-Aranda A et al. (2013).

Todos estos animales se adquirieron en Charles-River Laboratories (Wilmington, MA, USA) y se hospedaron en el estabulario de l'Institut d'Investigació de Bellvitge (IDIBELL) en condiciones libres de patógenos (SPF: "Specific Patogen Free"), a una temperatura de 20-24°C, con una humedad relativa del 60% y con períodos de luz-oscuridad de 12-12h. Los animales tuvieron libre acceso a agua, tratada previamente con radiación UV, y a una dieta estéril adecuada.

Todos los procedimientos relacionados con animales expuestos en la Tabla 15 se realizaron de acuerdo con las "National Institute of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals" y con la aprobación del comité ético de cuidado animal del IDIBELL.

4.1.5.1. Ratones hembra CD1 (non-nude)

Para los experimentos se utilizaron animales con pesos en un rango entre 29.9 y 48.9 gr. (peso medio \pm SD: 35.5 \pm 5.4). Con esta cepa se realizaron diferentes experimentos piloto:

4.1.5.1.1. Experimento piloto de tolerancia y supervivencia a la irradiación craneal.

Los animales se dividieron en dos grupos, un grupo control y un grupo irradiado, aplicándose un esquema clásico en clínica humana de irradiación craneal de 3 Gy/fracción, 1 fracción/día y 5 días/semana, hasta completar una dosis total de 30 Gy, con nuestro modelo de irradiación (ver sección 4.1.12.2.).

4.1.5.1.2. Experimentos piloto de inoculación intracarotídea.

El objetivo fue realizar modificaciones sobre la técnica quirúrgica de inoculación inicial ²⁰⁴ con la finalidad de aumentar la supervivencia de los animales y llegar a adaptar la técnica de inoculación al modelo de tratamiento. Tras la optimización de la instrumentación y el abordaje quirúrgico, se comprobó que las células tumorales fluorescentes que se inyectaban llegaban a los vasos sanguíneos cerebrales en cantidad suficiente.

4.1.5.2. Ratones hembra Balb/c-nude

4.1.5.2.1. Experimento piloto de tolerancia y supervivencia a la irradiación craneal.

El peso de los ratones al inicio del experimento tenían un rango entre 20.7 y 23.3 gr. (peso medio \pm SD: 22.2 ± 0.9). Al igual que con los CD1, los animales se dividieron en dos grupos, un grupo control y un grupo irradiado, aplicándose el esquema clásico de irradiación craneal en clínica humana de 3 Gy/fracción, 1 fracción/día y 5 días/semana, hasta completar una dosis total de 30 Gy con nuestro modelo de irradiación (ver sección 4.1.12.2.).

4.1.5.2.2. Experimentos de evaluación por RMN craneal del crecimiento de la metástasis tras la inoculación intracarotídea.

Estos experimentos se enmarcaron en una colaboración con el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona (Simoes et al., 2008)²⁰⁴ para demostrar "in vivo" mediante RMN el desarrollo de las MC tras la inoculación intracarotídea y realizar el seguimiento de la progresión metastásica en SNC. Para estos experimentos se utilizaron ratones cuyo peso estaba comprendido entre 22.0 y 24.0 gr.

4.1.5.3. Ratones hembra Atímicos (Nude-Foxn1nu)

4.1.5.3.1. Experimento piloto de tolerancia y supervivencia a la irradiación craneal.

Los animales se distribuyeron teniendo en cuenta sus pesos, que estaban en un rango entre 27.1 y 31.7 gr. (peso medio \pm SD: 28.7 ± 2.6). Para el tratamiento se dividieron en dos pequeños grupos, un grupo control y un grupo irradiado. El esquema de tratamiento estaba basado en el concepto de dosis efectiva biológica (BED) del Modelo Lineal-Cuadrático en Radiobiología (ver Anexos 10.2 y 10.3). Se aplicó un esquema modificado no clásico de irradiación craneal diseñado a tal efecto, consistente en 5.5 Gy/fracción, 1 fracción/día en 3 días consecutivos, hasta completar una dosis total de 16.5 Gy.

4.1.5.3.2. Experimento piloto de evaluación por RMN craneal de la técnica optimizada de inoculación intracarotídea.

El objetivo era constatar el desarrollo de MC utilizando la imagen de RMN, tras haber inoculado los ratones con células BR-eGFP-CMV/Luc (V5CA) y haber aplicado todas las modificaciones técnicas de implementación llevadas a cabo en los experimentos anteriores, a fin de definir la técnica actualizada de inoculación. Se utilizaron ratones cuyo peso estaba comprendido entre 22.0 y 28.0 gr.

4.1.5.3.3. Experimentos de selección celular y de tratamiento combinado.

Se utilizaron animales con pesos en un rango entre 22.0 y 28.0 gr. (peso medio \pm SD: 25.6 ± 1.4) para desarrollar un modelo de MC que consistía en inocular las células en el ventrículo izquierdo de los ratones y esperar el desarrollo de MC, para luego obtener por cultivo primario las células metastásicas, que se volvían a inyectar de nuevo en el ventrículo izquierdo de otros animales. En una primera fase, este proceso se llevó a cabo sucesivamente para obtener unas células altamente metastásicas en cerebro, que desarrollaban la enfermedad tras un corto período de latencia, al haberse seleccionado células con capacidad de atravesar la BHE. Una vez obtenidas células altamente metastásicas, diseñado el protocolo de irradiación craneal y optimizada la técnica de inoculación intracarotídea se estudió "in vivo" la respuesta a un tratamiento combinado radio-quimioterápico de las MC inducidas.

4.1.6. PROCEDIMIENTOS DE ANESTESIA

Las pautas de anestesia se adaptaron a las exigencias del procedimiento a realizar.

4.1.6.1. Inoculación intracardíaca (ventrículo izquierdo)

Los ratones se anestesiaron con una combinación de ketamina, a dosis de 100 mg/Kg, y de xilacina, a dosis de 10 mg/Kg, administrada por vía intraperitoneal. El procedimiento se realizó bajo condiciones estériles en una cámara de flujo.

4.1.6.2. Inoculación en la arteria carótida interna (técnica optimizada)

Los ratones se anestesiaron por vía inhalatoria bajo condiciones estériles en una cámara de flujo, usando una mezcla de O₂ e isoflurano al 5% a un flujo de 4 L/min para la inducción, y al 1.5 – 2.0% a un flujo de 0.3 L/min como pauta de mantenimiento.

4.1.6.3. Exploración del proceso metastásico mediante RMN

La anestesia por vía inhalatoria se realizó usando una mezcla de O₂ e isoflurano al 2.5 - 3.0% con un flujo de 2 L/min para la inducción, y al 0.7 - 2.5% con un flujo de 0.3 L/min para el mantenimiento. La frecuencia respiratoria se mantuvo entre 40 y 60 respiraciones/min. La temperatura corporal, medida con una sonda rectal, se mantuvo entre 36.5 y 37.5 °C aplicando un sistema de agua caliente recirculante incorporado al lecho del animal. La frecuencia respiratoria y la temperatura corporal se monitorizaron constantemente (SA Instruments, Inc, New York, NY, USA). Este procedimiento se realizó en la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), en el contexto de la colaboración con el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular.

4.1.6.4. Tratamiento holocraneal con radiación ionizante

Una vez configurado el modelo de irradiación, y bajo condiciones estériles en una campana de flujo, anestesiámos a los animales vía intraperitoneal con una combinación de ketamina, a una dosis de 100 mg/Kg, y de xilacina, a una dosis de 10 mg/Kg, antes de introducir los animales en decúbito supino dentro de la caja diseñada expresamente para la irradiación craneal (ver sección 4.1.12.2.).

4.1.6.5. Análisis por Bioluminiscencia

La anestesia inhalatoria, con una mezcla de O₂ e isoflurano, se administró a los ratones antes de la adquisición de imágenes: la inducción anestésica, con isoflurano al 4% a 2 L/min, se realizó fuera de la cámara de bioluminiscencia,

mientras que la pauta de mantenimiento, con isoflurano al 2% a 0.3 L/min, se proporcionó dentro de la cámara con los animales en posición de prono.

4.1.7. PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS PARA INDUCIR LA METÁSTASIS CEREBRAL

4.1.7.1. Inoculación en ventrículo cardíaco izquierdo

La inyección intracardíaca en ventrículo izquierdo es una técnica ampliamente utilizada para la inducción de metástasis ²⁰⁵, incluidas las cerebrales, menos agresiva y con menor mortalidad que la inyección intracarotídea. Por ello, se realizaron inicialmente experimentos de inoculación de las células BR-eGFP-CMV/Luc en el ventrículo cardíaco izquierdo, como paso previo para seleccionar las células con mayor capacidad de atravesar la BHE y llegar al parénquima cerebral.

Primero se realizó el procedimiento de anestesia correspondiente (ver sección 4.1.6.1.). Después se colocaron los animales en posición de supino y, tras limpiar la piel con solución antiséptica yodada, se procedió a visualizar las costillas abriendo la piel longitudinalmente en la línea paraesternal izquierda. Posteriormente, las células BR-eGFP-CMV/Luc, a una concentración de 1×10^6 células / 100 μ l HBSS, se inyectaron en el 3º espacio intercostal izquierdo, entre la 3ª y la 4ª costillas ²⁰⁵, perpendicularmente a la superficie de la pared torácica (Figura 12).

Después de haber traspasado la pared torácica con la aguja, seguíamos introduciéndola poco a poco y, sin variar su dirección, realizábamos pequeñas aspiraciones con el émbolo de la jeringa a medida que íbamos introduciendo la aguja, hasta que el volumen de la suspensión cargado en la jeringa se mezclaba bruscamente con sangre arterial oxigenada, de color rojo vivo, signo de que la aguja estaba dentro del ventrículo izquierdo. Llegado a este punto, se proseguía inoculando la suspensión de forma lenta durante unos 15 segundos. Una vez inyectada la suspensión, se procedió a cerrar la piel con grapas. Cuando los animales mostraban signos de haber desarrollado las metástasis, como hipomovilidad, asimetría de movimientos, alteraciones en la marcha o caquexia, se

sacrificaron mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (ver sección 4.1.10.1.). El cerebro y otros órganos como pulmones, hígado, glándulas suprarrenales, ovarios, ganglios linfáticos mediastínicos y abdominales se extirparon y se examinaron bajo el microscopio de fluorescencia para detectar la presencia de células BR-eGFP-CMV/Luc, que expresaban la proteína verde.

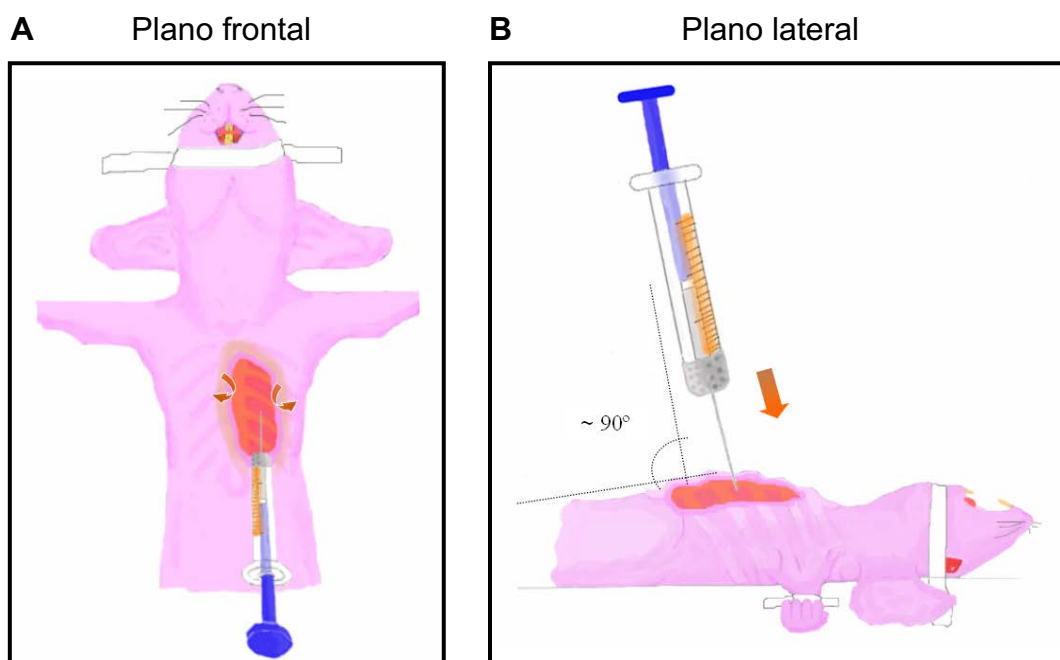


Figura 12. Técnica de inoculación celular en ventrículo cardíaco izquierdo. (A) Visión en el plano frontal. **(B)** Visión en el plano lateral.

4.1.7.2. Inoculación en arteria carótida interna (técnica optimizada)

La arteria carótida elegida para la inoculación fue siempre la derecha, por motivos de orientación respecto al campo visual para el experimentador diestro. Una vez realizado en el animal el procedimiento de anestesia correspondiente (ver sección 4.1.6.2.) y previamente a la intervención, se le inyectaba vía subcutánea 20 ml/Kg/día de suero glucosalino conjuntamente con meloxicam al 5% a dosis de 100 μ l/20gr/día y buprenorfina a dosis de 0.01 mg/Kg/día durante dos días; todo ello con el fin de mantener una buena hidratación y un óptimo efecto analgésico, respectivamente. Seguidamente, el cuello del animal se desinfectaba con solución antiséptica yodada, y una vez que la anestesia se reguló y el animal se mantuvo

dormido se procedió a abrir la piel del cuello con una incisión longitudinal en la línea media para, una vez llegada a la horquilla esternal, continuar con una incisión lateral derecha, adoptando la incisión una forma de “siete invertido”, con el objetivo de obtener un amplio campo quirúrgico (Figura 13A). Se mantuvo el campo quirúrgico abierto estirando la piel de cada lado con hilos de seda (Figura 13B) y posteriormente se disecaron todos los tejidos blandos, liberando cuidadosamente las estructuras para identificar claramente la arteria carótida derecha, con sus principales ramas, así como los demás tejidos y estructuras circundantes (Figura 13C). Posteriormente, pinzamos con unas pequeñas pinzas microvasculares (Vascular Clamps F.S.T. ref.00396-01-S&T, Switzerland) la raíz de la arteria carótida externa, bajo el origen de su rama occipital, y luego la rama estapedial, localizada profunda y cranealmente en el cuello. De esta manera, aseguramos que la mayoría de las células inoculadas (1×10^6 células/100 μ l HBSS) accediesen lentamente al cerebro a través de la rama carótida interna. Justo antes de la inoculación, para mantener inmóvil la arteria carótida común se podía utilizar bien un hilo de seda rodeando la arteria, para que al estirar lateralmente de él por sus dos extremos pudiésemos redirigirla e inmovilizarla, o bien unas pinzas que la sujetaran caudalmente cerca de la base del cuello. En este último caso, el punto de inyección de la suspensión celular se realizaría justo cranealmente a las pinzas. (Figura 13D). Para la inyección se utilizaba una jeringa Hamilton® (100 μ l, Bonaduz, Switzerland) y aguja Hamilton® de 33 Gauge (PK6), Una vez que la aguja estaba dentro de la luz de la arteria carótida común aflojábamos el hilo o las pinzas, dependiendo de lo que hayamos utilizado para inmovilizar la arteria, y seguidamente dirigíamos la aguja hacia la luz de la arteria carótida interna y, una vez aquí, liberábamos la suspensión celular lentamente en su totalidad. Después comprimíamos con una torunda el punto de inoculación y retirábamos la aguja, manteniendo la compresión durante unos minutos, realizándose así la hemostasia por compresión. Mientras realizábamos la hemostasia compresiva, retirábamos las pinzas microvasculares que habíamos colocado para que se reanudara el flujo vascular fisiológico. Una vez comprobado que no había sangrado (Figura 13E), se limpiaba el campo quirúrgico con suero fisiológico y solución yodada, se cerraba la piel con grapas y se limpiaba la herida con solución yodada (Figura 13F). Finalizábamos interrumpiendo el flujo de la mezcla con isoflurano y administrando una alta concentración de O₂ durante unos

segundos, antes de colocar al animal bajo una fuente de calor seco para una rápida recuperación.

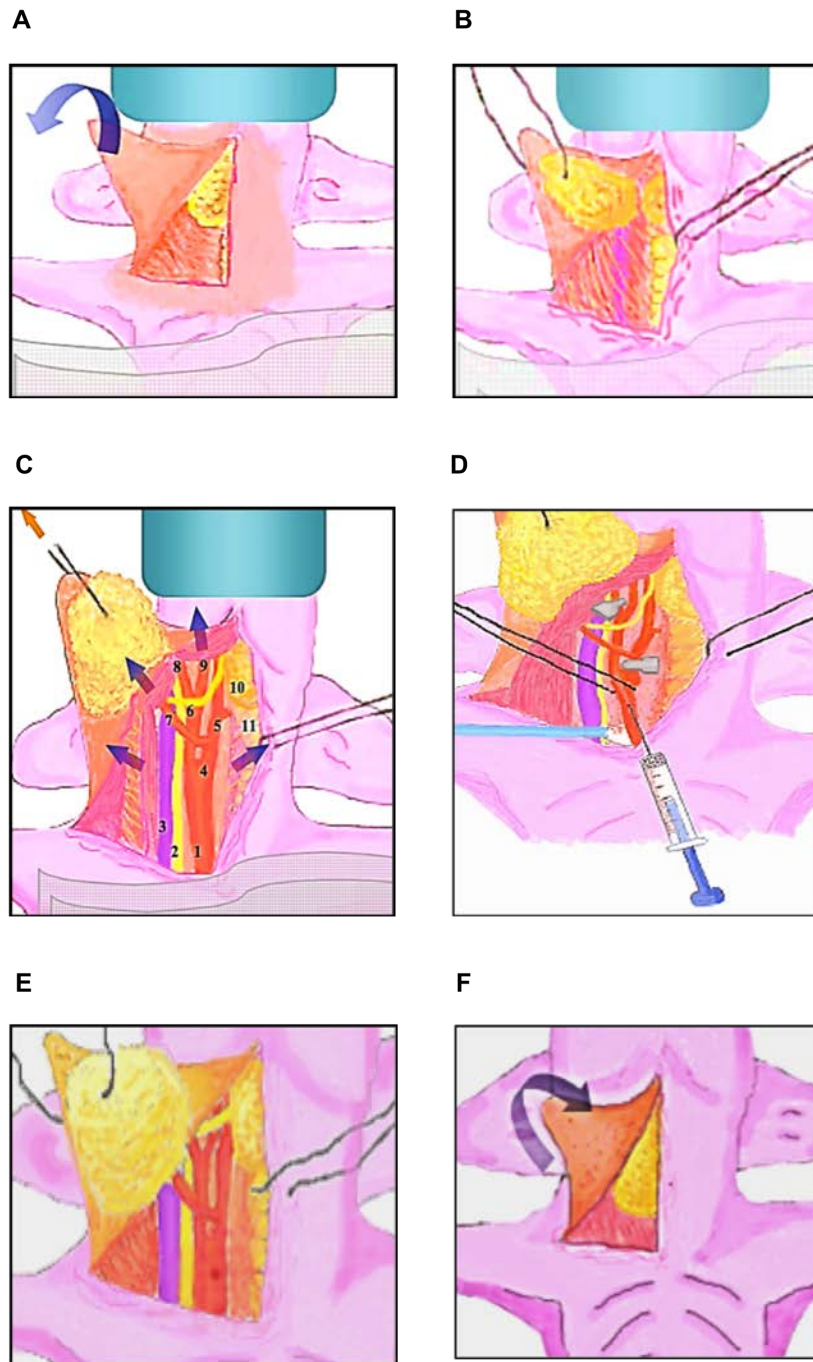


Figura 13. Esquema gráfico de los pasos seguidos para la inoculación intracarotídea con la técnica optimizada. 1. Arteria carótida común. 2. Nervio vago. 3. Vena yugular. 4. Bifurcación carotídea. 5. Arteria carótida externa. 6. Arteria carótida interna. 7. Rama arterial occipital. 8. Rama arterial estapedial. 9. Rama arterial carótida interna. 10. Glándula submaxilar. 11. Tráquea. En la Figura 13C, la arteria carótida interna parece externa, pero en realidad, está localizada en un plano más profundo, por detrás de la arteria carótida externa. Al disecar y liberar las estructuras puede apreciarse por detrás y ligeramente por fuera de la arteria carótida externa. Además, en su parte más craneal, muy cerca de la base del cráneo, da la rama arterial carótida interna propiamente dicha, que es la que se introduce en el cráneo e irá al parénquima cerebral.

4.1.8. ANÁLISIS POR RMN

La imagen por RMN (MRI) del cerebro permite visualizar con mayor precisión que la tomografía computerizada (TC) diferentes estructuras anatómicas.

Para constatar por imagen la aparición de MC en los ratones atímicos inoculados en la arteria carótida interna según la técnica descrita (ver sección 4.1.7.2.), se estudió un grupo de 6 animales, inoculados en el estabulario del IDIBELL y supervisando su recuperación post-operatoria durante las 48 horas siguientes a la inoculación. Después del período de recuperación se trasladaron al estabulario de la UAB, donde se aislaron y se sometieron a cuarentena 48 horas. Este tiempo también permitió que se recuperaran del estrés ocasionado por el traslado.

Los estudios de imagen de RMN se llevaron a cabo en un espectrómetro horizontal de alto campo, ubicado en el Servicio de Resonancia Magnética Nuclear de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB-CIBER-BBN), utilizando un imán horizontal de 7T (BioSpec 70/30; Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany) equipado con gradientes blindados o protegidos activamente, por una bobina de gradiente B-GA12 insertada en un sistema de gradiente B-GA20S, y una bobina de superficie de recepción en cuadratura, activamente desacoplada de un resonador de volumen con un diámetro interno de 72 mm.

Tras el procedimiento de anestesia correspondiente (ver sección 4.1.6.3.) todos los animales se exploraron en los planos axial y coronal con imágenes de resonancia magnética de alta resolución en secuencia T2. Para ello, se eligió una secuencia RARE; campo de visión (FOV) de 19.2 x 19.2 mm; matriz (MTX) de 256 x 256 (0.075 x 0.075 mm/pixel); número de cortes (NS): 10; grosor de corte (ST) de 0.50 mm; tiempo de ECHO (TE) de 12 ms (TE efectivo: 36 ms); tiempo de reciclaje (TR) de 4.2 s; número de promedios o medias (NA): 4; tiempo total de adquisición (TAT) de 6 min y 43 s. Las imágenes se obtuvieron semanalmente y sólo a nivel de cerebro, dado que la sonda de superficie estaba optimizada para esta zona. Cuando se apreció el deterioro clínico en consonancia con la imagen de las lesiones, los animales se sacrificaron según el procedimiento habitual (ver sección 4.1.10.1.).

4.1.9. ANÁLISIS DE BIOLUMINISCENCIA

La luciferina es una sustancia química que se encuentra en las células de varios organismos bioluminiscentes. Cuando el enzima luciferasa la oxida en presencia de ATP se produce la emisión de una luz verde azulada, que puede registrarse y cuantificarse con un sistema de análisis de imagen luminométrico.

Las células BR-eGFP-CMV/Luc, que llevan incorporado el gen de la luciferasa, emiten luminiscencia en contacto con la luciferina, por lo que pueden ser detectadas "in vivo", lo que permite realizar un seguimiento de la evolución de las células metastásicas en el cerebro de los animales tras el tratamiento administrado.

La solución de luciferina (D-Luciferin Firefly potassium salt, L-8220-Biosynth AG; 1 gr/vial) se preparó de acuerdo con la hoja de recomendaciones para el uso del producto o "data sheet". Así, preparamos 1 gr de luciferina en PBS sin Mg^{2+} ni Ca^{2+} , para conseguir una concentración de 15 mg/ml y posteriormente la filtramos a través de un filtro de 0.2 μm para esterilizarla. Una vez reconstituída se preservó en alícuotas a $-20^{\circ}C$.

La solución de luciferina se inyectaba a temperatura ambiente vía intraperitoneal a 10 μl /gr de peso, 10 minutos antes de la adquisición de las imágenes. El período de tiempo planificado para la adquisición de imágenes fue el mismo para todos los grupos de animales de un mismo experimento y se mantuvo hasta concluirlo.

Los animales anestesiados según el procedimiento (ver sección 4.1.6.5.) permanecían estables durante el proceso de adquisición de imágenes. A tal fin se utilizó un sistema Caliper (LifeSciences. Hopkinton, MA, USA) con un análisis de imagen incorporado (Living Image 4.1 image analysis software), con el que se efectuaba la adquisición luminiscente "in vivo" del proceso metastásico y su seguimiento. El número de fotones estaba expresado en fotones por segundo (p/s). El parámetro elegido para la evaluación del tratamiento fue el "Average Radiance (AvR)" (p/s/cm²/sr). Para la cuantificación total de la imagen se tenía en cuenta el número de fotones por pixel de un área de interés, esto es, la media de fotones por

pixel. Las señales inespecíficas de quimioluminiscencia se sustraían de todas las medidas de bioluminiscencia craneal como parte del análisis de las imágenes. Para ello, un ratón sano, no inoculado con células tumorales, recibía solución de luciferina intraperitonealmente, a dosis de 10 μ l/gr 10 minutos antes de la adquisición de las imágenes.

4.1.10. PROCEDIMIENTOS DE SACRIFICIO, NECROPSIA Y PRESERVACIÓN DE CEREBRO

4.1.10.1. Sacrificio

Los animales se sacrificaron mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (Dolethal®), a una dosis letal de 150 mg/Kg, dosis triple de la dosis anestésica a partir de la solución madre de 20 gr/100ml, cuando aparecían signos clínicos de enfermedad o se detectaba pérdida de peso progresiva.

4.1.10.2. Necropsia

El procedimiento de necropsia fue igual, siguiendo el mismo orden y de forma metódica, en todos los experimentos:

1º. Con el ratón en decúbito prono, se realizaba la apertura amplia de la piel del cráneo por su línea media, dejando al descubierto toda la superficie exterior del cráneo. Seguidamente, con unas tijeras pequeñas de puntas agudas se seccionaban ambas caras laterales del cráneo partiendo del orificio occipital y en sentido anterior, y luego se seccionaba todo el cráneo por su línea media en sentido sagital. Una vez realizadas estas tres secciones, se abría la cavidad craneal a modo de libro, exponiendo todo el encéfalo sin dañarlo ni cortarlo. Con unas pinzas finas de punta roma se separaba el encéfalo de la base del cráneo, seccionando todos los pares craneales y la parte distal del bulbo. De esta manera se extraía todo el encéfalo íntegro.

2°. Con el ratón en decúbito supino, separando las cuatro extremidades del tronco y fijándolas en la superficie de apoyo y fijando la cabeza en hiperextensión, se procedía a la apertura amplia de la piel del tórax por su línea media y en sentido ascendente, empezando por debajo de la apófisis xifoides del esternón, pasando por la fosa supraesternal y acabando en el mentón mandibular. Seguidamente, se seccionaba el esternón con tijeras pequeñas por su línea media o paraesternal en sentido ascendente, se abría la caja torácica y, tras una primera inspección, se seccionaba en bloque el mediastino con los pulmones, tráquea, esófago y corazón. Tras la extracción de los órganos torácicos éstos se inspeccionaban macroscópicamente con detenimiento, al igual que la parte interna de toda la pared torácica y cúpulas diafragmáticas. Al final de esta parte del proceso, se abría la cara anterior del cuello y se inspeccionaba ambos lados del mismo.

3°. Manteniendo el ratón en la posición de decúbito supino, se seccionaba ampliamente la piel abdominal por línea media y en sentido descendente hasta llegar al área genital. A continuación, se seccionaba en sentido descendente la pared abdominal por su línea media y se exponía todo el contenido abdomino-pélvico. Tras una inspección general de todos los órganos abdominales, se extraía en bloque todo el tubo digestivo, desde la parte distal del esófago hasta el recto, liberando y disecando sus estructuras para su inspección macroscópica. Después se extraía hígado, páncreas, bazo, riñones, glándulas suprarrenales, vejiga y genitales internos. Una vez extraídos los órganos abdomino-pélvicos, se inspeccionaba toda la pared interna abdominal.

Todos los órganos extraídos se lavaban con suero fisiológico para limpiarlos de sangre y se colocaban sobre papel secante antes de su análisis macroscópico individualizado.

4.1.10.3. Preservación de cerebro

Tras extraer el encéfalo en la necropsia, lo lavábamos con suero fisiológico y lo colocábamos unos segundos sobre papel secante. Seguidamente, para fijar el tejido cerebral se sumergía el órgano en paraformaldehído (PFA) al 4% durante 24 horas

aproximadamente. Tras este tiempo, se le hacía un lavado con solución salina con fosfato tamponada (PBS) al 1% y se trasladaba a una solución de sacarosa al 30% (30 gr sacarosa con 100 ml de PBS) durante 12-24 horas aproximadamente, hasta que el cerebro se depositaba en el fondo del recipiente. Después de este tiempo se dejaba escurrir en papel secante unos segundos, para colocarse finalmente en un molde y cubrirlo con medio de congelación tisular OCT (Sakura Tissue-Tek®), evitando que quedaran burbujas. Paralelamente, se disponía en un pequeño recipiente metálico una pequeña cantidad de metilbutano, la base del cual la poníamos en contacto con nitrógeno líquido hasta que se enfriara, unos 30 segundos aproximadamente. Para realizar la congelación de la muestra se introducía el molde con la muestra en OCT dentro del recipiente metálico, flotando en el metilbutano, y se volvía a poner la base de este recipiente en contacto con el nitrógeno líquido hasta que quedara todo completamente congelado, cosa que sucedía cuando el OCT con la muestra pasaba de ser viscoso y transparente a ser sólido y de color blanco opaco. Una vez congelada, la muestra se preservaba archivada en el congelador de -80°C hasta ser procesada.

4.1.11. ESTUDIO HISTOLÓGICO

4.1.11.1. Microscopía de fluorescencia

Para demostrar la llegada de células fluorescentes a la circulación cerebral tras la inoculación intracarotídea se utilizaron ratones hembra CD1, que se sacrificaron a los 5 minutos después de la inoculación y se les extrajo el cerebro, realizándose el procedimiento de preservación en OCT (ver sección 4.1.10.3.). El análisis microscópico del tejido se realizó en cortes criostáticos de 20 µm de espesor que se analizaron con el microscopio de fluorescencia (40X).

Por otra parte, tras el sacrificio de los ratones hembra atímicos utilizados en los experimentos de inoculación en el ventrículo cardíaco izquierdo como procedimiento de selección celular órgano-específica en los distintos pases, se realizó el procedimiento de necropsia, con la extracción de los órganos para su inspección macroscópica y con el microscopio de fluorescencia. Los órganos a estudio como

encéfalo/cerebro, pulmones, hígado, glándulas suprarrenales, ovarios y ganglios linfáticos macroscópicos mediastínicos y abdominales se lavaron con suero fisiológico en una placa de Petri y se disgregaron con un bisturí de forma minuciosa en sus respectivas placas, con el fin de evaluar la presencia de células tumorales fluorescentes.

4.1.11.2. Tinción con hematoxilina-eosina

Para demostrar que las lesiones observadas en RMN correspondían a MC alternativamente se realizaron análisis histológicos de los cerebros congelados en OCT y teñidos con la tinción de hematoxilina-eosina (H&E).

En el criostato, manteniendo una temperatura de -27°C , se realizaron cortes de $5\ \mu\text{m}$ de grosor en los bloques de cerebros en OCT. Las muestras de cerebro se dispusieron en portas de cristal tratados con polilisina y se tiñieron con el siguiente procedimiento:

- 1°. Se dejaron los cortes realizados a temperatura ambiente durante 15 min.
- 2°. Se les aplicó un breve lavado de 1 min en agua destilada.
- 3°. Se introdujeron en la cubeta con hematoxilina durante 3 min.
- 4°. Se realizó un baño en agua destilada durante 2 min.
- 5°. Se realizó un lavado rápido en solución ácida.
- 6°. Un lavado en una cubeta con agua corriente durante 2 min para conseguir el viraje de color, evitando que el agua cayera directamente sobre el tejido.
- 7°. Introducción de las muestras en la cubeta con eosina durante 1 min.
- 8°. Inicio de deshidratación, introduciendo las muestras de forma consecutiva y ordenada en alcohol etílico a concentraciones crecientes: alcohol 70%, 2 baños de 5 min cada uno; alcohol 96%, 3 baños de 5 min cada uno; y alcohol 100%, 3 baños de 5 min cada uno.
- 9°. Fijación en baños de xilol: 3 baños de 5 min cada uno.
- 10°. Al final del proceso, se puso una gota de medio de montaje DPX en el porta encima de cada muestra y luego se colocó encima de cada una de ellas un cubreobjetos.

Las muestras teñidas se observaron bajo el microscopio óptico inicialmente a 4X, y a 20X en las zonas donde se apreciaban lesiones.

4.1.12. RADIOTERAPIA

4.1.12.1. Infraestructura

Para calcular la distribución de dosis en el cerebro de los animales que se sometieron a tratamiento, utilizamos un escáner helicoidal de tomografía computerizada (TC) de uso clínico, y para realizar las sesiones de radioterapia utilizamos un acelerador lineal CLINAC-2100 (Varian Oncology Systems) también de uso clínico, ambos ubicados en el Servei d'Oncologia Radioteràpica de l'Institut Català d'Oncologia (I.C.O.) Hospital Duran i Reynals, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona.

Una vez obtenidas las imágenes de TC del cráneo de los animales, éstas se utilizaron para realizar el cálculo dosimétrico, el cual se hizo utilizando el "CADplan Treatment Planning Software" (Varian Dosimetry Software, Darmstadt, Germany), un programa de planificación de radioterapia externa ubicado en las instalaciones del Servei de Física Mèdica de l'Institut Català d'Oncologia (I.C.O.) del Hospital Duran i Reynals, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona.

4.1.12.2. Diseño del Modelo

Tanto para realizar el cálculo dosimétrico como posteriormente las sesiones de tratamiento, el diseño del modelo que utilizamos constaba de los siguientes elementos (Figura 14):

1. Una caja de estabulación hermética, con unas marcas dibujadas en las cinco caras de la misma para alinear y referenciar la posición de los animales.
2. Un soporte sólido flexible de gel de silicona o Bolus (Lorca Marín, S.A., 30007, Murcia, España), de densidad agua, de 3 cm de espesor, sobre el cual se excavaron previamente, de forma alineada, unos lechos individuales para el apoyo de las

cabezas de los animales en posición de supino. **3.** Un segundo soporte de gel con el que se cubrían las cabezas de los ratones una vez colocadas en su lecho.

En la campana de flujo del estabulario se colocaba el soporte o bolus en el fondo de la caja alineándolo con las marcas que previamente habíamos hecho en las caras de la misma (Figura 14A), y una vez que los animales se anestesiaron según el procedimiento correspondiente (ver sección 4.1.6.4.) se colocaron en decúbito supino sobre el bolus, colocando las cabezas de aquéllos en cada uno de los huecos del soporte realizados para tal fin. Los animales, una vez colocados en la posición de supino, se fijaron al soporte con esparadrapo de papel, vigilando que la vía aérea estuviera libre y que respiraran bien (Figura 14B). A continuación, las cabezas de los animales se cubrieron con otra lámina de bolus, de tal manera que el aire fluyera sin problemas hacia la boca y los orificios nasales (Figura 14C).

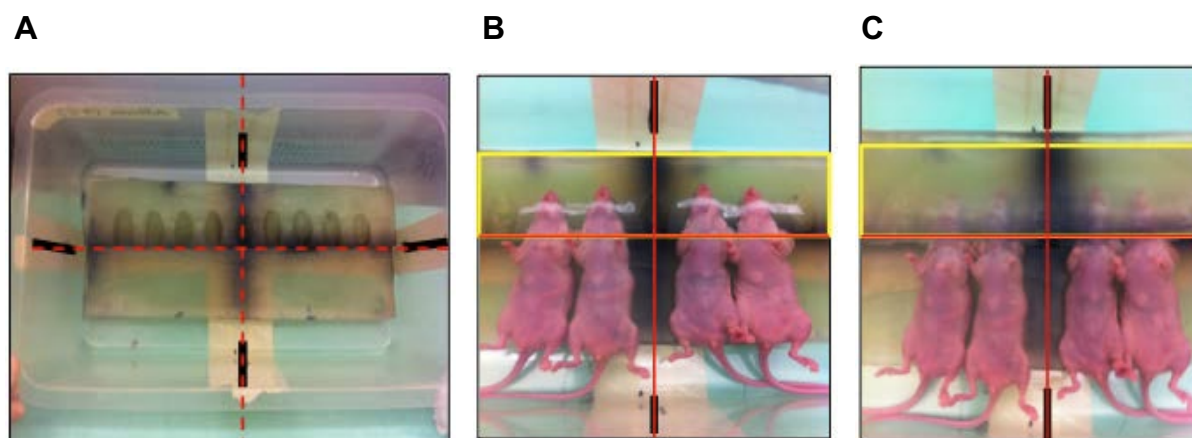


Figura 14. Elementos constitutivos del modelo de irradiación craneal. **A.** Bolus alineado con las marcas de la caja. Por las marcas negras dibujadas en la caja es por donde pasarán las luces láser de alineamiento (líneas rojas discontinuas) de la sala de tratamiento. **B.** Las cabezas de los animales anestesiados se colocan en posición de supino sobre el bolus en cada uno de sus lechos correspondientes. **C.** El segundo bolus cubre las cabezas, quedando representado cómo estarán alineados en la mesa del acelerador (líneas rojas de los láseres) y cuál será el campo de tratamiento, delimitado por líneas amarillas. Martínez-Aranda A et al. Int J Mol Sci. 2013.

4.1.12.3. Cálculo Dosimétrico

La tomografía computerizada (TC) obtenida del cráneo de los animales se utilizó para obtener, mediante el programa de planificación, el cálculo dosimétrico en el tejido que queríamos irradiar. Las imágenes de TC dan información de las

densidades de los diferentes tejidos y órganos, y esta información es la base para la realización del cálculo de la dosimetría, es decir, del cálculo de las líneas de isodosis (líneas que unen puntos con la misma dosis) y su distribución en el volumen de tejido que queríamos tratar, para una energía de radiación de fotones de rayos-X determinada.

Así, los parámetros suministrados por nosotros para la realización de la dosimetría fueron los siguientes:

1. Energía de fotones de rayos-X: 6 MV (megavolts).
2. Rotación del cabezal del acelerador ("gantry"): 180°.
3. Tamaño de campo (hemicampo):
X1 = X2 = 7.5 cm (dimensión total de X = 15.0 cm)
Y1 = 0.0 cm e Y2 = 5.0 cm.
4. Distancia foco-superficie (SSD)= 100.0 cm.
5. Dosis prescrita por fracción en el cerebro: 5.5 Gy.
6. Tasa de dosis: 240 UM/min (unidades de monitor/min).

Al realizar el cálculo, y una vez visualizada la distribución de las curvas de isodosis en el monitor del planificador, pudimos determinar a qué profundidad del tejido y en qué curva de isodosis queremos referenciar la dosis que queríamos administrar. Así, tras la realización de la TC y el cálculo, obtuvimos los siguientes datos:

1. Los cerebros de los animales estaban situados a una profundidad entre 2.3 - 3.0 cm desde el isocentro del acelerador, ubicado en nuestro caso en la superficie de la mesa de tratamiento.
2. El acelerador tenía que administrar 557 UM (unidades de monitor) para poder depositar 5.5 Gy/fracción en la isodosis del 100%.
3. La homogeneidad de dosis que obteníamos en el eje del haz fue de 5.5 Gy (100%) como dosis mínima y de 5.6 Gy (102%) como dosis máxima, y en la zona de mayor dosis (a medio camino entre el eje del haz y su límite, aproximadamente) fue de 5.6 Gy (102%) como dosis mínima y de 5.7 Gy (104%) como dosis máxima. Por tanto, los cerebros de los animales, situados a una profundidad entre 2.3 y 3.0 cm,

se irradiaron con una dosis mínima de 5.5 Gy y con una homogeneidad del 4%, es decir, recibieron entre 5.5 y 5.7 Gy/fracción (Figura 15).

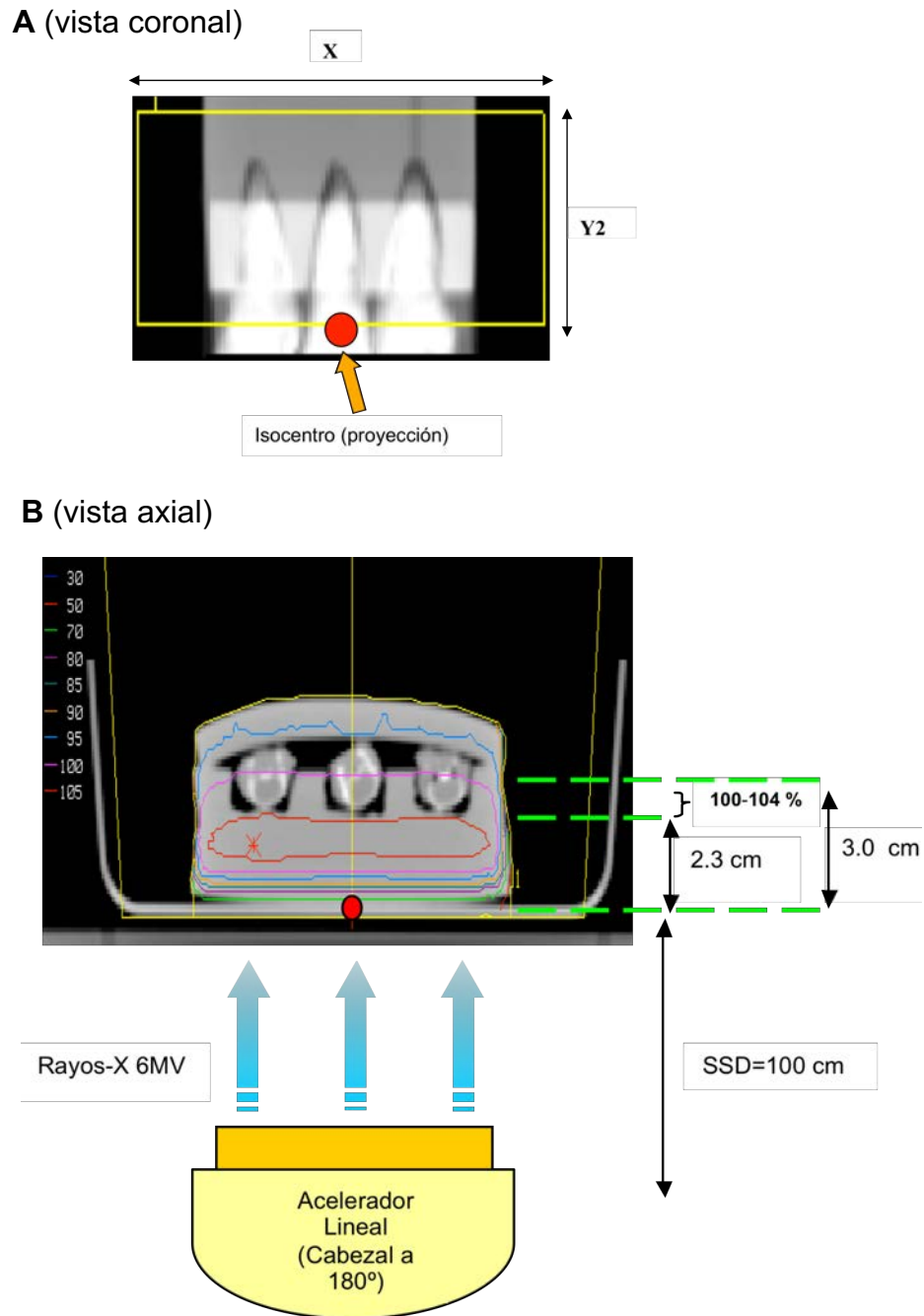


Figura 15. Representación esquemática de la conformación del campo de tratamiento y distribución de las curvas de isodosis. **A.** Vista coronal de las imágenes de TC reconstruidas sobre el modelo. Se aprecia la representación de las dimensiones del campo de tratamiento $X = 15.0$ cm e $Y2 = 5.0$ cm, limitado por el rectángulo amarillo (en este caso, $Y1 = 0.0$ cm). El punto rojo indica la proyección del isocentro del acelerador en relación al campo de tratamiento. El isocentro es el punto en el espacio alrededor del cual gira el foco de radiación ubicado en el cabezal del acelerador; punto del radio de giro del foco de radiación. **B.** Distribución de las curvas de isodosis (% de dosis) en un corte de imagen axial del modelo de irradiación cerebral, poniendo de manifiesto cómo incide la radiación sobre la cabeza de los animales. Martínez-Aranda A et al. Int J Mol Sci. 2013.

4.1.12.4. Tratamiento

En los días de tratamiento los animales se transportaron en la caja cerrada herméticamente, desde la campana de flujo del estabulario a la unidad de tratamiento donde está el acelerador lineal (Figura 16), no abriéndose la caja en ningún momento durante todo el procedimiento. Sólo cuando finalizaron el tratamiento y volvieron de nuevo a la campana del estabulario es cuando la caja se abrió para reubicarlos en sus jaulas.

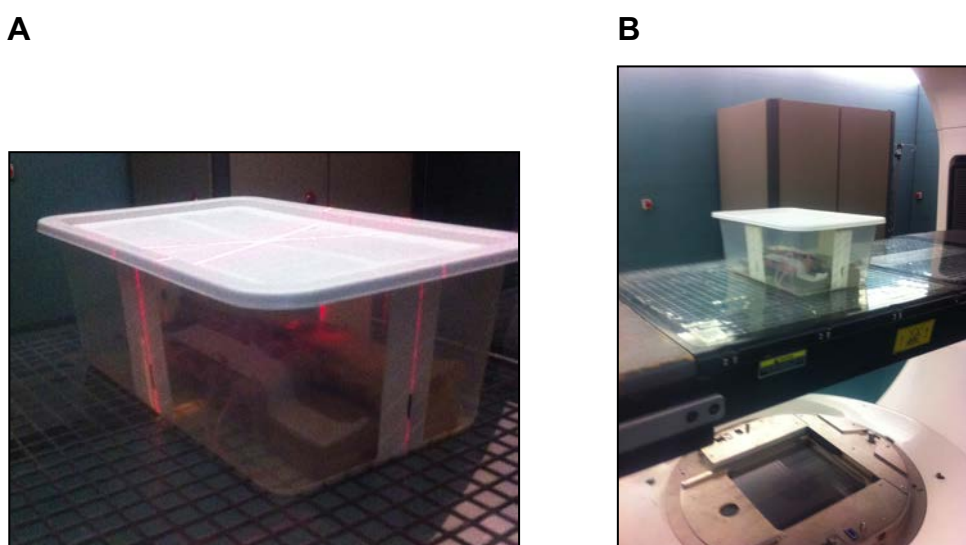


Figura 16. Disposición del modelo de irradiación en la sala de tratamiento. A. Caja herméticamente cerrada conteniendo los animales anestesiados y colocada en la mesa de tratamiento, con las marcas negras de la caja ajustadas con las luces láser de la sala, con el fin de alinearla en relación al foco de radiación del acelerador. **B.** Posición de giro que adopta el cabezal del acelerador (180°) en relación a la caja alineada en cada sesión de tratamiento.

4.1.13. QUIMIOTERAPIA

4.1.13.1. Temozolomida

Los fármacos antineoplásicos del grupo de los agentes alquilantes actúan directamente sobre el DNA, incorporando grupos alquilo que dan lugar a la formación de puentes inter o intracatenarios responsables de la alteración funcional del DNA y, en último término, de la muerte celular.

La temozolomida (TMZ) es un agente alquilante, derivado de imidazotetrazina, que actúa como un profármaco y se hidroliza espontáneamente, es decir, sufre hidrólisis no-enzimática a pH fisiológico, formándose su metabolito activo, la 5-(3-metiltriazen-1-il) imidazol-4-carboxamida (MTIC), que también por hidrólisis produce otros metabolitos como la 5-amino-imidazol-4-carboxamida (AIC) y la metilhidrazina. La citotoxicidad de MTIC se debe fundamentalmente a la alquilación (metilación) del DNA en las posiciones O6 y N7 de la guanina, formando O[6]-metilguanina, que resulta en la inhibición de la replicación del DNA y causa la muerte celular dependiente de la proteína p53. La TMZ es un inhibidor del ciclo celular no específico, teniendo lugar la detención del ciclo celular entre las fases G2 y M ²⁰⁶⁻²⁰⁹.

Desde el punto de vista farmacocinético, se trata de una molécula lipofílica que tras su administración vía oral se absorbe rápidamente. Atraviesa la BHE, siendo su concentración en el SNC aproximadamente el 20-30 % de la plasmática ²⁰⁹. Se une en un 15% a proteínas y su tiempo de vida media ($t_{1/2}$) es de 1.8h. Es frecuente la aparición de resistencia a este fármaco en humanos. Alrededor del 39% de la dosis de la TMZ se elimina por la orina. Por otro lado, clínicamente la TMZ se ha utilizado en el tratamiento de gliomas y melanomas metastásicos combinada con la radioterapia ²⁰⁶.

4.1.13.2. Preparación y administración

Para nuestro estudio, 100 mg de TMZ ($\geq 98\%$ HPLC, solid T2577, Sigma-Aldrich Química, St. Louis, MO, USA) se resuspendieron en 0.5 ml de dimetil-sulfóxido (DMSO, D5879 Sigma-Aldrich Química, St. Louis, MO, USA) como vehículo, con una concentración final de 200 mg/ml como solución madre. Para obtener homogeneidad en la solución, ésta se trató con ultrasonidos (UP50H Ultrasonic Processor, Hielscher, Ultrasound Technology, Teltow, Germany), administrando cuatro pulsos de 5 segundos de duración, y cada uno de ellos con una amplitud del 30%, con intervalos de 5 segundos entre ellos. La solución madre se preservó congelada a una temperatura de -80°C , dividida en alícuotas con las cantidades adecuadas para cada administración.

La dosis de TMZ administrada a los ratones fue de 60 mg/Kg/día, basada en el protocolo consultado gracias a la cortesía del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB - CIBER-BBN).

Una vez calculado el volumen de la solución madre para cada ratón, se añadía DMSO hasta completar 20 µL de solución de TMZ con DMSO, y una vez completados estos 20 µL se añadían 180 µL de suero fisiológico, obteniendo un vehículo de administración DMSO en suero salino al 10% (v/v), de tal manera que el volumen final de administración era de 200 µL cada día de tratamiento por vía oral mediante una cánula flexible estéril intragástrica (Instech Solomon, Plymouth, PA, USA).

4.2. ESTUDIO CLÍNICO

4.2.1. PACIENTES

Se reclutaron un total de 318 pacientes diagnosticadas de carcinoma infiltrante de mama entre 1989 – 2009 en tres centros hospitalarios: 252 pacientes del Hospital Duran i Reynals - Institut Català d'Oncologia con Hospital Universitari de Bellvitge (L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona); 24 pacientes del Consorci Hospitalari Parc Taulí (Sabadell, Barcelona) y 42 pacientes del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol - Institut Català d'Oncologia (Badalona, Barcelona).

En el estudio se tuvieron en cuenta variables clínico-patológicas, así como factores de riesgo conocidos clásicamente por su intervención en el desarrollo de metástasis en pacientes con cáncer de mama. Se analizaron un total de 22 variables:

Edad en años (<40 / 40-49 / ≥50); presencia de metástasis a distancia (M1) en el momento del diagnóstico del tumor primario (No / Sí); administración de quimioterapia neoadyuvante (No / taxanos / no-taxanos); cirugía (No / tumorectomía / mastectomía / tumorectomía con linfadenectomía axilar / mastectomía con linfadenectomía axilar / tumorectomía con ganglio centinela / mastectomía con ganglio centinela); administración de quimioterapia adyuvante (No / taxanos / no-

taxanos); hormonoterapia adyuvante (No / tamoxifeno / otros); administración de trastuzumab adyuvante (No / Sí); administración de radioterapia post-operatoria (No / Sí); recidiva local (No / Sí); recidiva regional (No / Sí); metástasis a distancia (M1) (No / Sí); localización de las metástasis; tamaño del tumor primario en mm (≤ 20 / ≥ 21); grado histológico (1 / 2 / 3); tipo histológico (ductal / lobular / mucinoso / medular); presencia de ganglios axilares positivos (0 / 1-3 / ≥ 4); estado de receptores estrogénicos (negativos / positivos); estado de receptores progestágenos (negativos / positivos); índice de Ki-67 (< 14 % / ≥ 14 %); estado de triple-negativo (No / Sí); estado del Her2 (negativo / positivo) y subtipo molecular (Luminal A / Luminal B / LumHer2+ / Her2-enriched / Triple-negativo).

La recogida de datos se hizo revisando la historia clínica de cada paciente. Al tratarse de un estudio retrospectivo que incluía pacientes con un seguimiento medio de seis años (rango: 8 meses - 12 años), los valores de algunas de las variables no estaban debidamente registrados en las historias; en este caso, la información se recogió como datos perdidos a efectos de ser consideradas como “missing data” en el análisis estadístico.

4.2.2. TEJIDOS

4.2.2.1. “Tissue Microarrays (TMAs)”

Los TMAs se prepararon con muestras de pacientes diagnosticadas de carcinoma infiltrante de mama, archivadas en bloques de parafina en los respectivos laboratorios de Anatomía Patológica de los diferentes hospitales. El patólogo utilizó las secciones teñidas con H&E para seleccionar tres áreas representativas del tumor. Los cilindros de 1 mm de diámetro de cada área se obtuvieron usando un sacabocados para biopsia cutánea y se depositaron en contenedores de bloques de parafina (Tissue Arrayer. Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA).

Una vez obtenido el bloque con los TMAs se realizaron las secciones de 3 μm de grosor y se transferían a los portas de cristal para el análisis inmunohistoquímico.

4.2.2.2. Desparafinización y tinción con hematoxilina-eosina

Con las muestras se realizaron los siguientes pasos de forma ordenada y consecutiva:

- 1°. Baños en xilol: 3 baños de 5 min cada uno.
- 2°. Proceso de hidratación, con baños en alcohol etílico a concentraciones decrecientes: en alcohol 100%, 3 baños de 5 min cada uno; en alcohol 96%, 3 baños de 5 min cada uno; y en alcohol 70%, 2 baños de 5 min cada uno.
- 3°. Un lavado de las muestras en agua corriente durante 5 min.
- 4°. Un breve lavado de 1 min en agua destilada.
- 5°. Sumergir las muestras en hematoxilina durante 3 min.
- 6°. Aplicar un baño en agua destilada durante 2 min.
- 7°. Aplicar un lavado rápido en solución ácida.
- 8°. Un lavado en agua corriente durante 2 min para que se produzca el viraje de color, evitando que el agua caiga directamente sobre el tejido.
- 9°. Sumergir las muestras en eosina durante 1 min.
- 10°. Proceso de deshidratación, baños en alcohol etílico en concentraciones crecientes y de forma ordenada: alcohol 70%, 2 baños de 5 min cada uno; alcohol 96%, 3 baños de 5 min cada uno; y alcohol 100%, 3 baños de 5 min cada uno.
- 11°. Proceso de aclaramiento: se vuelven a realizar baños en xilol, con 3 baños de 5 min cada uno. Y al final de este proceso de deshidratación, se aplica una gota de medio de montaje DPX sobre las muestras de tejido en el porta y se coloca encima un cubreobjetos para proceder al examen microscópico.

4.2.2.3. Inmunohistoquímica

Para el análisis de la expresión protéica, se utilizaron anticuerpos específicos y técnicas inmunohistoquímicas adaptadas a las características de cada proteína a estudio: Her2, receptores hormonales estrogénicos y progestágenos, Ki67, GRP94 y FN14.

Her2

Para estudiar el grado de expresión de Her2 se utilizaron el anticuerpo monoclonal "rabbit" Anti-Human HER2, clone anti-Her-2/NEU(4B5), pre-diluido (PATHWAY HER2 4B5, Ventana Medical Systems, Inc.; AZ, USA) y el anticuerpo primario policlonal "rabbit" Anti-Human HER2 (A0485, Dako, Glostrup, Denmark), clone c-erbB-2 oncoprotein, a dilución 1/350. Se utilizó el kit de detección Ultraview Universal DAB (Ventana Medical Systems, Inc.; AZ, USA) en un sistema de tinción automático (Benchmark TX, USA).

Según criterios de la SEAP-SEOM, guías de la FDA y de ASCO-College of American Pathologists ²¹⁰, en la determinación del estado de Her2 el resultado se consideró:

1. Negativo (0), en ausencia de tinción de membrana o tinción en <10% de las células;
2. Negativo (1+), en caso de tinción de membrana débil e incompleta en >10% de las células;
3. "Borderline" (2+), en caso de tinción completa, débil o moderada, en >10% de las células o tinción completa e intensa en 10-30% de las células;
4. Positivo (3+), en caso de tinción de membrana completa e intensa en >30% de las células.

En los casos en que se objetivó un resultado "borderline" (2+) para Her2, se realizó la técnica de "Hibridación in situ con Cromógeno" (CISH) o de "Hibridación in situ con Fluorescencia" (FISH) para evaluar el número de copias del gen de Her2 en el núcleo celular y, así, determinar su amplificación. Para ello se siguieron los criterios de las guías de la FDA y de ASCO-College of American Pathologists, y se interpretó el resultado como:

1. No amplificado: si la ratio de señales del gen Her2 frente a señales del cromosoma 17 era menor de 1.8.
2. Amplificado: si la ratio de señales del gen Her2 frente a señales del cromosoma 17 era mayor de 2.2.

3. “Borderline”: si la ratio de señales del gen Her2 frente a señales del cromosoma 17 estaba entre 1.8 y 2.2.
4. No interpretable, si ocurría al menos una de las siguientes circunstancias: ausencia de señales de una u otra sonda en al menos 20 células; si estas señales eran débiles o inexistentes en más del 25% de las células; si no era posible valorar como mínimo dos áreas diferentes de carcinoma infiltrante o si los controles no mostraban el resultado esperado.

Receptores hormonales (RE, RP)

Para la evaluación de los receptores estrogénicos (RE) se utilizaron el anticuerpo monoclonal “mouse” Anti-Human-ER (NCL-L-ER-6F11; Novocastra™/ Leica Biosystems), clone 6F11, a dilución 1/40; y el anticuerpo monoclonal “mouse” Anti-Human-ER (M7047; Dako. Glostrup. Denmark), clone ID5, a dilución 1/30.

Para la evaluación de los receptores de progesterona (RP) se utilizaron el anticuerpo monoclonal “mouse” Anti-Human-PR (NCL-L-PGR-312; Novocastra™/ Leica Biosystems), clone 16, a dilución 1/40; y el anticuerpo monoclonal “mouse” Anti-Human-PGR (N1630; Dako. Glostrup. Denmark), clone PgR-636, prediluido.

La valoración inmunohistoquímica de RE y RP se realizó utilizando el sistema automatizado de Ventana Benchmark Immunostainer con el kit Ultraview Universal. Ambos receptores hormonales se consideraron positivos si la positividad nuclear estaba presente en >5% de las células tumorales.

Ki67

La evaluación del Ki67 se realizó utilizando el anticuerpo monoclonal “mouse” Anti-Human-Ki67 (Dako. Glostrup, Denmark), clone MIB-1, a dilución 1/600; y el anticuerpo monoclonal “mouse” Anti-Human-Ki67 (NCL-L-Ki67-MM1; Novocastra™), clone MM1, a dilución 1/50.

La valoración inmunohistoquímica de Ki67 se realizó utilizando el sistema automatizado de Ventana Benchmark Immunostainer con el kit Ultraview Universal.

Ki67 se valoró como el porcentaje de células con positividad nuclear. Para su determinación se contabilizaron ≥ 200 células totales. El valor del resultado se dio en porcentaje: $<10\%$, $>30\%$, y para los valores comprendidos entre $10-30\%$ se especificó el valor porcentual correspondiente. El resultado fue revisado por dos patólogos y se consideró positivo cuando el porcentaje de células con positividad nuclear era $\geq 14\%$ y negativo cuando era $<14\%$.

GRP94

Para optimizar el análisis inmunohistoquímico se utilizó tejido de carcinoma de mama como tejido control para la expresión de GRP94. Para desenmascarar el antígeno se utilizó el calentamiento de la muestra en un recipiente a presión durante 7 min en tampón citrato. Se utilizó el anticuerpo primario policlonal "goat" anti-GRP94 sc-1794 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) a dilución 1/2000. Se diluyó en el tampón Dako Real™ Antibody Diluent Buffer (Dakocytomation, Dako, Glostrup, Denmark): "Tris buffer" a pH= 7.2, y 15 mM Na₃N. Se utilizó el kit de visualización "Labelled Streptavidin-Biotin System, Horseradish Peroxidase" (LSAB System, HRP; Dakocytomation), incluyendo como anticuerpos secundarios inmunoglobulinas "anti-goat" biotiniladas en PBS, estreptavidina conjugada con HRP (peroxidasa) en PBS, y 3-3'diaminobenzidina (DAB) líquida como sustrato cromógeno.

La optimización de las tinciones, los parámetros de evaluación y los análisis se establecieron por dos patólogos que desconocían los datos clínicos. Para determinar el grado de expresión se tuvieron en cuenta tejidos con expresión positiva del biomarcador y controles negativos de la tinción IHQ.

Para cuantificar la positividad de la proteína GRP94 en las muestras de carcinoma primario de mama, vistas bajo microscopio óptico a 20X, se consideró positiva aquella muestra con $>70\%$ de células tumorales con expresión de la proteína

catalogada por el patólogo como de intensidad 3+, y como negativa cuando la expresión en las células tumorales era débil, es decir, de intensidad 1+ ó 2+, o ausente, con el fin de evitar falsos positivos.

FN14

Para optimizar el análisis inmunohistoquímico de la proteína FN14 se utilizó como control de expresión tejido renal. Se desenmascaró el antígeno como se describe para la GRP94. Se utilizó el anticuerpo primario policlonal "goat" anti-FN14 sc-27143 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) a dilución 1/3000. Se diluyó en el tampón Dako Real™ Antibody Diluent Buffer (Dakocytomation, Dako, Glostrup, Denmark): "Tris buffer" a pH= 7.2, y 15 mM Na₃N. Se utilizó el kit de visualización "Labelled Streptavidin-Biotin System, Horseradish Peroxidase" (LSAB System, HRP; Dakocytomation), incluyendo como anticuerpos secundarios inmunoglobulinas "anti-goat" biotiniladas en PBS, estreptavidina conjugada con HRP (peroxidasa) en PBS, y 3-3'diaminobenzidina (DAB) líquida como sustrato cromógeno.

Al igual que en la determinación de GRP94, de manera independiente dos patólogos analizaron las muestras previamente anonimizadas. Para determinar el grado de expresión se tuvieron en cuenta tejidos con expresión positiva del biomarcador y controles negativos de la tinción IHQ.

Para cuantificar la positividad de la proteína FN14 en las muestras de carcinoma primario de mama, vistas bajo microscopio óptico a 20X, se consideró positiva aquella muestra con >70% de células tumorales con expresión de la proteína catalogada por el patólogo como de intensidad 3+, y como negativa cuando la expresión en las células tumorales era débil, es decir, de intensidad 1+ ó 2+, o ausente, con el fin de evitar falsos positivos.

4.3. ESTADÍSTICA

4.3.1. ANÁLISIS DE DATOS EXPERIMENTALES

Para el estudio del tiempo de supervivencia de los ratones usamos el test no-paramétrico de Mann-Whitney ("2-tailed"). Con este test se analizaron los resultados de los experimentos de inoculación en ventrículo izquierdo y los de inoculación intracarotídea.

Para la cuantificación de las metástasis en los experimentos "in vivo", los datos obtenidos de la bioluminiscencia se transformaron usando la función $\log(1+x)$, donde $x = AvR$, con el fin de obtener siempre un valor positivo en el logaritmo, ya que si no, al representar los datos en escala logarítmica (log en base 10), el logaritmo de un valor para $AvR > 0$ e < 1 daría negativo, y para obtener también una distribución más regular. Seguidamente, los datos de las determinaciones de los días posteriores se normalizaron respecto a los de la primera observación (día 14 post-inoculación) mediante la ratio de valores " $1+AvR$ ".

Para el estudio de la eficacia de los tratamientos, los grupos tratados se compararon mediante el test t-Student ("2-tailed"). Las curvas de supervivencia para cada tratamiento se estimaron por el método de Kaplan-Meier, y el test Log-Rank se utilizó para valorar si eran significativamente diferentes.

Valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

4.3.2. ANÁLISIS DE DATOS CLÍNICOS

Las frecuencias de las variables categóricas se compararon entre los grupos utilizando el test Chi-cuadrado o el test exacto de Fischer cuando estaba indicado.

Así, el test Chi-cuadrado se utilizó para: **1.** Relacionar el desarrollo o no de metástasis con las características clínico-patológicas de las pacientes. **2.** Estudiar la asociación entre las características clínico-patológicas y la expresión de los

biomarcadores de MC. **3.** Evaluar la distribución de los subtipos moleculares en relación a la presencia o no de metástasis.

Asimismo, las diferencias entre los grupos luminal y no-luminal con respecto a parámetros clínico-patológicos se estudiaron también mediante el test Chi-cuadrado o el test exacto de Fisher, según estuviera indicado. Este último test también se utilizó para estudiar la distribución de los biomarcadores de MC y de Her2 en las pacientes de los grupos luminal y no-luminal y relacionarlos con la presencia o no de la enfermedad.

Las muestras teñidas por IHQ se clasificaron en una escala de tres categorías según su resultado: negativo (-), positivo débil (1+ ó 2+) y positivo fuerte (3+). Los marcadores GRP94 y FN14 se catalogaron como “sobreexpresados” sólo en las muestras con resultado “positivo fuerte”.

Se realizó el cálculo de la sensibilidad, entre los tumores que desarrollaron la metástasis, y de la especificidad, entre aquellos que no la desarrollaron. La sensibilidad y especificidad de los biomarcadores, solos y en combinación, también se evaluó teniendo en cuenta el subtipo histológico de los tumores: luminal vs. no-luminal. La combinación de biomarcadores se consideró positiva cuando al menos uno de ellos era positivo, y negativa cuando todos ellos eran negativos. Asimismo, los índices de probabilidad positivos y negativos se calcularon también como índices predictivos integrados, obteniéndose áreas bajo la curva (AUC) ROC. Se realizó un análisis multivariado, que comparaba las muestras de pacientes que presentaron MC con aquellas de pacientes que recayeron en otros órganos o que no presentaron metástasis. El análisis se corrigió por las siguientes covariables: tamaño tumoral, grado histológico, estado de ganglios linfáticos, receptores hormonales, Her2 y tratamiento (quimioterapia adyuvante y antiestrógenos). Se calculó la “Odds Ratio” asociada con el biomarcador, su intervalo de confianza del 95% y el valor p.

Por otra parte, los marcadores se valoraron utilizando un modelo de regresión logística multivariado en un procedimiento por etapas o “paso a paso” (“forward stepwise”) para identificar la mejor combinación de marcadores para predecir la MC.

Debido a que el Her2 es un factor de riesgo de metástasis conocido, también se introdujo en el análisis, considerándolo como referencia basal, además del análisis estratificado para tumores Her2-positivo y Her2-negativo de cada marcador.

Otro análisis de regresión logística multivariado ajustado por covariables se llevó a cabo en los grupos luminal y no-luminal para estudiar la presencia de los biomarcadores en las pacientes con MC vs. aquellas que no habían desarrollado MC. Las covariables utilizadas fueron: edad (≥ 50 , 40-49, < 40), ganglios axilares positivos (0, 1-3, ≥ 4), Her2 (negativo, positivo) y presencia de metástasis pulmonar (no, sí), donde la primera categoría mencionada para cada variable fue la referencia. Se calculó la “Odds Ratio” asociada con el biomarcador, su intervalo de confianza del 95% y el valor p. En este análisis, la variable TN (no, sí) no fue incluida como una covariable debido a que se reportó negativa en todas las pacientes del grupo luminal. Además, el estado del Her2 no fue incluido como una covariable cuando la combinación de tres marcadores (GRP94 con FN14 y Her2) fue usada como biomarcador.

Por otro lado, la supervivencia libre de MC se estimó para cada grupo utilizando el método de Kaplan-Meier, y se comparó entre ellos utilizando el modelo de riesgos proporcionales de Cox (“Cox proportional hazards model”), estimando su ratio de riesgo (“hazard ratio”) y un intervalo de confianza del 95%.

En todos los análisis, las asociaciones se consideraron significativas cuando presentaban una $p < 0.05$.

Programa utilizado en los análisis: R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

MATERIAL Y MÉTODOS

5. RESULTADOS

5.1. OBTENCIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE METÁSTASIS CEREBRAL

Para nuestros estudios pusimos a punto dos métodos de inducción de la metástasis cerebral en ratones a partir de células metastásicas de origen humano: inyección intracardíaca en ventrículo izquierdo e inyección intracarotídea. El primer método (inyección intracardíaca) es más restrictivo, al vehiculizarse las células en el torrente sanguíneo y difundirse a todos los tejidos, y se utilizó para la selección de una variante altamente metastásica a cerebro. El segundo (inyección intracarotídea) permitía una mayor reproductibilidad del proceso de crecimiento metastásico, disminuyendo la variabilidad intraexperimental y la interexperimental, ya que los ratones evolucionaban de manera similar facilitándose la comparación entre respuestas terapéuticas o modificaciones génicas. La complejidad de la cirugía influyó en la mortalidad durante la inducción y en el período postoperatorio, siendo la mortalidad perioperatoria de los animales del 11% tras la inoculación en el ventrículo izquierdo y del 8% tras la inoculación en la arteria carótida.

5.1.1. SELECCIÓN DE CÉLULAS ALTAMENTE METASTÁSICAS EN CEREBRO: BR-eGFP-CMV/LUC-V5

Se transfectaron las células 435-Br1 para que expresaran de forma uniforme altas concentraciones de eGFP (BR-eGFP-CMV/Luc) y tras identificar por FACS las más positivas para la proteína verde (ver sección 4.1.1. de Material y Métodos) se utilizaron para la selección de células altamente metastásicas en cerebro, ya que tras la inyección eran fácilmente identificables en los tejidos al presentar la señal fluorescente.

Al inicio del proceso de selección, tras 4-6 semanas de la primera inyección en ventrículo izquierdo, aparecían signos de enfermedad, como pérdida de peso, hipomovilidad o tiraje intercostal, que obligaba al sacrificio de los animales. Una vez procesados los cerebros para la obtención de cultivos primarios, las células metastásicas presentes, fácilmente identificables por su fluorescencia (Figura 17), predominaban en el cultivo, y tras varias divisiones del mismo se conseguía

RESULTADOS

estabilizar el crecimiento exponencial del cultivo, momento en el cual las células eran reinoculadas nuevamente en el ventrículo izquierdo de nuevas hembras atímicas. Este procedimiento se repitió de forma cíclica hasta cinco veces (BR-V1 a BR-V5).

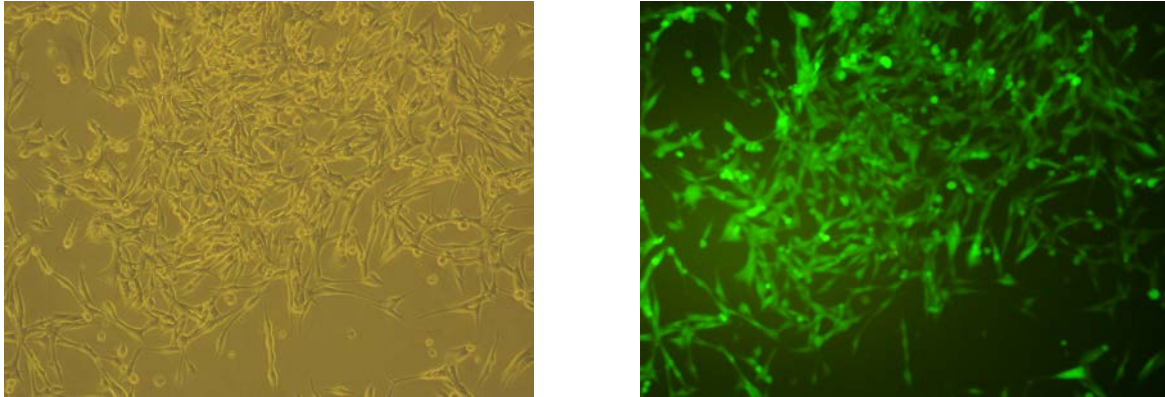


Figura 17. Células BR-eGFP-CMV/Luc en cultivo. Fenotipo fibroblástico de las células BR-eGFP-CMV/Luc bajo microscopio óptico (izquierda) y de fluorescencia (derecha), adquiridos a 20 X.

En los primeros pases con BR-V1 y BR-V2, la necropsia evidenció grandes metástasis mediastínicas macroscópicas en los animales inoculados, corroborado mediante fluorescencia, mientras que el cerebro y los pulmones sólo presentaban afectación microscópica y sin metástasis macroscópicas. Además, en el pase con BR-V2 también se observó una gran afectación macroscópica en forma de nódulos y masas en ovarios y glándulas suprarrenales. Posteriormente, observamos que los animales inoculados con las células BR-V3 en el ventrículo izquierdo presentaban una incidencia de afectación microscópica cerebral del 40%, pulmonar del 100%, hepática del 80% y mediastínica del 100% (Tabla 16). En este pase la afectación mediastínica era tanto microscópica como macroscópica, con presencia de conglomerados adenopáticos en todos los animales y ocasionando pérdida de peso asociada a dificultad respiratoria, siendo esto su principal causa de muerte, ya que en la necropsia no había metástasis macroscópicas pulmonares en ningún animal. En cambio, en el pase posterior con las células BR-V4 disminuyó la tendencia a formar metástasis micro y macroscópicas en los ganglios mediastínicos, presentándose en 4 animales de 6 inoculados (66.7%). Seguidamente, los animales inoculados con las células BR-V5 en la arteria carótida interna presentaban ya una

RESULTADOS

incidencia de afectación cerebral microscópica del 100%, mientras que la afectación pulmonar se mantenía igual (100%) y la afectación hepática y mediastínica se reducían al 20% y 60%, respectivamente (Tabla 16).

Tabla 16. Distribución de la incidencia de animales con presencia microscópica de células tumorales (BRV3 vs BRV5) en los órganos estudiados

	vía ventrículo izquierdo	vía arteria carótida interna
	V3 (n = 5)	V5 (n = 5)
	células GFP-Luc positivas	células GFP-Luc positivas
Cerebro	2 / 5 (40 %)	5 / 5 (100 %)
Pulmones	5 / 5 (100 %)	5 / 5 (100 %)
Hígado	4 / 5 (80 %)	1 / 5 (20 %)
Gl. Suprarrenales	1 / 5 (20 %)	3 / 5 (60 %)
Ovarios	2 / 5 (40 %)	2 / 5 (40 %)
Ganglios Mediastínicos	5 / 5 (100 %)	3 / 5 (60 %)
Ganglios Abdominales	1 / 5 (20 %)	1 / 5 (20 %)

Evolución del proceso in vivo tras la cuarta inoculación en ventrículo izquierdo de las células eGFP-CMV/Luc-V3 (BR-V3) y el resultado obtenido tras la primera inyección intracarotídea de las células BR-V5. El porcentaje de ratones afectados se evaluó demostrando la presencia de células tumorales fluorescentes a nivel microscópico en los distintos órganos extraídos. Martínez-Aranda A et al. Int J Mol Sci. 2013.

Un análisis posterior mostró, además, una diferencia en la supervivencia entre los animales de los pases con BR-V3 (vía ventrículo izquierdo) y BR-V5 (vía arteria carótida interna), ya que tras el pase por la arteria carótida se consiguió una menor afectación ganglionar mediastínica tanto micro como macroscópica, lo que supuso un aumento significativo de la supervivencia (Figura 18).

RESULTADOS

BR-eGFP-CMV/Luc	Vía de inoculación	Supervivencia Media (días) \pm SD
V3	Ventrículo izquierdo	33.8 \pm 10.9
V5	A. Carótida interna	60.8 \pm 13.8

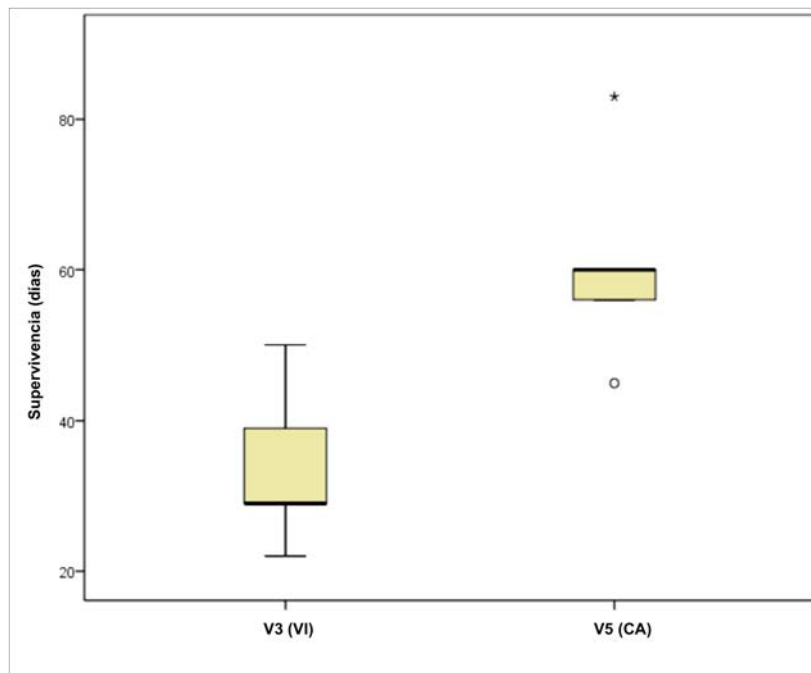


Figura 18. Supervivencia de los ratones en la mitad y final del procedimiento de selección. (Test Mann-Whitney, 2-tailed, $p=0.016$). Martínez-Aranda A et al. Int J Mol Sci. 2013.

Por tanto, este procedimiento de selección (ver sección 4.1.4. de Material y Métodos; Figura 11) dió como resultado una disminución progresiva en las metástasis mediastínicas y un aumento progresivo en la afectación cerebral, desde el primer hasta el quinto pase, compatible con organoespecificidad. Y como era de esperar, la inoculación de las células BR-V5 en la arteria carótida interna aplicando la técnica que habíamos optimizado (ver sección 4.1.7.2. de Material y Métodos; Figura 13), dió como resultado un 100% de eficiencia en cerebro, siendo estas células BR-eGFP-CMV/Luc V5CA (BRV5CA) las que utilizamos en las posteriores inoculaciones para los experimentos de radio-quimioterapia.

5.1.2. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA MODIFICADA DE INOCULACIÓN INTRACAROTÍDEA

Para comprobar la eficacia de los cambios introducidos en el procedimiento quirúrgico de inducción de MC, tras la extracción del cerebro y su lavado con solución salina se realizaron múltiples secciones del mismo, comprobándose en cortes seriados que había células fluorescentes en la luz de los vasos del parénquima cerebral (Figura 19), quedando así demostrada la llegada física de las células al interior de la microvasculatura.

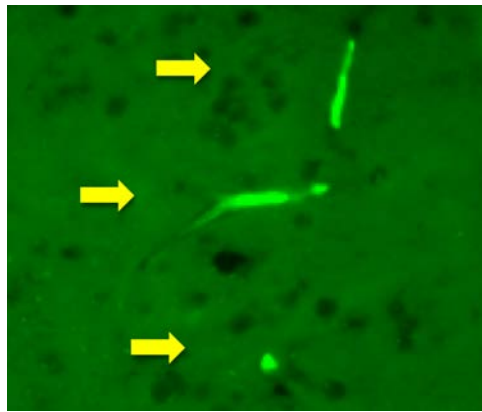


Figura 19. Imagen de fluorescencia del parénquima cerebral en ratones CD1. Presencia de fluorescencia en la luz de los microvasos cerebrales (flechas) a los cinco minutos de la inoculación celular en la arteria carótida interna (corte de 20 μm , a 40X). Martínez-Aranda A et al. Int J Mol Sci. 2013.

En una segunda etapa de la validación de la técnica para inducir MC se inocularon las células BRV5CA en un grupo de hembras atímicas, que se analizaron cada semana mediante imagen de RMN, en secuencias T2w y de alta resolución en los planos coronal y axial. Las imágenes obtenidas en los días 7, 14 y 21 post-inoculación no mostraron señales anormales en el cerebro ni tampoco hubo signos clínicos de enfermedad. En los días 29 y 35 post-inoculación, 2/6 ratones atímicos (~33%) presentaron lesiones visibles en las imágenes (Figura 20A), además de signos clínicos de afectación de su estado general, confirmándose histológicamente en el tejido de la necropsia la presencia de MC (Figura 20B). Estos resultados confirmaban que la técnica optimizada inducía MC que remedaba el proceso clínico, permitiendo el seguimiento “in vivo”.

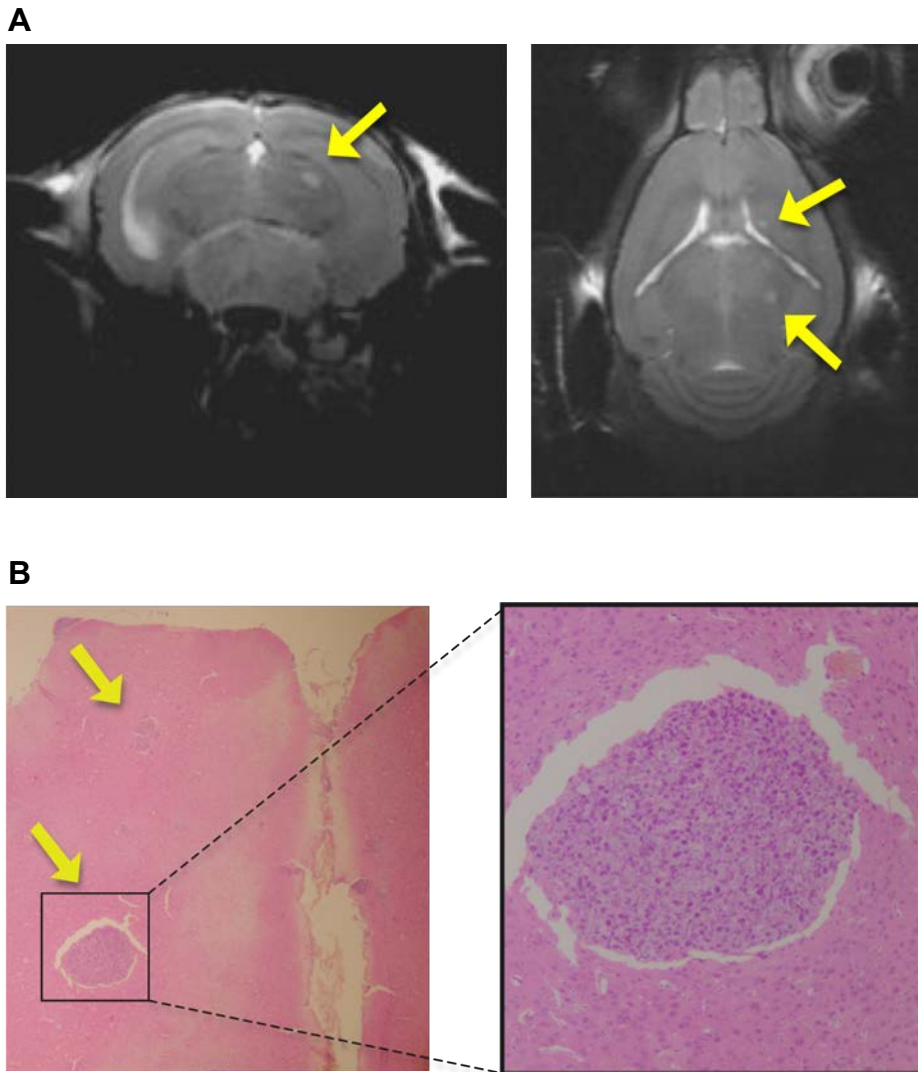


Figura 20. Imágenes de metástasis cerebral en ratones hembra atímicos. A. Imágenes por RMN, axial (izquierda) y coronal (derecha), de las lesiones en el hemisferio cerebral derecho (flechas). **B.** Imagen histológica de lesiones vistas al microscopio óptico (flechas) con tinción de H&E tras corte de 5 μ m de espesor a 4X de aumento (izquierda) y a 20X de aumento (derecha). Martínez-Aranda A et al. Int J Mol Sci. 2013.

5.2. OPTIMIZACIÓN DE LA RADIOTERAPIA EXPERIMENTAL

Una vez obtenido un modelo experimental de MC reproducible, el objetivo era tratar todo el cráneo de los ratones (irradiación holocraneal) con el esquema de tratamiento clásico para humanos, consistente en 3 Gy/fracción en 1 fracción/día y 5 días/semana, hasta completar una dosis total nominal de 30 Gy; en total 10 fracciones repartidas en dos semanas. Esta pauta terapéutica se llevó a cabo en dos cepas diferentes de ratones hembra: en ratones inmunocompetentes CD1 y en

RESULTADOS

ratones inmunodeprimidos Balb-c nude, con el fin de analizar si la sensibilidad a la radiación de sendas cepas podía condicionar su tolerancia a esta pauta y, en consecuencia, su supervivencia. A tal efecto, los animales se monitorizaron periódicamente, registrándose el peso y su estado general durante todo el procedimiento y hasta el día de la muerte por sacrificio, que se realizó en cada caso atendiendo a la evolución clínica de cada uno (Tabla 17).

Tabla 17. Evolución del peso medio (gr.) en ratones hembra CD1 y Balb-c nude sometidos a irradiación craneal con 30 Gy

		CD1		Balb-c nude	
		Controles (n=6)	30 Gy (n=6)	Controles (n=3)	30 Gy (n=4)
Días post- tratamiento	pre- tratamiento	35.0 ± 7.0	36.1 ± 3.7	22.7 ± 0.6	21.9 ± 1.0
	+4	33.9 ± 5.1	33.0 ± 3.1	22.8 ± 0.6	20.6 ± 0.1
	+7	34.4 ± 4.8	33.5 ± 3.2	23.2 ± 0.7	22.5 ± 0.6
	+12	34.9 ± 6.3	33.5 ± 2.2	23.2 ± 0.6	23.1 ± 0.8
	+17	36.4 ± 6.2	34.7 ± 2.6	23.4 ± 0.8	22.7 ± 1.0
	+28	37.3 ± 7.6	34.7 ± 2.4	23.3 ± 0.6	22.1 ± 0.8
	+55	40.4 ± 9.2	29.8 ± 5.0	23.8 ± 0.9	18.7 ± 2.4
	+123	42.7 ± 10.4	39.6 ± 4.0	--	--

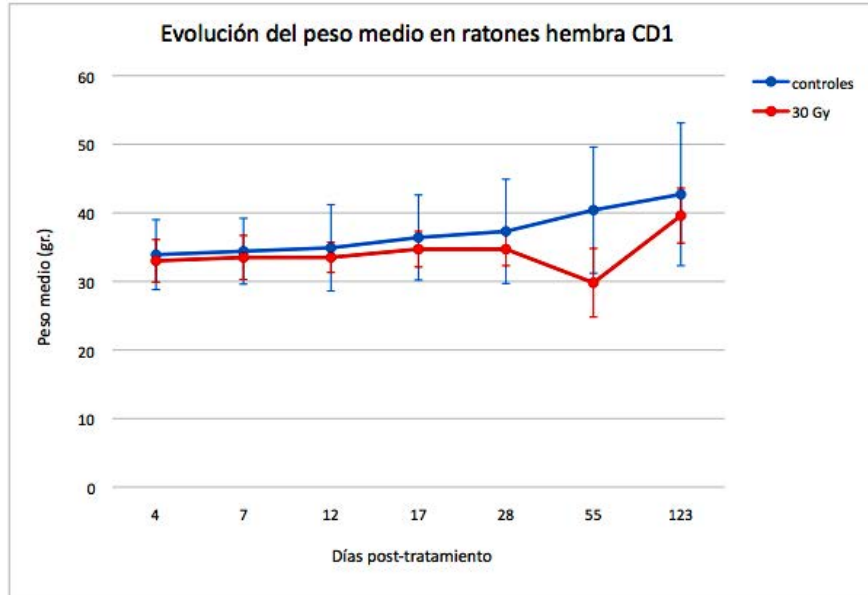
Valores medios del peso en gramos ± SD

En el caso de los ratones CD1, no hubo diferencias en la evolución del peso medio entre el grupo control y el sometido a 30 Gy durante su período de seguimiento de 4 meses (Figura 21A), llegando a sobrevivir los animales de ambos grupos hasta ocho meses tras el tratamiento. En todo este tiempo, los animales irradiados sólo presentaron opacidades corneales bilaterales como efecto secundario. En cambio,

RESULTADOS

los pesos medios de los ratones Balb-c nude irradiados disminuyeron, sobreviviendo sólo entre 55 y 60 días (Figura 21B).

A



B

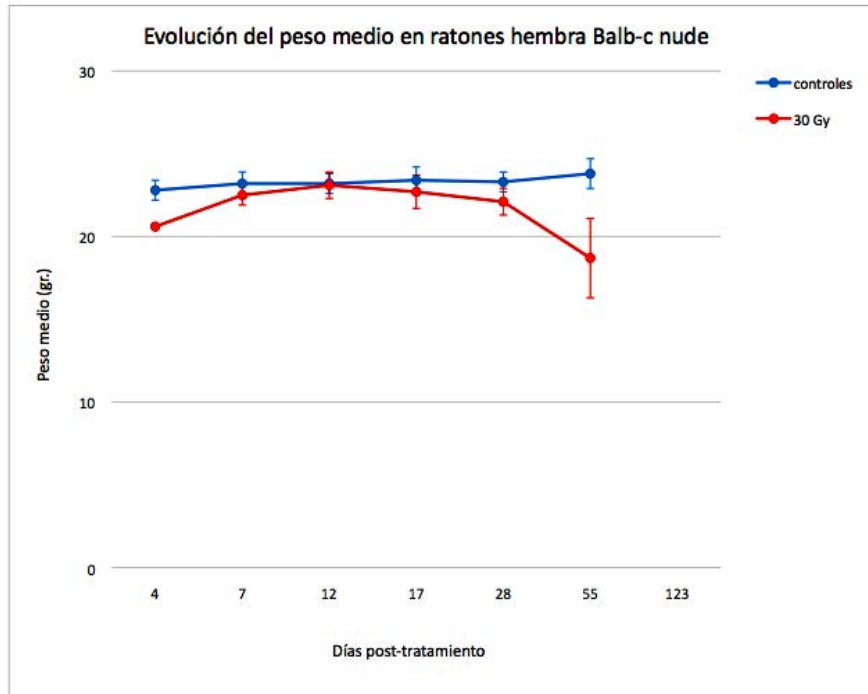


Figura 21. Evolución del peso medio en ratones hembra CD1 y Balb-c nude tras la irradiación craneal. Ratones sometidos a irradiación craneal con el mismo esquema (dosis total: 30 Gy) utilizando nuestro modelo de irradiación. **A.** Ratones CD1 (inmunocompetentes). **B.** Ratones Balb-c nude (inmunodeprimidos).

RESULTADOS

A pesar de la diferente sensibilidad de ambas cepas de ratones a un mismo esquema de tratamiento, el análisis histológico del cerebro de los ratones CD1 y Balb-c nude no mostró diferencias estructurales microscópicas entre los animales control y los irradiados. Estos resultados constataban una mayor sensibilidad de los ratones Balb-c nude y nos obligó a elegir una cepa de ratones inmunodeprimidos en general más resistentes, como son los atímicos, y a proponer un nuevo esquema de irradiación craneal.

Para el diseño de un nuevo esquema de irradiación se utilizó el concepto de Dosis Efectiva Biológica (BED), descrito en un modelo matemático clásico de “dosis - supervivencia celular a la radiación” llamado Modelo Lineal Cuadrático ²¹¹⁻²¹⁶ (ver Anexo 10.2.), que nos permite calcular el cambio de fraccionamiento entre dos esquemas de tratamiento manteniendo el mismo isoeffecto, tanto en el tumor como en el tejido sano, así como calcular la BED para diferentes esquemas de tratamiento y para tejidos con diferente tasa de recambio celular (ver Anexo 10.3.).

Al tener como premisa que el tratamiento se debía administrar en tres días, se preseleccionaron diferentes esquemas con el mismo número de fracciones ($n= 3$) y se calcularon sus respectivas BED (ver Anexo 10.3.). Así, para no correr riesgos con los animales, se seleccionó un esquema cuya BED para el tejido de recambio lento (tejido nervioso) fuera inferior a 50 Gy y cuya BED para tejido de recambio rápido (tumor, metástasis) fuera lo suficientemente grande como para evaluar la respuesta de la MC por imagen. Así pues, con este criterio, se propuso un esquema de 5.5 Gy/fracción en 3 fracciones hasta una dosis total nominal de 16.5 Gy, con BED para tejido de recambio rápido de 25.6 Gy y con BED para tejido de recambio lento de 46.7 Gy (ver Anexo 10.3.).

Este nuevo esquema de irradiación, se probó de forma preliminar en un grupo de ratones hembra atímicos Nude-Foxn1nu, con un rango de peso entre 27.1 y 31.7 gr. (peso medio: 28.7 ± 2.6) constatando que tanto el control como el grupo de los animales irradiados sobrevivieron más de 60 días tras el tratamiento (Figura 22).

RESULTADOS

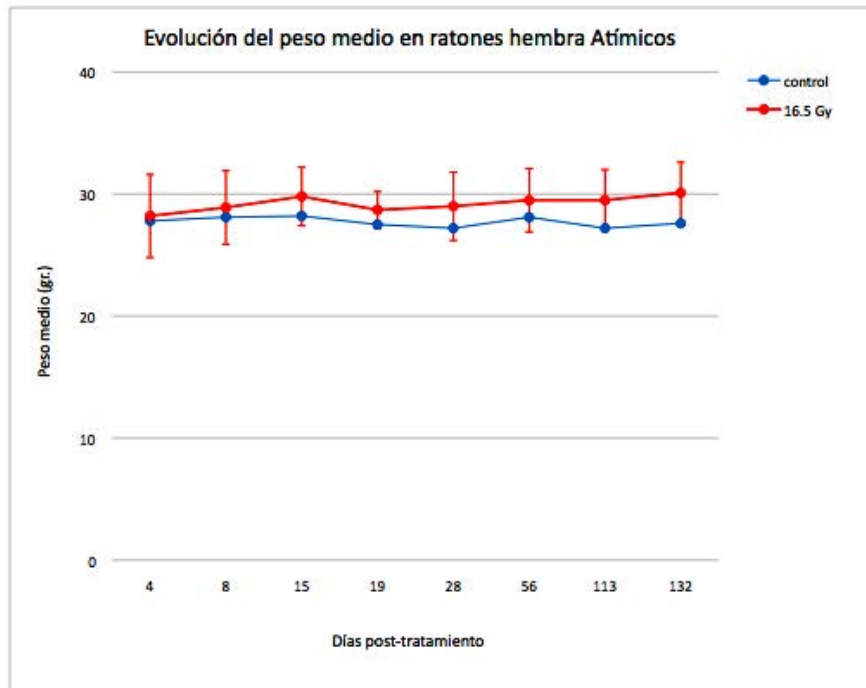


Figura 22. Evolución del peso medio en ratones hembra Atímicos Nude-Foxn1nu tras la irradiación craneal. El esquema de irradiación craneal utilizado consistía en 5.5Gy/fracción en 3 fracciones (dosis total de 16.5Gy), siguiendo la pauta optimizada en experimentos anteriores.

5.3. RADIO-QUIMIOTERAPIA EXPERIMENTAL Y SEGUIMIENTO “IN VIVO” POR BIOLUMINISCENCIA

Una vez validados tanto nuestra técnica de inoculación intracarotídea para la inducción de MC en ratones hembra atímicos como el modelo y esquema de irradiación craneal, se diseñó un experimento con el objetivo de estudiar “in vivo” la respuesta a un tratamiento combinado de quimioterapia oral con radioterapia craneal, estandarizando el modelo pre-clínico que imitaba una situación clínica. Para ello, los animales se inocularon con células BR-eGFP-CMV/Luc V5CA (BRV5CA), que tenían incorporado el gen de la luciferasa y podían emitir actividad bioluminiscente en presencia del sustrato luciferina, lo que facilitaba hacer el seguimiento. A efectos de randomizar la terapia, se diseñó un protocolo de tratamiento en el cual se dividieron aleatoriamente los animales en tres grupos (Figura 23): grupo “control” (n=5), grupo de “radioterapia sola” (n=10) y grupo de “radioterapia con TMZ” (n=10). El tratamiento se planificó en 5 días consecutivos. Al

RESULTADOS

grupo “control” se le administró 20 µl de DMSO y 180 µl de suero salino fisiológico, con un volumen final de 200 µl, cada día durante los 5 días (días 1 a 5 del protocolo). A los animales pertenecientes a los grupos de irradiación, se les aplicó el siguiente esquema: 5.5 Gy/fracción en 1 fracción/día y 3 días consecutivos (días 2 a 4 del protocolo), completando una dosis total de 16.5 Gy. Además, a los animales del grupo de “radioterapia con TMZ” se les administró el fármaco quimioterápico vía oral 60 mg/Kg/día en un volumen final de 200 µl, 20 µl de solución de TMZ con DMSO y 180 µl de suero salino fisiológico, durante los 5 días (días 1 a 5 del protocolo), utilizando un catéter flexible y estéril intragástrico (Instech Solomon, Plymouth, PA, USA). En este último grupo la TMZ se administró 1 hora antes de la irradiación craneal.

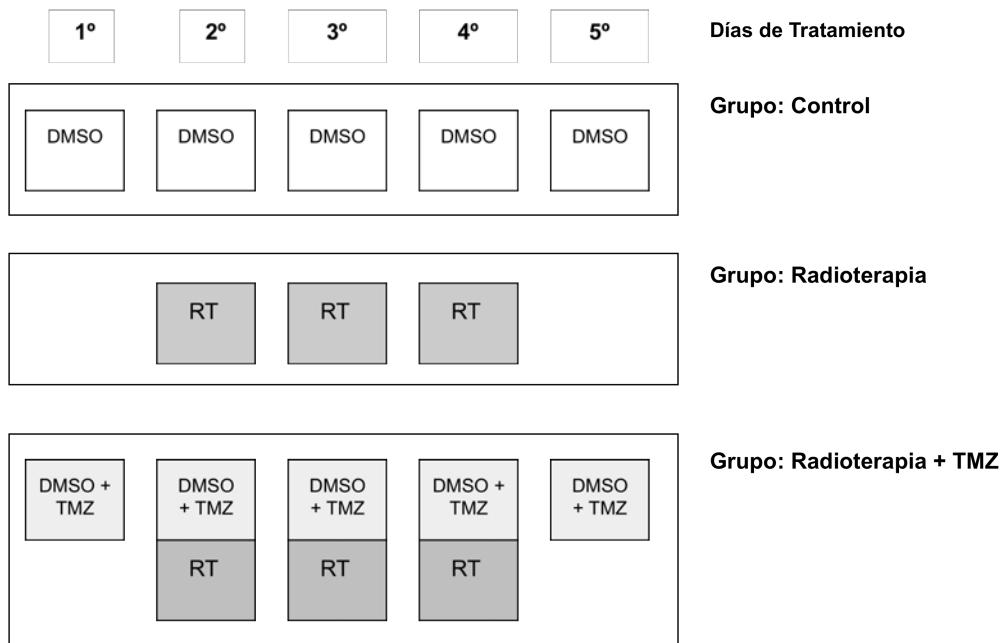


Figura 23. Esquema del protocolo del tratamiento combinado. Esquema de tratamiento administrado en los diferentes grupos de estudio, correspondiendo el día 1 del protocolo de tratamiento al día 26 post-inoculación, momento en el que se empezó a apreciar señal de bioluminiscencia craneal. DMSO: Dimetilsulfóxido. RT: Radioterapia. TMZ: Temozolomida. Martínez-Aranda A et al. Int J Mol Sci. 2013.

Después de las inoculaciones intracarótídeas, se dejaron pasar 14 días para que los animales se recuperasen. La Figura 24 muestra la evolución de la carga metastásica craneal con bioluminiscencia desde el primer día de aplicación del protocolo y a lo largo del seguimiento en los tres grupos de estudio.

RESULTADOS

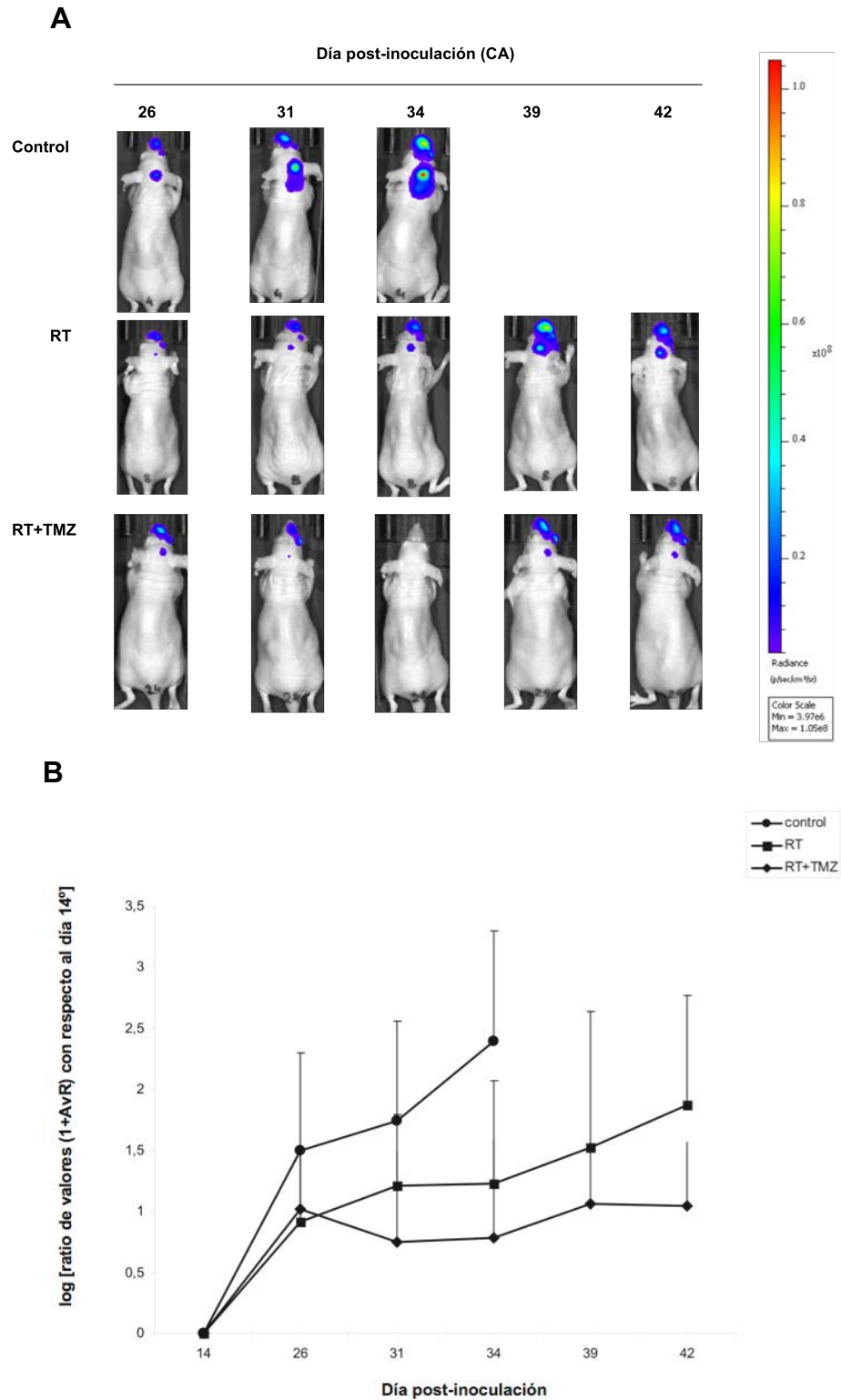


Figura 24. Evolución de la bioluminiscencia tras la aplicación del protocolo de tratamiento. A. Imágenes representativas de la evolución de la bioluminiscencia craneal de un animal de cada grupo de tratamiento, obtenidas desde el día 26 post-inoculación (día 1 del protocolo). El número de fotones estaba expresado en fotones por segundo (p/s) y el parámetro elegido para evaluar el tratamiento fue el “Average Radiance (AvR)” (p/s/cm²/sr), teniendo en cuenta en la cuantificación la media de fotones por pixel en el área de interés. **B.** Gráfica que muestra el grado de señal expresado como el log del ratio de valores (1+AvR), obtenido de forma normalizada en cada grupo de tratamiento tras cada evaluación con respecto al día 14 post-inoculación (primer día de adquisición de imágenes sin apreciarse señal craneal). Martínez-Aranda A et al. Int J Mol Sci. 2013.

RESULTADOS

Así, el primer día de adquisición de imagen de bioluminiscencia fue el día 14 post-inoculación, no observándose señal en el cráneo que indicara actividad metastásica. El día 26 post-inoculación ya se apreciaba señal bioluminiscente compatible con actividad de crecimiento celular a nivel craneal, momento en el cual se inició el tratamiento (día 1 del protocolo). Tras finalizar el tratamiento el día 30 post-inoculación (día 5 del protocolo), se siguió la evolución de la señal de bioluminiscencia craneal en los tres grupos de animales, comparándose los grupos tratados con el grupo control, el cual sólo recibió oralmente el vehículo DMSO. El seguimiento se realizó hasta el día 42 post-inoculación. La carga metastásica craneal fue más evidente en el grupo “control” a partir del día 34 post-inoculación, momento en que los animales se iban muriendo, y se continuó registrando sólo las diferencias de bioluminiscencia entre el grupo de “radioterapia sola” y el de “radioterapia con TMZ” (Figura 24). También se observó señal bioluminiscente en el hocico de la mayoría de animales de los grupos de estudio, confirmándose la presencia microscópica de células fluorescentes tras el sacrificio. No obstante, en ningún animal este hallazgo supuso la aparición de masas macroscópicas que dificultaran la alimentación y, en consecuencia, comprometieran su supervivencia. En la Tabla 18 se muestran los valores obtenidos al comparar la carga metastásica craneal media de los ratones entre los grupos de tratamiento durante los días de evaluación.

Tabla 18. Comparación de los valores de p (“p-value”) en referencia a la carga metastásica entre los diferentes grupos durante el seguimiento

Día	26	31	34	39	42
control vs RT	0.2039	0.2348	0.0526	-	-
control vs RT+TMZ	0.2639	0.0552	0.0115 (*)	-	-
RT vs RT+TMZ	0.7024	0.1813	0.3024	0.3337	0.0589

Valores de p (“p-value”) obtenidos de acuerdo a la carga metastásica media apreciada en las imágenes de bioluminiscencia en el cerebro de los animales de cada grupo a lo largo de los diferentes días de seguimiento tras la inoculación intracarotídea. Grupo “control” (n=5); Grupo “radioterapia sola” (n=7; ya que un animal de este grupo murió en el post-operatorio y dos durante el tratamiento) y Grupo “radioterapia con TMZ” (n=9; ya que un animal de este grupo murió durante la inoculación). Test t-Student; 2-tailed. (*): Diferencia significativa. Martínez-Aranda A et al. Int J Mol Sci. 2013.

RESULTADOS

Se aprecia una diferencia, aunque no significativa ($p=0.0552$) en la captación de señal entre los animales del grupo “control” y los sometidos a “radioterapia con TMZ” en el día 31 post-inoculación, pasando a ser esta diferencia significativa ($p=0.0115$) en el día 34 post-inoculación. Asimismo, la comparación entre los grupos “control” vs “radioterapia sola” por un lado y entre los grupos “radioterapia sola” vs “radioterapia con TMZ” por otro, muestran una diferencia, aunque no significativa, en el día 34 ($p=0.0526$) y en el día 42 ($p=0.0589$) post-inoculación, respectivamente.

Por otra parte, analizando la supervivencia entre los tres grupos de animales estudiados (Figura 25), observamos diferencia en los ratones tratados con “radioterapia sola” con respecto a los “controles” (60.29 ± 8.65 vs. 47.20 ± 11.14 días), aunque no significativa (“control” vs. “radioterapia sola”: Log Rank -Mantel-Cox-: Chi-Square 2.456; $df = 1$; $p = 0.117$). La supervivencia fue también mayor en el grupo de “radioterapia con TMZ” con respecto al de “radioterapia sola” (121.56 ± 52.53 vs. 60.29 ± 8.65 días) y de forma significativa (“radioterapia sola” vs. “radioterapia con TMZ”: Log Rank -Mantel-Cox-: Chi-Square 13.669; $df = 1$; $p < 0.001$). Finalmente, se demostró también un aumento significativo de la supervivencia en el grupo “radioterapia con TMZ” con respecto al grupo “control” (“control” vs. “radioterapia con TMZ”: Log Rank -Mantel-Cox-: Chi-Square 16.649; $df = 1$; $p < 0.001$).

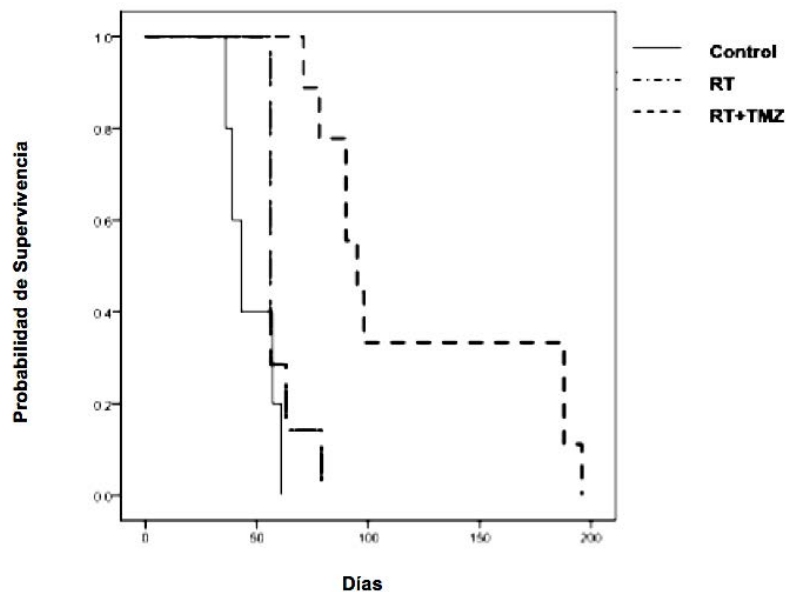


Figura 25. Curvas de supervivencia de los animales de los tres grupos a estudio. (Método Kaplan-Meier: Log Rank -Mantel-Cox-; Chi-Square 22.022; $df = 2$; $p < 0.001$). Martínez-Aranda A et al. Int J Mol Sci. 2013.

Estos resultados muestran el beneficio de la combinación terapéutica propuesta de TMZ con el esquema corto de radioterapia para tratar de manera eficaz las MC inducidas con las células BRV5CA.

5.4. ESTUDIO CLÍNICO

5.4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LAS PACIENTES

Se reclutaron para el estudio 318 pacientes diagnosticadas de carcinoma infiltrante de mama, de las que se recogió el seguimiento clínico y las características clínico-patológicas.

Como se describe en la Tabla 19, el rango de edad de las pacientes era de 24 a 88 años (edad media: 55 años). El 64.2% de las pacientes (n=204) tenían 50 años o más. El rango del período de seguimiento fue de 8 a 146 meses (seguimiento medio: 76.6 meses). Sólo el 3.1% (n=10) tenía metástasis a distancia (M1) en el momento del diagnóstico.

En relación a los tratamientos recibidos, esquemas con quimioterapia neoadyuvante se administraron en el 29% de las pacientes (n=91/314): taxanos (paclitaxel o docetaxel) en 17 pacientes, de las cuales taxanos sólo en 1, en 14 se combinó con antraciclinas y en 2 con antraciclinas y gemcitabina; 71 recibieron sólo antraciclinas y 3 CMF (Ciclofosfamida con Metotrexate y 5-Fluorouracilo).

El 98.4% de las pacientes (n=313/318) se sometieron a cirugía, recibiendo tratamiento conservador de la mama el 73.3% de ellas (n=233) y mastectomía el 25.1% (n=80). Las cinco pacientes restantes que no se intervinieron quedaron excluidas, por definición, de los tratamientos adyuvantes.

Tras la cirugía, el 62.9% (n=193/307) de las pacientes recibió quimioterapia adyuvante, administrándose esquemas con taxanos en 33 pacientes (10.8%), de las cuales 21 recibieron sólo taxanos y 12 recibieron taxanos con antraciclinas. Esquemas sin taxanos se administraron a 160 pacientes (52.1%), de las cuales 68

RESULTADOS

recibieron esquema CMF, 32 recibieron sólo antraciclinas y 60 recibieron antraciclinas con CMF.

La hormonoterapia adyuvante se administró en el 65.1% de las pacientes (n=203/312), de las cuales 170 (54.5%) recibieron tamoxifeno y las 33 restantes (10.6%) otros antiestrógenos, como anastrozol en 11, letrozol en 10, exemestano en 9, toremifeno en 1, tamoxifeno con exemestano en 1, y letrozol con análogos LHRH en 1.

Por otro lado, cabe resaltar que sólo el 1% de las pacientes (n=3/313) recibió trastuzumab en régimen adyuvante, debido a la fecha en la que se habían diagnosticado la mayoría de pacientes, ya que el trastuzumab se aprobó por la FDA en Estados Unidos en 1998 para el tratamiento del cáncer de mama metastásico en pacientes Her2-positivo, como agente único o tras quimioterapia ^{217,218}, siendo incluido posteriormente en las guías clínicas de NCCN ²¹⁹.

La radioterapia postoperatoria se administró al 84.3% (n=264/313) de las pacientes, en toda la mama afecta tras la cirugía conservadora a una dosis total de 50 a 50.4 Gy y con un fraccionamiento estándar de 1.8 a 2 Gy/fracción, o bien, cuando había indicación, en la pared torácica tras mastectomía utilizando el mismo esquema. La sobreimpresión del lecho tumoral o pared torácica con una dosis adicional de 10 a 20 Gy a 2 Gy/fracción, así como la irradiación de los ganglios linfáticos regionales a dosis total de 50 a 50.4 Gy con un fraccionamiento estándar de 1.8 a 2 Gy/fracción, se realizaron en los casos en que se requería.

Respecto a las recidivas, la recaída local ocurrió en el 11.9% de las pacientes (n=38/318), mientras que la recaída en los ganglios linfáticos regionales ocurrió en el 5.3% (n=17/318). Por otro lado, la recaída metastásica a distancia (M1) ocurrió en el 43.4% (n=138/318) de las pacientes, de las cuales 89 (64.5%) desarrollaron metástasis óseas, 84 (60.9%) metástasis cerebrales (MC), 54 (39.1%) metástasis hepáticas, 47 (34.1%) metástasis pulmonares, y 40 (29.0%) metástasis ganglionares no-regionales.

RESULTADOS

Tabla 19. Características Clínicas

Características	Pacientes Totales (N = 318)	
	N	(%)
Año de Diagnóstico	1989 - 2009	
Edad al Diagnóstico (años)	Media: 55 Rango: 24 - 88	
Seguimiento (meses)	Media: 76.6 Rango: 8 - 146	
Grupos de Edad (años)	318	
< 40	34	(10.7)
40 - 49	80	(25.1)
≥ 50	204	(64.2)
Metástasis (M1) al Diagnóstico	318	
No	308	(96.9)
Sí	10	(3.1)
Quimioterapia Neoadyuvante	314	
No	223	(71.0)
Taxanos	17	(5.4)
No-taxanos	74	(23.6)
datos perdidos	4	
Cirugía	318	
No	5	(1.6)
Tumorectomía (T)	1	(0.3)
Mastectomía (M)	0	(0.0)
T + Linfadenectomía Axilar	129	(40.6)
M + Linfadenectomía Axilar	76	(23.9)
T + Ganglio Centinela	103	(32.4)
M + Ganglio Centinela	4	(1.2)
Quimioterapia Adyuvante	307	
No	114	(37.1)
Taxanos	33	(10.8)
No-taxanos	160	(52.1)
datos perdidos	6	
*excluidos	5	
Hormonoterapia Adyuvante	312	
No	109	(34.9)
Tamoxifeno	170	(54.5)
Otros	33	(10.6)
datos perdidos	1	
*excluidos	5	
Trastuzumab Adyuvante	313	
No	310	(99.0)
Sí	3	(1.0)
*excluidos	5	
Radioterapia Postoperatoria	313	
No	49	(15.7)
Sí	264	(84.3)
*excluidos	5	

RESULTADOS

Tabla 19. (continuación)

Características	Pacientes Totales (N = 318)	
	N	(%)
Recidiva Local	318	
No	280	(88.1)
Sí	38	(11.9)
Recidiva Regional (N)	318	
No	301	(94.7)
Sí	17	(5.3)
Metástasis a Distancia (M1)	318	
No	180	(56.6)
Sí	138	(43.4)
Localización de las M1	138	
Hueso	89	(64.5)
Cerebro	84	(60.9)
Hígado	54	(39.1)
Pulmón	47	(34.1)
Ganglios Linfáticos no-regionales	40	(29.0)
Pleura	19	(13.8)
Piel	12	(8.7)
Meninges	9	(6.5)
Tejido Blando	7	(5.1)
Glándula Suprarrenal	5	(3.6)
Médula Ósea	4	(2.9)
Peritoneo	2	(1.4)
Pericardio	2	(1.4)
Ovario	2	(1.4)
Coroides	2	(1.4)
Médula Espinal	1	(0.7)
Cérvix	1	(0.7)

* En referencia a aquellas pacientes que no recibieron tratamiento adyuvante debido a que no se sometieron a cirugía.

Otras localizaciones metastásicas menos frecuentes fueron: pleura (13.8%), piel (8.7%), meninges (6.5%), tejidos blandos (5.1%), glándulas suprarrenales (3.6%), médula ósea (2.9%), peritoneo (1.4%), pericardio (1.4%), ovario (1.4%), coroides (1.4%), médula espinal (0.7%) y cérvix (0.7%).

Más de la mitad de las pacientes (56.6%; n=180/318) no presentaron progresión metastásica a distancia a lo largo del seguimiento (Tabla 19).

RESULTADOS

En referencia a las características patológicas (Tabla 20), en el 58.4% de las pacientes (n=174/298) el tamaño del tumor primario era inferior o igual a 20 mm y en el 41.6% restante era superior o igual a 21 mm.

Respecto al grado histológico (GH), sólo el 5.7% de las muestras (n=17/296) eran GH 1, mientras que el 49.0% eran GH 2 y el 45.3% GH 3.

El tipo histológico de carcinoma ductal infiltrante fue el más representativo (94.1%; n=299/318), seguido por el tipo lobular en el 5% (n=16), mucinoso en el 0.6% (n=2) y medular en el 0.3% (n=1).

El 50.7% (n=155/306) no presentaban afectación ganglionar axilar, el 27.1% presentaban de 1 a 3 ganglios afectados y el 22.2% tenían 4 o más ganglios afectados.

En cuanto a los receptores hormonales, los receptores estrogénicos (RE) eran positivos en el 74.7% (n=227/304), y los receptores de progesterona (RP) eran positivos en el 65.9% (n=197/299).

El marcador de proliferación Ki-67 se determinó en 179 pacientes, de las cuales el 52.0% (n=93) tenía un índice inferior al 14%, mientras que en el 48.0% restante el índice era igual o superior al 14%.

Por otro lado, sólo el 14.2% (n=42/296) tenía sobreexpresión de Her2. Y la determinación de los receptores hormonales junto con la de Her2 definió a las pacientes "triple-negativo" (TN), que representaban el 15.6% (n=47/302).

Como se muestra en la Tabla 20, la clasificación de las pacientes atendiendo al subtipo molecular se pudo realizar en 211 casos, de los cuales el 40.3% (n=85) correspondían al subtipo "Luminal A" (RE positivo, Ki-67 inferior a 14% y expresión normal de Her2); el 18.5% (n=39) eran "Luminal B" (RE positivo, Ki-67 superior o igual a 14% y expresión normal de Her2); el 9.0% (n=19) era del subtipo "Luminal/Her2+" (RE positivo y sobreexpresión de Her2); el 10.0% (n=21) era "Her2-

RESULTADOS

enriched” (RE negativo y sobreexpresión de Her2) y el 22.2% (n=47) eran del subtipo “Triple-negativo” (RE negativo, RP negativo y expresión normal de Her2).

Tabla 20. Características Patológicas y Subtipos Moleculares

Características	Pacientes Totales (N = 318)	
	N	(%)
Tamaño Tumor (mm)	298	
≤ 20	174	(58.4)
≥ 21	124	(41.6)
datos perdidos	15	
*excluidos	5	
Grado Histológico	296	
1	17	(5.7)
2	145	(49.0)
3	134	(45.3)
datos perdidos	22	
** Tipo Histológico	318	
Ductal	299	(94.1)
Lobular	16	(5.0)
Mucinoso	2	(0.6)
Medular	1	(0.3)
Ganglios Axilares Positivos	306	
0	155	(50.7)
1 - 3	83	(27.1)
≥ 4	68	(22.2)
datos perdidos	7	
*excluidos	5	
Receptores Estrógenos	304	
Negativos	77	(25.3)
Positivos	227	(74.7)
datos perdidos	14	
Receptores Progesterona	299	
Negativos	102	(34.1)
Positivos	197	(65.9)
datos perdidos	19	

RESULTADOS

Tabla 20. (continuación)

Características	Pacientes Totales (N = 318)	
	N	(%)
Índice Ki-67 (%)	179	
< 14	93	(52.0)
≥ 14	86	(48.0)
datos perdidos	139	
Triple Negativo	302	
No	255	(84.4)
Sí	47	(15.6)
datos perdidos	16	
Her 2	296	
Negativo	254	(85.8)
Positivo	42	(14.2)
datos perdidos	22	
Subtipo Molecular	211	
Luminal A	85	(40.3)
Luminal B	39	(18.5)
Lum / Her 2+	19	(9.0)
Her 2-enriched	21	(10.0)
Triple negativo	47	(22.2)
***excluidos	107	

* En referencia a aquellas pacientes no sometidas a cirugía. ** El Tipo Histológico se obtuvo mediante análisis de pieza quirúrgica y/o biopsia. *** En referencia a aquellas pacientes cuyo Subtipo Molecular no fue posible valorar debido a la falta de datos inmunohistoquímicos completos.

5.4.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS ATENDIENDO A LOS SUBTIPOS MOLECULARES

Clínicamente resulta útil la clasificación del carcinoma de mama atendiendo a los subtipos definidos anteriormente, ya que el tratamiento y la evolución de las pacientes vienen determinados en gran parte por las características moleculares del tumor.

En nuestra serie, debido a su limitado tamaño, establecimos dos grupos principales de pacientes: **1.** Pacientes pertenecientes al que denominamos grupo Luminal, aquellas cuyos tumores primarios tenían RE positivos. **2.** Pacientes pertenecientes al

RESULTADOS

que denominamos grupo no-Luminal, aquéllas cuyos tumores primarios tenían RE negativos.

Como se muestra en la Tabla 21, hay parámetros clínico-patológicos que presentaban diferencias entre las pacientes del grupo Luminal con respecto a las del grupo no-Luminal.

Así, el 32.61% de las pacientes del grupo Luminal y el 55.56% de las del grupo no-Luminal tenían un tamaño de tumor primario superior o igual a 21 mm ($p=0.002$).

En cuanto al grado histológico, también los tumores de GH 3 eran más frecuentes en el grupo no-Luminal (81.25% vs. 32.12%; $p<0.0001$); y la afectación ganglionar regional con 4 o más ganglios axilares positivos era también mayor en el grupo no-Luminal (35.39% vs. 14.39%; $p=0.0008$).

En relación al tratamiento, hay que mencionar que el 18.18% de las pacientes del grupo Luminal recibió quimioterapia neoadyuvante vs. el 41.79% de las del grupo no-Luminal ($p=0.0002$).

La cirugía conservadora se realizó en el 83.22% de las pacientes del grupo Luminal vs. el 55.88% de las del grupo no-Luminal ($p<0.0001$).

En relación a la quimioterapia adyuvante, el 55.24% de las pacientes del grupo Luminal la recibió vs. el 81.97% de las del grupo no-Luminal ($p=0.001$).

Por otro lado, el 85.92% de las pacientes del grupo Luminal recibieron hormonoterapia adyuvante vs. el 6.06% de las del grupo no-Luminal ($p<0.0001$), siendo el tamoxifeno el antiestrógeno más utilizado en los dos grupos.

Finalmente, las recaídas clínicas fueron menos frecuentes en las pacientes del grupo Luminal que en las del grupo no-Luminal, tanto las locales (8.39% vs. 19.12%, $p=0.024$), como las regionales (1.40% vs. 16.18%, $p<0.0001$) y las producidas a distancia (27.27% vs. 73.53%, $p<0.0001$).

RESULTADOS

Tabla 21. Características de las pacientes con cáncer de mama de acuerdo con los grupos Luminal vs No-Luminal

Características	* Pacientes (N=211)				valor -p
	** Grupo Luminal (N=143)		*** Grupo No-Luminal (N=68)		
	N	(%)	N	(%)	
Grupos de Edad (años)	143		68		
< 40	15	(10.49)	7	(10.29)	
40 - 49	41	(28.67)	15	(22.06)	
≥ 50	87	(60.84)	46	(67.65)	0.57
datos perdidos	0		0		
Tamaño Tumor (mm)	138		63		
≤ 20	93	(67.39)	28	(44.44)	
≥ 21	45	(32.61)	35	(55.56)	0.002
datos perdidos	5		5		
Grado Histológico	137		64		
1	6	(4.38)	0	(0.00)	
2	87	(63.50)	12	(18.75)	
3	44	(32.12)	52	(81.25)	<0.0001
datos perdidos	6		4		
Tipo Histológico	143		68		
Ductal	136	(95.10)	68	(100.00)	
Lobular	5	(3.50)	0	(0.00)	
Otros	2	(1.40)	0	(0.00)	0.18
datos perdidos	0		0		
Ganglios Axilares Positivos	139		65		
0	87	(62.59)	25	(38.46)	
1 - 3	32	(23.02)	17	(26.15)	
≥ 4	20	(14.39)	23	(35.39)	0.0008
datos perdidos	4		3		
Quimioterap. Neoadyuvante	143		67		
No	117	(81.82)	39	(58.21)	
Taxanos	4	(2.80)	10	(14.92)	
No-Taxanos	22	(15.38)	18	(26.87)	0.0002
datos perdidos	0		1		
Cirugía	143		68		
No	0	(0.00)	2	(2.94)	
Conservadora	119	(83.22)	38	(55.88)	
Mastectomía	24	(16.78)	28	(41.18)	<0.0001
datos perdidos	0		0		

RESULTADOS

Tabla 21. (continuación)

Características	* Pacientes (N=211)				valor -p
	** Grupo Luminal (N=143)		*** Grupo No-Luminal (N=68)		
	N	(%)	N	(%)	
Quimioterap. Adyuvante	143		61		
No	64	(44.76)	11	(18.03)	
Taxanos	15	(10.49)	9	(14.76)	
No-Taxanos	64	(44.75)	41	(67.21)	0.001
datos perdidos	0		7		
Hormonoterap. Adyuvante	142		66		
No	20	(14.08)	62	(93.94)	
Tamoxifeno	103	(72.54)	4	(6.06)	
Otros	19	(13.38)	0	(0.00)	<0.0001
datos perdidos	1		2		
Radioterap. Postoperatoria	143		66		
No	18	(12.59)	11	(16.67)	
Sí	125	(87.41)	55	(83.33)	0.43
datos perdidos	0		2		
Recidiva Local	143		68		
No	131	(91.61)	55	(80.88)	
Sí	12	(8.39)	13	(19.12)	0.024
datos perdidos	0		0		
Recidiva Regional (N)	143		68		
No	141	(98.60)	57	(83.82)	
Sí	2	(1.40)	11	(16.18)	<0.0001
datos perdidos	0		0		
Metástasis a Distancia (M1)	143		68		
No	104	(72.73)	18	(26.47)	
Sí	39	(27.27)	50	(73.53)	<0.0001
datos perdidos	0		0		

(*) Del total de 318 pacientes se recogieron todos los parámetros inmunohistoquímicos en 211, mientras que las 107 pacientes restantes se excluyeron debido a la ausencia de datos en uno o más de estos parámetros. (**) En este grupo se incluyeron todas las pacientes con los subtipos Luminal A, Luminal B y Lum/Her2+. (***) En este grupo se incluyeron todas las pacientes con los subtipos Triple-negativo y "Her2-enriched". Las frecuencias de las variables categóricas se compararon entre los grupos utilizando el Test Chi-cuadrado o el Test exacto de Fisher cuando era apropiado.

5.4.3. PROGRESIÓN METASTÁSICA: METÁSTASIS CEREBRAL VERSUS METÁSTASIS NO-CEREBRAL

Al estudiar el seguimiento clínico de las pacientes observamos que la presencia de metástasis a distancia en relación al subtipo molecular del tumor primario era diferente en su incidencia, su distribución en órganos secundarios y localización.

5.4.3.1. Diferencias en la distribución de las metástasis

La Tabla 22 recoge la distribución de la progresión metastásica entre los distintos subtipos. Así, vemos que en el 25.0% (13/52) de las pacientes con MC su tumor pertenecía a los subtipos moleculares del grupo Luminal, mientras que el 75.0% (39/52) restante el tumor pertenecía a los subtipos del grupo no-Luminal.

Tabla 22. Distribución de los subtipos moleculares de cáncer de mama de acuerdo con la presencia de metástasis

Subtipos Moleculares	*Pacientes (N=208)						valor -p (test-Chi ²)
	Metástasis Cerebral		** Metástasis (M1) No-Cerebral		Sin Metástasis		
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
	52	(25.0)	34	(16.3)	122	(58.7)	
Triple Negativo	27	(51.9)	7	(20.6)	12	(9.8)	
Her2-enriched	12	(23.1)	3	(8.8)	6	(4.9)	
Lum / Her2 +	6	(11.5)	3	(8.8)	10	(8.2)	
Luminal B	5	(9.6)	8	(23.6)	25	(20.5)	
Luminal A	2	(3.9)	13	(38.2)	69	(56.6)	< 0.0001

(*) Pacientes incluídas en estas tres categorías (N=208/318). 105 pacientes de las 318 totales se excluyeron debido a que no tenían registrados todos los parámetros que definen el subtipo molecular. (**) Las pacientes incluídas en la categoría "Metástasis (M1) No-Cerebral" eran aquellas con metástasis en uno o más de los siguientes órganos: hueso, pulmón, hígado y ganglio linfático no-regional, pero sin metástasis cerebral. En esta categoría, 5 pacientes se excluyeron previamente debido a que sólo tenían metástasis cutánea (n=2), o sólo tenían metástasis pleural (n=2) o sólo tenían metástasis meníngeas (n=1). Martínez-Aranda A et al. Front Oncol. 2017.

RESULTADOS

En las pacientes con metástasis no-cerebrales los subtipos del grupo Luminal representaban el 70.6% (24/34) vs. el 29.4% (10/34); y en aquellas sin metástasis los subtipos del grupo Luminal representaban el 85.3% (104/122) vs. el 14.7% (18/122).

El 75.0% de las pacientes con MC tenían RE negativos en su tumor primario, de las cuales el 51.9% pertenecían al subtipo TN. El 29.4% de las pacientes con metástasis no-cerebrales tenían RE negativos, de las cuales el 20.6% correspondían al subtipo TN; y sólo el 14.7% de las pacientes sin metástasis tenían RE negativos, siendo el 9.8% de las mismas del subtipo TN.

Por lo que se refiere a la presencia de Her2, su sobreexpresión era más frecuente en las pacientes con MC que en las que tenían metástasis en otras localizaciones o que no presentaban metástasis (34.6% vs 17.6% vs 13.1%, respectivamente; $p < 0.0001$).

Otros parámetros clínico-patológicos que también se asociaban de forma significativa con la presencia de metástasis se muestran en la Tabla 23, e incluyen la edad, el tamaño del tumor primario, el GH, los ganglios axilares afectados, el estado de los receptores hormonales y del Her2 y el índice proliferativo (Ki-67).

El 50% (42/84) de las pacientes con MC tenían menos de 50 años, mientras que el 38.8% (19/49) de las pacientes que tenían metástasis en otras localizaciones y el 28.3% (51/180) de las que no presentaban metástasis, eran menores de 50 años ($p=0.001$).

El tamaño del tumor primario era superior o igual a 21 mm en el 52.1% (38/73) de las pacientes con MC, en el 58.7% (27/46) de las pacientes con metástasis no-cerebral y en el 33.3% (58/174) de las pacientes sin metástasis ($p=0.001$).

El Her2 estaba sobreexpresado en el 24.7% de las pacientes con MC, en el 12.8% de las que recaían a distancia en otras localizaciones y en el 10.1% de las que no presentaban metástasis ($p=0.01$).

RESULTADOS

Tabla 23. Distribución de las características clínico-patológicas de las pacientes con cáncer de mama en relación con la presencia de metástasis

Características	*Pacientes (N=313)						valor -p (test- χ^2)
	Metástasis Cerebral		**Metástasis (M1) No-Cerebral		Sin Metástasis		
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
	84	(26.8)	49	(15.7)	180	(57.5)	
Edad (años)							
< 40	13	(15.5)	10	(20.4)	11	(6.1)	
40 - 49	29	(34.5)	9	(18.4)	40	(22.2)	
≥ 50	42	(50.0)	30	(61.2)	129	(71.7)	0.001
datos perdidos	0		0		0		
Tamaño Tumor (mm)							
≤ 20	35	(47.9)	19	(41.3)	116	(66.7)	
≥ 21	38	(52.1)	27	(58.7)	58	(33.3)	0.001
datos perdidos	11		3		6		
Grado Histológico							
1	2	(2.6)	1	(2.2)	13	(7.7)	
2	20	(26.3)	16	(34.8)	106	(62.7)	
3	54	(71.1)	29	(63.0)	50	(29.6)	< 0.0001
datos perdidos	8		3		11		
Ganglios axilares (+)							
0	25	(31.6)	15	(32.0)	113	(64.4)	
1-3	24	(30.4)	16	(34.0)	43	(24.7)	
≥ 4	30	(38.0)	16	(34.0)	19	(10.9)	< 0.0001
datos perdidos	5		2		5		
Recept. Estrógenos							
Negativos	45	(56.2)	11	(22.9)	20	(11.7)	
Positivos	35	(43.8)	37	(77.1)	151	(88.3)	< 0.0001
datos perdidos	4		1		9		
Recept. Progesterona							
Negativos	48	(60.8)	16	(34.0)	35	(20.8)	
Positivos	31	(39.2)	31	(66.0)	133	(79.2)	< 0.0001
datos perdidos	5		2		12		
Her 2							
Negativo	58	(75.3)	41	(87.2)	151	(89.9)	
Positivo	19	(24.7)	6	(12.8)	17	(10.1)	0.01
datos perdidos	7		2		12		
Índice Ki-67 (%)							
< 14	3	(11.5)	13	(43.3)	76	(63.3)	
≥ 14	23	(88.5)	17	(56.7)	44	(36.7)	< 0.0001
datos perdidos	58		19		60		

(*) Pacientes incluídas en estas tres categorías (N=313/318). (**) Las pacientes incluídas en la categoría de "Metástasis (M1) No-Cerebral" son aquellas con metástasis en uno o más de los siguientes órganos: hueso, pulmón, hígado y ganglios linfáticos no-regionales. En esta categoría, 5 pacientes se excluyeron previamente debido a que tenían sólo metástasis cutáneas (n=2), o sólo metástasis pleural (n=2) o sólo metástasis meníngeas (n=1). Cada categoría presenta un número variable de pacientes con datos perdidos ("missing data").

RESULTADOS

Finalmente, las pacientes con MC presentaban, de forma muy significativa ($p < 0.0001$) mayor incidencia de carcinoma con: GH 3 (71.1%), presencia de 4 o más ganglios axilares afectados (38.0%), RE negativos (56.2%), RP negativos (60.8%) y un alto índice proliferativo celular con una expresión de Ki-67 superior o igual a 14 (88.5%), con respecto a las pacientes sin MC.

5.4.3.2. Supervivencia libre de metástasis

Analizamos la supervivencia libre de metástasis no-cerebrales en función del subtipo y del grupo molecular (Figura 26).

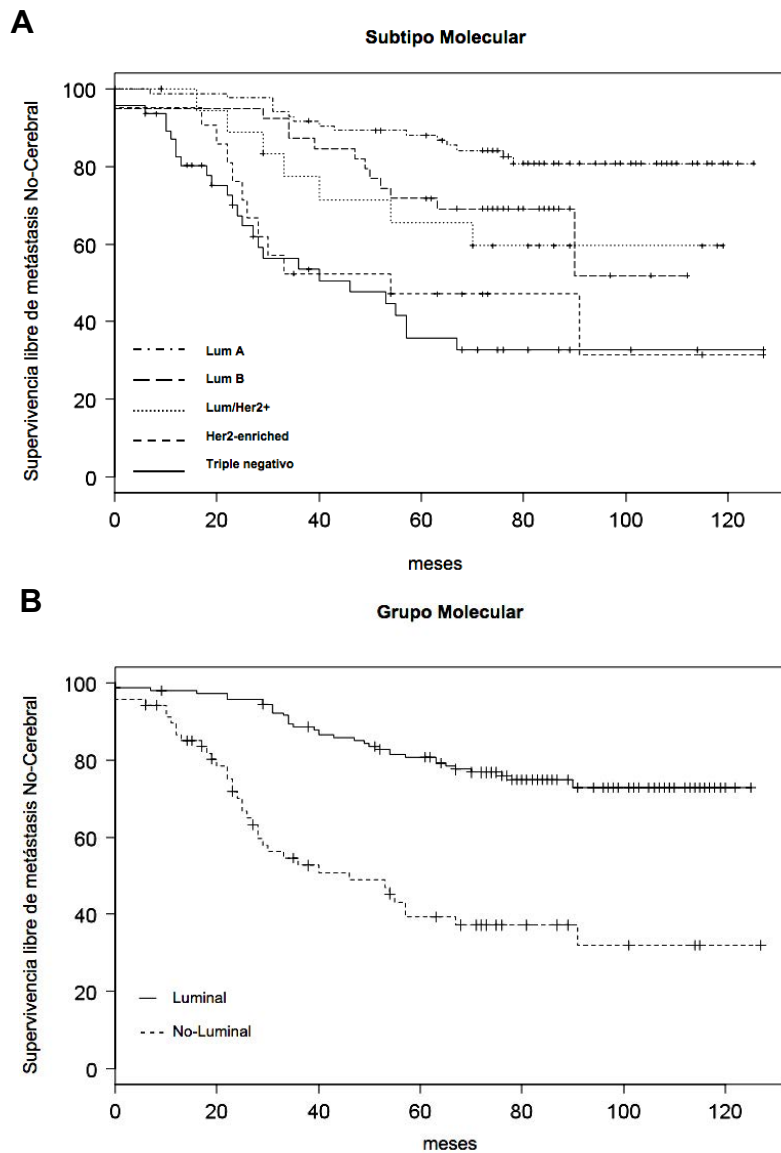


Figura 26. Supervivencia libre de metástasis no-cerebral, en función del subtipo molecular (A) y en función del grupo molecular (B). Método Kaplan-Meier, usando el modelo de Cox ("proportional hazards").

RESULTADOS

Observamos que las diferencias entre los subtipos TN y Her2-enriched no fueron estadísticamente significativas (HR=0.81; 95%CI: 0.41 - 1.60; p=0.53).

Por el contrario, los subtipos Luminal/Her2+ (HR=0.41; 95%CI: 0.18 - 0.96; p=0.039), Luminal B (HR=0.33; 95%CI: 0.17 - 0.64; p=0.0012) y Luminal A (HR=0.16; 95%CI: 0.08 - 0.30; p<0.0001) mostraron una incidencia significativamente menor de metástasis no-cerebrales que los carcinomas de mama TN (Figura 26A).

Debido al bajo número de efectivos en cada subgrupo, se analizó también la supervivencia libre de metástasis no-cerebral reagrupando las pacientes según tuvieran tumores catalogados como Luminal o no-Luminal (Figura 26B), dando como resultado un mayor riesgo de metástasis no-cerebrales en las pacientes del grupo no-Luminal (HR=4.01; 95%CI: 2.52-6.38; p<0.0001).

Por otra parte, también analizamos la supervivencia libre de metástasis cerebrales (MC) en función del subtipo y del grupo molecular (Figura 27).

Así, en la Figura 27A, observamos que el subtipo Her2-enriched no difería de forma significativa del subtipo TN en cuanto a la supervivencia libre de MC (HR=0.79; 95%CI: 0.40 - 1.55; p=0.49).

En cambio, los restantes subtipos sí que mostraron un riesgo de MC significativamente menor que el TN (Luminal/Her2+: HR=0.33, 95%CI: 0.13 - 0.80, p=0.014; Luminal B: HR=0.13, 95%CI: 0.05 - 0.33, p<0.0001; y Luminal A: HR=0.02, 95%CI: 0.005 - 0.09, p<0.0001).

Por otra parte, atendiendo a la subdivisión que consideraba las pacientes del grupo no-Luminal respecto a las del grupo Luminal (Figura 27B), se vió que estas pacientes diferían significativamente entre sí (HR=10.57; 95%CI: 5.60-19.96; p<0.0001).

RESULTADOS

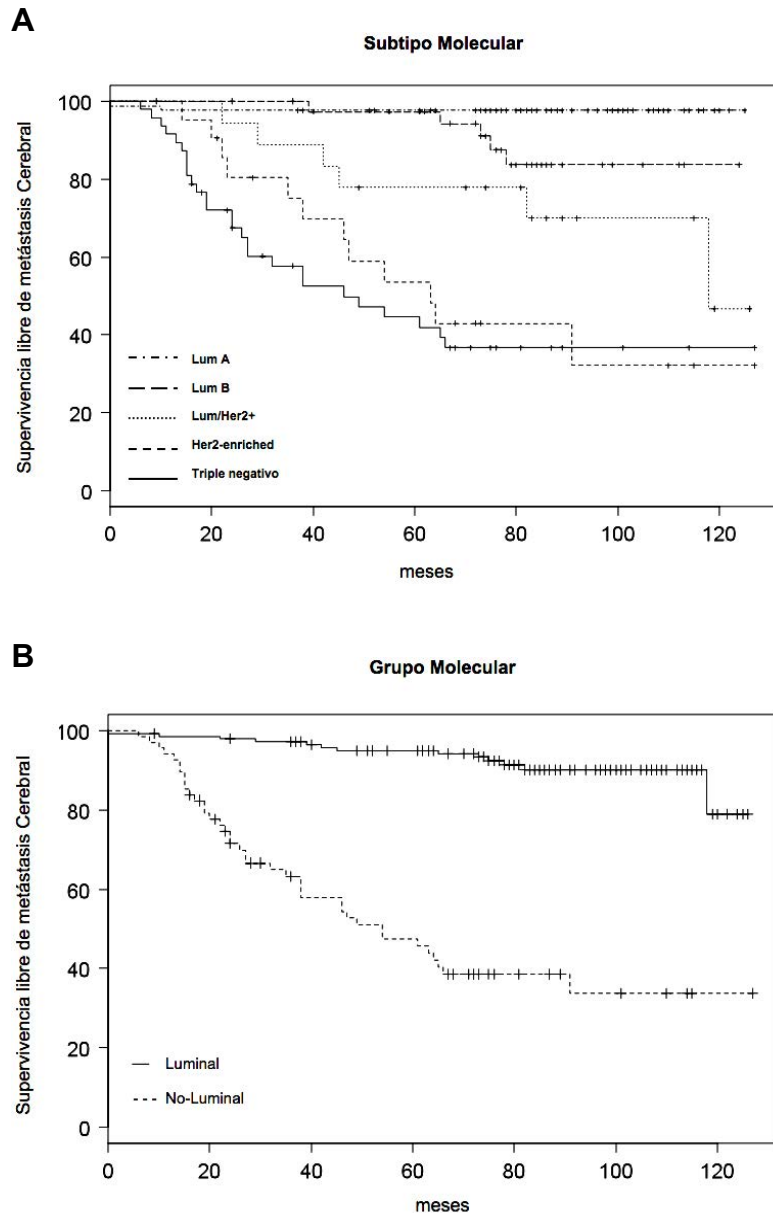


Figura 27. Supervivencia libre de metástasis cerebral, en función del subtipo molecular **(A)** y en función del grupo molecular **(B)**. Método Kaplan-Meier, usando el modelo de Cox ("proportional hazards").

5.4.4. DESARROLLO DE BIOMARCADORES DE METÁSTASIS CEREBRAL EN CARCINOMAS INFILTRANTES DE MAMA

5.4.4.1. Validación de biomarcadores de predicción y pronóstico

Previamente ya se había descrito un perfil organoespecífico de progresión metastásica a cerebro utilizando técnicas transcriptómicas y proteómicas que

RESULTADOS

combinadas “in silico” definían un perfil funcional que las células de cáncer de mama desarrollan para conseguir su actividad metastásica en cerebro ¹⁶⁹.

Posteriormente, se validó la expresión de algunas moléculas en un “array” de tejido que contenía 122 muestras de carcinoma ductal infiltrante de mama, con un seguimiento clínico mínimo de cinco años, incluyendo tumores que no habían metastatizado, tumores que habían desarrollado metástasis sistémicas y aquellos que habían progresado a cerebro ²⁰¹.

Dicho estudio comparativo y el análisis multivariado basado en regresión logística reveló que las proteínas GRP94, FN14 e inhibina eran la mejor combinación para discriminar las MC (AUC=0.85; 95%CI: 0.73-0.96), superando a la predicción que facilitaba la sobreexpresión del Her2 (AUC=0.76; 95%CI: 0.58-0.93), la variable más estrechamente relacionada con las MC. Además, la discriminación o predicción de las MC mejoraba si a la combinación de la expresión de GRP94, FN14 e inhibina se añadía el Her2 (AUC=0.91; 95%CI: 0.77-1.00).

Por otra parte, en el estudio multicéntrico retrospectivo con nuestra serie de pacientes diagnosticadas de carcinoma infiltrante de mama se pretendía validar la expresión de las proteínas GRP94 y FN14 como biomarcadores de MC, analizando su expresión en las muestras de los tumores primarios mediante técnicas de IHQ con anticuerpos específicos, buscando correlacionar dicha expresión con los factores de riesgo clínico-patológicos clásicos, con la incidencia de metástasis, con los subtipos moleculares a los que pertenecían las muestras y con el riesgo de metástasis cerebral.

La valoración de la expresión de cada una de estas proteínas con anticuerpos específicos se realizó siguiendo los protocolos de detección que previamente se habían puesto a punto ²⁰¹ (ver sección 4.2.2.3. de Material y Métodos), teniendo en cuenta que la expresión de la proteína GRP94 era eminentemente citoplasmática mientras que la del receptor FN14 era citoplasmática y de membrana (Figura 28).

RESULTADOS

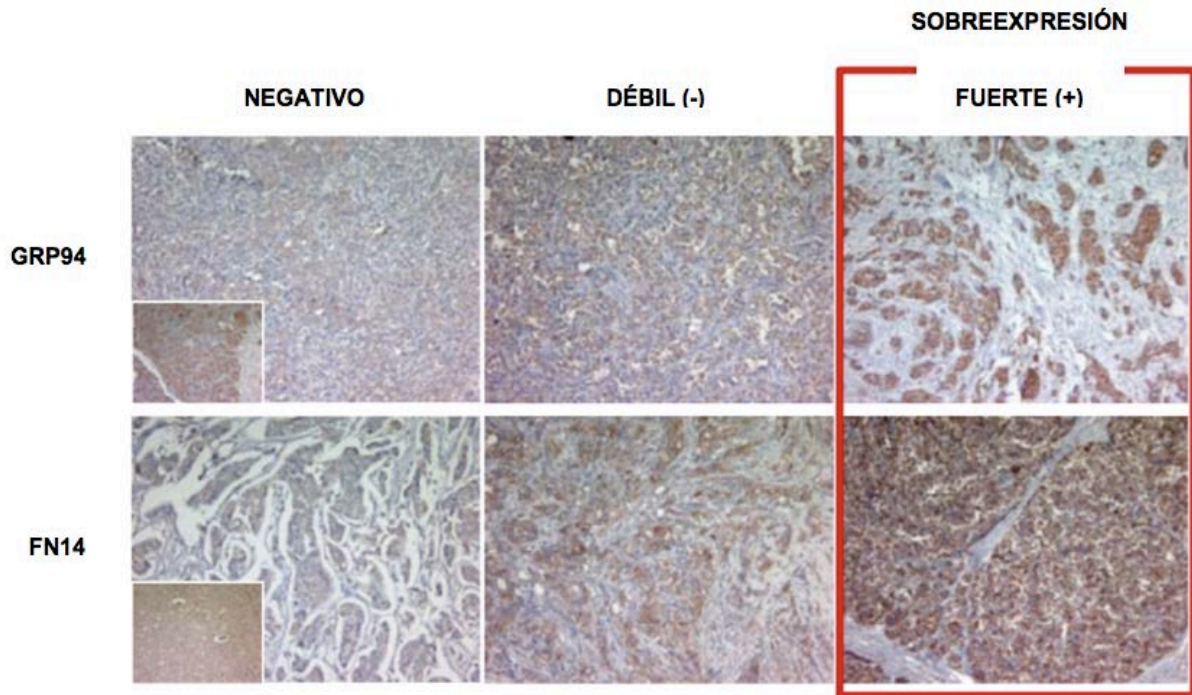


Figura 28. Valoración inmunohistoquímica de los biomarcadores al microscopio óptico. Tinción representativa de GRP94 y FN14 y tabulación de su expresión protéica en muestras de cáncer de mama. Las tinciones de intensidad débil o negativa se consideraron negativas bajo una valoración semi-cuantitativa, con el fin de evitar falsos positivos, y sólo los tumores primarios con una evidente y fuerte intensidad en la tinción (>70% de células tumorales positivas) se consideraron como positivos (sobreeexpresión). Magnificación a 10X. Recuadros: muestras de tejido control positivo estándar utilizadas en cada determinación. Martínez-Aranda A et al. Front Oncol. 2017.

Seguidamente, se analizó la relación entre la expresión de estos marcadores y los factores de riesgo clínico-patológicos clásicos (Tabla 24).

La expresión de la proteína GRP94 se correlacionaba de forma significativa con la afectación de los ganglios linfáticos axilares, siendo positiva en el 56.1% de las pacientes con 4 o más ganglios axilares ($p= 0.049$), y con la presencia de Her2, ya que un 65.9% de estos tumores sobreexpresaban GRP94 ($p= 0.013$). En cambio, la positividad de GRP94 en las muestras no se correlacionaba con el tamaño tumoral, el GH, el estado de los receptores hormonales ni con el subtipo molecular TN.

La expresión de FN14 se correlacionaba con el GH, siendo positiva en el 25.2% de los tumores con GH 3 ($p= 0.004$). Al igual que sucedía con la GRP94, la positividad de FN14 también se correlacionaba en el 35.0% de los casos con sobreexpresión de Her2 ($p= 0.005$). En cambio, FN14 no se correlacionaba con el tamaño tumoral,

RESULTADOS

grado de afectación axilar, estado de receptores hormonales ni con el subtipo molecular TN.

Tabla 24. Asociación entre las características clínico-patológicas y la expresión de los biomarcadores en el cáncer de mama

	GRP94 (N = 313)*	FN14 (N = 308)*
	Nº Pacientes (%)**	No. Pacientes (%)**
	151 (48.2)	55 (17.9)
Tamaño Tumor (mm)		
≤ 20	78 (45.6)	24 (14.2)
> 20	65 (52.8)	25 (20.7)
	test Chi ² p = 0.269	test Chi ² p = 0.198
G. Linfáticos Axilares		
0	78 (50.7)	23 (15.0)
1-3	30 (37.0)	13 (16.5)
≥ 4	37 (56.1)	15 (23.4)
	test Chi ² p = 0.049	test Chi ² p = 0.320
Grado Histológico		
1	5 (31.3)	3 (18.8)
2	74 (51.8)	14 (9.8)
3	66 (50.0)	32 (25.2)
	test Chi ² p = 0.298	test Chi ² p = 0.004
R. Estrógenos		
Positivos	104 (46.9)	34 (15.5)
Negativos	37 (48.7)	18 (24.3)
	test Chi ² p = 0.886	test Chi ² p = 0.124
R. Progesterona		
Positivos	87 (45.1)	33 (17.3)
Negativos	52 (51.5)	19 (19.4)
	test Chi ² p = 0.356	test Chi ² p = 0.779
Her-2		
Positivo	27 (65.9)	14 (35.0)
Negativo	110 (43.7)	38 (15.1)
	test Chi ² p = 0.013	test Chi ² p = 0.005
Subtipo Molecular		
Triple Negativo	18 (41.9)	7 (16.2)
Otros	125 (49.0)	46 (18.3)
	test Chi ² p = 0.481	test Chi ² p = 0.914

(*) La variación en los denominadores es el resultado de tener en cuenta los valores perdidos en los datos inmunohistoquímicos (pérdida de tejido, tinción inviable, fondo, etc.). (**) Porcentajes de tumores positivos distribuidos de acuerdo con las características clínicas y patológicas de las pacientes. Tabla adaptada de Martínez-Aranda A et al. Oncotarget. 2015.

RESULTADOS

Como se observa en la Tabla 25, el 65.1% (54/83) de pacientes que desarrollaron MC tenían tumores que sobreexpresaban GRP94, mientras que la sobreexpresión de esta proteína en el resto de pacientes con metástasis no-cerebrales o sin metástasis se observó en el 42.2% (97/230). FN14 se sobreexpresaba en el 38.3% (31/81) de las pacientes con MC y sólo en el 10.6% (24/227) del resto de pacientes.

Tabla 25. Riesgo de metástasis cerebral de acuerdo con la expresión de los biomarcadores en los tumores primarios

	Incidencia de Metástasis		OR	(95% CI)	valor -p
	Metástasis Cerebral	Otras M1 y No-M1			
GRP94	54 / 83 (65.1 %)	97 / 230 (42.2 %)	2.55	(1.52 - 4.30)	0.0003
FN14	31 / 81 (38.3 %)	24 / 227 (10.6 %)	5.24	(2.83 - 9.71)	< 0.0001

La variación en los denominadores es el resultado de tener en cuenta los valores perdidos en los datos inmunohistoquímicos (pérdida de tejido, tinción inviable, fondo, etc.). M1: Metástasis a distancia. Tabla adaptada de Martínez-Aranda A et al. Oncotarget. 2015.

El análisis multivariado, que comparaba las muestras de pacientes que presentaban MC con aquellas en que la metástasis apareció en otros órganos o que no presentaron metástasis, indicaba que la probabilidad de recaída cerebral en pacientes con tumores primarios GRP94-positivos era 2.55 veces mayor (95%CI: 1.52 – 4.30; p=0.0003), mientras que este riesgo se incrementaba a 5.24 veces cuando las pacientes tenían tumores FN14-positivos (95%CI: 2.83 – 9.71; p<0.0001). Estos resultados indicaban, en su conjunto, el potencial predictivo de ambas moléculas para establecer el riesgo asociado con un tumor que muestra estas características.

Se analizó la distribución de la expresión de GRP94 y FN14 entre los subgrupos moleculares, tanto en las pacientes con MC como en aquellas sin MC. En un primer análisis se observó que la distribución de GRP94 y FN14 entre los subtipos

RESULTADOS

moleculares de los grupos del estudio 'metástasis no-cerebral' y las categorizadas como 'sin metástasis' no era diferente (Fisher's exact test; $p= 0.230$) y consideramos ambas categorías de pacientes dentro de un único grupo (pacientes sin MC) a efectos de comparar la expresión de los biomarcadores de MC entre los tumores Luminal (RE positivos; $n= 141$) y no-Luminal (RE negativos; $n= 67$).

Tal como muestra la Tabla 26, el FN14 estaba sobreexpresado en el 14.5% (20/138) de los tumores Luminales y en el 23.1% (15/65) de los tumores no-Luminales.

Además, en los tumores Luminales, la expresión de FN14 fue significativamente diferente entre las pacientes con MC y las que no tenían MC, con un 53.8% (7/13) vs. el 10.4% (13/125), respectivamente (Fisher's exact test, $p= 0.0005$).

Por otro lado, en los tumores no-Luminales, la expresión de FN14 también fue diferente, aunque no de forma significativa (Fisher's exact test, $p= 0.07$), entre las pacientes con MC y las que no tenían MC, siendo de un 31.6% (12/38) vs. un 11.1% (3/27) respectivamente.

Con esto, pudimos afirmar que la expresión de FN14 en los tumores de mama Luminales se asociaba con progresión a MC.

Por lo que se refiere a la expresión de GRP94, esta proteína la encontramos sobreexpresada en el 47.5% (66/139) de los tumores Luminales y en el 50.0% (33/66) de los no-Luminales.

En los tumores Luminales la expresión de GRP94 era también significativamente diferente entre las pacientes con MC de aquéllas sin MC, 76.9% (10/13) vs. 44.4% (56/126), respectivamente (Fisher's exact test, $p= 0.04$), mientras que su expresión en los tumores no-Luminales fue similar en las pacientes con MC, con un 57.9% (22/38), y en las pacientes sin MC, con un 39.3% (11/28); Fisher's exact test, $p= 0.21$.

RESULTADOS

Tabla 26. Distribución de los biomarcadores en pacientes con metástasis cerebrales (MC) y sin metástasis cerebrales (No-MC) en los grupos Luminal y no-Luminal.

Biomarcador	Pacientes (N=208)							
	Grupo Luminal (N=141)				Grupo No-Luminal (N=67)			
	MC		*No-MC		MC		*No-MC	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)
**FN14 +	7 / 13	(53.8)	13 / 125	(10.4)	12 / 38	(31.6)	3 / 27	(11.1)
	test exacto Fisher (p= 0.0005)				test exacto Fisher (p= 0.07)			
***GRP94 +	10 / 13	(76.9)	56 / 126	(44.4)	22 / 38	(57.9)	11 / 28	(39.3)
	test exacto Fisher (p= 0.04)				test exacto Fisher (p= 0.21)			

Pacientes incluídas en estos grupos: N=208/318. 105 pacientes del total de 318 se excluyeron debido a que no tenían registrados todos los parámetros que definen el subtipo/grupo. * Esta categoría comprende a aquellas pacientes “sin metástasis” y a aquellas con “metástasis a distancia no-cerebrales” (metástasis óseas, pulmonares, hepáticas y ganglionares no-regionales; en esta categoría, 5 pacientes se excluyeron previamente debido a que sólo tenían metástasis cutáneas n=2, sólo tenían metástasis pleural n=2 y sólo metástasis meníngeas n=1). Las diferencias mostradas en el número de pacientes (N) en cada grupo son debidas a aquellas pacientes cuya evaluación del biomarcador no fue posible (desconocido): ** El biomarcador FN14 se valoró en 138 pacientes pertenecientes al grupo luminal (sólo en 3 no fue posible) y en 65 pertenecientes al grupo no-luminal (sólo en 2 no fue posible). *** El biomarcador GRP94 se valoró en 139 pacientes pertenecientes al grupo luminal (sólo en 2 no fue posible) y en 66 pertenecientes al grupo no-luminal (sólo en 1 no fue posible). Martínez-Aranda A et al. Front Oncol. 2017.

En 211 tumores se pudo definir el subtipo molecular; y entre ellos, 52 (24.6%) habían originado MC. En base a esto, analizamos si la expresión de FN14 y GRP94 estaba o no asociada a la sobreexpresión de Her2 (Tabla 27), encontrando que la expresión de FN14 era independiente del estado de Her2 en los tumores del grupo Luminal (Fisher’s exact test; p= 0.59). Por el contrario, la expresión de FN14 en tumores no-Luminales se asociaba de forma significativa (Fisher’s exact test; p= 0.017) con el subtipo molecular Her2-enriched (63.6%) y no con el subtipo triple-negativo (18.5%).

Por lo que se refiere a la expresión de GRP94, ésta resultó ser independiente de la expresión de Her2, tanto en las tumores Luminales (Fisher’s exact test; p= 1.00) como en los no-Luminales (Fisher’s exact test; p= 0.30).

RESULTADOS

Tabla 27. Distribución de los biomarcadores en los grupos Luminal y no-Luminal de acuerdo con el estado de Her2 en las pacientes con metástasis cerebrales

Bio-marcador	Pacientes (N=52)									
	Grupo Luminal (N=13)				Grupo No-Luminal *(N=39)					
	Her2 + **(N=6)		Her2 – (N=7)		Her2 + ***(N=11)		Her2 – (N=27)		valor -p (Fisher)	
N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)			
FN14 +	4	(66.7)	3	(42.9)	0.59	7	(63.6)	5	(18.5)	0.017
GRP94 +	5	(83.3)	5	(71.4)	1.00	8	(72.7)	14	(51.9)	0.30

* De las 39 pacientes que pertenecen a este grupo, una se excluyó (estado desconocido de los biomarcadores).
 ** Seis pacientes pertenecientes al subtipo Lum/Her2+. *** Once pacientes pertenecientes al subtipo "Her2-enriched".

Finalmente, se estudió la sensibilidad y especificidad de los biomarcadores para predecir las MC y se analizó en función del grupo molecular (Tabla 28), teniendo en cuenta el valor predictivo de Her2 en los tumores de estas pacientes.

Como resultado se obtuvo que las pacientes que pertenecían al grupo Luminal, con bajo riesgo de MC a priori, FN14 y Her2 mostraron más especificidad (89.60% y 89.84%, respectivamente) que GRP94 (55.56%), mientras que la GRP94 mostró más sensibilidad (76.92%) que el FN14 y el Her2 (53.85% y 46.15%, respectivamente) para predecir la afectación metastásica cerebral. Asimismo, en pacientes con un mayor riesgo de MC, como las pertenecientes al grupo no-Luminal, FN14 fue la proteína más específica (88.89%) para discriminar tumores que desarrollaron MC, seguida de Her2 (67.86%) y GRP94 (60.71%). La sensibilidad de la GRP94 en este grupo de pacientes fue también más alta (57.89%) que la obtenida con el FN14 o con el Her2 (31.58% y 30.77%, respectivamente).

Por otra parte, la combinación de FN14 con GRP94 mejoraba la sensibilidad en la valoración del riesgo de MC en ambos grupos de pacientes, aunque fue mayor en

aquellas que tenían tumores Luminales (84.62%) que en las que tenían tumores no-Luminales (68.42%).

Tabla 28. Sensibilidad y Especificidad de los biomarcadores, en solitario o en combinación, con respecto a las MC en las pacientes de los grupos Luminal y no-Luminal

Biomarcador	Pacientes (N=208)					
	Grupo Luminal (N=141)			Grupo No-Luminal (N=67)		
	**N	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	**N	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
FN14	138	(53.85)	(89.60)	65	(31.58)	(88.89)
GRP94	139	(76.92)	(55.56)	66	(57.89)	(60.71)
Her2	141	(46.15)	(89.84)	67	(30.77)	(67.86)
*FN14+GRP94	139	(84.62)	(50.00)	66	(68.42)	(57.14)
*FN14+GRP94+Her2	139	(84.62)	(45.24)	67	(71.79)	(42.86)

Pacientes evaluadas: 208/211. Tres pacientes se excluyeron (dos pertenecientes al grupo Luminal y una perteneciente al No-Luminal). (*) En cada caso, estas combinaciones se consideraron con resultado “positivo” cuando en al menos una de las moléculas valoradas era “positivo”; y se consideraron con resultado “negativo” cuando en todas ellas era “negativo”. (**) Las diferencias en el número de pacientes (N) eran debidas a aquellas pacientes cuya valoración de los biomarcadores, en solitario o en combinación, era desconocida. Martínez-Aranda A et al. Front Oncol. 2017.

La especificidad de la combinación FN14 y GRP94 fue menor que la correspondiente a la de los biomarcadores de forma individual, tanto en el grupo Luminal (50.00%) como en el no-Luminal (57.14%). Cuando se analizó la expresión de FN14 y GRP94 junto con la evaluación de Her2, no se modificaba la sensibilidad (84.62%) y se empeoraba la especificidad (45.24%) en las pacientes del grupo Luminal; en tanto que en las pacientes del grupo no-Luminal, añadir la evaluación del Her2 mejoraba levemente la sensibilidad (71.79%), aunque también empeoraba la especificidad (42.86%). Así, la combinación de estos tres marcadores incrementa la sensibilidad para predecir la evolución a MC en el grupo no-Luminal.

La alta especificidad mostrada por el FN14 y por el Her2 evaluados individualmente decrecía cuando se evaluaban en combinación, sugiriendo que ambos

biomarcadores estratificaban diferentes subgrupos de pacientes con arreglo al riesgo de sufrir MC en el curso de la enfermedad.

5.4.4.2. Valor predictivo y pronóstico de los biomarcadores en nuestra serie

Para identificar la mejor combinación para la predicción de MC sobre el total de pacientes de nuestra serie (n=318), los marcadores se valoraron en un modelo de regresión logística multivariado utilizando un procedimiento de “paso a paso” (“forward stepwise”).

En la Figura 29A se constata la combinación de GRP94 con FN14 como la mejor para predecir la MC, incrementando la capacidad de predicción del riesgo de MC (AUC=0.69) sobre la asignada a la sobreexpresión de Her2 sólo (AUC=0.57). Además, la información adicional sobre la expresión de Her2 (GRP94 con FN14 y Her2) no mejoraba la predicción de MC en pacientes con cáncer de mama (AUC= 0.69).

Por otra parte, tras el análisis realizado de los biomarcadores de forma aislada, la GRP94 fue la que presentó mayor sensibilidad (65.06%), seguida del FN14 (38.27%) y del Her2 (24.68%). En cambio, el FN14 y el Her2 mostraron mayor especificidad (89.43% y 89.55%, respectivamente). La combinación de los biomarcadores GRP94 con FN14 mostró una mayor sensibilidad (74.07%) que cuando se evaluaron aisladamente; en cambio, esta evaluación conjunta mostró una menor especificidad (51.98%) en relación al análisis de los biomarcadores de forma aislada (Figura 29B).

Cuando el análisis multivariado se corregía por las covariables ‘tamaño tumoral’, ‘GH’, ‘estado de ganglios linfáticos’, ‘receptores hormonales’, ‘Her2’ y ‘tratamiento’ (quimioterapia adyuvante y antiestrógenos), el mejor marcador predictivo para la presencia de MC seguía siendo el FN14 ($p < 0.0001$), seguido por la GRP94 ($p = 0.0017$). Estos resultados confirmaban la independencia de ambos biomarcadores de la categorización clásica de los carcinomas de mama y de los cinco subtipos moleculares de cáncer de mama, reforzando su valor intrínseco como biomarcadores para la predicción de recaídas en forma de MC.

RESULTADOS

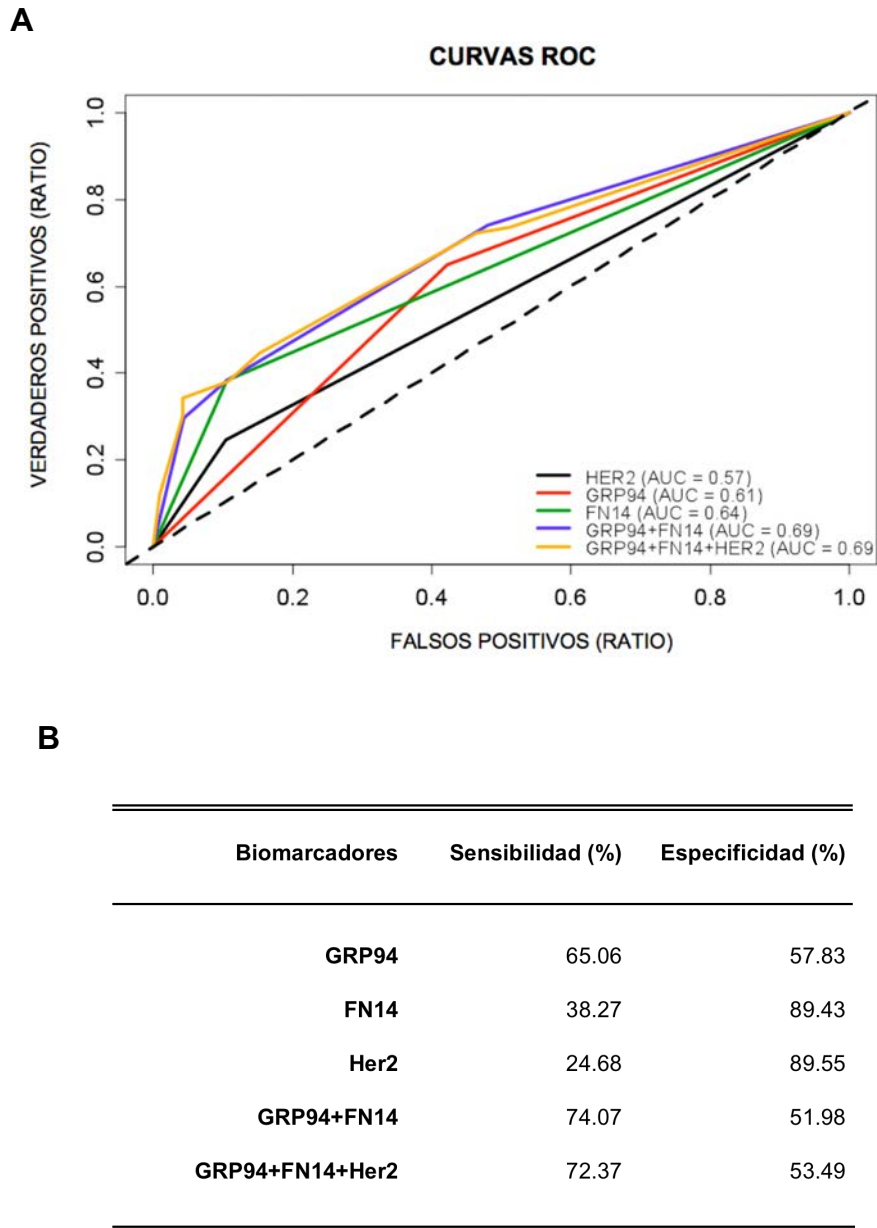


Figura 29. Predicción de MC según la combinación de biomarcadores. A. Área bajo la curva (AUC) ROC obtenida con los índices predictivos integrados, valorando los marcadores en un modelo de regresión logística multivariado. Se calcularon los ratios de probabilidad positiva y negativa para valorar la exactitud predictiva de cada molécula como marcador de MC, considerando la sensibilidad y especificidad de cada una de ellas. **B.** Sensibilidad y especificidad mostrada por los marcadores. Figura adoptada de Martínez-Aranda A et al. Oncotarget. 2015.

Así pues, la expresión de FN14 en los tumores primarios es el predictor más fiable del desarrollo de MC en pacientes con cáncer de mama, pudiendo usarse para estratificar a pacientes de acuerdo con su riesgo de desarrollar MC, tanto para tomar

RESULTADOS

una decisión terapéutica en el primer diagnóstico como para indicar tratamientos con finalidad preventiva.

Por otra parte, para valorar la utilidad de FN14 y GRP94 como factores independientes de riesgo de MC en las pacientes de los grupos Luminal y no-Luminal, se realizó un análisis multivariado incluyendo 'edad', 'afectación ganglionar axilar', 'estado de Her2' y 'presencia de metástasis pulmonar' como covariables (Tabla 29).

Tabla 29. Análisis multivariado de los biomarcadores en pacientes con metástasis cerebrales de los grupos Luminal y no-Luminal.

Biomarcador	Pacientes *(N=199)					
	Grupo Luminal (N=136)			Grupo No-Luminal (N=63)		
	OR	(95% CI)	p	OR	(95% CI)	p
FN14	36.70	(3.65 - 368.25)	0.002	3.29	(0.64 - 16.79)	0.153
GRP94	5.74	(0.87 - 37.66)	0.069	3.23	(0.98 - 10.63)	0.053
** FN14+GRP94	7.10	(0.88 - 57.51)	0.066	4.04	(1.19 - 13.65)	0.025
** FN14+GRP94+Her2	5.80	(0.86 - 39.08)	0.071	2.45	(0.73 - 8.22)	0.147

Las covariables utilizadas en este estudio fueron: edad, afectación ganglionar axilar, Her2 y presencia de metástasis pulmonar. El Her2 no se incluyó como covariable cuando utilizamos como biomarcador la combinación GRP94+FN14+Her2. * El número de pacientes (N) obtenido en cada grupo corresponde a aquellas pacientes que tienen disponibles todas las covariables requeridas. ** En cada caso, estas combinaciones se consideraron con resultado "positivo" cuando al menos una de las moléculas valoradas tenía resultado "positivo", y "negativo" cuando en todas ellas era "negativo". Martínez-Aranda A et al. Front Oncol. 2017.

Los resultados mostraron que las pacientes que pertenecían al grupo Luminal (RE positivos) tenían un riesgo significativamente más alto de desarrollar MC si el tumor primario expresaba FN14 comparado con los tumores que eran negativos para este biomarcador (OR: 36.70; 95%CI: 3.65 - 368.25; p= 0.002). La probabilidad, por tanto, de desarrollar MC en estas pacientes se incrementaba 36.70. Por el contrario, cuando los tumores primarios sobreexpresaban GRP94, el riesgo de desarrollar MC

RESULTADOS

no fue significativo (OR: 5.74; 95%CI: 0.87 - 37.66; $p= 0.069$), y tampoco al evaluarse en combinación con FN14 (OR: 7.10; 95%CI: 0.88 - 57.51; $p= 0.066$) o en combinación con FN14 y Her2 (OR: 5.80; 95%CI: 0.86 - 39.08; $p= 0.071$). Sólo en las pacientes con tumores del grupo no-Luminal (RE negativos), la positividad en la combinación de FN14 con GRP94 fue significativamente predictiva de progresión a MC (OR: 4.04; 95%CI: 1.19 - 13.65; $p=0.025$).

Se analizó la supervivencia libre de MC en relación a la expresión en el tumor primario de FN14, GRP94, Her2 y del fenotipo TN (Figura 30).

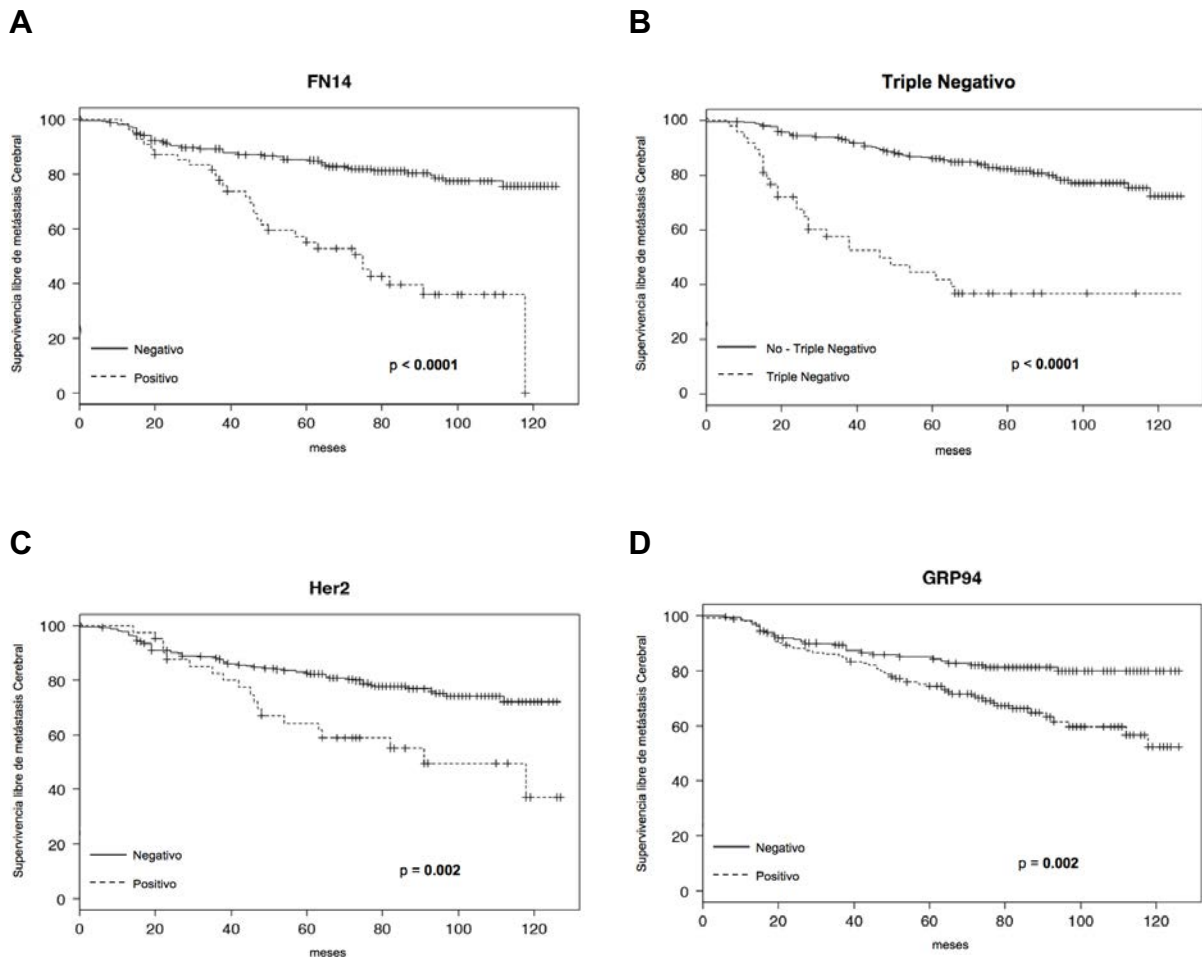


Figura 30. Probabilidad de supervivencia libre de metástasis cerebral en función de los biomarcadores. Probabilidad de supervivencia libre de MC sobre el total de nuestra serie de pacientes ($n=318$) en función de la positividad o no de los marcadores a estudio FN14 y GRP94 y de la positividad o no de parámetros clásicos como el estado de Her2 y el fenotipo TN. Método Kaplan-Meier y valores de p obtenidos mediante el log-rank test. Martínez-Aranda A et al. Oncotarget. 2015.

RESULTADOS

Así, observamos que las pacientes con tumores primarios FN14-positivos (Figura 30A) tenían una probabilidad de supervivencia libre de MC menor que aquellas que eran negativas para el marcador, de forma muy significativa ($p < 0.0001$), al igual que aquellas pacientes con tumores primarios TN ($p < 0.0001$), como muestra la Figura 30B.

Por otro lado, las pacientes con sobreexpresión de Her2 en el tumor primario (Figura 30C) y las que presentaban positividad para la GRP94 (Figura 30D) también presentaban una probabilidad de supervivencia libre de MC menor, de forma significativa ($p = 0.002$ y $p = 0.002$, respectivamente), que aquellas cuyos tumores primarios no las sobreexpresaban.

Estos resultados indicaban el valor pronóstico que tiene la expresión de FN14 y GRP94 en el carcinoma de mama.

Por otra parte, siendo la quimioterapia adyuvante seleccionada de acuerdo a las características del tumor primario y estadio, evaluamos si la presencia de FN14 y GRP94 en el tumor podrían predecir la respuesta a la quimioterapia adyuvante y determinar la supervivencia total (Figura 31).

Tal como se muestra en la Figura 31A, las pacientes tratadas con taxanos tuvieron una supervivencia menor con respecto a otros regímenes terapéuticos sin taxanos cuando los tumores primarios eran FN14-positivos ($HR=3.21$; $p = 0.048$).

Por el contrario, la supervivencia de las pacientes con tumores primarios FN14-negativos fue similar en las tratadas con taxanos a las tratadas con otros esquemas sin taxanos ($HR=1.48$; $p = 0.360$), tal como indica la Figura 31B.

Por lo que se refiere a la GRP94 (Figuras 31C-D), observamos que no había diferencia en la supervivencia entre las pacientes tratadas con taxanos y las tratadas con otros esquemas sin taxanos, tanto en aquellas pacientes cuyo tumor primario era GRP94-positivo ($HR=1.69$; $p = 0.310$) como en aquellas GRP94-negativo ($HR=1.63$; $p = 0.290$).

RESULTADOS

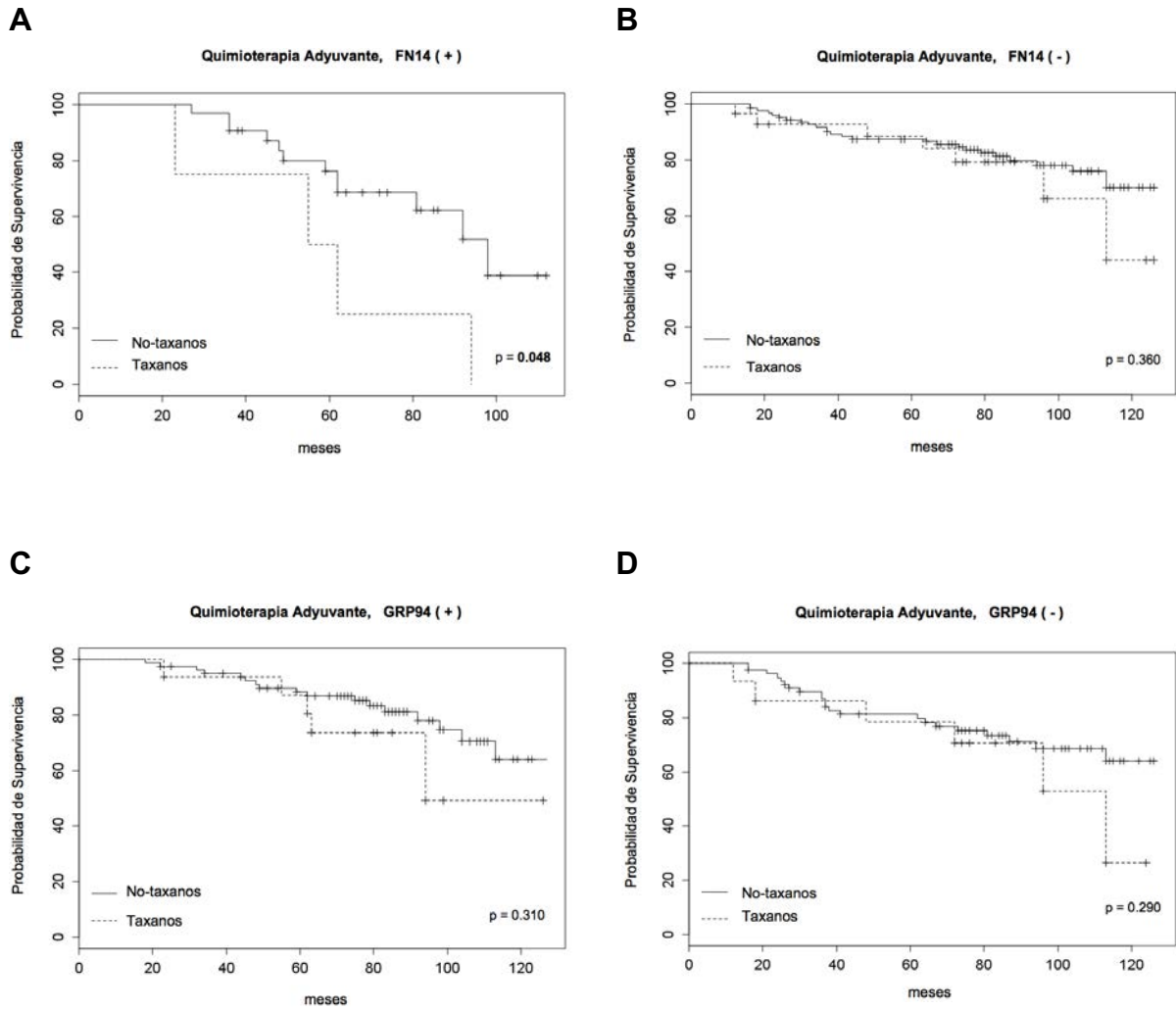


Figura 31. Probabilidad de supervivencia en pacientes que recibieron quimioterapia adyuvante y su relación con la presencia de los biomarcadores. Supervivencia sobre el total de nuestra serie de pacientes (n=318) que recibieron quimioterapia adyuvante. Método Kaplan-Meier y valores de p obtenidos mediante el log-rank test. Figuras 31A-B adoptadas de Martínez-Aranda A et al. Oncotarget. 2015.

En su conjunto, estos resultados mostraban que la presencia en el tumor primario de FN14 podría predecir una disminución de la supervivencia en las pacientes con cáncer de mama que fueran sometidas a un tratamiento adyuvante basado en taxanos.

Se analizó la supervivencia libre de MC en pacientes con tumores que expresaban FN14 tratadas con taxanos (Figura 32A), resultando no significativa ($p = 0.066$), al igual que tampoco lo era en las pacientes que tenían tumores primarios FN14-negativos (Figura 32B; $p = 0.134$).

RESULTADOS

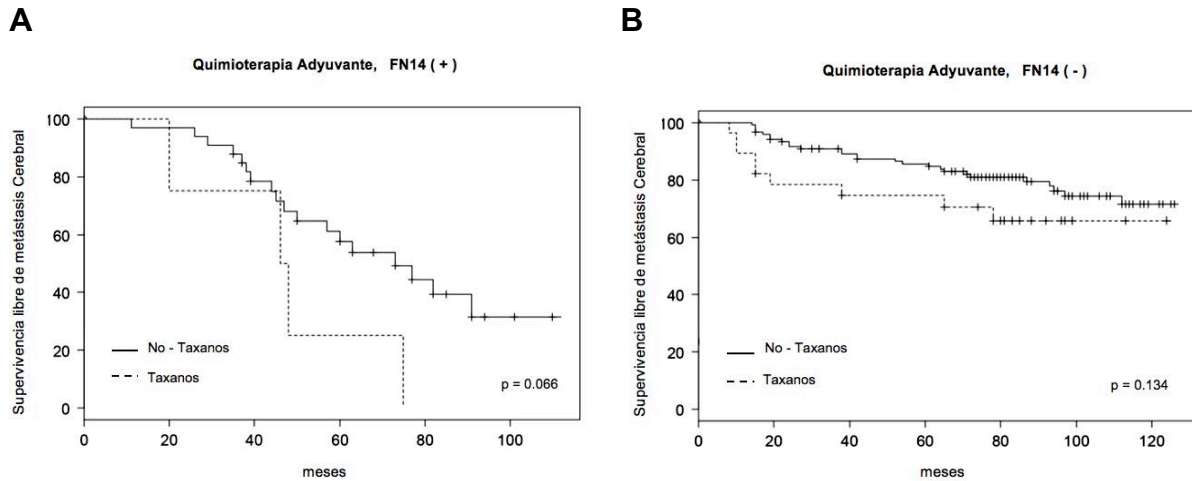


Figura 32. Probabilidad de supervivencia libre de metástasis cerebral en pacientes que recibieron quimioterapia adyuvante y su relación con el FN14. Supervivencia libre de MC sobre el total de nuestra serie de pacientes (n=318) que recibieron quimioterapia adyuvante y de acuerdo con la expresión de FN14 en sus tumores primarios. Método Kaplan-Meier y valores de p obtenidos mediante el log-rank test. Martínez-Aranda A et al. Oncotarget. 2015.

Dado que los resultados obtenidos en nuestra serie con respecto a la supervivencia libre de metástasis entre los diferentes subtipos y grupos moleculares son congruentes con los clínicamente esperados (ver Figuras 26 y 27; sección 5.4.3.2. de Resultados), se decidió estudiar la supervivencia libre de MC en los grupos Luminal y no-Luminal en función de si el tumor primario expresaba o no FN14 y GRP94 (Figuras 33 y 34).

Así, la sobreexpresión de FN14 en las pacientes del grupo Luminal (Figura 33A) se asociaba de forma significativa con una disminución en la supervivencia libre de MC (HR=8.25; 95%CI: 2.77 - 24.61; p= 0.00015), a diferencia de las pacientes del grupo no-Luminal (Figura 33B), donde la asociación de la expresión de FN14 con la supervivencia libre de MC no era estadísticamente significativa (HR=1.74; 95%CI: 0.87 - 3.47; p= 0.11).

Por otro lado, al analizar la supervivencia libre de MC en pacientes del grupo Luminal de acuerdo a la expresión de GRP94 (Figura 34A), observamos que la sobreexpresión de este biomarcador en el tumor primario de estas pacientes también se asociaba a una disminución en la supervivencia libre de MC, aunque no estadísticamente significativa (HR=3.58; 95%CI: 0.98 - 13.11; p= 0.054). Mientras

RESULTADOS

tanto, las pacientes del grupo no-Luminal (Figura 34B) no mostraban tampoco una relación significativa entre la sobreexpresión de este biomarcador y la supervivencia libre de MC (HR=1.22; 95%CI: 0.64 - 2.32; $p= 0.55$).

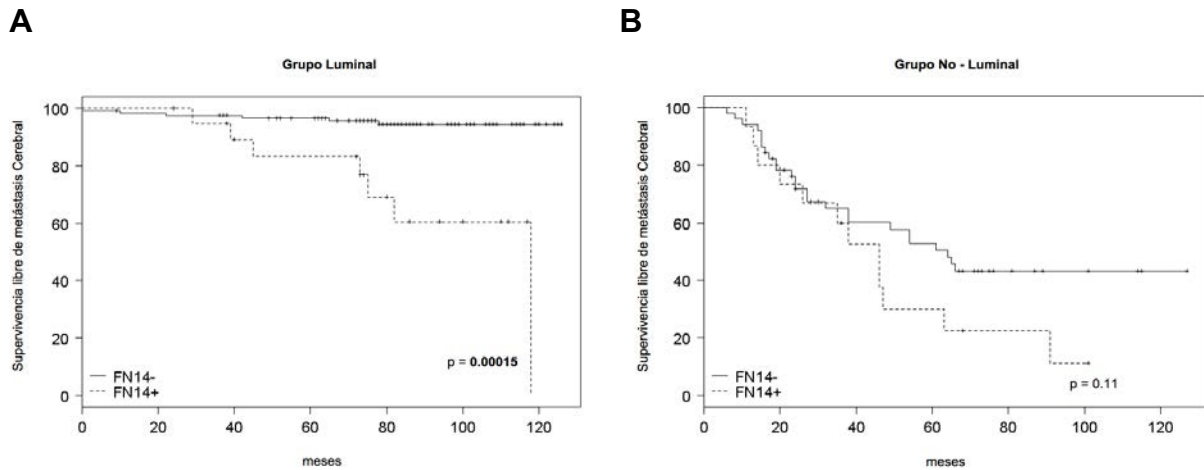


Figura 33. Supervivencia libre de MC en pacientes con cáncer de mama de acuerdo con la expresión de FN14. Método Kaplan-Meier y modelo de Cox ("proportional hazards"). Martínez-Aranda A et al. Front Oncol. 2017

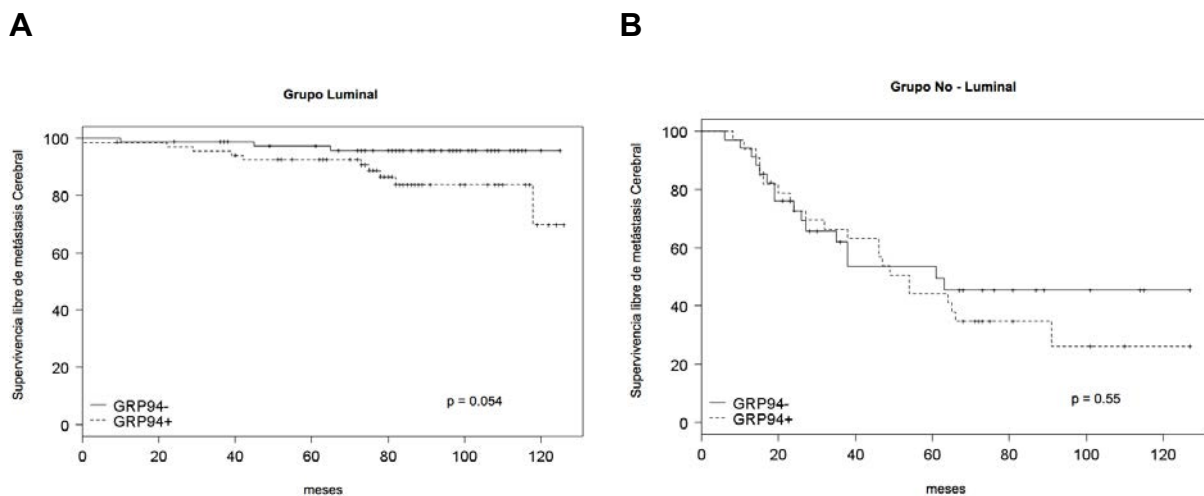


Figura 34. Supervivencia libre de MC en pacientes con cáncer de mama de acuerdo con la expresión de GRP94. Método Kaplan-Meier y modelo de Cox ("proportional hazards"). Martínez-Aranda A et al. Front Oncol. 2017.

Estos resultados indican que en las pacientes del grupo Luminal la sobreexpresión de FN14 se asocia a una disminución de la supervivencia libre de MC y resalta el valor intrínseco de FN14 y GRP94 como biomarcadores organoespecíficos de MC en aquellas pacientes con tumores de mejor pronóstico 'a priori'.

6. DISCUSIÓN

El gran reto que en la actualidad presenta el tratamiento de la MC en cáncer de mama es conseguir mejores protocolos terapéuticos, ya que los actuales presentan una eficacia limitada. De hecho, se aplican criterios generales en los tratamientos locales, sea cirugía y/o radioterapia, de las MC de cualquier origen. Para cambiar este paradigma y avanzar en un tratamiento eficaz se hace necesario incorporar herramientas para la detección precoz de la progresión metastásica a cerebro. Sin esta implementación diagnóstica no se mejora de manera significativa la expectativa de vida de las pacientes, por lo que es de máximo interés establecer protocolos de predicción que permitan su prevención antes de la aparición de los primeros síntomas.

El desarrollo de la MC depende no sólo del fenotipo de la célula metastásica sino también de la interacción de las células tumorales con la inmunidad del huésped y con el microambiente cerebral, todos ellos factores que pueden afectar la respuesta de los tumores al tratamiento y condicionar la resistencia al mismo. Desentrañar los factores biológicos y las vías de señalización celular que promueven y facilitan el anclaje de células carcinomatosas en el cerebro es una información básica para poder limitar o prevenir el crecimiento organoespecífico de las células que han conseguido atravesar la BHE y medrar en el SNC.

Basándonos en este razonamiento, nuestro objetivo fue identificar proteínas involucradas en la progresión metastásica a cerebro del cáncer de mama siguiendo una estrategia de mapeo de perfiles de expresión transcriptómica y proteómica para establecer redes de interacción proteína-proteína de las que pudiéramos obtener información biológica relevante y funciones específicas de células de origen epitelial con capacidad para desarrollar un tumor secundario en el SNC. La construcción inicial de un fenotipo organoespecífico fue el primer paso para buscar marcadores de progresión cerebral en el tumor primario de pacientes con cáncer de mama y analizar el poder predictivo que tenían sobre la enfermedad. Así, el análisis con tecnologías ómicas de muestras del tumor primario de las pacientes y metástasis de distinto origen, incluido hígado, pulmón, hueso, piel y cerebro, nos permitió la sustracción de las proteínas/genes relevantes para la MC, dando pie a la estratificación de pacientes que podrían beneficiarse de un determinado tratamiento

más selectivo o personalizado, al mismo tiempo que se identificaban a las pacientes que no se beneficiarían de la terapia ²⁰¹. De hecho, nuestro trabajo se inició tras estudios previos en los que se había descrito este perfil de expresión organoespecífico de las células metastásicas a cerebro ^{169,201}.

El objetivo inicial fue valorizar aquellas moléculas que de manera significativa se habían asociado a MC, explorando su poder predictivo para prevenirla y/o incidir en el tratamiento precoz, ya que una vez instaurada las posibilidades terapéuticas no son eficaces para contrarrestar la disminución drástica de la supervivencia de las pacientes. Así, iniciamos un estudio clínico retrospectivo y multicéntrico donde participaban tres hospitales, con un total de 318 pacientes, analizando muestras de tumores primarios de carcinoma infiltrante de mama que habían dado lugar a MC, metástasis en otras localizaciones o que no habían dado metástasis. En este estudio se analizó la expresión de las proteínas FN14 y GRP94 en el tumor primario de estas pacientes y se realizó una primera fase de validación clínica de estas proteínas como biomarcadores de MC.

Un biomarcador es “una característica que se puede medir de manera objetiva y es evaluada como un indicador de un proceso biológico normal, un proceso patológico o como la respuesta farmacológica a una intervención terapéutica” ²²⁰. Esta definición se aplica a la evaluación de genes o perfiles genéticos, de proteínas, de metabolitos, o incluso parámetros fisiológicos y anatómicos; y entre los tipos de biomarcadores tenemos los de predicción, los de pronóstico y los de diagnóstico. En el desarrollo metodológico de detección del biomarcador hay que tener en cuenta la eficiencia del método para detectarlo de forma específica y evitar la interferencia y contaminación cruzada con otras moléculas ²²¹. En oncología, el biomarcador es aquel parámetro que está presente y se mide en el tejido tumoral o suero (p.e. DNA, mRNA o proteínas) ²²² y se aplica al diagnóstico, pronóstico y selección de tratamiento, permitiendo identificar a los pacientes que se pueden beneficiar de un tratamiento evitando toxicidades innecesarias ²²³. Las funciones biológicas de las proteínas FN14 y GRP94 y su asociación con la progresión metastásica del cáncer de mama hacen que, además de biomarcadores específicos, puedan ser

consideradas dianas terapéuticas para inhibir funciones críticas para la progresión metastásica.

El resultado más importante de nuestro estudio clínico-patológico ha sido la validación multicéntrica de las proteínas FN14 y GRP94 como biomarcadores de predicción y pronóstico de MC, ya que su sobreexpresión en los tumores primarios de carcinoma infiltrante de mama se asocia de forma significativa con un mayor riesgo de progresión a MC en las pacientes, siendo ambos biomarcadores independientes de la categorización clásica ^{224,225}. La determinación del nivel de expresión de cada uno o de ambos puede efectuarse a nivel de mRNA o protéico, y constituye en sí mismo una herramienta diagnóstica, por lo que el desarrollo de un “kit” que tenga como objetivo el análisis de estos biomarcadores permitiría la aplicación de terapias antimetastásicas preventivas y nuevas estrategias de diagnóstico precoz de las pacientes que tengan un alto riesgo de contraer la enfermedad, pudiendo también ser utilizado como factor pronóstico de la respuesta a los tratamientos convencionales. En su conjunto, estos resultados originales se protejeron con dos patentes que definían la relevancia de esta invención en la práctica clínica, actualmente otorgadas en Europa (Patente N° 2440931) y también en EE. UU. (Patente N° 9.645.150).

FN14 es una proteína transmembrana de tipo I, receptor de superficie celular, miembro de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), altamente inducible en cerebro a través de su ligando natural TWEAK, que es producido por astrocitos activados. FN14 está implicado en muchas vías de señalización intracelular, desencadenando procesos como la proliferación celular, diferenciación, migración e invasión, y participando en otras funciones como la apoptosis, angiogénesis, inflamación, promoción de la proliferación tumoral y metástasis ^{226,227}. El FN14, que está conectado a diversas vías de señalización intracelular como la vía del NF- κ B, se une a TWEAK, citoquina multifuncional y miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF), que también controla actividades celulares como la proliferación, migración, diferenciación, apoptosis, angiogénesis e inflamación, constituyendo la vía de señalización TWEAK-FN14, importante vía fisiológica mediadora de la reparación tisular tras una lesión aguda. Así, la expresión

de FN14 es baja en organismos adultos sanos, pero aumenta cuando el tejido es lesionado o se remodela ²²⁸. El papel de FN14 en la regulación de la metástasis tumoral está siendo desvelado en los últimos años, demostrándose su influencia en la regulación de la transición epitelial-mesenquimal (EMT), el citoesqueleto y degradación de la matriz extracelular (MEC) ²²⁷. El FN14 está altamente expresado en muchos tipos de tumores sólidos, relacionándose su expresión con el aumento de la capacidad metastásica a diferentes órganos ²²⁹⁻²³², así como con el aumento de la capacidad invasiva “in vitro” ²²⁶, pudiendo desempeñar un importante papel tanto en el crecimiento tumoral como en las metástasis ²²⁸.

Con respecto al cáncer de mama, se ha visto en modelos “in vitro” que la expresión de Her2 va paralela al incremento en la concentración de FN14 y que la depleción de FN14 conlleva una disminución en la capacidad de migración e invasión ²³³. Además, la expresión de FN14 es más alta en líneas celulares de cáncer de mama invasivas con receptores estrogénicos negativos, y la sobreexpresión de FN14 en líneas poco invasivas resulta en una mayor inducción de la invasión y de la activación de la vía de señalización de NF- κ B, apoyando el papel que tiene esta vía mediada por FN14 en la invasión del cáncer de mama y sus metástasis ²³⁴.

Diferente función celular tiene la GRP94, la cual es una proteína regulada por glucosa (GRP) de la familia de las HSP90 y está expresada de forma constitutiva en todos los tipos de células ²³⁵. Las GRPs se localizan en el retículo endoplásmico y mitocondria; son chaperonas que intervienen en el plegamiento estructural, ensamblaje y degradación de otras proteínas y ayudan a mantener el equilibrio del calcio en el retículo endoplásmico, protegiendo a las células de la apoptosis ²³⁶. Las células en rápida proliferación necesitan un incremento de la síntesis de proteínas, por lo que se requiere un aumento de la actividad de las chaperonas para realizar el plegamiento, ensamblaje y transporte de dichas proteínas ²³⁷. Las GRPs son inducibles en diferentes situaciones de estrés, principalmente metabólico, como el déficit de glucosa, el estrés oxidativo, la depleción de calcio del retículo y la acumulación de proteínas con defectos en su plegamiento estructural ²³⁸, pudiendo ser activamente translocadas a otras localizaciones celulares, como la superficie celular, y actuar como receptores, asumiendo nuevas funciones como regular la

DISCUSIÓN

señalización, proliferación, invasión, supresión de apoptosis, angiogénesis, inflamación, inmunidad y viabilidad celular ^{237,239,240}. Existen péptidos que inhiben la interacción entre la GRP94 y las integrinas, bloqueando la invasión celular ²⁴⁰. Las proteínas con función chaperona, como la GRP94, también están relacionadas con el fenotipo de troncalidad (pluripotencialidad en la diferenciación celular), con la transición epitelial-mesenquimal (EMT) y están implicadas en los procesos bioenergéticos celulares, interviniendo en la reprogramación del metabolismo energético de las células ²⁴¹. La expresión de la GRP94 se correlaciona con un estadio avanzado y baja supervivencia en una variedad de cánceres, revelando estudios pre-clínicos recientes que su expresión está estrechamente ligada al crecimiento tumoral y metástasis ²⁴².

En estudios con células de cáncer de mama humana, éstas presentan uniones de la GRP94 a la superficie celular, uniéndose también a Her2 en la superficie, regulando su capacidad migratoria y la actividad promotora oncogénica ²⁴³. La GRP94 interviene en el mantenimiento de la alta densidad de Her2 en la membrana plasmática de células de cáncer de mama y actúa como chaperona del receptor, contribuyendo a su buen funcionamiento ²⁴⁴. Además, la sobreexpresión de GRP94 estaría proveyendo a las células de capacidad para superar el estrés de retículo y facilitar la adaptación a microentornos metabólicamente hostiles ¹⁶⁹. De hecho, la sobreexpresión de GRP94 en tumores que metastatizan a cerebro y en las células de la metástasis, sería un indicativo de que esta proteína podría intervenir en diferentes estadios de la evolución metastásica ²⁰¹.

La concentración de glucosa en el espacio intersticial del parénquima cerebral es menor que en el plasma sanguíneo; en cambio, este espacio intersticial tiene alta concentración de aminoácidos, como glutamina, valina, leucina e isoleucina, los cuales pueden ser utilizados como sustratos energéticos por las células de cáncer de mama que metastatizan en cerebro en ausencia de glucosa. Así, las células que metastatizan en cerebro presentan mayor actividad de la vía gluconeogénica y glucogénica y un mayor metabolismo oxidativo de los aminoácidos, lo que contribuye a su supervivencia y proliferación independientemente del aporte externo de glucosa¹⁹⁰. En este contexto, la deprivación¹⁹⁰ de glucosa provoca un aumento en la

expresión de GRP94 en líneas celulares de cáncer de mama y, consecuentemente, un aumento en su capacidad invasiva ²⁴⁵. En un estudio "in vitro / in vivo" reciente con células de cáncer de mama, las MC que sobreexpresan GRP94 resisten más la privación de glucosa, debido a la inducción de proteínas anti-apoptóticas y a la activación del mecanismo de autofagia, lo que les permite sobrevivir ²⁴⁶. Además, otros estudios experimentales recientes muestran que las células cancerosas, con el fin de aumentar su aporte de glucosa, sobreexpresan también moléculas transportadoras de glucosa, aumentando su capacidad para metabolizarla y facilitando la supervivencia de las células de cáncer de mama en el cerebro, lo cual favorece la MC. Estos transportadores de glucosa podrían ser, pues, potenciales "dianas" terapéuticas para el tratamiento de las MC de cáncer de mama ²⁴⁷. Otro estudio "in vitro / in vivo" ha demostrado que las células que metastatizan en cerebro presentan también un fenotipo lipídico diferencial con respecto a las que metastatizan en otros órganos, aumentando principalmente el contenido de los ácidos grasos y su capacidad para oxidarlos en aquéllas con más habilidad metastásica, e interviniendo de forma crítica la GRP94 en la supervivencia al estrés metabólico de las células que metastatizan en cerebro al actuar como moduladora del metabolismo lipídico ²⁴⁸. En consecuencia, la progresión de la MC se vería favorecida por la disponibilidad de un sustrato bioenergético alternativo, como los ácidos grasos, en situaciones de restricción de glucosa. Recientemente, se ha estudiado el papel de la GRP94 sobre el metabolismo de otro tipo de lípidos como los gangliósidos (GM), lípidos complejos que controlan la dinámica de la superficie de la membrana celular y su señalización. Así, se ha observado que la GRP94 actúa como chaperona del cofactor del enzima hexosaminidasa-A, facilitando que este enzima intervenga en la conversión del GM2 en GM3 en el lisosoma, con lo que mantiene el equilibrio en la relación GM2/GM3 en la membrana celular y se favorece así el potencial metastásico. En consecuencia, la deficiencia de GRP94 favorece la acumulación de GM2 en el lisosoma y la disminución de la conversión de GM2 a GM3, haciendo que este desequilibrio contribuya a la disminución del potencial metastásico. Por tanto, el cofactor de la hexosaminidasa-A, podría ser una diana diagnóstica y terapéutica para las MC ²⁴⁹.

Aunque se han confeccionado y validado nomogramas con variables clínico-patológicas para indicar la probabilidad de MC ^{250,251}, la evaluación de los parámetros patológicos clásicos es todavía insuficiente para predecir el riesgo de MC, no disponiéndose hasta el momento actual de biomarcadores específicos independientes de los parámetros clásicos para predecir este riesgo ni para actuar como dianas terapéuticas. La capacidad predictiva de MC de los dos biomarcadores juntos es mayor que la de cada uno de ellos por separado, y mientras que el FN14 presenta mayor especificidad y la GRP94 mayor sensibilidad, la evaluación combinada de ambas moléculas incrementa la sensibilidad, tanto en el grupo Luminal (RE-positivos) como en el no-Luminal (RE-negativos) ^{224,225}.

En nuestra serie, la predicción de MC en las pacientes con carcinoma infiltrante de mama está relacionada con el subtipo molecular del tumor primario, siendo el riesgo mayor en las pacientes con RE negativos. No obstante, las pacientes con un mejor pronóstico "a priori", como las del grupo Luminal (RE-positivos) pueden ser estratificadas por su probabilidad de desarrollar MC, teniendo mayor riesgo de presentarla si sobre todo FN14 está sobreexpresado (OR= 36.70) ²²⁴. Al igual que la detección precoz de la MC y su tratamiento con SRS parece mejorar el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama metastásico Her2-positivo ²⁵², la predicción de MC de forma más específica en las pacientes del grupo Luminal por medio de los biomarcadores podría plantear estrategias terapéuticas futuras para mejorar el pronóstico de estas pacientes, a la espera de disponer de terapias específicas dirigidas a las células metastásicas a cerebro.

En las pacientes con cáncer de mama del grupo no-Luminal (RE-negativos) la valoración combinada de FN14 y GRP94 mejora la evaluación del riesgo de progresión a MC, que aumenta si esta combinación de biomarcadores es positiva, de manera independiente del estado de Her2 (OR= 4.04). Esto hace que el "kit" diagnóstico propuesto integre la determinación de los dos biomarcadores. Además, en estas pacientes del grupo no-Luminal, con la combinación de FN14, GRP94 y Her2 también se incrementa la sensibilidad para predecir la evolución a MC ²²⁴. Los factores de riesgo que se han asociado al desarrollo de MC de cáncer de mama incluyen: Her2-positivo, RE-negativos, alta actividad proliferativa (Ki-67), tumor de

alto grado histológico, tamaño tumoral superior a 2 cm, edad joven (inferior a 50 años) y afectación ganglionar linfática ²⁵³⁻²⁵⁵. Las MC en pacientes con cáncer de mama suelen ocurrir en estadios avanzados, pacientes diagnosticadas de metástasis sistémicas (p.e. pulmonares, hepáticas u óseas) o amplia afectación loco-regional, cuyo tumor primario presenta además un estatus Her2-positivo o TN^{24,253,256}. El patrón de expresión genética en el cáncer de mama podría utilizarse como marcador de detección precoz de MC ²⁵⁷ y la presencia de formas truncadas de Her2 mostraría un valor predictivo significativo ²⁵⁸. También se han relacionado algunos factores socioeconómicos con la presentación sintomática de la MC ²⁵⁹. El valor de la expresión de FN14 y GRP94 reside en su capacidad de predecir la MC con independencia de la expresión de Her2 y/o de receptores hormonales, por lo que el potencial predictivo del riesgo de desarrollar MC se ejerce tanto en pacientes TN como Her2-positivas ²²⁴. Además, la expresión de GRP94 no sólo es independiente del estado de los RE, sino también de la edad, tamaño del tumor primario y grado de afectación ganglionar regional ²⁶⁰.

Por otro lado, en nuestro estudio, al igual que las pacientes que sobreexpresan Her2 y aquéllas que son TN, las que sobreexpresan FN14 y GRP94 tienen una disminución de la probabilidad de supervivencia libre de MC, por lo que estos biomarcadores demuestran tener un valor pronóstico que se extiende de forma significativa a aquellas pacientes con tumores Luminales que sobreexpresan FN14, al igual que es menor en las pacientes del grupo no-Luminal (RE-negativos). La MC suele desarrollarse de forma tardía en el transcurso de la enfermedad metastásica de pacientes con cáncer de mama, y empeora drásticamente el pronóstico de las pacientes, con una supervivencia del 20% al primer año, siendo el subtipo molecular el predictor final de la supervivencia total ²⁵³. Hay autores que han relacionado también la presencia de determinadas mutaciones genéticas (p.e. BRCA1) con un menor período libre de MC ²⁶¹. El estadio, la extensión de la enfermedad primaria, el KPS y los subtipos TN y Her2-positivo juegan un importante papel en el pronóstico²⁶². Además del KPS, la existencia de metástasis extracraneales en el momento del diagnóstico de las MC, el número de MC, el tipo de tratamiento local administrado y el tratamiento sistémico con trastuzumab influyen en la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama que sobreexpresan Her2 ²⁶³. También la

edad, sexo, clase de RPA y la radioterapia postoperatoria se han evaluado como factores pronósticos que influyen en la supervivencia en pacientes que han sido tratadas quirúrgicamente de su MC ²⁶⁴. Por otro lado, el valor pronóstico de las distintas variables clínico-patológicas en el cáncer de mama puede ser diferente si analizamos las pacientes antes o después de que desarrollen MC ²⁶⁵. Así, tras el diagnóstico de MC, la edad joven, el estatus Her2-positivo y la presencia de MC única son factores que mejoran la supervivencia ¹⁵. Asimismo, el índice pronóstico GPA-específico de cáncer de mama en las pacientes con MC, basado en las variables edad, KPS y fenotipo molecular, posee una capacidad pronóstica significativamente mayor que el subtipo molecular sólo ²⁵³, y se asocia de forma significativa con la supervivencia total ²⁶⁶. Respecto a la expresión de FN14, ésta es baja en el tejido mamario normal, pero suele estar significativamente elevada en todos los subtipos moleculares de cáncer de mama, sobre todo en los tumores primarios TN ²⁶⁷ y Her2-positivo ²³³. Se ha visto en estudios previos que una elevada expresión de FN14 se correlaciona de forma significativa con diversos indicadores de mal pronóstico, siendo más alta en pacientes con el subtipo molecular “Her2-enriched” ²³⁴, pudiendo ser un marcador pronóstico válido para pacientes con carcinoma de mama ²⁶⁸.

Otro dato a tener en cuenta es que las pacientes con tumores FN14-positivos que habían recibido quimioterapia adyuvante con taxanos, tienen una supervivencia significativamente menor, mientras que la supervivencia libre de MC en estas pacientes que sobreexpresan FN14 no viene influenciada por la administración adyuvante de taxanos. Esto posiblemente pueda deberse a la poca permeabilidad de la BHE a estos fármacos quimioterápicos, o bien que estos fármacos no actúen de forma eficaz sobre las células del tumor que sobreexpresan FN14. Estos resultados, aunque esperanzadores, requerirán una futura ampliación del estudio ya que el análisis multivariado y la subclasificación de las muestras hacen que el número de efectivos sobre los que se está haciendo el seguimiento sea pequeño.

Por otra parte, la determinación de los dos biomarcadores sería de utilidad para seleccionar a las pacientes que podrían beneficiarse de un seguimiento por imagen de RMN craneal de forma regular, desde el momento del diagnóstico del tumor

primario, sobre todo si tenemos en cuenta la supervivencia libre de MC de las pacientes del grupo Luminal de nuestro estudio. Esto sería especialmente importante si tenemos en cuenta que, según el estudio de Molnár IA, et al. ²⁶⁹, las metástasis detectadas en las pacientes con subtipo Luminal-A de cáncer de mama suelen ser solitarias en más del 50% de ellas, lo que hace que puedan beneficiarse de un diagnóstico y tratamiento precoces. Los estudios de imagen para el cribaje de las MC en pacientes con cáncer de mama no están recomendados habitualmente, puesto que no hay evidencia de que se prolongue la supervivencia total, aun siendo importante la detección precoz de la MC para actuar con el fin de minimizar el daño irreversible al SNC ²⁵³. No obstante, se está evaluando la conveniencia o no de realizar estudios de cribaje o rutina de MC por RMN, tanto en las pacientes Her2-positivo como en las que son TN, además de la adquisición de imágenes especiales que detecten alteraciones metabólicas en el cerebro de forma precoz, y no sólo realizar la RMN cuando haya síntomas neurológicos (Estudio: NCT03881605). Asimismo, un estudio clínico está analizando la utilidad de realizar RMN cerebral de cribaje en función del subtipo molecular (Estudio: NCT04030507). Y otros estudios que están en marcha se basan en la detección de las células de cáncer de mama en el SNC. En este sentido, se está investigando en fase II el uso de radionúclidos dirigidos contra las MC de pacientes Her2-positivo, como el compuesto molecular conjugado formado por una parte anti-Her2 unida al radionúclido Galio-68 (Ga-68), donde se intenta evaluar mediante PET-TC la incorporación de este compuesto por las células Her2-positivo de la MC de cáncer de mama (Estudio: NCT03331601); este enfoque permitiría detectar las células Her2-positivo de la MC y valorar la respuesta a terapias anti-Her2 por imagen. También se está poniendo a prueba el papel de los ultrasonidos guiados por imagen de RMN en la disrupción de la BHE, con el fin de estudiar su factibilidad y seguridad en pacientes con MC de cáncer de mama Her2-positivo (Estudio: NCT03714243).

El diseño de un protocolo en el que incluyera no sólo el conocimiento del subtipo molecular sino también el de la expresión de los biomarcadores FN14 y GRP94 podría aportar una valoración fiable del riesgo de MC, facilitando el diagnóstico precoz a través del seguimiento por RMN craneal y, en consecuencia, la indicación precoz del tratamiento local y sistémico de la MC ²²⁴. Por ello, proponemos que este

DISCUSIÓN

seguimiento realizado con imagen de RMN sea efectuado durante al menos 7 años (alrededor de los 80 meses), período tras el cual la recaída por MC en las pacientes del grupo Luminal se estabiliza (Figura 35). Esta es una propuesta novedosa que revertiría en una mejora de la evolución clínica de las pacientes.

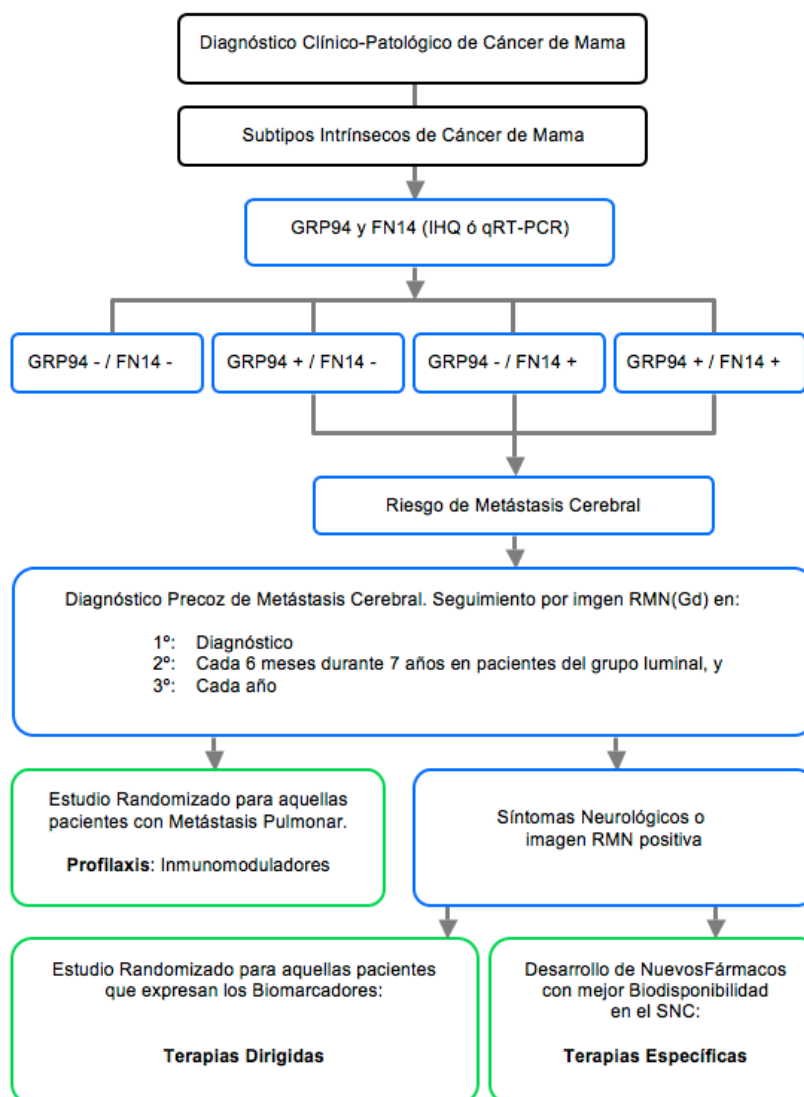


Figura 35. Protocolo propuesto desde el diagnóstico a la profilaxis y/o enfoque terapéutico para pacientes en riesgo de metástasis cerebral. Negro: Protocolo diagnóstico actual. **Azul:** Seguimiento propuesto para aquellas pacientes del grupo Luminal con los biomarcadores positivos. **Verde:** Profilaxis y terapias basadas en la expresión de los biomarcadores. Martínez-Aranda A et al. Front Oncol. 2017.

Dados los resultados obtenidos en la práctica clínica y en los estudios realizados, por el momento existen grandes limitaciones tanto en la detección precoz como en el tratamiento de las MC de cáncer de mama. No obstante, estamos en espera de

resultados de los estudios clínicos que todavía están en curso. Actualmente, la indicación de un tipo u otro de tratamiento local (cirugía, WBRT, radioterapia local o SRS) en la MC viene condicionada por el estadio, evolución de la enfermedad primaria, estado general de las pacientes, la accesibilidad quirúrgica, la posible secuela postquirúrgica y el tratamiento local previo recibido, así como por el tamaño y número de las MC ^{44,86,253}. La WBRT tiene sus limitaciones, ya que con las dosis de radiación habituales existe un riesgo no despreciable de alteración de las funciones neurocognitivas ⁴⁵. A este respecto, la SRS permite mantener la función neurocognitiva con menores efectos adversos, con mejora en el control local, ventaja en la supervivencia en pacientes de menos o igual de 50 años de edad y mejora en la calidad de vida ^{253,270-273}. No obstante, la presencia de múltiples MC y la aparición del efecto adverso a la radiación o ARE (complicaciones basadas en la lesión endotelial, necrosis, edema vasogénico y efecto masa en el tejido cerebral) ²⁷⁴ limitan su aplicación, ya que estas complicaciones están relacionadas con la re-irradiación, dosis administrada y volumen de la MC ²⁷⁵. Existen estudios fase II en curso sobre el tratamiento de las MC de cáncer de mama empleando la SRS y/o cirugía. El papel de la SRS y/o cirugía en el control de las MC de pacientes Her2-positivo (Estudio: NCT02898727), así como la administración de radioterapia estereotáxica fraccionada (8 Gy/fracción, de 3 a 5 fracciones) en lugar de SRS en pacientes que tengan entre 1 y 10 MC (Estudio: NCT04061408) forman parte de estudios que evalúan la tasa de control local, la supervivencia libre de progresión y los efectos adversos. Otro estudio clínico en fase III randomizado compara la SRS con la WBRT en pacientes con un número mayor de 4 MC, concretamente entre 5 y 20 MC, ya que por el momento se desconoce si la SRS podría mejorar la calidad de vida en estos pacientes con tantas MC en comparación con el esquema clásico de WBRT, es decir, de 30 Gy en 10 fracciones (Estudio: NCT03075072).

El papel de la quimioterapia en pacientes con MC de cáncer de mama ha sido controvertido y limitado. Fármacos como la capecitabina y la temozolomida (TMZ) se han utilizado en el tratamiento de las MC, mostrando la combinación de ambos una TRO en el cerebro del 18% ²⁷⁶. La capecitabina es un profármaco oral que no tiene actividad antiproliferativa y que se convierte, con la intervención de la citidina-deaminasa y la timidina-fosforilasa, en el compuesto citotóxico activo 5-fluorouracilo

en el tejido tumoral, donde alcanza más concentración que en el tejido sano, aunque tampoco alcanza altas concentraciones en el SNC ^{277,278}. El tratamiento con TMZ, un agente quimioterápico alquilante vía oral que atraviesa la BHE y que ha formado parte del tratamiento estándar en pacientes con gliomas de alto grado ²⁰⁹, no se ha mostrado eficaz para el tratamiento de las MC cuando se administra solo. En una revisión realizada por Zhu W et al. ²⁷⁹ se analizaron 21 estudios clínicos, de los cuales en 9 se englobaron pacientes con MC de cáncer de mama, que estudiaron el papel de la TMZ en el tratamiento de las MC. Al utilizar la TMZ como agente único se observó que la TRO y la supervivencia libre de progresión cuando se administraba a dosis estándar (150-200 mg/m²) eran similares a cuando se administraba con dosis más altas. Analizando en estos estudios las pacientes con MC de cáncer de mama, se observó que la inmensa mayoría progresó y en una minoría se estabilizó la enfermedad tras el tratamiento, obteniéndose una supervivencia libre de progresión inferior a dos meses. Estos resultados no han propiciado la monoterapia con TMZ como opción terapéutica. Además, muchas de las pacientes a las que se les administró TMZ en combinación con otros fármacos quimioterápicos habían recibido ya tratamientos previos sin éxito, presentando la mayoría estabilización o progresión de sus MC, con una supervivencia libre de progresión inferior a seis meses. Incluso en un estudio fase II más reciente, la combinación de TMZ con irinotecán ha demostrado una actividad limitada en pacientes con cáncer de mama de cualquier subtipo molecular que han progresado en SNC, obteniéndose una supervivencia mediana total de 5.6 meses ²⁸⁰. Otros estudios clínicos fase II han evaluado la respuesta sobre la MC utilizando esquemas terapéuticos que combinaban TMZ con WBRT, no obteniéndose un beneficio clínico con esta combinación, tanto en relación con la TRO como en relación con la supervivencia total y libre de progresión ²⁸¹⁻²⁸³.

Los estudios farmacocinéticos han mostrado que la concentración que la TMZ adquiere en el líquido cefalorraquídeo es similar a la que adquiere en el parénquima, aunque puede llegar a alcanzar el 35% de la concentración plasmática cuando se administra de forma concurrente con radiación ionizante ²⁰⁹. Además, existe cierto efecto radiosensibilizante de la TMZ con dosis inferiores a 150 mg/m² cuando se combina con WBRT a dosis entre 20-40 Gy; sin embargo, los ensayos que han

analizado el papel de esta combinación en las pacientes con MC de cáncer de mama mostraron o bien una respuesta parcial ²⁸⁴ o bien progresión en la mayoría de las pacientes ²⁸⁵, alcanzando en ambos casos una supervivencia libre de progresión inferior a un año. Por otro lado, las pacientes diagnosticadas de su tumor primario y MC que se someten precozmente a tratamiento sistémico concomitante con SRS presentan, de forma significativa, mejor supervivencia que aquellas sometidas sólo a SRS ²⁸⁶. En un estudio experimental reciente se ha visto que bajas dosis de TMZ de forma profiláctica puede prevenir la aparición de MC en modelos murinos de cáncer de mama, por lo que la administración oral de TMZ a pacientes con MC de cáncer de mama Her2-positivo tras el tratamiento local está actualmente en estudio dentro del contexto de un ensayo clínico de prevención secundaria ²⁸⁷.

Cabe señalar que muchos estudios clínicos realizados en pacientes con MC son estudios de fase II en los que se han englobado pacientes con MC de diferentes orígenes, mostrando características clínicas heterogéneas entre las pacientes estudiadas, diferencias entre sus regímenes terapéuticos administrados para las MC y diferencias entre los tratamientos previos recibidos ^{279,285}. Así, el papel controvertido que la quimioterapia ha tenido en el control de las MC del cáncer de mama puede depender de la ausencia de datos de estudios randomizados prospectivos específicamente bien diseñados que incluyan sólo pacientes con MC de cáncer de mama ²⁸⁸.

Por otra parte, se han realizado estudios con terapias biológicas dirigidas contra moléculas concretas en pacientes con MC de cáncer de mama, en combinación o no con fármacos quimioterápicos. Además, muchas combinaciones entre las diferentes terapias dirigidas están actualmente en diferentes fases de estudio clínico. Así, en pacientes metastásicas con receptores hormonales (RH) positivos se han estudiado, en diferentes fases clínicas, el efecto de los antiestrógenos asociados a inhibidores de las kinasas dependientes de ciclina CDK4/6 (p.e. ribociclib, abemaciclib, palbociclib) ²⁸⁹. En un reciente estudio fase II, el abemaciclib parece tener un beneficio clínico en las pacientes con RH-positivos y MC, alcanzando concentraciones terapéuticas en la MC ²⁹⁰. El palbociclib asociado a terapias anti-Her2 y endocrina está siendo estudiado en fase III para pacientes con RH-positivos y

con MC (Estudio: NCT02947685) y en otros estudios con otras combinaciones terapéuticas; y por su parte, el ribociclib está siendo evaluado en estudios fase III en combinación con antiestrógenos, como el letrozol o el fulvestrant, en pacientes con RH-positivos y con MC de cáncer de mama ²⁹¹. Sobre las pacientes con RH-positivos también hay estudios en diferentes fases clínicas que asocian antiestrógenos con inhibidores de vía PI3K/AKT/mTOR (p.e. alpelisib, vistusertib, everolimus). Así, están en estudio asociaciones de fulvestrant con alpelisib, fulvestrant con vistusertib, y letrozol o exemestano con everolimus ²⁸⁹.

Desde un punto de vista experimental, hay estudios que muestran que el promotor del enzima MGMT está con frecuencia metilado (silenciado) en las células con RE-negativos, mientras que este enzima está sobreexpresado en células de cáncer de mama con RE-positivos, resultando la inhibición “in vivo” de la MGMT en un aumento de la sensibilidad a la TMZ de las células de cáncer de mama con RE-positivos ²⁹². La TMZ no evita la aparición de MC producidas por células de cáncer de mama que expresan MGMT, y en muestras pareadas de pacientes con cáncer de mama se ha observado en el 43.5% de casos una expresión disminuída de MGMT tanto en la muestra del tumor primario como en la de la MC ²⁹³.

Las pacientes con Her2-positivo en el tumor primario de mama son habitualmente tratadas con trastuzumab (anticuerpo anti-Her2) después de la administración de quimioterapia, obteniendo una mejor respuesta sistémica ²⁹⁴. El trastuzumab actúa sobre las metástasis sistémicas prolongando la supervivencia, pero no actúa sobre las MC, ya que la mayoría de anticuerpos o agentes anti-Her2 no atraviesan la BHE; el trastuzumab sólo podría entrar en el SNC y actuar en las células tumorales Her2-positivas si hubiera una disrupción en la integridad de la BHE en la propia MC o por WBRT, por lo que sería razonable tratar las MC de pacientes que expresan Her2 con fármacos anti-Her2 que atraviesen la BHE ²⁸⁸.

Un estudio en fase II combina el quimioterápico TMZ con un conjugado de trastuzumab-emtansina (T-DM1), formado por la unión estable de trastuzumab (T) y un fármaco citotóxico antimicrotúbulo (DM1), con el fin de analizar si esta combinación es mejor que la administración sola de T-DM1 en la prevención

secundaria de nuevas MC en pacientes Her2-positivo tras SRS (Estudio: NCT03190967). Otro estudio trata de evaluar la tasa de respuesta en el SNC cuando se combina el trastuzumab con un inhibidor de la actividad del enzima PI3K (Estudio: NCT03765983). En pacientes metastásicas con Her2-positivo se ha estudiado también los inhibidores de vía PI3K/AKT/mTOR (p.e. sirolimus) con trastuzumab, con significativa eficacia, aunque se ha visto desarrollo de resistencias. Estos inhibidores también se han estudiado en combinación con lapatinib mostrando resultados prometedores ²⁸⁹.

Por otro lado, la proteína Her2 presenta un dominio intracelular con actividad tirosin-kinasa, que se activa cuando Her2 se une a su ligando, produciéndose a su vez activación de vías de señalización (p.e. PI3K/Akt y Ras/MAPK) que llevarán, en última instancia, al aumento de la proliferación celular y la supresión de apoptosis²⁹⁵. Muchos inhibidores de tirosin-kinasa (TKI) no atraviesan la BHE, por lo que su papel no está todavía totalmente definido en pacientes con cáncer de mama. No obstante, la inhibición de la actividad tirosin-kinasa contribuiría a equilibrar estas funciones disreguladas, por lo que estos fármacos TKI (p.e. lapatinib, sunitinib, pyrotinib, afatinib, neratinib, tucatinib) han adquirido relevancia en los últimos años, sobre todo aquellos que penetran en el SNC.

Se han realizado estudios clínicos y existen otros en curso en los que, de forma secuencial o combinada, se administran TKI o anticuerpos monoclonales en asociación o no con quimioterapia. La mayoría de estos estudios clínicos son de fase II, en los que se valora la seguridad y la efectividad de un determinado tratamiento. Las pacientes Her2-positivo con MC refractarias que han sido tratadas con quimioterapia, trastuzumab y WBRT presentan una tasa de respuesta objetiva (TRO) del 6% al tratamiento con lapatinib ²⁷⁶, y la combinación de lapatinib con capecitabina en pacientes Her2-positivo con MC ha mostrado respuesta objetiva de la MC en más del 60% de las pacientes ⁷⁸, aunque con una toxicidad no despreciable. Además, no se ha observado diferencia significativa en la incidencia de MC entre las pacientes metastásicas tratadas con lapatinib y capecitabina (3%) o con trastuzumab y capecitabina (5%) ²⁹⁶. Otros estudios en fase I y II han mostrado

resultados esperanzadores con la combinación de lapatinib con WBRT, tanto en la respuesta objetiva como en la supervivencia total ²⁷⁶.

Otro TKI como el sunitinib (inhibidor multikinasa) ha demostrado, en estudios pre-clínicos en animales, su distribución en el cerebro y médula espinal tras su administración oral o intravenosa ²⁹⁷, por lo que el argumento para su uso en el tratamiento de las MC de cáncer de mama está basado en la hipótesis de que potencialmente es capaz de atravesar la BHE. No obstante, en un estudio clínico en fase II, realizado sobre un reducido número de pacientes con MC de cáncer de mama, se vió que la administración combinada de capecitabina con WBRT seguido de capecitabina con sunitinib no prolongaba la supervivencia libre de progresión y, en cambio, aumentaba la toxicidad ²⁹⁸. Estos datos nos llevan a pensar en la necesidad de constatar mediante estudios randomizados fase III el grado de eficacia del sunitinib al combinarlo con SRS y precisar su grado de toxicidad, con el fin de determinar su contribución en la respuesta de la MC de pacientes con cáncer de mama.

En pacientes Her2-positivo con MC también se está estudiando la TRO en el SNC, así como el tiempo hasta la progresión y la supervivencia total cuando se combina el pyrotinib vía oral, un TKI que actúa contra los receptores Her1, Her2 y Her4, con la vinorelbina (Estudio: NCT03933982). Otros fármacos TKI son el afatinib y el neratinib, que son moléculas más pequeñas que el lapatinib ²⁷⁶. Así, está en curso un estudio fase I/II en pacientes Her2-positivo con MC refractaria en el que se combina el afatinib con el compuesto T-DM1, con el objetivo de valorar la TRO y la supervivencia libre de progresión (Estudio: NCT04158947). Por su parte, el neratinib, un inhibidor irreversible de todos los receptores Her2, ha mostrado más eficacia sistémica que el trastuzumab ²⁸⁹, y en pacientes Her2-positivo con MC también se está estudiando en fase II en combinación con capecitabina o con T-DM1, con el fin de valorar la TRO y la supervivencia libre de progresión (Estudio: NCT01494662).

Finalmente, se ha visto que en pacientes metastásicas Her2-positivo, el tucatinib, un inhibidor muy selectivo de la tirosin-kinasa de Her2, presenta una tolerancia y toxicidad aceptables cuando se asocia a trastuzumab y capecitabina ²⁹⁹. En estudios

clínicos randomizados recientes se ha demostrado que el tucatinib, añadido a la combinación de trastuzumab y capecitabina, mejora significativamente la supervivencia libre de progresión a un año entre las pacientes Her2-positivo con MC en comparación con las pacientes que reciben sólo la combinación de trastuzumab y capecitabina, mostrando además una mayor TRO intracraneal y una mayor supervivencia mediana ^{300,301}. Por tanto, el esquema terapéutico de tucatinib con trastuzumab y capecitabina es el primero que demuestra una eficacia en el contexto de estudios clínicos randomizados.

Mención especial requiere la MC proveniente del cáncer de mama triple-negativo (TN), ya que la agresividad y heterogeneidad biológicas de estas células, su resistencia a fármacos y la ausencia de receptores hormonales y de expresión de Her2 complican el diseño de una estrategia terapéutica tanto a nivel pre-clínico como clínico. Para las pacientes TN la quimioterapia, con el uso de taxanos, antraciclinas y platino, sigue siendo todavía el tratamiento estándar. No obstante, en estas pacientes también se ha estudiado el papel de los antiangiogénicos, el de los inhibidores de los puntos de control inmune y el de los inhibidores de la PARP (Poli ADP-Ribosa Polimerasa).

Los antiangiogénicos son compuestos que inhiben la formación de vasos, siendo un ejemplo de ellos el bevacizumab, que es un anticuerpo monoclonal que inhibe el VEGF. El desarrollo de las MC se ha relacionado con la expresión de VEGF y la angiogénesis, mecanismo ampliamente referenciado en estudios pre-clínicos, donde la neoangiogénesis es una característica de las MC de ciertos tumores sólidos, aunque el desarrollo de la MC en el cáncer de mama no está influenciado por el tratamiento con bevacizumab, quizás porque su patrón de crecimiento es a lo largo de las estructuras vasculares preexistentes (“cooptivo”) y no como consecuencia de neoangiogénesis ³⁰². Por tanto, aunque el bevacizumab ha mostrado un grado de seguridad aceptable tras su administración, su papel en la MC del carcinoma de mama tampoco está del todo definido.

También están actualmente en curso estudios clínicos fase II en los que se están estudiando compuestos denominados ‘inhibidores de punto de control inmunitario’,

como el pembrolizumab y el atezolizumab, los cuales intervienen sobre el sistema inmune bloqueando la vía PD-1 (proteína de membrana del linfocito T) / PD-L1 (proteína de membrana expresada en algunos cánceres) y, así, favoreciendo el efecto citotóxico de los linfocitos T sobre las células malignas. Sobre esta línea de investigación se están estudiando pacientes con cáncer de mama y con al menos dos MC, que reciben tratamiento local con SRS y pembrolizumab sistémico como anticuerpo monoclonal, el cual bloquea la proteína PD-1 del linfocito T, con el fin de valorar la progresión cerebral y los efectos adversos de esta combinación (Estudio: NCT03449238). El cáncer de mama TN es muy inmunogénico y sus células expresan gran cantidad de PD-L1 ³⁰³, por lo que en otro estudio se combina la SRS con el atezolizumab, anticuerpo monoclonal dirigido contra el punto de control inmunitario PD-L1 de la membrana celular en las células cancerosas, con el fin de analizar en estas pacientes TN con MC la supervivencia libre de progresión bajo esta combinación terapéutica (Estudio: NCT03483012). En el contexto de un estudio fase I se está estudiando la toxicidad limitante de dosis de otro anticuerpo monoclonal anti-PD-1, como el nivolumab, cuando se administra previamente a la SRS en pacientes con cáncer de mama metastásico y MC (Estudio: NCT03807765).

Un inhibidor de la PARP como el olaparib ha mostrado, en un estudio randomizado fase III, un aumento de la supervivencia libre de progresión en comparación con quimioterapia en pacientes con cáncer de mama metastásico Her2-negativo con mutación de BRCA ³⁰⁴. Otros inhibidores están en diferentes fases de estudio clínico (veliparib, niraparib, rucaparib, talazoparib).

Por otro lado, en el cáncer de mama TN es frecuente la alteración en la expresión de diferentes miR (microRNA), la cual puede ayudar a diferenciar el cáncer de mama TN del resto de tipos; incluso hay miR que se han asociado con la resistencia o sensibilidad de las células TN tanto a fármacos quimioterápicos como a la radiación ionizante ³⁰⁵. Por tanto, el uso de miR como "dianas" terapéuticas permitiría también estudiar determinadas macromoléculas (p.e. oligonucleótidos antisentido) que inhiban su acción y, así, desarrollar terapias con nanopartículas más específicas para el cáncer de mama TN y menos tóxicas ^{305,306}.

DISCUSIÓN

Actualmente, las terapias basadas en nanopartículas son motivo de un amplio estudio. El principio que fundamenta la administración de un fármaco asociado a una nanopartícula radica en su mayor tiempo de permanencia en la circulación sistémica y en su mayor permeabilidad a través de los vasos del tumor. Muchos fármacos son incapaces de atravesar la BHE por difusión pasiva, por lo que necesitan que las nanopartículas, como vehículo del fármaco, presenten un equilibrio entre su hidrosolubilidad y su liposolubilidad. Además, la BHE en la MC de cáncer de mama presenta una disrupción parcial que no es suficiente para permitir concentraciones elevadas de los quimioterápicos en la metástasis, por lo que las nanopartículas utilizadas, además de estar diseñadas para transportar fármacos de forma selectiva a las células, deben asociarse a compuestos que modulen la permeabilidad de la BHE, con lo que se mejora la llegada del fármaco a la MC ³⁰⁷.

Clínicamente se han utilizado para el cáncer de mama nanopartículas no dirigidas contra ninguna "diana" celular específica, basadas en polietilenglicol, liposomas o albúmina unidos al fármaco quimioterápico (antraciclina o taxano), mostrando mejor efectividad y menor toxicidad comparado con el fármaco de forma aislada ^{64,308}.

En estudios experimentales pre-clínicos "in vitro / in vivo" sobre líneas celulares de cáncer de mama humana de diferentes subtipos moleculares también se han diseñado diferentes estrategias basadas en nanopartículas, como p.e. liposomas ligados a doxorubicina, nanopartículas de óxido de hierro ligadas a pequeños fragmentos de RNA de interferencia o silenciamiento (siRNA), o polímeros ligados a emtansina o paclitaxel ²⁸⁹. Se ha observado que las nanopartículas de oro asociadas a un conjugado péptido-doxorubicina son capaces de atravesar la BHE y llegar a las células metastásicas de cáncer de mama, aumentando la citotoxicidad sobre estas células y la supervivencia de los animales de experimentación ³⁰⁹.

Para células Her2-positivo se ha estudiado a nivel pre-clínico el uso de péptidos que producen disrupción de la dimerización de la proteína Her2 y apoptosis ³¹⁰; el mRNA del trastuzumab vehiculizado por nanopartículas lipídicas para la formación endógena "in vivo" de trastuzumab ³¹¹; el uso de nanopartículas con oro, que son biocompatibles y fáciles de sintetizar, transportando anticuerpos anti-Her2 o

DISCUSIÓN

conjugados trastuzumab-fármaco ^{312,313}; el uso de nanopartículas con alta biocompatibilidad y baja inmunogenicidad, como los exosomas diseñados para modular la inmunidad celular, denominados SMART-Exo (“Synthetic Multivalent Antibodies ReTargeted exosomes”), que pueden transportar en su superficie anticuerpos anti-Her2 y anticuerpos anti-CD3, lo que les permite interactuar con las células de cáncer de mama Her2 positivo y con los linfocitos T ³¹⁴; la utilización de nanopartículas con anti-Her2 y el antibiótico salinomicina (molécula ionófora que forma complejos con iones, afectando el transporte de iones a través de la membrana), con propiedad para eliminar las “stem cell” cancerosas y las células resistentes a apoptosis ³¹⁵; o la utilización de nanopartículas acopladas al complejo trastuzumab-paclitaxel y que mejoran la hidrosolubilidad y biodisponibilidad del quimioterápico ³¹⁶.

No obstante, las peculiares características del cáncer de mama TN han hecho plantear diseños terapéuticos “in vivo” con nanopartículas dirigidas de forma selectiva contra otras “dianas” de la superficie celular presentes en estas células ³¹⁷. Las nanopartículas ligadas a anticuerpos monoclonales específicos contra proteínas de superficie celular pueden liberar de forma más efectiva el fármaco dentro de la célula vía endocitosis. No obstante, a pesar de la eficacia mostrada por las nanopartículas en estos modelos, es fundamental realizar más estudios para mejorar la farmacocinética y la farmacodinámica de estos compuestos antes de su introducción en la clínica ³⁰⁸. La doxorubicina y el paclitaxel son fármacos utilizados para el tratamiento del cáncer de mama TN, aunque su eficacia está limitada por su baja hidrosolubilidad, rápida eliminación, poca selectividad celular y alta toxicidad, por lo que se ha estudiado el efecto de exosomas con su superficie modificada para que reconozcan selectivamente las células TN, haciendo que estos liberen doxorubicina de forma más eficiente ³¹⁸.

También se han utilizado nanopartículas con mayor especificidad en su capacidad de adhesión y dirigidas a un receptor celular, nanopartículas denominadas DART (“Decreased non-specific Adhesivity, Receptor-Targeted polymeric formulations”), aunque son necesarias más investigaciones para definir mejor su papel de vehículo del fármaco, así como su eficacia y seguridad ³¹⁹. No obstante, en un estudio pre-

clínico reciente sobre un modelo de MC de cáncer de mama TN se han utilizado nanopartículas DART que vehiculizan paclitaxel y llevan asociadas un anticuerpo monoclonal anti-FN14, mostrando actividad antitumoral, ya que la expresión de FN14 en la membrana celular de las células de cáncer de mama está aumentada, sobre todo en las células TN ²⁶⁷.

Otras estrategias propuestas para las células Her2-negativo van dirigidas a modular su microentorno tumoral. Así, el microentorno estaría regulado por exosomas, modificadores genéticos, hipoxia, vías de señalización, quimioquinas, factores de crecimiento, reguladores epigenéticos, células inmunes, fibroblastos, etc., por lo que las posibles “dianas” en el microentorno de estas células serían aquellos factores que intervendrían en la migración, la proliferación, la angiogénesis, la evasión de la apoptosis, y las “stem cells” cancerosas (CSCs) ³²⁰. También se podría intervenir sobre algunos miR, inhibiendo la proliferación o regulando la inmunidad ³²¹. La heterogeneidad biológica, genética y molecular del cáncer de mama TN conlleva a que este subtipo molecular sea, a su vez, subclasificado en diferentes subtipos: los subtipos “basal-like 1-2” (BL-1/BL-2), que presentan mutaciones en BRCA1-2, inestabilidad genómica, alteraciones en los puntos de control del ciclo celular, de reparación del DNA y de las vías de señalización de factores de crecimiento, siendo sensibles a esquemas quimioterápicos con platino; el subtipo “mesenquimal” (M), que presenta mutaciones de PIK3CA, donde el papel de los inhibidores de PI3K podría ser importante; el subtipo “mesenquimal-stem like” (MSL), que presenta expresión de genes implicados en la EMT y asociados con las “stem-cell”, pudiendo ser sensibles a inhibidores de la EMT; el subtipo “immunomodulatory” (IM), donde los genes implicados en las vías de señalización de procesos inmunes juegan un importante papel; el subtipo “luminal-androgen receptor” (LAR), sensible a moléculas cuya “diana” sean los receptores de andrógenos; y el subtipo “unstable” (UNS)^{320,322}. Estas características diferenciales dentro del cáncer TN implican también la existencia de una heterogeneidad biológica en los componentes inmune, angiogénico, estromal y metabólico de sus respectivos microentornos, permitiendo plantear nuevas estrategias inmunoterápicas según estos perfiles ^{320, 323}.

Por su parte, los biomarcadores FN14 y GRP94 no sólo pueden indicar la predicción y pronóstico de las MC por cáncer de mama, sino que también podrían constituirse como “dianas” terapéuticas en las MC de estas pacientes. Desde un punto de vista terapéutico, los anticuerpos anti-FN14 ya han demostrado actividad antitumoral en modelos experimentales con xenoinjertos utilizando células de cáncer de mama, incluso potenciando la eficacia del paclitaxel ³²⁴. La interacción de la citoquina TWEAK con el receptor FN14 es una importante diana terapéutica. Recientemente se han descrito cuatro péptidos sintéticos capaces de unirse a TWEAK e inhibir la vía de señalización de FN14 en células de cáncer de mama metastásicas a cerebro³²⁵. Asimismo, anticuerpos anti-TWEAK ya se han administrado en fase I a pacientes con tumores sólidos avanzados que expresan FN14, observándose una buena tolerancia y una farmacocinética favorable, siendo la primera evidencia de un tratamiento específico contra la vía de señalización FN14/TWEAK ³²⁶. También se ha estudiado la liberación dirigida de paclitaxel liposomal en células tumorales FN14-positivas en un modelo murino, aumentando la supervivencia en las metástasis pulmonares de carcinoma de mama ³²⁷. Por otro lado, estudios pre-clínicos y estudios clínicos fases I-II han mostrado que el mecanismo de inhibición de las proteínas HSP90 puede ser importante en el tratamiento de las pacientes con cáncer de mama avanzado Her2-positivo refractarias a trastuzumab, con lo que los inhibidores de HSP90 pueden ser prometedores como terapia en futuros ensayos clínicos. Para estudiar la actividad inhibitoria sobre las proteínas de la familia HSP90, y sobre la isoforma GRP94 en particular, diversos compuestos naturales, quiméricos o sintéticos se han probado en experimentos “in vitro” e “in vivo”. Uno de los efectos que producen los inhibidores de las HSP90 es la degradación de la proteína Her2, debido a que estos inhibidores interfieren con su función de chaperona. Así, el derivado antibiótico geldanamicina, inhibidor de HSP90, ha mostrado actividad anticancerosa, aunque presenta baja biodisponibilidad y solubilidad y un perfil de hepatotoxicidad que ha impedido su valoración en posteriores estudios clínicos. Un análogo de la geldanamicina, la 17-allylamino-geldanamicina (17-AAG), ha mostrado una eficacia similar pero con menos efectos secundarios. Otro inhibidor como el radicicol presenta mayor afinidad “in vitro” por la HSP90 que la geldanamicina, pero no presenta actividad antitumoral “in vivo” ³²⁸. El compuesto quimérico (no-natural) radamida, al inhibir las proteínas HSP90, induce la

degradación de Her2 “in vitro”; y su análogo, el Bnlm, presenta una actividad inhibidora selectiva de GRP94 “in vitro”. La inhibición de la GRP94 se relaciona con un descenso en la capacidad migratoria, proliferativa e invasiva de las células metastásicas de cáncer de mama MDA-MB-231 ³²⁸⁻³³⁰. Otros compuestos basados en purina, como el PU-WS13, presentan actividad inhibidora selectiva “in vitro” contra la GRP94, inhibiendo las interacciones entre la GRP94 y el Her2 en la membrana celular, lo que conlleva una inestabilidad de Her2 y, por tanto, facilitando la degradación lisosómica de este receptor ³²⁸. La exposición “in vitro” del análogo purínico sintético BIIB021 con células tumorales MCF-7 promueve la degradación de Her2 y de otras proteínas de señalización oncogénica, mostrando también actividad antitumoral “in vivo” contra células de cáncer de mama que sobreexpresan Her2 ³³¹. Por otra parte, el ganetespib (STA-9090), un inhibidor de la familia de proteínas HSP90 que contiene resorcinol, presenta mayor afinidad que la 17-AAG por la HSP90, mayor penetración tumoral y mejor perfil de efectos secundarios en estudios pre-clínicos ³²⁸, por lo que a diferencia de los inhibidores de HSP90 de primera generación basados en geldanamicina, el ganetespib presenta mejor perfil farmacológico y de seguridad, con mejor solubilidad y menor toxicidad, tanto hepática como cardíaca y ocular ^{332,333}. La acción inhibitoria del ganetespib sobre HSP90 conduce a la degradación del receptor Her2, y a nivel experimental “in vivo” e “in vitro” el ganetespib también actúa a diferentes niveles sobre las células de cáncer de mama Her2-positivo, inhibiendo su proliferación, induciendo su parada del ciclo celular en fases G2/M y facilitando la apoptosis por vía de las caspasas ³³². En estudios “in vitro” e “in vivo” el ganetespib inhibe la capacidad migratoria e invasiva de las células de cáncer de mama metastásicas MDA-MB-231 y reduce las metástasis pulmonares ³³³.

Se han realizado estudios clínicos fase II con ganetespib en pacientes con cáncer de mama metastásico no seleccionadas, Her2-positivo refractarias al trastuzumab o TN, y que han recibido tratamientos previos, observándose actividad antitumoral y buena tolerancia al mismo ³³⁴. Asimismo, en otro estudio clínico fase I la combinación de ganetespib con paclitaxel y trastuzumab también se ha mostrado segura, bien tolerada y clínicamente activa en pacientes con cáncer de mama Her2-positivo refractarias al trastuzumab ³³⁵. Además, el ganetespib potencia los efectos del

lapatinib, y al combinarlo con taxanos inhibe de forma significativa el crecimiento tumoral en modelos "in vitro" e "in vivo" de cáncer de mama TN^{332,333}. El ganetespib también aumenta la citotoxicidad de la doxorubicina interviniendo en la modulación de la respuesta al daño en el DNA, ya que la HSP90 juega un papel crítico en la reparación del DNA y en la estabilidad del genoma³³³. No obstante, la eficacia del tratamiento con ganetespib no está todavía resuelta, pudiendo ser futuramente una molécula prometedora en el tratamiento del cáncer de mama Her2-positivo refractario a tratamientos actuales, incluso cuando existan mutaciones en los dominios extracelular y/o tirosin-kinasa del Her2³³². Otro estudio clínico fase II, utilizando la retaspimicina (IPI-504) como inhibidor de HSP90 en combinación con trastuzumab, ha mostrado una buena tolerancia con una moderada actividad antitumoral en pacientes con cáncer de mama avanzado Her2-positivo³³⁶. El luminespib (AUY922), otro inhibidor de HSP90 que contiene resorcinol, y que ha mostrado actividad contra células de cáncer de mama "in vitro" e "in vivo", se ha utilizado también en estudios clínicos fase II en cáncer de mama metastásico Her2-positivo y RE-positivo³²⁸.

La aplicación o trasvase bidireccional de los conocimientos obtenidos en las investigaciones pre-clínicas y clínicas para la solución de problemas en el ámbito de la biomedicina forma parte de la llamada medicina traslacional, potenciando un conocimiento entre las diferentes disciplinas con el objetivo de solucionar problemas de salud. En consecuencia, nuestro enfoque necesita de forma indiscutible de una perspectiva traslacional, en la que los resultados obtenidos a nivel experimental permitan trasladar o aplicar estas estrategias a nivel clínico y viceversa.

Los múltiples estudios experimentales que han permitido conocer el papel de FN14 y GRP94 en el proceso metastásico junto con el conocimiento de su grado de expresión en las muestras humanas del tumor primario de mama, hacen posible el desarrollo metodológico para la validación de estas moléculas como biomarcadores, correlacionando su expresión con los datos clínico-patológicos de las pacientes. Para una aplicación clínica óptima de los biomarcadores es necesario un amplio número de muestras tisulares de pacientes con una buena recogida y selección de las mismas, un correcto desarrollo y optimización del procedimiento analítico que

verifique la fiabilidad del resultado en la detección del biomarcador y su reproducibilidad (robustez del procedimiento), una correcta validación analítica y clínica y un correcto análisis estadístico y flujo de datos con adecuadas herramientas bioinformáticas ^{222,223,337}. Todo esto permite identificar pacientes que podrían beneficiarse de terapias más selectivas, identificar a pacientes con mayor riesgo de toxicidad, monitorizar la respuesta al tratamiento ajustando dosis y/o pauta, simplificar el proceso de desarrollo del nuevo fármaco, optimizar el número de pacientes y de estudios clínicos necesarios para demostrar la eficacia del fármaco o agente biológico y aumentar la tasa de respuesta objetiva en la subpoblación de pacientes que presentan el biomarcador ³³⁸. Además, continuamente se van desarrollando tests de biomarcadores o pruebas diagnósticas "in vitro" de forma paralela al desarrollo de los fármacos dirigidos contra dianas moleculares específicas ("companion diagnostics"). Estos tests también se conocen como tests farmacodiagnósticos o farmacogenómicos, deben ser probados a nivel pre-clínico y clínico antes de utilizarse de forma rutinaria en la práctica clínica diaria para asegurar su validez analítica y clínica y son la guía para el uso de determinadas moléculas que van dirigidas contra una diana molecular específica, base para un tratamiento selectivo y personalizado ^{338,339}. Por tanto, en la mayoría de ensayos fase II la determinación de la expresión de los biomarcadores de MC sería acompañante en la selección de las pacientes subsidiarias de beneficiarse del nuevo fármaco.

Por otra parte, los resultados obtenidos en clínica con los tratamientos convencionales así como con las diferentes terapias ensayadas contra las MC de cáncer de mama, la mayoría de ellas en el contexto de estudios en fases I-II, permiten plantear el diseño de estrategias terapéuticas diferentes y más selectivas contra las MC. Así, el diseño de estrategias terapéuticas basadas en nanopartículas portadoras de fármaco o agente biológico que atraviesen la BHE y que, a su vez, reconozcan selectivamente las "dianas" FN14 y GRP94 en las células metastásicas de cáncer de mama, abre la puerta no sólo a esquemas de tratamientos más personalizados a nivel sistémico para prevenir la aparición de la MC, sino también al diseño de terapias combinadas de estas nanopartículas con diferentes esquemas de radiación ionizante una vez que la MC ya se ha formado clínicamente. Además, la

aparición de continuas mutaciones en las células cancerosas podría desencadenar resistencia a las terapias biológicas dirigidas, produciéndose un fracaso en el tratamiento selectivo, siendo también necesario desarrollar y diseñar esquemas de terapia múltiple, con varios agentes biológicos selectivos guiados por estos biomarcadores. De esta forma se actuaría sobre varias vías de señalización celular haciendo más difícil la aparición de resistencias ³³⁹.

Por tanto, las potenciales aplicaciones clínicas de estas estrategias terapéuticas combinadas o múltiples precisan de su estudio previo pre-clínico en un modelo experimental adecuado, que permita el análisis “in vitro” e “in vivo” de los efectos de estos esquemas sobre las células cancerosas y de su posible tolerancia y toxicidad. Así, la falta de recursos terapéuticos efectivos para combatir la MC ha llevado a la necesidad de modelos pre-clínicos que remedien la situación patológica de manera fiable y ayuden a incorporar en la práctica clínica el descubrimiento de nuevos fármacos, así como nuevos esquemas de tratamientos combinados.

Por ello, objeto de nuestro interés ha sido perfeccionar un modelo pre-clínico de inducción de MC y de irradiación craneal para optimizar terapias utilizando dos de las herramientas básicas de que se dispone en la actualidad: radioterapia y quimioterapia. Las implementaciones que hemos aportado a la técnica clásica de inoculación intracarotídea junto con el diseño de nuestro modelo de irradiación craneal permiten el estudio pre-clínico “in vivo” de las MC por carcinoma de mama cuando son sometidas a esquemas terapéuticos basados en radio-quimioterapia.

La formación espontánea de MC es poco frecuente en los modelos experimentales de cáncer de mama, teniéndose pues que desarrollar diferentes métodos para estudiar los mecanismos patogénicos y la respuesta a terapias, por lo que tener modelos “in vivo” que reproduzcan estos mecanismos es necesario para desarrollar estrategias diagnósticas y terapéuticas que den respuesta a los problemas en el manejo de la enfermedad ³⁴⁰⁻³⁴⁴. Así, básicamente se conocen dos métodos distintos: la inducción mediante la inyección de células tumorales directamente en el cerebro o en el torrente sanguíneo, utilizando la vía intravenosa (vena de la cola del ratón), la vía intracardíaca (ventrículo cardíaco izquierdo) o la vía intracarotídea; o

alternativamente, haciendo una selección gradual de las células metastásicas al cerebro para obtener líneas celulares que, una vez vehiculizadas, se alojen preferentemente en él y proliferen.

El método de inoculación en ventrículo cardíaco izquierdo produce metástasis en muchos órganos, ocasionando una gran variabilidad en la eficiencia del crecimiento tumoral, lo que dificulta el posterior análisis y evaluación terapéutica ¹⁸⁸. Además, presenta dos problemas: controlar de forma fiable el número exacto de células tumorales inyectadas, teniendo en cuenta que se ha de mantener la aguja en el interior del corazón que late durante todo el proceso de inoculación, y determinar el número de células que llegarán a cada uno de los órganos, incluido el cerebro. En nuestro caso, tras la inoculación celular en el ventrículo cardíaco izquierdo, el tropismo de las células 435Br1 por colonizar inicialmente el pulmón y mediastino dificultaba la obtención de MC, ya que los ratones morían por la enfermedad mediastínica antes de desarrollar la enfermedad cerebral, mucho más selectiva y tardía. Por ese motivo, sólo utilizamos la inyección en ventrículo izquierdo como método de selección de clones metastásicos a cerebro y se optó por la inyección intracarotídea, más específica y reproducible para la MC, en el pase final del procedimiento experimental de selección.

La selección celular da como resultado que en cada pase se inyectan células con mayor habilidad metastásica a cerebro, estas células necesitan menos tiempo para adaptarse al órgano diana, y se disminuye el crecimiento de células en otros órganos ³⁴⁵. Por tanto, planificamos un procedimiento de selección celular “in vivo / in vitro” a partir de repetidas inoculaciones celulares en ventrículo izquierdo, permitiendo seleccionar aquellas pocas células capaces de atravesar la BHE y ser viables en el parénquima cerebral. La maniobra de inoculación en ventrículo izquierdo se realizó guiándonos sólo del signo de llenado rápido de la jeringa con sangre oxigenada (color rojo vivo) ³⁴⁶ para confirmar que estábamos dentro de ese ventrículo, a diferencia de otros trabajos en los que se ha utilizado el control ecográfico para dicha inoculación ^{347,348}. En nuestro caso, el procedimiento supuso una mortalidad intra y postoperatoria del 11%.

Además, es de gran ayuda en estos procedimientos de selección el uso de marcadores celulares que permitan el seguimiento de la actividad metastásica, por lo que utilizamos en la inoculación células de carcinoma de mama humana 435-Br1 (BR-eGFP-CMV/Luc), que expresan, además de la luciferasa, la proteína verde, permitiendo el seguimiento de todo el proceso metastásico con facilidad y, así, adquirir la información en las diferentes etapas experimentales.

Este procedimiento de selección tiene ventaja respecto a la inoculación intravenosa, en la que gran parte de las células inyectadas van a parar a los pulmones y se desarrollan en ellos ^{349,350}, comprometiéndose de este modo la vida de los animales al ser un órgano de vital importancia. Por otro lado, la ventaja de usar líneas celulares con tropismo por el SNC cuando son inoculadas por vía sistémica es que los mecanismos fisiopatológicos por los cuales se produce la MC se asemejan bastante a los que ocurren durante la progresión metastásica del cáncer de mama¹⁸. La gran heterogeneidad de los carcinomas de mama hace necesario disponer de diversos modelos que recojan diferentes perfiles génicos y se definan sobre éstos los elementos de organoespecificidad y malignidad. Este protocolo de obtención de MC se ha utilizado en muchos trabajos pre-clínicos para estudiar diferentes aspectos patogénicos ^{183,351-353}, así como también para el estudio del papel de determinados fármacos quimioterápicos (p.e. TMZ) en la prevención de MC de cáncer de mama²⁹³.

Por otro lado, el procedimiento clásico de inoculación de células tumorales mediante inyección intracarotídea conllevaba, generalmente, una alta incidencia de MC y una baja incidencia de lesiones viscerales ^{354,355}, simulando la diseminación hematógena de las células tumorales al cerebro, su parada en los capilares, su extravasación y penetración en el parénquima cerebral y, por último, su crecimiento en el tejido cerebral ¹⁴⁴. Gran parte de los trabajos publicados que han utilizado este modelo de MC lo han hecho estudiando la patogénesis de la MC con células tumorales de melanoma murino y/o humano ³⁵⁴⁻³⁵⁸ y de carcinoma de mama humana ³⁵⁹. Y en posteriores estudios de otros autores se han incorporado ligeras modificaciones en el procedimiento de inoculación con respecto a la técnica original ^{189,360,361}. El mayor inconveniente de la técnica clásica es que conllevaba un alto grado de traumatismo quirúrgico para los animales, minimizado con la introducción de la anestesia

DISCUSIÓN

inhalatoria, que produce menos problemas que la anestesia intraperitoneal ya que esta última estaba sujeta a mayor variabilidad farmacocinética y era menos controlable. Por otra parte, no tenemos constancia explícita de la mortalidad intra o postoperatoria que se producía con el uso de la técnica clásica por sí misma en los diferentes estudios analizados ^{354,355,359}, ni tampoco cuando se han realizado modificaciones sobre la misma ³⁶⁰.

La técnica de inoculación intracarotídea requiere de una alta habilidad microquirúrgica y produce resultados experimentales más reproducibles, permitiendo tener ratones con MC con características similares en crecimiento tumoral y mortalidad, lo que facilita el estudio de los mecanismos biológicos que intervienen en la progresión de la MC ^{362,363}.

Sobre nuestro estudio experimental, las implementaciones que introdujimos a la técnica clásica de inoculación intracarotídea se realizaron en dos fases. La primera se recoge en el trabajo de Simoes RV et al. ²⁰⁴ con la inoculación de células de carcinoma de mama humana 435-Br1. En ese estudio además se protocolizó la adquisición de imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) para el seguimiento “in vivo” del crecimiento metastásico cerebral. En este estudio se detectaron lesiones cerebrales por RMN en el 69% de los animales entre los días 20 y 62 post-inoculación, confirmándose histológicamente en el 61% del total. Globalmente, la presencia de lesiones, sea por RMN y/o por histología, estaba presente en el 85% de los casos estudiados. Las metástasis pulmonares se confirmaron histológicamente en el 46% de los animales y otras metástasis aparecieron en el cuello y parte derecha de mandíbula, progresando rápidamente y causando problemas de alimentación en los animales, lo que precipitaba su muerte. Del total de animales inoculados con las leves modificaciones técnicas aplicadas en aquel momento, la mortalidad perioperatoria resultó ser del 68%. En la segunda fase de implementación introdujimos nuevas modificaciones técnicas y metodológicas (ver sección 4.1.7.2. de Material y Métodos) con el objetivo de hacer el procedimiento más eficiente, lo que ha supuesto en primer lugar no alterar de forma permanente la circulación arterial fisiológica, ya que las ramas arteriales se pinzaron transitoriamente; y en segundo lugar, aumentar la supervivencia perioperatoria con

DISCUSIÓN

el uso de la anestesia inhalatoria acompañada de pauta analgésica y de hidratación³⁶⁴. Todo ello ha dado como resultado que la mortalidad en el procedimiento quirúrgico sea sólo del 8%, que la evolución metastásica sea más homogénea y que los animales vivan lo suficiente como para poder evaluar la respuesta al tratamiento, a pesar de que su complejidad hizo que se requiriera entre 45 y 60 minutos de intervención por cada animal.

Una vez completada esta segunda fase de implementación a la técnica de inoculación intracarotídea, las células seleccionadas BR-eGFP-CMV/Luc-V5CA (BRV5CA) se utilizaron para los experimentos de radio-quimioterapia.

Las mejoras introducidas en la inoculación intracarotídea residen en la eficiencia del procedimiento quirúrgico, ya que las células BRV5 inyectadas en la arteria carótida interna de los ratones se hallaron histológicamente en el cerebro en el 100% de los animales, no desarrollando grandes masas en localizaciones próximas, como cuello o mandíbula, que condicionasen su supervivencia a corto plazo; tampoco hubo síntomas de dificultad respiratoria durante todo el seguimiento ni presencia de metástasis macroscópicas en pulmones ni ganglios linfáticos mediastínicos, aunque microscópicamente se hallasen células en estos órganos, indicando que la progresión de las MC fue la causa de la muerte.

Por tanto, con la selección celular y con las modificaciones aplicadas a la técnica de inoculación intracarotídea conseguimos una supervivencia media suficiente (60.8 ± 13.8 días) para realizar el seguimiento "in vivo" por imagen de RMN y el seguimiento por bioluminiscencia del tratamiento administrado. Además, las imágenes de bioluminiscencia mostraron señales craneales en el 83% de los animales el día 26 post-inyección, justo antes del inicio del protocolo de tratamiento³⁶⁴.

Por otro lado, el diseño de nuestro modelo experimental de irradiación craneal permite irradiar el cerebro de los ratones de forma fiable y reproducible con cualquier esquema de tratamiento radioterápico, pudiendo ser aplicado por investigadores en un entorno hospitalario.

Un pilar fundamental en el tratamiento de las pacientes con MC es la radioterapia. Sin embargo, la radiación ionizante, como arma terapéutica, no ha sido incorporada de forma importante en el diseño de modelos pre-clínicos de MC ³⁶⁵. Clásicamente, un obstáculo importante para incorporar los hallazgos de laboratorio al campo de la radioterapia es la diferencia tecnológica en los métodos de irradiación aplicados en humanos en relación con los aplicados en la investigación con animales.

En los diferentes estudios pre-clínicos se han utilizado diversos métodos y tecnologías para la irradiación craneal de pequeños animales de experimentación, así como diferentes tipos de radiación. Hay estudios en que se han utilizado fuentes naturales de radiación, como el radioisótopo ¹⁹²-Ir (emisor de partículas β^- y rayos- γ) ^{366,367}, el ⁶⁰-Co (emisor de rayos- γ) ³⁶⁸, y el ¹³⁷-Cs (emisor de rayos- γ) ^{369,370}. La principal ventaja de usar una fuente natural radiactiva en un tratamiento de radioterapia es que el coste del equipamiento y la complejidad tecnológica asociada al mismo son relativamente reducidos; no obstante, los principales inconvenientes son que no es posible “desconectar” la fuente de radiación, se ha de reemplazar la fuente radiactiva cada cierto tiempo debido a la progresiva pérdida de actividad, y son necesarios mayores requisitos de protección radiológica.

En otros estudios, en lugar de utilizar una fuente radiactiva natural como medio de irradiación se ha utilizado tecnología generadora de rayos-X para irradiar los animales a estudio. Así, tenemos estudios que han utilizado rayos-X de origen artificial utilizando plataformas integradas tecnológicas, como el SARRP (“Small Animal Radiation Research Platform”) ³⁷¹, sistemas de micro-TC (microtomografía computerizada) ³⁷², cabinas con sistema de irradiación incorporado ³⁷³⁻³⁷⁵, y sistemas de radioterapia de microhaz (“Microbeam Radiation Therapy”) como método de radiocirugía pre-clínica experimental en el cerebro de ratones ³⁷⁶. En estos casos, la ventaja de utilizar tecnología generadora de rayos-X es que la emisión de radiación sólo está disponible si el aparato recibe flujo eléctrico, y además, el hecho de que la radiación no provenga de una fuente natural implica que no existe el problema de la pérdida de actividad con el tiempo. No obstante, el inconveniente de esta tecnología es su alta complejidad y su coste económico.

Por otro lado, gran parte de los estudios clásicos que han utilizado modelos de irradiación craneal en animales se han basado en modelos experimentales de glioma ^{368,372-375,377-379}, en los que se realizaron la implantación ortotópica de las células tumorales a estudio. Gran parte de estos estudios de irradiación craneal en animales han precisado, basándose en sus diferentes objetivos, irradiar focalmente con precisión una parte del cerebro de los animales portadores de glioma, aspecto que ha requerido de una tecnología y una infraestructura de gran coste económico. Además de los mayoritarios estudios pre-clínicos de irradiación craneal sobre modelos murinos de glioma, también se han realizado estudios de irradiación craneal sobre modelos murinos de MC, obtenidos mediante inyección intracerebral de células de cáncer de mama ³⁶⁹ o de células de melanoma humano ³⁷⁰, u obtenidos mediante la inyección intracardíaca de células de cáncer de mama ³⁸⁰.

En referencia a nuestro modelo de irradiación el objetivo no era irradiar una parte concreta del cerebro de los animales, sino el cerebro entero (irradiación holocraneal)³⁶⁴, ya que el patrón de diseminación y comportamiento biológico de las MC no es el mismo que en los gliomas. Por tanto, al administrar la radiación de forma holocraneal, no necesitamos la alta tecnología de precisión que se requiere para irradiar sólo partes concretas del cerebro de los animales. Además, utilizamos una fuente artificial de rayos-X de alta energía, provenientes de un acelerador lineal de uso clínico, un aparato de tomografía (TC) para adquirir las imágenes del modelo y un sistema informático para planificación de dosimetría en 3D, ambos también de uso clínico. Por ello, la aplicación de nuestro modelo es asequible en cuanto a coste económico y fácil de realizar por investigadores dentro de un contexto hospitalario. Además, este modelo permite administrar cualquier fracción de dosis de radiación de forma precisa, fiable y reproducible sobre todo el cráneo, a lo largo de todas las sesiones de tratamiento, así como saber los márgenes de dosis que recibe el cerebro. También permite potencialmente tratar un gran número de animales de forma simultánea, con lo que, en relativamente poco tiempo, se pueden estudiar grandes series de animales.

Es necesario diseñar nuevos regímenes terapéuticos y nuevos fármacos para el tratamiento de la MC, por lo que a nivel experimental se han creado modelos de

tratamiento en busca de opciones terapéuticas, solas o en combinación, más eficaces. A este respecto, nuestro interés en diseñar y desarrollar una terapia experimental combinada basada en radio-quimioterapia radica en el limitado efecto que tienen la radioterapia y quimioterapia solas para tratar las MC y aumentar de forma importante la supervivencia. Por ello, decidimos diseñar en el modelo con ratones hembra atímicos un tratamiento experimental de TMZ combinada con un esquema no-convencional y bien tolerado de radiación ionizante holocraneal, con el fin de analizar "in vivo" la respuesta a esta combinación terapéutica en las MC de cáncer de mama y estudiar su eficiencia.

En nuestro caso, el protocolo de irradiación evaluaba inicialmente la tolerancia y supervivencia de los animales al esquema clásico de irradiación craneal utilizado en humanos (3 Gy/fracción y 10 fracciones, con una dosis total de 30 Gy). El primer inconveniente con el que nos encontramos fue la diferente susceptibilidad a la radiación de las cepas de ratones. Mientras que en los ratones convencionales (CD1) había una buena tolerancia, con sólo presencia de opacidades corneales bilaterales en los irradiados y una supervivencia superior a 5 meses en todos ellos, los ratones inmunodeprimidos Balb-c-nude, apropiados para los xenoinjertos de las células tumorales de origen humano, eran mucho más sensibles, y el mismo esquema clásico de irradiación craneal inducía la muerte en 55-60 días post-tratamiento. La opción de utilizar ratones atímicos de un determinado peso y de un nuevo esquema de irradiación valorado en función de la Dosis Biológica Efectiva o BED (ver Anexo 10.3.) disminuyó la toxicidad, consiguiéndose que los animales tratados sobrevivieran el tiempo suficiente para que se pudiera hacer el seguimiento del proceso metastásico cerebral, siendo la supervivencia en todos los animales atímicos irradiados con el nuevo esquema de irradiación superior a los 5 meses.

Otro inconveniente que podríamos tener con el esquema clásico de radiación es que, al administrar a los animales anestesia con fármacos vía intraperitoneal antes de cada sesión de tratamiento, tendríamos que anestesiarnos hasta un total de diez veces a lo largo del experimento. Esto comportaba el riesgo propio de cada sesión de anestesia, así como el riesgo de que los animales se despertaran y se movieran de forma prematura durante las sesiones finales del tratamiento, por lo que hubieran

sido sesiones fallidas en la administración de la dosis total correcta planificada. El nuevo esquema de radiación aplicado a los atómicos, administrando la dosis planificada en sólo 3 sesiones, evitó en parte este problema al reducirse los días de administración de anestesia.

Por lo que se refiere a la quimioterapia, las evidencias publicadas sobre el efecto radiosensibilizante de la TMZ, su efecto de respuesta sobre modelos experimentales de glioma y la experiencia del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB - CIBER-BBN), fueron la base para la elección de la dosis y el esquema de tratamiento con TMZ en nuestros experimentos.

A nivel experimental se ha estudiado la TMZ sobre todo en modelos de glioma. En el estudio de Cheng CL et al.³⁸¹ utilizando un modelo experimental sobre glioma humano en ratones inmunodeprimidos, se determinó la dosis letal de TMZ en el 10% de animales (LD₁₀) al administrarse vía intraperitoneal, que fue de 350 mg/Kg, observándose que con una dosis de 88 mg/Kg de TMZ (aproximadamente el 25% de la LD₁₀), en el contexto de un tratamiento combinado, se conseguía un retraso en el crecimiento del glioma. En otro estudio, realizado por Kitange GJ et al.³⁸² sobre un modelo murino de glioblastoma multiforme humano, se observó que un esquema de tratamiento con TMZ a dosis de 50 mg/kg/día, 5 días por semana durante 2 semanas, se relacionó con un aumento significativo de la supervivencia de los animales. En otro estudio “in vitro/in vivo” que utilizaba células de carcinoma de mama humana (MDA-MB-231BR) con expresión negativa para el enzima O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferasa (MGMT), un enzima que repara el daño en el DNA producido por grupos metilo, se observó que la radiosensibilidad aumentaba al exponerlas a la TMZ una hora antes de la irradiación, administrando a los animales 10 mg/Kg de TMZ en dosis única³⁸³.

En base a esto, dentro del diseño del tratamiento experimental en nuestro modelo, la dosis de TMZ utilizada para nuestros experimentos fue de 60 mg/Kg/día (ver sección 4.1.13.2. de Material y Métodos), administrada oralmente 5 días consecutivos según nuestro protocolo de tratamiento (ver sección 5.3. de Resultados). Esta dosis supone

DISCUSIÓN

una dosis inferior al 25% de la LD₁₀, intentando evaluar su efecto radiosensibilizante al combinarla con un esquema no-convencional de radiación craneal. Esta dosis fue bien tolerada por los animales, siendo inferior a la dosis de 125 mg/kg/día durante 5 días, considerada como dosis mieloablativa en un estudio "in vivo" posterior ³⁸⁴.

En definitiva, el cáncer de mama es el cáncer que se diagnostica en las mujeres con mayor frecuencia y es el segundo que produce más MC. La prevalencia de la MC entre las pacientes con cáncer de mama oscila entre el 10% y 16%, alcanzando entre el 20% y 36% cuando se incluyen los datos de las series de necropsias. Este escenario es el que motiva trabajos como el nuestro, que intentan aunar la capacidad predictiva sobre la MC que tienen las moléculas que podemos encontrar en las muestras del tumor primario, al mismo tiempo que se desarrollan modelos terapéuticos experimentales; ambos nos ayudan a visualizar nuevas estrategias terapéuticas que cambien el curso de la enfermedad.

7. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La sobreexpresión de los biomarcadores FN14 y GRP94 en los carcinomas infiltrantes de mama predice el riesgo de metástasis cerebral de las pacientes.
2. El valor predictivo que tiene la expresión del receptor FN14 en el carcinoma de mama es más específico de progresión a cerebro que la sobreexpresión de la proteína GRP94, aunque ésta es más sensible, obteniéndose con la combinación de ambos biomarcadores un mayor valor predictivo sobre la aparición de la metástasis cerebral.
3. El FN14 es un marcador pronóstico en los carcinomas de mama del grupo Luminal, ya que su sobreexpresión en este grupo de pacientes se asocia con una disminución de la supervivencia libre de metástasis cerebral.
4. El FN14 es un marcador predictivo de respuesta a terapia en las pacientes con cáncer de mama; en aquéllas pacientes con carcinomas que expresan el receptor la quimioterapia adyuvante con taxanos es menos eficaz y presentan una menor supervivencia que las que reciben pautas con antraciclinas.
5. Las implementaciones introducidas en la técnica de inducción experimental de la metástasis cerebral han mejorado la supervivencia de los animales y permiten disponer de un modelo reproducible para estandarizar estudios de respuesta a terapias y seguimiento “in vivo” por imagen.
6. La pauta de tratamiento radioterápico que hemos optimizado en el modelo experimental de irradiación craneal es fiable, reproducible y permite estandarizar protocolos de tratamiento de la metástasis cerebral, combinando quimio y radioterapia.

CONCLUSIONES

8. LÍNEAS DE FUTURO

LÍNEAS DE FUTURO

Las líneas de futuro que se plantean con el estudio de la presencia de los biomarcadores FN14 y GRP94 en el cáncer de mama se centran en valorar su utilidad en la práctica clínica:

- 1.** Realización de estudios clínicos prospectivos multicéntricos con un mayor número de pacientes con el fin de afianzar el poder predictivo y pronóstico para metástasis cerebral de ambos biomarcadores.
- 2.** La incorporación a la práctica clínica del análisis de la expresión de los biomarcadores FN14 y GRP94 ayudará a identificar un subgrupo de pacientes con cáncer de mama que tienen mayor riesgo de metástasis cerebral y permitirá acciones preventivas.
- 3.** Determinar en muestras de pacientes con cáncer de mama que hayan participado en estudios clínicos randomizados el valor pronóstico de FN14 y GRP94 y el valor predictivo de la respuesta terapéutica a taxanos, tanto en régimen de adyuvancia como de neoadyuvancia.
- 4.** La utilización de estos biomarcadores acoplada al diagnóstico permitiría un desarrollo de tests biotecnológicos que incluyan la determinación de FN14 y GRP94 en muestras tumorales y/o biopsia líquida para mejorar la predicción y pronóstico de la metástasis cerebral del cáncer de mama u otros tumores como pulmón, próstata y riñón.
- 5.** Ampliar el estudio diferencial entre la expresión de estos biomarcadores en el tumor primario de diferentes orígenes y su correspondiente metástasis cerebral, con el fin de constatar si estas moléculas se expresan o no desde el inicio del proceso metastásico y, así, poder diseñar estrategias terapéuticas selectivas y personalizadas, dirigidas contra el tumor primario y/o su posible metástasis cerebral.
- 6.** Analizar en estudios clínicos prospectivos la relación entre la expresión de FN14 y GRP94 y la supervivencia libre de metástasis cerebral en las pacientes Her2-positivo que hayan recibido trastuzumab.

- 7.** Realización de estudios clínicos prospectivos donde la metástasis cerebral por cáncer de mama sea el criterio de inclusión, y donde los biomarcadores expresados en la metástasis cerebral sirvan como “dianas” de terapias selectivas que pasen la BHE, asociándose con diferentes esquemas de SRS o de radioterapia estereotáxica fraccionada.
- 8.** Estudiar el papel que podría tener la temozolomida en la prevención secundaria de las metástasis cerebrales por cáncer de mama en el subgrupo de pacientes que sobreexpresen FN14 y/o GRP94.
- 9.** Utilizar FN14 y GRP94 como “dianas” terapéuticas específicas para dirigir nanopartículas y ensayar “in vivo” esquemas terapéuticos no-convencionales combinando quimio y radioterapia en estudios pre-clínicos de metástasis cerebral.
- 10.** Los resultados obtenidos a nivel pre-clínico con diferentes esquemas terapéuticos combinados pueden ser la base para el diseño de tratamientos en fases clínicas I y II en pacientes que expresen estos biomarcadores.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011; 22(8):1736-47. doi: 10.1093/annonc/mdr304.
2. Principles of HER2 testing (BINV-A). Breast Cancer. Version 3.2012. NCCN (National Comprehensive Cancer Network®). Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines ®) [Internet]. [fecha última actualización: 6 Marzo 2020. Version 3.2020; fecha de consulta: 18 Noviembre 2012]. Disponible en: NCCN.org /www.nccn.com.
3. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MC, Voduc D, Speers CH, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol.* 2010; 28(20):3271-7. doi: 10.1200/JCO.2009.25.9820.
4. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple negative phenotype. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(5):1368-76. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1658.
5. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009; 101(10):736-50. doi: 10.1093/jnci/djp082.
6. Varga Z, Diebold J, Dommann-Scherrer C, Frick H, Kaup D, Noske A, et al. How reliable is Ki-67 immunohistochemistry in grade 2 breast carcinomas? A QA study of the Swiss Working Group of Breast- and Gynecopathologists. *PLoS One.* 2012; 7(5):e37379. doi:10.1371/journal.pone.0037379.
7. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnani M, Piccart-Gebhart M, et al. Panel Members. Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol.* 2015; 26(8):1533-46. doi: 10.1093/annonc/mdv221.
8. Denkert C, Budczies J, von Minckwitz G, Wienert S, Loibl S, Klauschen F. Strategies for developing Ki67 as a useful biomarker in breast cancer. *Breast.* 2015; 24 Suppl 2: S67-72. Review. doi: 10.1016/j.breast.2015.07.017.

9. Ballester RM, Cirauqui B, Dorca J, del Barco S, Falo C, Gil M, Margelí M, Martínez S, Quiroga V, Vayreda J, Rey M, Villanueva R, Vinyes G. ICO Praxi per al tractament mèdic i amb irradiació del càncer de mama. [Internet]. 3^a Edició. Institut Català d'Oncologia. L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona). Departament de Salut, Generalitat de Catalunya. Octubre 2016. [fecha última actualización: 2016; fecha de consulta: 2017]. Disponible en: http://ico.gencat.cat/ca/professionals/guies_i_protocols.
10. Taillibert S, Le Rhun É. Epidemiology of brain metastases. *Cancer Radiother.* 2015; 19(1):3-9. Review.
doi: 10.1016/j.canrad.2014.11.001.
11. Potts DG, Abbott GF, von Sneidern JV. National Cancer Institute study: evaluation of computed tomography in the diagnosis of intracranial neoplasms. III. Metastatic tumors. *Radiology.* 1980; 136(3):657-64.
12. Delattre JY, Krol G, Thaler HT, Posner JB. Distribution of brain metastases. *Arch Neurol.* 1988; 45(7):741-4.
13. Hwang TL, Close TP, Grego JM, Brannon WL, Gonzales F. Predilection of brain metastasis in gray and white matter junction and vascular border zones. *Cancer.* 1996; 77(8):1551-5.
14. Gil-Gil MJ, Martínez-García M, Sierra A, Conesa G, del Barco S, González-Jiménez S, et al. Breast cancer brain metastases: a review of the literature and a current multidisciplinary management guideline. *Clin Transl Oncol.* 2014; 16(5): 436-46. Review.
doi: 10.1007/s12094-013-1110-5.
15. Shen Q, Sahin AA, Hess KR, Suki D, Aldape KD, Sawaya R, et al. Breast cancer with brain metastases: clinicopathologic features, survival, and paired biomarker analysis. *Oncologist.* 2015; 20(5):466-73.
doi: 10.1634/theoncologist.2014-0107.
16. Harrell JC, Prat A, Parker JS, Fan C, He X, Carey L, et al. Genomic analysis identifies unique signatures predictive of brain, lung, and liver relapse. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 132(2):523-35.
doi: 10.1007/s10549-011-1619-7.
17. Smid M, Wang Y, Zhang Y, Sieuwerts AM, Yu J, Klijn JG, et al. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res.* 2008; 68(9):3108-14.
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5644.
18. Lin NU, Amiri-Kordestani L, Palmieri D, Liewehr DJ, Steeg PS. CNS metastases in breast cancer: old challenge, new frontiers. *Clin Cancer Res.* 2013; 19(23):6404-18. Review.
doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0790.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

19. Bendell JC, Domchek SM, Burstein HJ, Harris L, Younger J, Kuter I, et al. Central nervous system metastases in women who receive trastuzumab-based therapy for metastatic breast carcinoma. *Cancer*. 2003; 97(12):2972–7. doi: 10.1002/cncr.11436.
20. Duchnowska R, Biernat W, Szostakiewicz B, Sperinde J, Piette F, Haddad M, et al. Correlation between quantitative HER-2 protein expression and risk for brain metastases in HER-2+ advanced breast cancer patients receiving trastuzumab containing therapy. *Oncologist*. 2012; 17(1):26–35. doi: 10.1634/theoncologist.2011-0212.
21. Clayton AJ, Danson S, Jolly S, Ryder WD, Burt PA, Stewart AL, et al. Incidence of cerebral metastases in patients treated with trastuzumab for metastatic breast cancer. *Br J Cancer*. 2004; 91(4):639–43. doi: 10.1038/sj.bjc.6601970.
22. Lai R, Dang CT, Malkin MG, Abrey LE. The risk of central nervous system metastases after trastuzumab therapy in patients with breast carcinoma. *Cancer*. 2004; 101(4):810–6. doi: 10.1002/cncr.20418.
23. Miller KD, Weathers T, Haney LG, Timmerman R, Dickler M, Shen J, et al. Occult central nervous system involvement in patients with metastatic breast cancer: prevalence, predictive factors and impact on overall survival. *Ann Oncol*. 2003; 14(7):1072–7. doi: 10.1093/annonc/mdg300.
24. Kim YJ, Kim JS, Kim IA. Molecular subtype predicts incidence and prognosis of brain metastasis from breast cancer in SEER database. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018; 144(9):1803-16. doi: 10.1007/s00432-018-2697-2.
25. Warren LE, Guo H, Regan MM, Nakhliis F, Yeh ED, Jacene HA, et al. Inflammatory breast cancer and development of brain metastases: risk factors and outcomes. *Breast Cancer Res Treat*. 2015; 151(1):225-32. doi: 10.1007/s10549-015-3381-8.
26. Tham YL, Sexton K, Kramer R, Hilsenbeck R, Elledge R. Primary breast cancer phenotypes associated with propensity for central nervous system metastases. *Cancer*. 2006; 107(4):696–704. doi: 10.1002/cncr.22041.
27. Brufsky AM, Mayer M, Rugo HS, Kaufman PA, Tan-Chiu E, Tripathy D, et al. Central nervous system metastases in patients with HER2-positive metastatic breast cancer: incidence, treatment, and survival in patients from registHER. *Clin Cancer Res*. 2011; 17(14):4834–43. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2962.

28. Hicks DG, Short SM, Prescott NL, Tarr SM, Coleman KA, Yoder BJ, et al. Breast cancers with brain metastases are more likely to be estrogen receptor negative, express the basal cytokeratin CK5/6, and overexpress HER2 or EGFR. *Am J Surg Pathol.* 2006; 30(9):1097-104.
doi: 10.1097/01.pas.0000213306.05811.b9.
29. Rudat V, El-Sweilmeen H, Brune-Erber I, Nour AA, Almasri N, Altuwaijri S, et al. Identification of breast cancer patients with a high risk of developing brain metastases: a single-institutional retrospective analysis. *BMC Cancer.* 2014; 14:289.
doi: 10.1186/1471-2407-14-289.
30. Duchnowska R, Jassem J, Goswami CP, Dundar M, Gökmen-Polar Y, Li L, et al. Predicting early brain metastases based on clinicopathological factors and gene expression analysis in advanced HER2-positive breast cancer patients. *J Neurooncol.* 2015; 122(1):205-16.
doi: 10.1007/s11060-014-1704-y.
31. Aversa C, Rossi V, Geuna E, Martinello R, Milani A, Redana S, et al. Metastatic breast cancer subtypes and central nervous system metastases. *Breast.* 2014; 23(5):623-8.
doi: 10.1016/j.breast.2014.06.009.
32. Kaal EC, Taphoorn MJ, Vecht CJ. Symptomatic management and imaging of brain metastases. *J Neurooncol.* 2005; 75(1):15–20.
doi: 10.1007/s11060-004-8094-5.
33. Soffietti R, Cornu P, Delattre JY, Grant R, Graus F, Grisold W, et al. EFNS Guidelines on diagnosis and treatment of brain metastases: Report of an EFNS Task Force. *Eur J Neurol.* 2006; 13(7):674–81.
doi: 0.1111/j.1468-1331.2006.01506.x.
34. Fink KR, Fink JR. Imaging of brain metastases. *Surg Neurol Int.* 2013; 4(Suppl 4): S209-19.
doi: 10.4103/2152-7806.111298.
35. Barajas RF Jr, Cha S. Imaging diagnosis of brain metastasis. *Prog Neurol Surg.* 2012; 25:55–73.
doi: 10.1159/000331174.
36. Murrell DH, Foster PJ, Chambers AF. Brain metastases from breast cancer: lessons from experimental magnetic resonance imaging studies and clinical implications. *J Mol Med (Berl).* 2014; 92(1):5-12.
doi: 10.1007/s00109-013-1108-z.

37. Ramakrishna N, Temin S, Chandarlapaty S, Crews JR, Davidson NE, Esteva FJ, et al. Recommendations on disease management for patients with advanced human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer and brain metastases: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol*. 2014; 32(19):2100-8.
doi: 10.1200/JCO.2013.54.0955.
38. Niwinska A, Tacikowska M, Murawska M. The effect of early detection of occult brain metastases in HER2-positive breast cancer patients on survival and cause of death. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010; 77(4):1134–9.
doi: 10.1016/j.ijrobp.2009.06.030.
39. Momose T, Nariai T, Kawabe T, Inaji M, Tanaka Y, Watanabe S, et al. Clinical benefit of ¹¹C methionine PET imaging as a planning modality for radiosurgery of previously irradiated recurrent brain metastases. *Clin Nucl Med*. 2014; 39(11):939-43.
doi: 10.1097/RLU.0000000000000561.
40. Lockman PR, Mittapalli RK, Taskar KS, Rudraraju V, Gril B, Bohn KA, et al. Heterogeneous blood-tumor barrier permeability determines drug efficacy in experimental brain metastases of breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2010; 16(23):5664–78.
doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1564.
41. Andrews DW, Scott CB, Sperduto PW, Flanders AE, Gaspar LE, Schell MC, et al. Whole brain radiation therapy with or without stereotactic radiosurgery boost for patients with one to three brain metastases: phase III results of the RTOG 9508 randomised trial. *Lancet*. 2004; 363(9422):1665–72.
doi: 10.1016/S0140-6736(04)16250-8.
42. Limited Brain Metastases (LTD-1), Extensive Brain Metastases (MU-1). Central Nervous System Cancers. Version 2.2018.-November 26, 2018. NCCN (National Comprehensive Cancer Network ®). Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines ®). NCCN Evidence Blocks™. [Internet]. [fecha última actualización: 26 Noviembre 2018. Version 2.2018; fecha de consulta: 07 Febrero 2019]. Disponible en: NCCN.org / www.nccn.com
43. Lippitz B, Lindquist C, Paddick I, Peterson D, O'Neill K, Beaney R. Stereotactic radiosurgery in the treatment of brain metastases: the current evidence. *Cancer Treat Rev*. 2014; 40(1):48-59.
doi: 10.1016/j.ctrv.2013.05.002.
44. Lin NU, Gaspar LE, Soffiatti R. Breast cancer in the central nervous system: multidisciplinary considerations and management. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2017; 37:45–56.
doi: 10.14694/EDBK_175338.

45. Elder JB, Nahed BV, Linskey ME, Olson JJ. Congress of neurological surgeons systematic review and evidence-based guidelines on the role of emerging and investigational therapies for the treatment of adults with metastatic brain tumors. *Neurosurgery*. 2019; 84(3): E201-3.
doi: 10.1093/neuros/nyy547.
46. Patchell RA, Tibbs PA, Walsh JW, Dempsey RJ, Maruyama Y, Kryscio RJ, et al. A randomized trial of surgery in the treatment of single metastases to the brain. *N Engl J Med*. 1990; 322(8):494-500.
doi: 10.1056/NEJM199002223220802.
47. Ayas AW, Grau S, Jablonska K, Ruess D, Ruge M, Marnitz S, et al. Postoperative local fractionated radiotherapy for resected single brain metastases. *Strahlenther Onkol*. 2018; 194(12):1163-70.
doi: 10.1007/s00066-018-1368-1.
48. Brown PD, Jaeckle K, Ballman KV, Farace E, Cerhan JH, Anderson SK, et al. Effect of radiosurgery alone vs radiosurgery with whole brain radiation therapy on cognitive function in patients with 1 to 3 brain metastases: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2016; 316(4):401-9.
doi: 10.1001/jama.2016.9839.
49. Prabhu RS, Miller KR, Asher AL, Heinzerling JH, Moeller BJ, Lankford SP, et al. Preoperative stereotactic radiosurgery before planned resection of brain metastases: updated analysis of efficacy and toxicity of a novel treatment paradigm. *J Neurosurg*. 2019; 131:1387-94.
doi: 10.3171/2018.7.JNS181293.
50. Yamamoto M, Serizawa T, Shuto T, Akabane A, Higuchi Y, Kawagishi J, et al. Stereotactic radiosurgery for patients with multiple brain metastases (JLGK0901): a multiinstitutional prospective observational study. *Lancet Oncol*. 2014; 15(4):387-95.
doi: 10.1016/S1470-2045(14)70061-0.
51. Tam M, Narayana A, Raza S, Kunnakkat S, Golfinos JG, Parker EC, et al. Role of HER2 status in the treatment for brain metastases arising from breast cancer with stereotactic radiosurgery. *Med Oncol*. 2014; 31(2):832.
doi: 10.1007/s12032-013-0832-0.
52. Teplinsky E, Esteva FJ. Systemic therapy for HER2-positive central nervous system disease: where we are and where do we go from here? *Curr Oncol Rep*. 2015; 17(10):46.
doi: 10.1007/s11912-015-0471-z.
53. Brosnan EM, Anders CK. Understanding patterns of brain metastasis in breast cancer and designing rational therapeutic strategies. *Ann Transl Med*. 2018; 6(9):163.
doi: 10.21037/atm.2018.04.35.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

54. Franciosi V, Cocconi G, Michiara M, Di Costanzo F, Fosser V, Tonato M, et al. Frontline chemotherapy with cisplatin and etoposide for patients with brain metastases from breast carcinoma, nonsmall cell lung carcinoma, or malignant melanoma: a prospective study. *Cancer*. 1999; 85(7):1599–605.
55. Christodoulou C, Bafaloukos D, Linardou H, Aravantinos G, Bamias A, Carina M, et al. Temozolomide (TMZ) combined with cisplatin (CDDP) in patients with brain metastases from solid tumors: a Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) Phase II study. *J Neurooncol*. 2005; 71(1):61–5.
doi: 10.1007/s11060-004-9176-0.
56. Colleoni M, Graiff C, Nelli P, Vicario G, Sgarbossa G, Pancheri F, et al. Activity of combination chemotherapy in brain metastases from breast and lung adenocarcinoma. *Am J Clin Oncol*. 1997; 20(3):303–7.
doi: 10.1097/00000421-199706000-00020.
57. Oberhoff C, Kieback DG, Wurstlein R, Deertz H, Sehouli J, van Soest C, et al. Topotecan chemotherapy in patients with breast cancer and brain metastases: results of a pilot study. *Onkologie*. 2001; 24(3):256–60.
doi: 10.1159/000055088.
58. Lorusso V, Galetta D, Giotta F, Rinaldi A, Romito S, Brunetti C, et al. Topotecan in the treatment of the brain metastases. A phase II study of GOIM (Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale). *Anticancer Res*. 2006; 26(3B):2259–63.
59. Trudeau ME, Crump M, Charpentier D, Yelle L, Bordeleau L, Matthews S, et al. Temozolomide in metastatic breast cancer (MBC): a phase II trial of the National Cancer Institute of Canada-Clinical Trials Group (NCIC-CTG). *Ann Oncol*. 2006; 17(6):952–6.
doi: 10.1093/annonc/mdl056.
60. Omuro AM, Raizer JJ, Demopoulos A, Malkin MG, Abrey LE. Vinorelbine combined with a protracted course of temozolomide for recurrent brain metastases: a phase I trial. *J Neurooncol*. 2006; 78(3):277–80.
doi: 10.1007/s11060-005-9095-8.
61. Rivera E, Meyers C, Groves M, Valero V, Francis D, Arun B, et al. Phase I study of capecitabine in combination with temozolomide in the treatment of patients with brain metastases from breast carcinoma. *Cancer*. 2006; 107(6):1348–54.
doi: 10.1002/cncr.22127.
62. Kurt M, Aksoy S, Hayran M, Guler N. A retrospective review of breast cancer patients with central nervous system metastases treated with capecitabine. [Abstract]. *J Clin Oncol*. 2007; 25(suppl 18):Abstract 1098.
doi: 10.1200/jco.2007.25.18_suppl.1098.

63. Lassman AB, Abrey LE, Shah GD, Panageas KS, Begemann M, Malkin MG, et al. Systemic high-dose intravenous methotrexate for central nervous system metastases. *J Neurooncol.* 2006; 78(3):255–60.
doi: 10.1007/s11060-005-9044-6.
64. Linot B, Campone M, Augereau P, Delva R, Abadie-Lacourtoisie S, Nebout-Mesgouez N, et al. Use of liposomal doxorubicin-cyclophosphamide combination in breast cancer patients with brain metastases: a monocentric retrospective study. *J Neurooncol.* 2014; 117(2):253-9.
doi: 10.1007/s11060-014-1378-5.
65. Kabraji S, Ni J, Lin NU, Xie S, Winer EP, Zhao JJ. Drug resistance in HER2-positive breast cancer brain metastases: blame the barrier or the brain? *Clin Cancer Res.* 2018; 24(8):1795-804.
doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3351.
66. Kodack DP, Askoxylakis V, Ferraro GB, Fukumura D, Jain RK. Emerging strategies for treating brain metastases from breast cancer. *Cancer Cell.* 2015; 27(2):163-75. Review.
doi: 10.1016/j.ccell.2015.01.001.
67. Stemmler HJ, Schmitt M, Willems A, Bernhard H, Harbeck N, Heinemann V. Ratio of trastuzumab levels in serum and cerebrospinal fluid is altered in HER2-positive breast cancer patients with brain metastases and impairment of blood-brain barrier. *Anticancer Drugs.* 2007; 18(1):23–8.
doi: 10.1097/01.cad.0000236313.50833.ee.
68. Saleem A, Searle GE, Kenny LM, Huiban M, Kozlowski K, Waldman AD, et al. Lapatinib access into normal brain and brain metastases in patients with Her-2 overexpressing breast cancer. *EJNMMI Res.* 2015; 5:30.
doi: 10.1186/s13550-015-0103-5.
69. Gril B, Palmieri D, Bronder JL, Herring JM, Vega-Valle E, Feigenbaum L, et al. Effect of lapatinib on the outgrowth of metastatic breast cancer cells to the brain. *J Natl Cancer Inst.* 2008; 100(15):1092–103.
doi: 10.1093/jnci/djn216.
70. Labidi SI, Bachelot T, Ray-Coquard I, Mosbah K, Treilleux I, Fayette J, et al. Bevacizumab and paclitaxel for breast cancer patients with central nervous system metastases: a case series. *Clin Breast Cancer.* 2009; 9(2):118–21.
doi: 10.3816/CBC.2009.n.021.
71. Valiente M, Ahluwalia MS, Boire A, Brastianos PK, Goldberg SB, Lee EQ, et al. The evolving landscape of brain metastasis. *Trends Cancer.* 2018; 4(3):176-96.
doi: 10.1016/j.trecan.2018.01.003.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

72. Johnson AG, Ruiz J, Hughes R, Page BR, Isom S, Lucas JT, et al. Impact of systemic targeted agents on the clinical outcomes of patients with brain metastases. *Oncotarget*. 2015; 6(22):18945-55.
doi: 10.18632/oncotarget.4153.
73. Parsai S, Miller JA, Juloori A, Chao ST, Kotecha R, Mohammadi AM, et al. Stereotactic radiosurgery with concurrent lapatinib is associated with improved local control for HER2-positive breast cancer brain metastases. *J Neurosurg*. 2019; 132(2):503-11.
doi: 10.3171/2018.10.JNS182340.
74. Kim JM, Miller JA, Kotecha R, Chao ST, Ahluwalia MS, Peereboom DM, et al. Stereotactic radiosurgery with concurrent HER2-directed therapy is associated with improved objective response for breast cancer brain metastasis. *Neuro Oncol*. 2019; 21(5):659-68.
doi: 10.1093/neuonc/noz006.
75. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92(3):205-16.
doi: 10.1093/jnci/92.3.205.
76. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009; 45(2): 228–47.
doi: 10.1016/j.ejca.2008.10.026.
77. Lin NU, Dieras V, Paul D, Lossignol D, Christodoulou C, Stemmler HJ, et al. Multicenter phase II study of lapatinib in patients with brain metastases from HER2-positive breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(4):1452–9.
doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1080.
78. Bachelot T, Romieu G, Campone M, Diéras V, Cropet C, Dalenc F, et al. Lapatinib plus capecitabine in patients with previously untreated brain metastases from HER2- positive metastatic breast cancer (LANDSCAPE): a single-group phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2013; 14(1):64–71.
doi: 10.1016/S1470-2045(12)70432-1.
79. Bartsch R, Berghoff AS, Vogl U, Rudas M, Bergen E, Dubsy P, et al. Activity of T-DM1 in Her2-positive breast cancer brain metastases. *Clin Exp Metastasis*. 2015; 32(7): 729-37.
doi: 10.1007/s10585-015-9740-3.

80. Cameron D, Casey M, Press M, Lindquist D, Pienkowski T, Romieu CG, et al. A phase III randomized comparison of lapatinib plus capecitabine versus capecitabine alone in women with advanced breast cancer that has progressed on trastuzumab: updated efficacy and biomarker analyses. *Breast Cancer Res Treat.* 2008; 112(3):533–43.
doi: 10.1007/s10549-007-9885-0.
81. Metro G, Foglietta J, Russillo M, Stocchi L, Vidiri A, Giannarelli D, et al. Clinical outcome of patients with brain metastases from HER2-positive breast cancer treated with lapatinib and capecitabine. *Ann Oncol.* 2011; 22(3):625–30.
doi: 10.1093/annonc/mdq434.
82. Chargari C, Idrissi HR, Pierga JY, Bollet MA, Diéras V, Campana F, et al. Preliminary results of whole brain radiotherapy with concurrent trastuzumab for treatment of brain metastases in breast cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011; 81(3):631–6.
doi: 10.1016/j.ijrobp.2010.06.057.
83. Lin NU, Ramakrishna N, Younger WJ, Storniolo AM, Come SE, Gelman RS, et al. Phase I study of lapatinib (L) in combination with whole-brain radiation therapy (WBRT) in patients (pts) with brain metastases from HER2-positive breast cancer. [Abstract]. *J Clin Oncol.* 2010; 28(15 suppl): Abstract 1154.
doi: 10.1200/jco.2010.28.15_suppl.1154.
84. Senda N, Yamaguchi A, Nishimura H, Shiozaki T, Tsuyuki S. Pertuzumab, trastuzumab and docetaxel reduced the recurrence of brain metastasis from breast cancer: a case report. *Breast Cancer.* 2016; 23(2):323-8.
doi: 10.1007/s12282-015-0623-x.
85. Lauko A, Thapa B, Venur VA, Ahluwalia MS. Management of brain metastases in the new era of checkpoint inhibition. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2018; 18(10):70.
doi: 10.1007/s11910-018-0877-8.
86. Mahmoud-Ahmed AS, Suh JH, Lee SY, Crownover RL, Barnett GH. Results of whole brain radiotherapy in patients with brain metastases from breast cancer: a retrospective study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002; 54(3): 810-7.
doi: 10.1016/s0360-3016(02)02967-x.
87. Niwinska A, Murawska M, Pogoda K. Breast cancer brain metastases: differences in survival depending on biological subtype, RPA RTOG prognostic class and systemic treatment after whole-brain radiotherapy (WBRT). *Ann Oncol.* 2010; 21(5):942–8.
doi: 10.1093/annonc/mdp407.

88. Hayashi N, Niikura N, Masuda N, Takashima S, Nakamura R, Watanabe K, et al. Prognostic factors of HER2-positive breast cancer patients who develop brain metastasis: a multicenter retrospective analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2015; 149(1):277-84.
doi: 10.1007/s10549-014-3237-7.
89. Ho VK, Gijtenbeek JM, Brandsma D, Beerepoot LV, Sonke GS, van der Heiden-van der Loo M. Survival of breast cancer patients with synchronous or metachronous central nervous system metastases. *Eur J Cancer.* 2015; 51(17):2508-16.
doi: 10.1016/j.ejca.2015.07.040.
90. Gaspar L, Scott C, Rotman M, Asbell S, Phillips T, Wasserman T, et al. Recursive partitioning analysis (RPA) of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) brain metastases trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1997; 37(4):745–51.
doi: 10.1016/s0360-3016(96)00619-0.
91. Regine WF, Rogozinska A, Kryscio RJ, Tibbs PA, Young AB, Patchell RA. Recursive partitioning analysis classifications I and II: applicability evaluated in a randomized trial for resected single brain metastases. *Am J Clin Oncol.* 2004; 27(5):505-9.
doi: 10.1097/01.coc.0000135379.36325.de.
92. Sperduto PW, Berkey B, Gaspar LE, Mehta M, Curran W. A new prognostic index and comparison to three other indices for patients with brain metastases: an analysis of 1,960 patients in the RTOG database. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008; 70(2):510-4.
doi: 10.1016/j.ijrobp.2007.06.074.
93. Villà S, Weber DC, Moretones C, Mañes A, Combescure C, Jové J, et al. Validation of the new Graded Prognostic Assessment scale for brain metastases: a multicenter prospective study. *Radiat Oncol.* 2011; 6:23.
doi:10.1186/1748-717X-6-23.
94. Sperduto PW, Kased N, Roberge D, Xu Z, Shanley R, Luo X, et al. 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.* 2012; 30(4):419–25.
doi: 10.1200/JCO.2011.38.0527.
95. Sperduto PW, Chao ST, Sneed PK, Luo X, Suh J, Roberge D, et al. Diagnosis-specific prognostic factors, indexes, and treatment outcomes for patients with newly diagnosed brain metastases: a multi-institutional analysis of 4,259 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010; 77(3):655-61.
doi: 10.1016/j.ijrobp.2009.08.025.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

96. Sperduto PW, Xu Z, Sneed P, Luo X, Roberge D, Bhatt AK, et al. A graded prognostic assessment (GPA) for women with breast cancer and brain metastases. [Abstract]. *J Clin Oncol*. 2010; 28(15 suppl): Abstract 1028. 2010 ASCO Annual Meeting.
doi: 10.1200/jco.2010.28.15_suppl.1028.
97. Sperduto PW, Kased N, Roberge D, Xu Z, Shanley R, Luo X, et al. Effect of tumor subtype on survival and the graded prognostic assessment for patients with breast cancer and brain metastases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012; 82(5):2111-7.
doi: 10.1016/j.ijrobp.2011.02.027.
98. De Ieso PB, Schick U, Rosenfelder N, Mohammed K, Ross GM. Breast cancer brain metastases - A 12 year review of treatment outcomes. *Breast*. 2015; 24(4):426-33.
doi: 10.1016/j.breast.2015.03.007.
99. Wong E, Tsao M, Zhang L, Danjoux C, Barnes E, Pulenzas N, et al. Survival of patients with multiple brain metastases treated with whole-brain radiotherapy. *CNS Oncol*. 2015; 4(4):213-24.
doi: 10.2217/cns.15.17.
100. Subbiah IM, Lei X, Weinberg JS, Sulman EP, Chavez-MacGregor M, Tripathy D, et al. Validation and development of a modified breast Graded Prognostic Assessment as a tool for survival in patients with breast cancer and brain metastases. *J Clin Oncol*. 2015; 33(20):2239-45.
doi: 10.1200/JCO.2014.58.8517.
101. Kuba S, Ishida M, Nakamura Y, Yamanouchi K, Minami S, Taguchi K, et al. Treatment and prognosis of breast cancer patients with brain metastases according to intrinsic subtype. *Jpn J Clin Oncol*. 2014; 44(11):1025-31.
doi: 10.1093/jjco/hyu126.
102. Niikura N, Hayashi N, Masuda N, Takashima S, Nakamura R, Watanabe K, et al. Treatment outcomes and prognostic factors for patients with brain metastases from breast cancer of each subtype: a multicenter retrospective analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2014; 147(1):103-12.
doi: 10.1007/s10549-014-3090-8.
103. Nieder C, Dalhaug A, Haukland E, Mannsåker B, Pawinski A. Tumor marker analyses in patients with brain metastases: patterns of practice and implications for survival prediction research. *Tumour Biol*. 2015; 36(8):6471-6.
doi: 10.1007/s13277-015-3337-y.
104. Chow R, Lao N, Popovic M, Chow E, Cella D, Beaumont J, et al. Comparison of the EORTC QLQ-BN20 and the FACT-Br quality of life questionnaires for patients with primary brain cancers: a literature review. *Support Care Cancer*. 2014; 22(9):2593-8.
doi: 10.1007/s00520-014-2352-7.

105. Chiu L, Chiu N, Zeng L, Zhang L, Popovic M, Chow R, et al. Quality of life in patients with primary and metastatic brain cancer as reported in the literature using the EORTC QLQ-BN20 and QLQ-C30. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res.* 2012; 12(6):831-7.
doi: 10.1586/erp.12.70.
106. Bedard G, Ray S, Zhang L, Zeng L, Cella D, Wong E, et al. Validation of the Brain Symptom and Impact Questionnaire (BASIQ) to assess symptom and quality of life in brain metastases. *CNS Oncol.* 2014; 3(4):275-85.
doi: 10.2217/cns.14.28.
107. Saunus JM, McCart Reed AE, Lim ZL, Lakhani SR. Breast cancer brain metastases: clonal evolution in clinical context. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(1):152.
doi: 10.3390/ijms18010152.
108. Villaseñor R, Lampe J, Schwaninger M, Collin L. Intracellular transport and regulation of transcytosis across the blood-brain barrier. *Cell Mol Life Sci.* 2019; 76(6):1081-92. Review.
doi: 10.1007/s00018-018-2982-x.
109. Custódio-Santos T, Videira M, Brito MA. Brain metastasization of breast cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2017; 1868(1):132-47.
doi: 10.1016/j.bbcan.2017.03.004.
110. Sá-Pereira I, Brites D, Brito MA. Neurovascular unit: a focus on pericytes. *Mol Neurobiol.* 2012; 45(2):327-47.
doi: 10.1007/s12035-012-8244-2.
111. Quintana FJ. Astrocytes to the rescue! Glia limitans astrocytic endfeet control CNS inflammation. *J Clin Invest.* 2017; 127(8):2897-99.
doi: 10.1172/JCI95769.
112. Weil RJ, Palmieri DC, Bronder JL, Stark AM, Steeg PS. Breast cancer metastasis to the central nervous system. *Am J Pathol.* 2005; 167(4):913-20.
doi: 10.1016/S0002-9440(10)61180-7.
113. Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9(4):274-84. Review.
doi: 10.1038/nrc2622.
114. Fidler IJ, Balasubramanian K, Lin Q, Kim SW, Kim SJ. The brain microenvironment and cancer metastasis. *Mol Cells.* 2010; 30(2):93-8.
doi: 10.1007/s10059-010-0133-9.
115. Talmadge JE, Fidler IJ. AACR Centennial series: The biology of cancer metastasis: Historical perspective. *Cancer Res.* 2010; 70(14):5649-69.
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1040.

116. Waring P, Müllbacher A. Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. *Immunol Cell Biol.* 1999; 77(4): 312–7. Review.
doi: 10.1046/j.1440-1711.1999.00837.x.
117. Gilmore AP. Anoikis. *Cell Death Differ.* 2005; 12(Suppl 2):1473–7. Review.
doi: 10.1038/sj.cdd.4401723.
118. Norton L. Tumor self-seeding in breast cancer. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2011; 9(7):541-2.
119. Comen E, Norton L. Self-seeding in cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2012; 195: 13-23. Review.
doi: 10.1007/978-3-642-28160-0_2.
120. Comen E, Norton L, Massagué J. Clinical implications of cancer self-seeding. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011; 8(6):369-77. Review.
doi: 10.1038/nrclinonc.2011.64.
121. Fokas E, Engenhart-Cabillic R, Daniilidis K, Rose F, An HX. Metastasis: the seed and soil theory gains identity. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; 26(3-4):705-15. Review.
doi: 10.1007/s10555-007-9088-5.
122. Ramakrishna R, Rostomily R. Seed, soil, and beyond: The basic biology of brain metastasis. *Surg Neurol Int.* 2013; 4(Suppl 4):S256–64.
doi: 10.4103/2152-7806.111303.
123. Ni W, Chen W, Lu Y. Emerging findings into molecular mechanism of brain metastasis. *Cancer Med.* 2018; 7(8):3820-33. Review.
doi: 10.1002/cam4.1667.
124. Kaplan RN, Rafii S, Lyden D. Preparing the “soil”: the premetastatic niche. *Cancer Res.* 2006; 66(23):11089–93. Review.
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2407.
125. Celià-Terrassa T, Kang Y. Metastatic niche functions and therapeutic opportunities. *Nat Cell Biol.* 2018; 20(8):868-77. Review.
doi: 10.1038/s41556-018-0145-9.
126. Zhou W, Fong MY, Min Y, Somlo G, Liu L, Palomares MR, et al. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell.* 2014; 25(4):501–15.
doi: 10.1016/j.ccr.2014.03.007.
127. Camacho L, Guerrero P, Marchetti D. MicroRNA and protein profiling of brain metastasis competent cell-derived exosomes. *PLoS One.* 2013; 8(9):e73790.
doi: 10.1371/journal.pone.0073790.

128. Syn N, Wang L, Sethi G, Thiery JP, Goh BC. Exosome-mediated metastasis: From epithelial-mesenchymal transition to escape from immunosurveillance. *Trends Pharmacol Sci.* 2016; 37(7):606–17. Review. doi: 10.1016/j.tips.2016.04.006.
129. DeNardo DG, Johansson M, Coussens LM. Immune cells as mediators of solid tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2008; 27(1):11–8. Review. doi: 10.1007/s10555-007-9100-0.
130. Hoshida R, Jandial R. The role of the neural niche in brain metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 2017; 34(6-7):369–76. Review. doi: 10.1007/s10585-017-9857-7.
131. Guo F, Wang Y, Liu J, Mok SC, Xue F, Zhang W. CXCL12/CXCR4: a symbiotic bridge linking cancer cells and their stromal neighbors in oncogenic communication networks. *Oncogene.* 2016; 35(7):816-26. Review. doi: 10.1038/onc.2015.139.
132. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2010; 16(11):2927–31. Review. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2329.
133. Fang JY, Tan SJ, Wu YC, Yang Z, Hoang BX, Han B. From competency to dormancy: a 3D model to study cancer cells and drug responsiveness. *J Transl Med.* 2016; 14:38. doi: 10.1186/s12967-016-0798-8.
134. Anderberg C, Cunha SI, Zhai Z, Cortez E, Pardali E, Johnson JR, et al. Deficiency for endoglin in tumor vasculature weakens the endothelial barrier to metastatic dissemination. *J Exp Med.* 2013; 210(3):563–79. doi: 10.1084/jem.20120662.
135. Hinton CV, Avraham S, Avraham HK. Role of the CXCR4/CXCL12 signaling axis in breast cancer metastasis to the brain. *Clin Exp Metastasis.* 2010; 27(2):97–105. Review. doi: 10.1007/s10585-008-9210-2.
136. Cabioglu N, Sahin AA, Morandi P, Meric-Bernstam F, Islam R, Lin HY, et al. Chemokine receptors in advanced breast cancer: differential expression in metastatic disease sites with diagnostic and therapeutic implications. *Ann Oncol.* 2009; 20(6):1013-9. doi: 10.1093/annonc/mdn740.
137. Sato R, Nakano T, Hosonaga M, Sampetean O, Harigai R, Sasaki T, et al. RNA sequencing analysis reveals interactions between breast cancer or melanoma cells and the tissue microenvironment during brain metastasis. *Biomed Res Int.* 2017; 2017:8032910. doi: 10.1155/2017/8032910.

138. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7(11):834–46. Review.
doi: 10.1038/nrc2256.
139. Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XHF, Norton L, et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell*. 2009; 139(7):1315–26.
doi: 10.1016/j.cell.2009.11.025.
140. Yadav AS, Pandey PR, Butti R, Radharani NNV, Roy S, Bhalara SR, et al. The biology and therapeutic implications of tumor dormancy and reactivation. *Front Oncol*. 2018; 8:72. Review.
doi: 10.3389/fonc.2018.00072.
141. Gelao L, Criscitiello C, Fumagalli L, Locatelli M, Manunta S, Esposito A, et al. Tumour dormancy and clinical implications in breast cancer. *Ecancermedicalscience*. 2013; 7:320.
doi: 10.3332/ecancer.2013.320.
142. Neman J, Termini J, Wilczynski S, Vaidehi N, Choy C, Kowolik CM, et al. Human breast cancer metastases to the brain display GABAergic properties in the neural niche. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111(3):984-9.
doi: 10.1073/pnas.1322098111.
143. Da Silva L, Simpson PT, Smart CE, Cocciardi S, Waddell N, Lane A, et al. HER3 and downstream pathways are involved in colonization of brain metastases from breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010; 12(4):R46.
doi: 10.1186/bcr2603.
144. Fidler IJ. The role of the organ microenvironment in brain metastasis. *Semin Cancer Biol*. 2011; 21(2):107-12. Review.
doi: 10.1016/j.semcancer.2010.12.009.
145. Wasilewski D, Priego N, Fustero-Torre C, Valiente M. Reactive astrocytes in brain metastasis. *Front Oncol*. 2017; 7:298. Review.
doi: 10.3389/fonc.2017.00298.
146. Fidler IJ. The biology of brain metastasis: challenges for therapy. *Cancer J*. 2015; 21(4):284-93. Review.
doi: 10.1097/PPO.000000000000126.
147. Lyle LT, Lockman PR, Adkins CE, Mohammad AS, Sechrest E, Hua E, et al. Alterations in pericyte subpopulations are associated with elevated blood-tumor barrier permeability in experimental brain metastasis of breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2016; 22(21):5287-99.
doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1836.

148. Valiente M, Obenauf AC, Jin X, Chen Q, Zhang XHF, Lee DJ, et al. Serpins promote cancer cell survival and vascular co-option in brain metastasis. *Cell*. 2014; 156(5):1002-16.
doi: 10.1016/j.cell.2014.01.040.
149. Kienast Y, von Baumgarten L, Fuhrmann M, Klinkert WEF, Goldbrunner R, Herms J, et al. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med*. 2010; 16(1):116–22.
doi: 10.1038/nm.2072.
150. Sartorius CA, Hanna CT, Gril B, Cruz H, Serkova NJ, Huber KM, et al. Estrogen promotes the brain metastatic colonization of triple negative breast cancer cells via an astrocyte-mediated paracrine mechanism. *Oncogene*. 2016; 35(22):2881-92.
doi: 10.1038/onc.2015.353.
151. Saunus JM, Quinn MCJ, Patch AM, Pearson JV, Bailey PJ, Nones K, et al. Integrated genomic and transcriptomic analysis of human brain metastases identifies alterations of potential clinical significance. *J Pathol*. 2015; 237(3):363–78.
doi: 10.1002/path.4583.
152. Momeny M, Saunus JM, Marturana F, McCart Reed AE, Black D, Sala G, et al. Heregulin-HER3-HER2 signaling promotes matrix metalloproteinase-dependent blood-brain-barrier transendothelial migration of human breast cancer cell lines. *Oncotarget*. 2015; 6(6):3932-46.
doi: 10.18632/oncotarget.2846.
153. Pukrop T, Dehghani F, Chuang HN, Lohaus R, Bayanga K, Heermann S, et al. Microglia promote colonization of brain tissue by breast cancer cells in a Wnt-dependent way. *Glia*. 2010; 58(12):1477-89.
doi: 10.1002/glia.21022.
154. Louie E, Chen XF, Coomes A, Ji K, Tsirka S, Chen EI. Neurotrophin-3 modulates breast cancer cells and the microenvironment to promote the growth of breast cancer brain metastasis. *Oncogene*. 2013; 32(35):4064–77.
doi: 10.1038/onc.2012.417.
155. Schousboe A, Bak LK, Waagepetersen HS. Astrocytic control of biosynthesis and turnover of the neurotransmitters glutamate and GABA. *Front Endocrinol*. 2013; 4:102.
doi: 10.3389/fendo.2013.00102.
156. Sahu A, Gopalakrishnan L, Gaur N, Chatterjee O, Mol P, Modi PK, et al. The 5-Hydroxytryptamine signaling map: an overview of serotonin-serotonin receptor mediated signaling network. *J Cell Commun Signal*. 2018; 12(4):731-35.
doi: 10.1007/s12079-018-0482-2.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

157. Mehler AH. Metabolismo de los aminoácidos II: Metabolismo de los diferentes aminoácidos. Capítulo 12. En: T.M. Devlin. Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas. Vol.1. 2ª Edición. New York, USA: Ed. Reverté S.A.; 1988. p. 571-616. ISBN: 8429172033.
158. Sarrouilhe D, Mesnil M. Serotonin and human cancer: a critical view. *Biochimie*. 2019; 161:46-50. Review.
doi: 10.1016/j.biochi.2018.06.016.
159. Gautam J, Banskota S, Regmi SC, Ahn S, Jeon YH, Jeong H, et al. Tryptophan hydroxylase 1 and 5-HT7 receptor preferentially expressed in triple-negative breast cancer promote cancer progression through autocrine serotonin signaling. *Mol Cancer*. 2016; 15(1):75.
doi: 10.1186/s12943-016-0559-6.
160. Ikeda Y, Nishiyama N, Saito H, Katsuki H. GABAA receptor stimulation promotes survival of embryonic rat striatal neurons in culture. *Brain Res Dev Brain Res*. 1997; 98(2): 253-8.
doi: 10.1016/s0165-3806(96)00183-6.
161. Olson MS. Bioenergética y metabolismo oxidativo. Capítulo 6. En: T.M. Devlin. Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas. Vol.1. 2ª Edición. New York, USA: Ed. Reverté S.A.; 1988. p. 263-327. ISBN: 8429172033.
162. Comen EA. Tracking the seed and tending the soil: evolving concepts in metastatic breast cancer. *Discov Med*. 2012; 14(75):97-104. Review.
163. Mitra A, Mishra L, Li S. EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance. *Oncotarget*. 2015; 6(13):10697-711. Review.
doi: 10.18632/oncotarget.4037.
164. Pattabiraman DR, Bierie B, Kober KI, Thiru P, Krall JA, Zill C, et al. Activation of PKA leads to mesenchymal-to-epithelial transition and loss of tumor-initiating ability. *Science*. 2016; 351(6277):aad3680.
doi: 10.1126/science.aad3680.
165. Mon AM, MacKinnon Jr AC, Traktman P. Overexpression of the VRK1 kinase, which is associated with breast cancer, induces a mesenchymal to epithelial transition in mammary epithelial cells. *PLoS One*. 2018; 13(9):e0203397.
doi: 10.1371/journal.pone.0203397.
166. Pangen RP, Channathodiyil P, Huen DS, Eagles LW, Johal BK, Pasha D et al. The GALNT9, BNC1 and CCDC8 genes are frequently epigenetically dysregulated in breast tumours that metastasise to the brain. *Clin Epigenetics*. 2015; 7(1):57.
doi: 10.1186/s13148-015-0089-x.

167. Givant-Horwitz V, Davidson B, Reich R. Laminin-induced signaling in tumor cells. *Cancer Lett.* 2005; 223(1):1-10. Review.
doi: 10.1016/j.canlet.2004.08.030.
168. Cloutier G, Sallenbach-Morrisette A, Beaulieu JF. Non-integrin laminin receptors in epithelia. *Tissue Cell.* 2019; 56:71-8. Review.
doi: 10.1016/j.tice.2018.12.005.
169. Martin B, Aragüés R, Sanz R, Oliva B, Boluda S, Martinez A, et al. Biological pathways contributing to organ-specific phenotype of brain metastatic cells. *J Proteome Res.* 2008; 7(3):908–20.
doi: 10.1021/pr070426d.
170. Lu W, Bucana CD, Schroit AJ. Pathogenesis and vascular integrity of breast cancer brain metastasis. *Int J Cancer.* 2007; 120(5):1023-6.
doi: 10.1002/ijc.22388.
171. Qiao L, Liang N, Zhang J, Xie J, Liu F, Xu D, et al. Advanced research on vasculogenic mimicry in cancer. *J Cell Mol Med.* 2015; 19(2):315–26. Review.
doi: 10.1111/jcmm.12496.
172. Wagenblast E, Soto M, Gutiérrez-Ángel S, Hartl CA, Gable AL, Maceli AR, et al. A model of breast cancer heterogeneity reveals vascular mimicry as a driver of metastasis. *Nature.* 2015; 520(7547):358-62.
doi: 10.1038/nature14403.
173. Berghoff AS, Preusser M. Role of the blood-brain barrier in metastatic disease of the central nervous system. *Handb Clin Neurol.* 2018; 149:57-66. Review.
doi: 10.1016/B978-0-12-811161-1.00004-9.
174. Askoxylakis V, Arvanitis CD, Wong CSF, Ferraro GB, Jain RK. Emerging strategies for delivering antiangiogenic therapies to primary and metastatic brain tumors. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017; 119:159-74. Review.
doi: 10.1016/j.addr.2017.06.011.
175. Fidler IJ, Yano S, Zhang RD, Fujimaki T, Bucana CD. The seed and soil hypothesis: vascularisation and brain metastases. *Lancet Oncol.* 2002; 3(1):53-7. Review.
doi: 10.1016/s1470-2045(01)00622-2.
176. Lin JH, Yamazaki M. Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications. *Clin Pharmacokinet.* 2003; 42(1):59-98. Review.
doi: 10.2165/00003088-200342010-00003.
177. Schröder C, Schumacher U, Fogel M, Feuerhake F, Müller V, Wirtz RM, et al. Expression and prognostic value of L1-CAM in breast cancer. *Oncol Rep.* 2009; 22(5):1109–17.
doi: 10.3892/or_00000543.

178. Salhia B, Kiefer J, Ross JTD, Metapally R, Martinez RA, Johnson KN, et al. Integrated genomic and epigenomic analysis of breast cancer brain metastasis. *PLoS One*. 2014; 9(1):e85448.
doi: 10.1371/journal.pone.0085448.
179. Bollig-Fischer A, Michelhaugh SK, Wijesinghe P, Dyson G, Kruger A, Palanisamy N, et al. Cytogenomic profiling of breast cancer brain metastases reveals potential for repurposing targeted therapeutics. *Oncotarget*. 2015; 6(16):14614-24.
doi: 10.18632/oncotarget.3786.
180. Kanojia D, Morshed RA, Zhang L, Miska JM, Qiao J, Kim JW, et al. β III-Tubulin regulates breast cancer metastases to the brain. *Mol Cancer Ther*. 2015; 14(5):1152-61.
doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0950.
181. Colombo F, Meldolesi J. L1-CAM and N-CAM: From adhesion proteins to pharmacological targets. *Trends Pharmacol Sci*. 2015; 36(11):769-81. Review.
doi: 10.1016/j.tips.2015.08.004.
182. Zhang J, Yang F, Ding Y, Zhen L, Han X, Jiao F, et al. Overexpression of L1 cell adhesion molecule correlates with aggressive tumor progression of patients with breast cancer and promotes motility of breast cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; 8(8):9240-7.
183. Woditschka S, Evans L, Duchnowska R, Reed LT, Palmieri D, Qian Y, et al. DNA double-strand break repair genes and oxidative damage in brain metastasis of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2014; 106(7):dju145.
doi: 10.1093/jnci/dju145.
184. McMullin RP, Wittner BS, Yang C, Denton-Schneider BR, Hicks D, Singavarapu R, et al. A BRCA1 deficient-like signature is enriched in breast cancer brain metastases and predicts DNA damage-induced poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor sensitivity. *Breast Cancer Res*. 2014; 16(2):R25.
doi: 10.1186/bcr3625.
185. Lee HT, Xue J, Chou PC, Zhou A, Yang P, Conrad CA, et al. Stat3 orchestrates interaction between endothelial and tumor cells and inhibition of Stat3 suppresses brain metastasis of breast cancer cells. *Oncotarget*. 2015; 6(12):10016-29.
doi: 10.18632/oncotarget.3540.
186. Kim HM, Jung WH, Koo JS. Expression of reactive oxygen species-related proteins in metastatic breast cancer is dependent on the metastatic site. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7(12):8802-12.
187. Liu B, Qu L, Yan S. Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity. *Cancer Cell Int*. 2015; 15:106.
doi: 10.1186/s12935-015-0260-7.

188. Bos PD, Zhang XHF, Nadal C, Shu W, Gomis RR, Nguyen DX, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature*. 2009; 459(7249): 1005-9.
doi: 10.1038/nature08021.
189. Kim LS, Huang S, Lu W, Lev DC, Price JE. Vascular endothelial growth factor expression promotes the growth of breast cancer brain metastases in nude mice. *Clin Exp Metastasis*. 2004; 21(2):107-18.
doi: 10.1023/b:clin.0000024761.00373.55.
190. Chen J, Lee HJ, Wu X, Huo L, Kim SJ, Xu L, et al. Gain of glucose-independent growth upon metastasis of breast cancer cells to the brain. *Cancer Res*. 2015; 75(3):554-65.
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2268.
191. Zhang L, Sullivan PS, Goodman JC, Gunaratne PH, Marchetti D. MicroRNA-1258 suppresses breast cancer brain metastasis by targeting heparanase. *Cancer Res*. 2011; 71(3):645-54.
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1910.
192. Chen Q, Boire A, Jin X, Valiente M, Er EE, Lopez-Soto A, et al. Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. *Nature*. 2016; 533(7604):493-98.
doi: 10.1038/nature18268.
193. Lee JY, Park K, Lim SH, Kim HS, Yoo KH, Jung KS, et al. Mutational profiling of brain metastasis from breast cancer: matched pair analysis of targeted sequencing between brain metastasis and primary breast cancer. *Oncotarget*. 2015; 6(41):43731-42.
doi: 10.18632/oncotarget.6192.
194. Wikman H, Lamszus K, Detels N, Uslar L, Wrage M, Benner C, et al. Relevance of PTEN loss in brain metastasis formation in breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2012; 14(2):R49.
doi: 10.1186/bcr3150.
195. Wikman H, Westphal L, Schmid F, Pollari S, Kropidlowski J, Sielaff-Frimpong B, et al. Loss of CADM1 expression is associated with poor prognosis and brain metastasis in breast cancer patients. *Oncotarget*. 2014; 5(10):3076-87.
doi: 10.18632/oncotarget.1832.
196. Ahmad A, Ginnebaugh KR, Sethi S, Chen W, Ali R, Mittal S, et al. miR-20b is up-regulated in brain metastases from primary breast cancers. *Oncotarget*. 2015; 6(14):12188-95.
doi: 10.18632/oncotarget.3664.
197. Ahmad A, Sethi S, Chen W, Ali-Fehmi R, Mittal S, Sarkar FH. Up-regulation of microRNA-10b is associated with the development of breast cancer brain metastasis. *Am J Transl Res*. 2014; 6(4):384-90.

198. Tominaga N, Kosaka N, Ono M, Katsuda T, Yoshioka Y, Tamura K, et al. Brain metastatic cancer cells release microRNA-181c-containing extracellular vesicles capable of destructing blood-brain barrier. *Nat Commun.* 2015; 6:6716. doi: 10.1038/ncomms7716.
199. Okuda H, Xing F, Pandey PR, Sharma S, Watabe M, Pai SK, et al. miR-7 suppresses brain metastasis of breast cancer stem-like cells by modulating KLF4. *Cancer Res.* 2013; 73(4):1434-44. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2037.
200. Xing F, Sharma S, Liu Y, Mo YY, Wu K, Zhang YY, et al. miR-509 suppresses brain metastasis of breast cancer cells by modulating RhoC and TNF- α . *Oncogene.* 2015; 34(37):4890-900. doi: 10.1038/onc.2014.412.
201. Sanz-Pamplona R, Aragüés R, Driouch K, Martín B, Oliva B, Gil M, et al. Expression of endoplasmic reticulum stress proteins is a candidate marker of brain metastasis in both ErbB-2+ and ErbB-2- primary breast tumors. *Am J Pathol.* 2011; 179(2):564-79. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.04.037.
202. Chambers AF. MDA-MB-435 and M14 cell lines: identical but not M14 melanoma? *Cancer Res.* 2009; 69(13):5292-3. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1528.
203. Román I, Vilalta M, Rodríguez J, Matthies AM, Srouji S, Livne E, et al. Analysis of progenitor cell-scaffold combinations by in vivo non-invasive photonic imaging. *Biomaterials.* 2007; 28(17):2718-28. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.02.011.
204. Simoes RV, Martínez-Aranda A, Martín B, Cerdán S, Sierra A, Arús C. Preliminary characterization of an experimental breast cancer cells brain metastasis mouse model by MRI/MRS. *MAGMA.* 2008; 21(4):237-49. doi: 10.1007/s10334-008-0114-6.
205. Minn AJ, Kang Y, Serganova I, Gupta GP, Giri DD, Doubrovin M, et al. Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J Clin Invest.* 2005; 115(1):44-55. doi: 10.1172/JCI22320.
206. Tew KD. Alkylating Agents. Chapter 34. En: V.T. De Vita Jr., T.S. Lawrence, S.A. Rosenberg, editors. *Cancer, Principles & Practice of Oncology.* 9th Edition. Philadelphia, USA: Ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 375-385. ISBN: 978-1-4511-1813-1.
207. Kato Y, Okollie B, Raman V, Vesuna F, Zhao M, Baker SD, et al. Contributing factors of temozolomide resistance in MCF-7 tumor xenograft models. *Cancer Biol Ther.* 2007; 6(6):891-7. doi: 10.4161/cbt.6.6.4096.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

208. Hirose Y, Berger MS, Pieper RO. p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 2001; 61(5): 1957-63.
209. Schreck KC, Grossman SA. Role of temozolomide in the treatment of cancers involving the central nervous system. *Oncology (Williston Park).* 2018; 32(11):555-60, 569. Review.
210. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007; 25(1):118-45. doi: 10.1200/JCO.2006.09.2775.
211. Joiner MC. Models of radiation cell killing. Chapter 7. En: G.G. Steel. *Basic Clinical Radiobiology.* 2nd Edition. London, UK. and New York, USA: Ed. Arnold; 1997. p. 52-57. ISBN: 0340700203.
212. Joiner MC, van der Kogel AJ. The linear-quadratic approach to fractionation and calculation of isoeffect relationships. Chapter 13. En: G.G. Steel. *Basic Clinical Radiobiology.* 2nd Edition. London, UK. and New York, USA: Ed. Arnold; 1997. p. 106-122. ISBN:0340700203.
213. Ciudad J. El efecto de la tasa de dosis. Capítulo 5. En: D. Guirado. *Radiobiología Clínica.* Grupo de trabajo sobre Radiobiología Clínica de la Sociedad Española de Física Médica. Madrid, España: Ed. Servymagen Union, S.L.; 2003. p. 91-103. ISBN: 84-95074-35-4.
214. Joiner MC, Bentzen SM. Fractionation: the linear-quadratic approach. Chapter 8. En: M. Joiner, A. van der Kogel. *Basic Clinical Radiobiology.* 4th Edition. London, UK: Ed. Hodder Arnold; 2009. p. 102-119. ISBN: 9780340929667.
215. Bentzen SM, Joiner MC. The linear-quadratic approach in clinical practice. Chapter 9. En: M. Joiner, A. van der Kogel. *Basic Clinical Radiobiology.* 4th Edition. London, UK: Ed. Hodder Arnold; 2009. p. 120-134. ISBN: 9780340929667.
216. Beyzadeoglu M, Ozyigit G, Ebruli C. Radiobiology. Chapter 2. En: M. Beyzadeoglu, G. Ozyigit, C. Ebruli. *Basic Radiation Oncology.* Germany: Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2010. p. 71-144. ISBN: 978-3-642-11665-0.
217. Albanell J, Baselga J. Trastuzumab, a humanized anti-HER2 monoclonal antibody, for the treatment of breast cancer. *Drugs Today (Barc).* 1999; 35(12):931-46.
218. Goldenberg MM. Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer. *Clin Ther.* 1999; 21(2):309-18. Review. doi: 10.1016/S0149-2918(00)88288-0.

219. Treish I, Schwartz R, Lindley C. Pharmacology and therapeutic use of trastuzumab in breast cancer. *Am J Health Syst Pharm.* 2000; 57(22):2063-76. Review.
220. Biomarkers Definition Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001; 69(3):89-95. Review.
doi: 10.1067/mcp.2001.113989.
221. Mattocks CJ, Morris MA, Matthijs G, Swinnen E, Corveleyn A, Dequeker E, et al. EuroGentest Validation Group. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. *Eur J Hum Genet.* 2010; 18(12):1276-88.
doi: 10.1038/ejhg.2010.101.
222. Ziegler A, Koch A, Krockenberger K, Grosshennig A. Personalized medicine using DNA biomarkers: a review. *Hum Genet.* 2012; 131(10):1627-38. Review.
doi: 10.1007/s00439-012-1188-9.
223. Khleif SN, Doroshow JH, Hait WN. AACR-FDA-NCI Cancer Biomarkers Collaborative consensus report: advancing the use of biomarkers in cancer drug development. *Clin Cancer Res.* 2010; 16(13):3299-318.
doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0880.
224. Martínez-Aranda A, Hernández V, Moreno F, Baixeras N, Cuadras D, Urruticoechea A, et al. Predictive and prognostic brain metastases assessment in luminal breast cancer patients: FN14 and GRP94 from diagnosis to prophylaxis. *Front Oncol.* 2017; 7:283.
doi: 10.3389/fonc.2017.00283.
225. Martínez-Aranda A, Hernández V, Guney E, Muixí L, Foj R, Baixeras N, et al. FN14 and GRP94 expression are prognostic/predictive biomarkers of brain metastasis outcome that open up new therapeutic strategies. *Oncotarget.* 2015; 6(42):44254-73.
doi: 10.18632/oncotarget.5471.
226. Cheng E, Whitsett TG, Tran NL, Winkles JA. The TWEAK receptor Fn14 is an Src-inducible protein and a positive regulator of Src-driven cell invasion. *Mol Cancer Res.* 2015; 13(3):575-83.
doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0411.
227. Wang X, Zeng Y, Ho DN, Yin J, Liu G, Chen X. Fibroblast Growth Factor-Inducible 14: multiple roles in tumor metastasis. *Curr Mol Med.* 2015; 15(10):892-904.
doi: 10.2174/1566524016666151123105752.

228. Trebing J, Lang I, Chopra M, Salzmann S, Moshir M, Silence K, et al. A novel llama antibody targeting Fn14 exhibits anti-metastatic activity in vivo. *MAbs*. 2014; 6(1): 297-308.
doi: 10.4161/mabs.26709.
229. Sun Y, Han Y, Wang X, Wang W, Wang X, Wen M, et al. Correlation of EGFR Del 19 with Fn14/JAK/STAT signaling molecules in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. 2016; 36(2):1030-40.
doi: 10.3892/or.2016.4905.
230. Jandova J, Mason CJ, Pawar SC, Watts GS. Fn14 receptor promotes invasive potential and metastatic capacity of non-small lung adenocarcinoma cells through the up-regulation of integrin $\alpha 6$. *Neoplasma*. 2015; 62(1):41-52.
doi: 10.4149/neo_2015_006.
231. Yin J, Liu YN, Tillman H, Barrett B, Hewitt S, Ylaya K, et al. AR-regulated TWEAK-FN14 pathway promotes prostate cancer bone metastasis. *Cancer Res*. 2014; 74(16):4306-17.
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3233.
232. Dai L, Gu L, Ding C, Qiu L, Di W. TWEAK promotes ovarian cancer cell metastasis via NF-kappaB pathway activation and VEGF expression. *Cancer Lett*. 2009; 283(2):159-67.
doi: 10.1016/j.canlet.2009.03.036.
233. Asrani K, Keri RA, Galisteo R, Brown SAN, Morgan SJ, Ghosh A, et al. The HER2- and heregulin $\beta 1$ (HRG)-inducible TNFR superfamily member Fn14 promotes HRG-driven breast cancer cell migration, invasion, and MMP9 expression. *Mol Cancer Res*. 2013; 11(4):393-404.
doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0542.
234. Willis AL, Tran NL, Chatigny JM, Charlton N, Vu H, Brown SAN, et al. The fibroblast growth factor-inducible 14 receptor is highly expressed in HER2-positive breast tumors and regulates breast cancer cell invasive capacity. *Mol Cancer Res*. 2008; 6(5):725-34.
doi: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0005.
235. Marzec M, Eletto D, Argon Y. GRP94: An HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1823(3):774-87. Review.
doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.10.013.
236. Eletto D, Dersh D, Argon Y. GRP94 in ER quality control and stress responses. *Semin Cell Dev Biol*. 2010; 21(5):479-85. Review.
doi: 10.1016/j.semcdb.2010.03.004.

237. Luo B, Lee AS. The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies. *Oncogene*. 2013; 32(7):805-18. doi: 10.1038/onc.2012.130.
238. Ansa-Addo EA, Thaxton J, Hong F, Wu BX, Zhang Y, Fugle CW, et al. Clients and oncogenic roles of molecular chaperone gp96/grp94. *Curr Top Med Chem*. 2016; 16(25):2765-78. Review. doi: 10.2174/1568026616666160413141613.
239. Zhu G, Lee AS. Role of the unfolded protein response, GRP78 and GRP94 in organ homeostasis. *J Cell Physiol*. 2015; 230(7):1413-20. Review. doi: 10.1002/jcp.24923.
240. Lee AS. Glucose-regulated proteins in cancer: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Cancer*. 2014; 14(4):263-76. Review. doi: 10.1038/nrc3701.
241. Kabakov A, Yakimova A, Matchuk O. Molecular chaperones in cancer stem cells: determinants of stemness and potential targets for antitumor therapy. *Cells*. 2020; 9(4):892. Review. doi: 10.3390/cells9040892.
242. Wu BX, Hong F, Zhang Y, Ansa-Addo E, Li Z. GRP94/gp96 in cancer: biology, structure, immunology, and drug development. *Adv Cancer Res*. 2016; 129:165-90. Review. doi: 10.1016/bs.acr.2015.09.001.
243. Dejeans N, Glorieux C, Guenin S, Beck R, Sid B, Rousseau R, et al. Overexpression of GRP94 in breast cancer cells resistant to oxidative stress promotes high levels of cancer cell proliferation and migration: implications for tumor recurrence. *Free Radic Biol Med*. 2012; 52(6):993–1002. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.12.019.
244. Patel PD, Yan P, Seidler PM, Patel HJ, Sun W, Yang C, et al. Paralog-selective Hsp90 inhibitors define tumor-specific regulation of Her2. *Nat Chem Biol*. 2013; 9(11):677-84. doi: 10.1038/nchembio.1335.
245. Buc Calderon P, Sennesael AL, Glorieux C. Glucose-regulated protein of 94 kDa contributes to the development of an aggressive phenotype in breast cancer cells. *Biomed Pharmacother*. 2018; 105:115-20. doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.106.
246. Santana-Codina N, Muixí L, Foj R, Sanz-Pamplona R, Badia-Villanueva M, Abramowicz A, et al. GRP94 promotes brain metastasis by engaging pro-survival autophagy. *Neuro Oncol*. 2020; 22(5):652-64. doi: 10.1093/neuonc/noz198.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

247. Kuo MH, Chang WW, Yeh BW, Chu YS, Lee YC, Lee HT. Glucose transporter 3 is essential for the survival of breast cancer cells in the brain. *Cells*. 2019; 8(12):1568.
doi: 10.3390/cells8121568.
248. Santana-Codina N, Marcé-Grau A, Muixí L, Nieva C, Marro M, Sebastián D, et al. GRP94 is involved in the lipid phenotype of brain metastatic cells. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(16):3883.
doi: 10.3390/ijms20163883.
249. Bedia C, Badia M, Muixí L, Levade T, Tauler R, Sierra A. GM2-GM3 gangliosides ratio is dependent on GRP94 through down-regulation of GM2-AP cofactor in brain metastasis cells. *Sci Rep*. 2019; 9(1):14241.
doi: 10.1038/s41598-019-50761-5.
250. Graesslin O, Abdulkarim BS, Coutant C, Huguet F, Gabos Z, Hsu L, et al. Nomogram to predict subsequent brain metastasis in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010; 28(12):2032-7.
doi: 10.1200/JCO.2009.24.6314.
251. Genre L, Roché H, Varela L, Kanoun D, Ouali M, Filleron T, et al. External validation of a published nomogram for prediction of brain metastasis in patients with extra-cerebral metastatic breast cancer and risk regression analysis. *Eur J Cancer*. 2017; 72:200-9.
doi: 10.1016/j.ejca.2016.10.019.
252. Matsuo S, Watanabe J, Mitsuya K, Hayashi N, Nakasu Y, Hayashi M. Brain metastasis in patients with metastatic breast cancer in the real world: a single institution, retrospective review of 12-year follow-up. *Breast Cancer Res Treat*. 2017; 162(1): 169-79.
doi: 10.1007/s10549-017-4107-x.
253. Niikura N, Saji S, Tokuda Y, Iwata H. Brain metastases in breast cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2014; 44(12):1133-40. Review.
doi: 10.1093/jjco/hyu156.
254. Berghoff AS, Bartsch R, Wöhrer A, Streubel B, Birner P, Kros JM, et al. Predictive molecular markers in metastases to the central nervous system: recent advances and future avenues. *Acta Neuropathol*. 2014; 128(6):879–91. Review.
doi:10.1007/s00401-014-1350-7.
255. Preusser M, Winkler F, Collette L, Haller S, Marreaud S, Soffietti R, et al. Trial design on prophylaxis and treatment of brain metastases: lessons learned from the EORTC Brain Metastases Strategic Meeting 2012. *Eur J Cancer*. 2012; 48(18):3439–47.
doi:10.1016/j.ejca.2012.07.002.

256. Saraf A, Grubb CS, Hwang ME, Tai CH, Wu CC, Jani A, et al. Breast cancer subtype and stage are prognostic of time from breast cancer diagnosis to brain metastasis development. *J Neurooncol.* 2017; 134(2):453-63.
doi: 10.1007/s11060-017-2549-y.
257. Boral D, Vishnoi M, Liu HN, Yin W, Sprouse ML, Scamardo A, et al. Molecular characterization of breast cancer CTCs associated with brain metastasis. *Nat Commun.* 2017; 8(1):196.
doi: 10.1038/s41467-017-00196-1.
258. Duchnowska R, Sperinde J, Chenna A, Huang W, Weidler JM, Winslow J, et al. Quantitative HER2 and p95HER2 levels in primary breast cancers and matched brain metastases. *Neuro Oncol.* 2015; 17(9):1241-9.
doi: 10.1093/neuonc/nov012.
259. Alphonse-Sullivan N, Taksler GB, Lycan T, Weaver KE, McTyre ER, Shenker RF, et al. Sociodemographic predictors of patients with brain metastases treated with stereotactic radiosurgery. *Oncotarget.* 2017; 8(60):101005-11.
doi: 10.18632/oncotarget.22291.
260. Liu S, Li R, Zuo S, Luo R, Fang W, Xie Y. GRP94 overexpression as an indicator of unfavorable outcomes in breast cancer patients. *Int J Clin Exp Pathol.* 2018; 11(6):3061-7.
261. Zavitsanos PJ, Wazer DE, Hepel JT, Wang Y, Singh K, Leonard KL. BRCA1 mutations associated with increased risk of brain metastases in breast cancer: A 1: 2 matched-pair analysis. *Am J Clin Oncol.* 2018; 41(12):1252-56.
doi: 10.1097/COC.0000000000000466.
262. Rostami R, Mittal S, Rostami P, Tavassoli F, Jabbari B. Brain metastasis in breast cancer: a comprehensive literature review. *J Neurooncol.* 2016; 127(3):407-14. Review.
doi: 10.1007/s11060-016-2075-3.
263. Pessina F, Navarria P, Cozzi L, Franceschini D, Tomatis S, Clerici E, et al. Outcome evaluation of HER2 breast cancer patients with limited brain metastasis. *Anticancer Res.* 2017; 37(12):7057-62.
doi: 10.21873/anticancer.12177.
264. Pojskic M, Bopp MHA, Schymalla M, Nimsy C, Carl B. Retrospective study of 229 surgically treated patients with brain metastases: Prognostic factors, outcome and comparison of recursive partitioning analysis and diagnosis-specific graded prognostic assessment. *Surg Neurol Int.* 2017; 8:259.
doi: 10.4103/sni.sni_228_17.
265. Li R, Zhang K, Siegal GP, Wei S. Clinicopathological factors associated with survival in patients with breast cancer brain metastasis. *Hum Pathol.* 2017; 64:53-60.
doi: 10.1016/j.humpath.2017.03.022.

266. Griguolo G, Dieci MV, Giarratano T, Giorgi CA, Orvieto E, Ghiotto C, et al. Beyond breast specific-Graded Prognostic Assessment in patients with brain metastases from breast cancer: treatment impact on outcome. *J Neurooncol.* 2017; 131(2):369-76.
doi: 10.1007/s11060-016-2309-4.
267. Dancy JG, Wadajkar AS, Connolly NP, Galisteo R, Ames HM, Peng S, et al. Decreased nonspecific adhesivity, receptor-targeted therapeutic nanoparticles for primary and metastatic breast cancer. *Sci Adv.* 2020; 6(3):eaax3931.
doi: 10.1126/sciadv.aax3931.
268. Wang J, Liu Y, Wei MJ, Mi XY, Wang EH. Clinical correlations and prognostic relevance of Fn14 expression in breast carcinoma. *Histol Histopathol.* 2013; 28(7): 859-64.
doi: 10.14670/HH-28.859.
269. Molnár IA, Molnár BÁ, Vizkeleti L, Fekete K, Tamás J, Deák P, et al. Breast carcinoma subtypes show different patterns of metastatic behavior. *Virchows Arch.* 2017; 470(3):275-83.
doi: 10.1007/s00428-017-2065-7.
270. Lam TC, Sahgal A, Chang EL, Lo SS. Stereotactic radiosurgery for multiple brain metastases. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2014; 14(10):1153-72. Review.
doi: 10.1586/14737140.2014.940325.
271. Tsao M, Xu W, Sahgal A. A meta-analysis evaluating stereotactic radiosurgery, whole-brain radiotherapy, or both for patients presenting with a limited number of brain metastases. *Cancer.* 2012; 118(9):2486-93.
doi: 10.1002/cncr.26515.
272. Sahgal A, Aoyama H, Kocher M, Neupane B, Collette S, Tago M, et al. Phase 3 trials of stereotactic radiosurgery with or without whole-brain radiation therapy for 1 to 4 brain metastases: individual patient data meta-analysis. *Int J Radiation Oncol Biol Phys.* 2015; 91(4):710-7.
doi: 10.1016/j.ijrobp.2014.10.024.
273. Wolf A, Kvint S, Chachoua A, Pavlick A, Wilson M, Donahue B, et al. Toward the complete control of brain metastases using surveillance screening and stereotactic radiosurgery. *J Neurosurg.* 2018; 128(1):23-31.
doi: 10.3171/2016.10.JNS161036.
274. Fanous AA, Fabiano AJ. Bevacizumab for the treatment of post-stereotactic radiosurgery adverse radiation effect. *Surg Neurol Int.* 2016; 7(Suppl 19): S542-4.
doi: 10.4103/2152-7806.187531.

275. Sneed PK, Mendez J, Vemer-van den Hoek JG, Seymour ZA, Ma L, Molinaro AM, et al. Adverse radiation effect after stereotactic radiosurgery for brain metastases: incidence, time course, and risk factors. *J Neurosurg.* 2015; 123(2):373-86.
doi: 10.3171/2014.10.JNS141610.
276. Duchnowska R, Loibl S, Jassem J. Tyrosine kinase inhibitors for brain metastases in HER2-positive breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2018; 67:71-7. Review.
doi: 10.1016/j.ctrv.2018.05.004.
277. Reigner B, Blesch K, Weidekamm E. Clinical pharmacokinetics of capecitabine. *Clin Pharmacokinet.* 2001; 40(2):85-104. Review.
doi: 10.2165/00003088-200140020-00002.
278. Zhang J, Zhang L, Yan Y, Li S, Xie L, Zhong W, et al. Are capecitabine and the active metabolite 5-Fu CNS penetrable to treat breast cancer brain metastasis? *Drug Metab Dispos.* 2015; 43(3):411-7.
doi: 10.1124/dmd.114.061820.
279. Zhu W, Zhou L, Qian JQ, Qiu TZ, Shu YQ, Liu P. Temozolomide for treatment of brain metastases: a review of 21 clinical trials. *World J Clin Oncol.* 2014; 5(1):19-27. Review.
doi: 10.5306/wjco.v5.i1.19.
280. Melisko ME, Assefa M, Hwang J, DeLuca A, Park JW, Rugo HS. Phase II study of irinotecan and temozolomide in breast cancer patients with progressing central nervous system disease. *Breast Cancer Res Treat.* 2019; 177(2):401-8.
doi: 10.1007/s10549-019-05309-6.
281. Tian J, Luo Y, Xiang J, Tang J. Combined treatment for non-small cell lung cancer and breast cancer patients with brain metastases with whole brain radiotherapy and temozolomide: a systematic review and meta-analysis. *J Neurooncol.* 2017; 135(2):217-27. Review.
doi: 10.1007/s11060-017-2572-z.
282. Addeo R, Caraglia M. Combining temozolomide with other antitumor drugs and target-based agents in the treatment of brain metastases: an unending quest or chasing a chimera? *Expert Opin Investig Drugs.* 2011; 20(7):881-95. Review.
doi: 10.1517/13543784.2011.580736.
283. Addeo R, Sperlongano P, Montella L, Vincenzi B, Carraturo M, Iodice P, et al. Protracted low dose of oral vinorelbine and temozolomide with whole-brain radiotherapy in the treatment for breast cancer patients with brain metastases. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2012; 70(4):603-9.
doi: 10.1007/s00280-012-1945-4.

284. Addeo R, De Rosa C, Faiola V, Leo L, Cennamo G, Montella L, et al. Phase 2 trial of temozolomide using protracted low-dose and whole-brain radiotherapy for nonsmall cell lung cancer and breast cancer patients with brain metastases. *Cancer*. 2008; 113(9):2524–31.
doi: 10.1002/cncr.23859.
285. Kouvaris JR, Miliadou A, Kouloulis VE, Kolokouris D, Balafouta MJ, Papacharalampous XN, et al. Phase II study of temozolomide and concomitant whole-brain radiotherapy in patients with brain metastases from solid tumors. *Onkologie*. 2007; 30(7):361-6.
doi: 10.1159/000102557.
286. Shen CJ, Kummerlowe MN, Redmond KJ, Rigamonti D, Lim MK, Kleinberg LR. Stereotactic radiosurgery: treatment of brain metastasis without interruption of systemic therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2016; 95(2):735-42.
doi: 10.1016/j.ijrobp.2016.01.054.
287. Zimmer AS, Steinberg SM, Smart DD, Gilbert MR, Armstrong TS, Burton E, et al. Temozolomide in secondary prevention of HER2-positive breast cancer brain metastases. *Future Oncol*. 2020; 16(14):899-909.
doi: 10.2217/fon-2020-0094.
288. Addeo R, Caraglia M. The oral tyrosine kinase inhibitors lapatinib and sunitinib: new opportunities for the treatment of brain metastases from breast cancer? *Expert Rev Anticancer Ther*. 2011; 11(2):139-42.
doi: 10.1586/era.10.190.
289. Gadag S, Sinha S, Nayak Y, Garg S, Nayak UY. Combination therapy and nanoparticulate systems: Smart approaches for the effective treatment of breast cancer. *Pharmaceutics*. 2020; 12(6):524. Review.
doi: 10.3390/pharmaceutics12060524.
290. Tolaney SM, Sahebjam S, Le Rhun E, Bachelot T, Kabos P, Awada A, et al. A phase II study of abemaciclib in patients with brain metastases secondary to hormone receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2020; 26(20):5310-19.
doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-1764.
291. Shah N, Mohammad AS, Saralkar P, Sprowls SA, Vickers SD, John D, et al. Investigational chemotherapy and novel pharmacokinetic mechanisms for the treatment of breast cancer brain metastases. *Pharmacol Res*. 2018; 132:47-68. Review.
doi: 10.1016/j.phrs.2018.03.021.
292. Bobustuc GC, Kassam AB, Rovin RA, Jeudy S, Smith JS, Isley B, et al. MGMT inhibition in ER positive breast cancer leads to CDC2, TOP2A, AURKB, CDC20, KIF20A, Cyclin A2, Cyclin B2, Cyclin D1, ER α and survivin inhibition and enhances response to temozolomide. *Oncotarget*. 2018; 9(51):29727-42.
doi: 10.18632/oncotarget.25696.

293. Palmieri D, Duchnowska R, Woditschka S, Hua E, Qian Y, Biernat W, et al. Profound prevention of experimental brain metastases of breast cancer by temozolomide in an MGMT-dependent manner. *Clin Cancer Res.* 2014; 20(10):2727-39.
doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2588.
294. Crown J, Kennedy MJ, Tresca P, Marty M, Espie M, Burris HA, et al. Optimally tolerated dose of lapatinib in combination with docetaxel plus trastuzumab in first-line treatment of HER2-positive metastatic breast cancer. *Ann Oncol.* 2013; 24(8):2005–11.
doi:10.1093/annonc/mdt222.
295. Scaltriti M, Verma C, Guzman M, Jimenez J, Parra JL, Pedersen K, et al. Lapatinib, a HER2 tyrosine kinase inhibitor, induces stabilization and accumulation of HER2 and potentiates trastuzumab-dependent cell cytotoxicity. *Oncogene.* 2009; 28(6):803-14.
doi: 10.1038/onc.2008.432.
296. Pivot X, Manikhas A, Żurawski B, Chmielowska E, Karaszewska B, Allerton R, et al. CEREBEL (EGF111438): A phase III, randomized, open-label study of lapatinib plus capecitabine versus trastuzumab plus capecitabine in patients with Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2015; 33(14):1564-73.
doi: 10.1200/JCO.2014.57.1794.
297. Patyna S, Peng J. Distribution of sunitinib and its active metabolite in brain and spinal cord tissue following oral or intravenous administration in rodents and monkeys. *Eur J Cancer (Supplements).* 2006; 4(12):21.
298. Niravath P, Tham YL, Wang T, Rodriguez A, Foreman C, Hilsenbeck SG, et al. A phase II trial of capecitabine concomitantly with whole-brain radiotherapy followed by capecitabine and sunitinib for brain metastases from breast cancer. *Oncologist.* 2015; 20(1):13.
doi: 10.1634/theoncologist.2014-0278.
299. Murthy R, Borges VF, Conlin A, Chaves J, Chamberlain M, Gray T, et al. Tucatinib with capecitabine and trastuzumab in advanced HER2-positive metastatic breast cancer with and without brain metastases: a non-randomised, open-label, phase 1b study. *Lancet Oncol.* 2018; 19(7):880-8.
doi: 10.1016/S1470-2045(18)30256-0.
300. Murthy RK, Loi S, Okines A, Paplomata E, Hamilton E, Hurvitz SA, et al. Tucatinib, trastuzumab, and capecitabine for HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2020; 382(7):597-609.
doi: 10.1056/NEJMoa1914609.

301. Lin NU, Borges V, Anders C, Murthy RK, Paplomata E, Hamilton E, et al. Intracranial efficacy and survival with tucatinib plus trastuzumab and capecitabine for previously treated HER2-positive breast cancer with brain metastases in the HER2CLIMB Trial. *J Clin Oncol*. 2020; 38(23):2610-19. doi: 10.1200/JCO.20.00775.
302. Berghoff AS, Preusser M. Anti-angiogenic therapies in brain metastases. *Memo*. 2018; 11(1):14-7. Review. doi: 10.1007/s12254-018-0384-2.
303. Kwa MJ, Adams S. Checkpoint inhibitors in triple-negative breast cancer (TNBC): Where to go from here. *Cancer*. 2018; 124(10):2086-2103. Review. doi: 10.1002/cncr.31272.
304. Robson M, Im S-A, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, et al. Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline BRCA mutation. *N Engl J Med*. 2017; 377(6): 523–33. doi: 10.1056/NEJMoa1706450.
305. Ding L, Gu H, Xiong X, Ao H, Cao J, Lin W, et al. MicroRNAs involved in carcinogenesis, prognosis, therapeutic resistance, and applications in human triple-negative breast cancer. *Cells*. 2019; 8(12):1492. Review. doi: 10.3390/cells8121492.
306. Yin H, Xiong G, Guo S, Xu C, Xu R, Guo P, et al. Delivery of anti-miRNA for triple-negative breast cancer therapy using RNA nanoparticles targeting stem cell marker CD133. *Mol Ther*. 2019; 27(7):1252-61. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.04.018.
307. Zhang S, Deng G, Liu F, Peng B, Bao Y, Du F, et al. Autocatalytic delivery of brain tumor-targeting, size-shrinkable nanoparticles for treatment of breast cancer brain metastases. *Adv Funct Mater*. 2020; 30(14):1910651. doi: 10.1002/adfm.201910651.
308. Miller-Kleinhenz JM, Bozeman EN, Yang L. Targeted nanoparticles for image-guided treatment of triple-negative breast cancer: clinical significance and technological advances. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2015; 7(6):797-816. Review. doi: 10.1002/wnan.1343.
309. Morshed RA, Muroski ME, Dai Q, Wegscheid ML, Auffinger B, Yu D, et al. Cell-penetrating peptide-modified gold nanoparticles for the delivery of doxorubicin to brain metastatic breast cancer. *Mol Pharm*. 2016; 13(6):1843-54. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00004.
310. Zhang L, Jing D, Jiang N, Rojalin T, Baehr CM, Zhang D, et al. Transformable peptide nanoparticles arrest HER2 signalling and cause cancer cell death in vivo. *Nat Nanotechnol*. 2020; 15(2):145-53. doi: 10.1038/s41565-019-0626-4.

311. Rybakova Y, Kowalski PS, Huang Y, Gonzalez JT, Heartlein MW, DeRosa F, et al. mRNA delivery for therapeutic anti-HER2 antibody expression in vivo. *Mol Ther*. 2019; 27(8):1415-23.
doi: 10.1016/j.ymthe.2019.05.012.
312. Dong Q, Yang H, Wan C, Zheng D, Zhou Z, Xie S, et al. Her2-functionalized gold-nanoshelled magnetic hybrid nanoparticles: a theranostic agent for dual-modal imaging and photothermal therapy of breast cancer. *Nanoscale Res Lett*. 2019; 14(1):235.
doi: 10.1186/s11671-019-3053-4.
313. Cruz E, Kayser V. Synthesis and enhanced cellular uptake in vitro of anti-HER2 multifunctional gold nanoparticles. *Cancers (Basel)*. 2019; 11(6):870.
doi: 10.3390/cancers11060870.
314. Shi X, Cheng Q, Hou T, Han M, Smbatyan G, Lang JE, et al. Genetically engineered cell-derived nanoparticles for targeted breast cancer immunotherapy. *Mol Ther*. 2020; 28(2):536-47.
doi: 10.1016/j.ymthe.2019.11.020.
315. Li J, Xu W, Yuan X, Chen H, Song H, Wang B, et al. Polymer-lipid hybrid anti-HER2 nanoparticles for targeted salinomycin delivery to HER2-positive breast cancer stem cells and cancer cells. *Int J Nanomedicine*. 2017; 12:6909-21.
doi: 10.2147/IJN.S144184.
316. Nieto C, Centa A, Rodríguez-Rodríguez JA, Pandiella A, Martín Del Valle EM. Paclitaxel-trastuzumab mixed nanovehicle to target HER2-overexpressing tumors. *Nanomaterials (Basel)*. 2019; 9(7):948.
doi: 10.3390/nano9070948.
317. Duan T, Xu Z, Sun F, Wang Y, Zhang J, Luo C, et al. HPA aptamer functionalized paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles for enhanced anticancer therapy through targeted effects and microenvironment modulation. *Biomed Pharmacother*. 2019; 117:109121.
doi: 10.1016/j.biopha.2019.109121.
318. Li S, Wu Y, Ding F, Yang J, Li J, Gao X, et al. Engineering macrophage-derived exosomes for targeted chemotherapy of triple-negative breast cancer. *Nanoscale*. 2020; 12(19):10854-62.
doi: 10.1039/d0nr00523a.
319. Wadajkar AS, Dancy JG, Roberts NB, Connolly NP, Strickland DK, Winkles JA, et al. Decreased non-specific adhesivity, receptor targeted (DART) nanoparticles exhibit improved dispersion, cellular uptake, and tumor retention in invasive gliomas. *J Control Release*. 2017; 267:144-53.
doi: 10.1016/j.jconrel.2017.09.006.

320. Deepak KGK, Vempati R, Nagaraju GP, Dasari VR, Nagini S, Rao DN, et al. Tumor microenvironment: Challenges and opportunities in targeting metastasis of triple negative breast cancer. *Pharmacol Res.* 2020; 153:104683. Review. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104683.
321. Qattan A. Novel miRNA targets and therapies in the triple-negative breast cancer microenvironment: An emerging hope for a challenging disease. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(23):8905. Review. doi: 10.3390/ijms21238905.
322. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 2011; 121(7): 2750-67. doi: 10.1172/JCI45014.
323. Bareche Y, Buisseret L, Grusso T, Girard E, Venet D, Dupont F, et al. Unraveling triple-negative breast cancer tumor microenvironment heterogeneity: towards an optimized treatment approach. *J Natl Cancer Inst.* 2020; 112(7):708-19. doi: 10.1093/jnci/djz208.
324. Michaelson JS, Kelly R, Yang L, Zhang X, Wortham K, Joseph IJBK. The anti-Fn14 antibody B1B036 inhibits tumor growth in xenografts and patient derived primary tumor models and enhances efficacy of chemotherapeutic agents in multiple xenograft models. *Cancer Biol Ther.* 2012; 13(9):812-21. doi: 10.4161/cbt.20564.
325. Badia-Villanueva M, Defaus S, Foj R, Andreu D, Oliva B, Sierra A, et al. Evaluation of computationally designed peptides against TWEAK, a cytokine of the tumour necrosis factor ligand family. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(3):1066. doi: 10.3390/ijms22031066.
326. Lassen UN, Meulendijks D, Siu LL, Karanikas V, Mau-Sorensen M, Schellens JH, et al. A phase I monotherapy study of RG7212, a first-in-class monoclonal antibody targeting TWEAK signaling in patients with advanced cancers. *Clin Cancer Res.* 2015; 21(2):258-66. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1334.
327. Li Z, Xie J, Peng S, Liu S, Wang Y, Lu W, et al. Novel strategy utilizing extracellular cysteine-rich domain of membrane receptor for constructing d-peptide mediated targeted drug delivery systems: a case study on Fn14. *Bioconjug Chem.* 2017; 28(8):2167-79. doi:10.1021/acs.bioconjchem.7b00326.
328. Khandelwal A, Crowley VM, Blagg BSJ. Natural product inspired Hsp90 N-terminal inhibitors for the treatment of cancer: From bench to bedside. *Med Res Rev.* 2016; 36(1):92-118. Review. doi: 10.1002/med.21351.

329. Muth A, Crowley V, Khandelwal A, Mishra S, Zhao J, Hall J, et al. Development of radamide analogs as Grp94 inhibitors. *Bioorg Med Chem*. 2014; 22(15):4083-98.
doi: 10.1016/j.bmc.2014.05.075.
330. Crowley VM, Khandelwal A, Mishra S, Stothert AR, Huard DJ, Zhao J, et al. Development of Glucose Regulated Protein 94-selective inhibitors based on the Bnlm and radamide scaffold. *J Med Chem*. 2016; 59(7):3471-88.
doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00085.
331. Lundgren K, Zhang H, Brekken J, Huser N, Powell RE, Timple N, et al. BIIB021, an orally available, fully synthetic small-molecule inhibitor of the heat shock protein Hsp90. *Mol Cancer Ther*. 2009; 8(4):921-9.
doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0758.
332. Lee H, Saini N, Howard EW, Parris AB, Ma Z, Zhao Q, et al. Ganetespib targets multiple levels of the receptor tyrosine kinase signaling cascade and preferentially inhibits ErbB2-overexpressing breast cancer cells. *Sci Rep*. 2018; 8(1):6829.
doi: 10.1038/s41598-018-25284-0.
333. Proia DA, Zhang C, Sequeira M, Jimenez JP, He S, Spector N, et al. Preclinical activity profile and therapeutic efficacy of the HSP90 inhibitor ganetespib in triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2014; 20(2):413-24.
doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2166.
334. Jhaveri K, Chandarlapaty S, Lake D, Gilewski T, Robson M, Goldfarb S, et al. A phase II open-label study of ganetespib, a novel heat shock protein 90 inhibitor for patients with metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2014; 14(3):154-60.
doi: 10.1016/j.clbc.2013.12.012.
335. Jhaveri K, Wang R, Teplinsky E, Chandarlapaty S, Solit D, Cadoo K, et al. A phase I trial of ganetespib in combination with paclitaxel and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor-2 (HER2)-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2017; 19(1):89.
doi: 10.1186/s13058-017-0879-5.
336. Modi S, Saura C, Henderson C, Lin NU, Mahtani R, Goddard J, et al. A multicenter trial evaluating retaspimycin HCL (IPI-504) plus trastuzumab in patients with advanced or metastatic HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013; 139(1):107-13.
doi: 10.1007/s10549-013-2510-5.
337. Simon RM, Paik S, Hayes DF. Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *J Natl Cancer Inst*. 2009; 101(21):1446-52.
doi: 10.1093/jnci/djp335.

338. Jørgensen JT, Hersom M. Companion diagnostics - a tool to improve pharmacotherapy. *Ann Transl Med.* 2016; 4(24):482. Review. doi: 10.21037/atm.2016.12.26.
339. Olsen D, Jørgensen JT. Companion diagnostics for targeted cancer drugs - clinical and regulatory aspects. *Front Oncol.* 2014; 4:105. Review. doi: 10.3389/fonc.2014.00105.
340. Clarke R. Animal models of breast cancer: their diversity and role in biomedical research. *Breast Cancer Res Treat.* 1996; 39(1):1–6. doi: 10.1007/BF01806073.
341. Clarke R. Human breast cancer cell line xenografts as models of breast cancer. The immunobiologies of recipient mice and the characteristics of several tumorigenic cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* 1996; 39(1):69–86. doi: 10.1007/BF01806079.
342. Kanojia D, Balyasnikova IV, Morshed RA, Frank RT, Yu D, Zhang L, et al. Neural stem cells secreting anti-HER2 antibody improve survival in a preclinical model of HER2 overexpressing breast cancer brain metastases. *Stem Cells.* 2015; 33(10):2985-94. doi: 10.1002/stem.2109.
343. Murrell DH, Hamilton AM, Mallett CL, van Gorkum R, Chambers AF, Foster PJ. Understanding heterogeneity and permeability of brain metastases in murine models of HER2-positive breast cancer through magnetic resonance imaging: implications for detection and therapy. *Transl Oncol.* 2015; 8(3):176-84. doi: 10.1016/j.tranon.2015.03.009.
344. Karginova O, Siegel MB, van Swearingen AED, Deal AM, Adamo B, Sambade MJ, et al. Efficacy of carboplatin alone and in combination with ABT888 in intracranial murine models of BRCA-mutated and BRCA-wild-type triple-negative breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 2015; 14(4):920-30. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0474.
345. Yoneda T, Williams PJ, Hiraga T, Niewolna M, Nishimura R. A bone-seeking clone exhibits different biological properties from the MDA-MB-231 parental human breast cancer cells and a brain-seeking clone in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res.* 2001; 16(8):1486–95. doi: 10.1359/jbmr.2001.16.8.1486.
346. Arguello F, Baggs RB, Frantz CN. A murine model of experimental metastasis to bone and bone marrow. *Cancer Res.* 1988; 48(23): 6876-81.
347. Zhou H, Chen M, Zhao D. Longitudinal MRI evaluation of intracranial development and vascular characteristics of breast cancer brain metastases in a mouse model. *PLoS One.* 2013; 8(4):e62238. doi: 10.1371/journal.pone.0062238.

348. Zhou H, Zhao D. Ultrasound imaging-guided intracardiac injection to develop a mouse model of breast cancer brain metastases followed by longitudinal MRI. *J Vis Exp*. 2014; (85):51146.
doi: 10.3791/51146.
349. Liu H, Kato Y, Erzinger SA, Kiriakova GM, Qian Y, Palmieri D, et al. The role of MMP-1 in breast cancer growth and metastasis to the brain in a xenograft model. *BMC Cancer*. 2012; 12:583.
doi: 10.1186/1471-2407-12-583.
350. Hoenerhoff MJ, Chu I, Barkan D, Liu ZY, Datta S, Dimri GP, et al. BMI1 cooperates with H-RAS to induce an aggressive breast cancer phenotype with brain metastases. *Oncogene*. 2009; 28(34):3022-32.
doi: 10.1038/onc.2009.165.
351. Palmieri D, Bronder JL, Herring JM, Yoneda T, Weil RJ, Stark AM, et al. Her-2 overexpression increases the metastatic outgrowth of breast cancer cells in the brain. *Cancer Res*. 2007; 67(9):4190–8.
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3316.
352. Palmieri D, Lockman PR, Thomas FC, Hua E, Herring J, Hargrave E, et al. Vorinostat inhibits brain metastatic colonization in a model of triple-negative breast cancer and induces DNA double-strand breaks. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(19):6148–57.
doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1039.
353. Wurth R, Tarn K, Jernigan D, Fernandez SV, Cristofanilli M, Fatatis A, et al. A preclinical model of inflammatory breast cancer to study the involvement of CXCR4 and ACKR3 in the metastatic process. *Transl Oncol*. 2015; 8(5):358-67.
doi: 10.1016/j.tranon.2015.07.002.
354. Schackert G, Fidler IJ. Development of in vivo models for studies of brain metastasis. *Int J Cancer*. 1988; 41(4):589-94.
doi: 10.1002/ijc.2910410419.
355. Schackert G, Fidler IJ. Site-specific metastasis of mouse melanomas and a fibrosarcoma in the brain or meninges of syngeneic animals. *Cancer Res*. 1988; 48(12):3478-84.
356. Schackert G, Price JE, Zhang RD, Bucana CD, Itoh K, Fidler IJ. Regional growth of different human melanomas as metastases in the brain of nude mice. *Am J Pathol*. 1990; 136(1):95-102.
357. Zhang RD, Price JE, Schackert G, Itoh K, Fidler IJ. Malignant potential of cells isolated from lymph node or brain metastases of melanoma patients and implications for prognosis. *Cancer Res*. 1991; 51(8):2029-35.

358. Fidler IJ, Schackert G, Zhang RD, Radinsky R, Fujimaki T. The biology of melanoma brain metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 1999; 18(3):387-400. Review.
doi: 10.1023/a:1006329410433.
359. Schackert G, Price JE, Bucana CD, Fidler IJ. Unique patterns of brain metastasis produced by different human carcinomas in athymic nude mice. *Int J Cancer.* 1989; 44(5):892-7.
doi: 10.1002/ijc.2910440524.
360. Küsters B, Westphal JR, Smits D, Ruiter DJ, Wesseling P, Keilholz U, et al. The pattern of metastasis of human melanoma to the central nervous system is not influenced by integrin alpha(v)beta(3) expression. *Int J Cancer.* 2001; 92(2):176-80.
doi:10.1002/1097-0215(200102)9999:9999<:aidijc1173>3.0.co;2-l.
361. Perides G, Zhuge Y, Lin T, Stins MF, Bronson RT, Wu JK. The fibrinolytic system facilitates tumor cell migration across the blood-brain barrier in experimental melanoma brain metastasis. *BMC Cancer.* 2006; 6:56.
doi: 10.1186/1471-2407-6-56.
362. Zhang C, Lowery FJ, Yu D. Intracarotid cancer cell injection to produce mouse models of brain metastasis. *J Vis Exp.* 2017; (120):55085.
doi: 10.3791/55085.
363. Zhang C, Yu D. Microenvironment determinants of brain metastasis. *Cell Biosci.* 2011; 1(1):8.
doi: 10.1186/2045-3701-1-8.
364. Martínez-Aranda A, Hernández V, Picón C, Modolell I, Sierra A. Development of a preclinical therapeutic model of human brain metastasis with chemoradiotherapy. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(4):8306-27.
doi:10.3390/ijms14048306.
365. Smart D, Garcia-Glaessner A, Palmieri D, Wong-Goodrich SJ, Kramp T, Gril B, et al. Analysis of radiation therapy in a model of triple-negative breast cancer brain metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 2015; 32(7):717-27.
doi: 10.1007/s10585-015-9739-9.
366. Stojadinovic S, Low DA, Vicic M, Mutic S, Deasy JO, Hope AJ, et al. Progress toward a microradiation therapy small animal conformal irradiator. *Med Phys.* 2006; 33(10):3834-45.
doi: 10.1118/1.2349693.
367. Stojadinovic S, Low DA, Hope AJ, Vicic M, Deasy JO, Cui J, et al. MicroRT-small animal conformal irradiator. *Med Phys.* 2007; 34(12):4706-16.
doi: 10.1118/1.2799887.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

368. Newcomb EW, Lukyanov Y, Kawashima N, Alonso-Basanta M, Wang SC, Liu M, et al. Radiotherapy enhances antitumor effect of anti-CD137 therapy in a mouse Glioma model. *Radiat Res.* 2010; 173(4):426-32.
doi: 10.1667/RR1904.1.
369. Yang H, Lee HW, Kim Y, Lee Y, Choi YS, Kim KH, et al. Radiosensitization of brain metastasis by targeting c-MET. *Lab Invest.* 2013; 93(3):344-53.
doi: 10.1038/labinvest.2012.180.
370. Wall BA, Yu LJ, Khan A, Haffty B, Goydos JS, Chen S. Riluzole is a radiosensitizing agent in an in vivo model of brain metastasis derived from GRM1 expressing human melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015; 28(1):105-9.
doi: 10.1111/pcmr.12327.
371. Wong J, Armour E, Kazanzides P, Iordachita I, Tryggestad E, Deng H, et al. High resolution, small animal radiation research platform with x-ray tomographic guidance capabilities. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008; 71(5):1591–9.
doi: 10.1016/j.ijrobp.2008.04.025.
372. Felix MC, Fleckenstein J, Kirschner S, Hartmann L, Wenz F, Brockmann MA, et al. Image-guided radiotherapy using a modified industrial micro-CT for preclinical applications. *PLoS One.* 2015; 10(5):e0126246.
doi: 10.1371/journal.pone.0126246.
373. Squatrito M, Brennan CW, Helmy K, Huse JT, Petrini JH, Holland EC. Loss of ATM/Chk2/p53 pathway components accelerates tumor development and contributes to radiation resistance in gliomas. *Cancer Cell.* 2010; 18(6):619-29.
doi: 10.1016/j.ccr.2010.10.034.
374. Halliday J, Helmy K, Pattwell SS, Pitter KL, LaPlant Q, Ozawa T, et al. In vivo radiation response of proneural glioma characterized by protective p53 transcriptional program and proneural-mesenchymal shift. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111(14):5248-53.
doi: 10.1073/pnas.1321014111.
375. Chung C, Jalali S, Foltz W, Burrell K, Wildgoose P, Lindsay P, et al. Imaging biomarker dynamics in an intracranial murine glioma study of radiation and antiangiogenic therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2013; 85(3):805-12.
doi:10.1016/j.ijrobp.2012.07.005.
376. Zhang L, Yuan H, Burk LM, Inscoe CR, Hadsell MJ, Chtcheprov P, et al. Image-guided microbeam irradiation to brain tumour bearing mice using a carbon nanotube x-ray source array. *Phys Med Biol.* 2014; 59(5):1283-303.
doi: 10.1088/0031-9155/59/5/1283.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

377. Zeng J, See AP, Phallen J, Jackson CM, Belcaid Z, Ruzevick J, et al. Anti-PD-1 blockade and stereotactic radiation produce long-term survival in mice with intracranial gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2013; 86(2):343-9.
doi: 10.1016/j.ijrobp.2012.12.025.
378. Patel MA, Kim JE, Theodoros D, Tam A, Velarde E, Kochel CM, et al. Agonist anti-GITR monoclonal antibody and stereotactic radiation induce immune-mediated survival advantage in murine intracranial glioma. *J Immunother Cancer*. 2016; 4:28.
doi: 10.1186/s40425-016-0132-2.
379. Kim JE, Patel MA, Mangraviti A, Kim ES, Theodoros D, Velarde E, et al. Combination therapy with anti-PD-1, anti-TIM-3, and focal radiation results in regression of murine gliomas. *Clin Cancer Res*. 2017; 23(1):124-36.
doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1535.
380. Murrell DH, Zarghami N, Jensen MD, Chambers AF, Wong E, Foster PJ. Evaluating changes to blood-brain barrier integrity in brain metastasis over time and after radiation treatment. *Transl Oncol*. 2016; 9(3):219-27.
doi: 10.1016/j.tranon.2016.04.006.
381. Cheng CL, Johnson SP, Keir ST, Quinn JA, Ali-Osman F, Szabo C, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibition reverses temozolomide resistance in a DNA mismatch repair-deficient malignant glioma xenograft. *Mol Cancer Ther*. 2005; 4(9):1364-8.
doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0128.
382. Kitange GJ, Carlson BL, Schroeder MA, Grogan PT, Lamont JD, Decker PA, et al. Induction of MGMT expression is associated with temozolomide resistance in glioblastoma xenografts. *Neuro Oncol*. 2009; 11(3):281-91.
doi: 10.1215/15228517-2008-090.
383. Kil WJ, Cerna D, Burgan WE, Beam K, Carter D, Steeg PS, et al. In vitro and in vivo radiosensitization induced by the DNA methylating agent temozolomide. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(3):931-8.
doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1856.
384. Sanchez-Perez LA, Choi BD, Archer GE, Cui X, Flores C, Johnson LA, et al. Myeloablative temozolomide enhances CD8+ T-cell responses to vaccine and is required for efficacy against brain tumors in mice. *PLoS One*. 2013; 8(3):e59082.
doi: 10.1371/journal.pone.0059082.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10. ANEXOS

10.1. SISTEMAS DE VALORACIÓN DEL PRONÓSTICO EN PACIENTES CON METÁSTASIS CEREBRALES

10.1.1. RPA (“Recursive Partitioning Analysis”)

Clase	Características Clínicas
1	KPS \geq 70, y: Edad < 65 a., y Tumor primario controlado, y No metástasis extracraneales.
2	KPS \geq 70, y: Edad \geq 65 a., o Tumor primario no controlado, o Metástasis extracraneales.
3	KPS < 70.

A partir de la base de datos de la RTOG (“Radiation Therapy Oncology Group”) se aplica el método estadístico RPA (“Recursive Partitioning Analysis”), el cual crea un árbol de regresión de acuerdo a la significancia pronóstica. Para incluir a los pacientes en una determinada clase pronóstica deben cumplir las condiciones de cada una de las variables o características clínicas. KPS: “Karnofsky Performance Status”. Fuente: Gaspar L et al. 1997.

10.1.2. GPA (“Graded Prognostic Assessment”)

Variables	Puntuación		
	0	0.5	1.0
Edad (años)	> 60	50 - 60	< 50
KPS	< 70	70 - 80	90 - 100
nº MC	> 3	2 - 3	1
Metástasis extracraneales	Sí	—	No

A partir de la base de datos actualizada de la RTOG (“Radiation Therapy Oncology Group”) los datos se obtuvieron de cinco estudios randomizados. La puntuación total en el sistema GPA obedece a la suma de las puntuaciones parciales obtenidas en la evaluación de cada variable, obteniéndose cuatro categorías pronósticas en función de la puntuación total obtenida: 0.0-1.0; 1.5-2.5; 3.0; 3.5-4.0. Tabla adaptada de Sperduto PW et al. 2008.

10.1.3. “GPA-específico de mama”

Variable	Puntuación		
	0.0	0.5	1.0
KPS	< 70	70 - 80	90 - 100
Her2	negativo		positivo
RE / RP	negativo	positivo	
nº MC	> 4	2 - 4	1

La variable RE/RP se considera positiva si cualquiera de los receptores es positivo. La puntuación total en el sistema "GPA-específico de mama" obedece a la suma de las puntuaciones parciales obtenidas en la evaluación de cada variable, obteniéndose cuatro categorías pronósticas en función de la puntuación total obtenida: 0.0-1.0; 1.5-2.0; 2.5-3.0; 3.5. Tabla adaptada de Sperduto PW et al. 2010.

10.2. SÍNTESIS EXPLICATIVA DEL MODELO LINEAL-CUADRÁTICO (L-Q) EN RADIOBIOLOGÍA

La muerte celular a consecuencia de la radiación ionizante es de naturaleza dual. Uno de los mecanismos corresponde a la “acción directa” de la radiación sobre las cadenas del DNA, muerte celular directa producida por un único impacto letal de energía y no reparable; y el segundo mecanismo corresponde a la “acción indirecta” de la radiación sobre las cadenas del DNA, produciendo daño sobre la molécula de agua con producción de radicales libres que, a su vez, producen daño sobre el DNA, lo que implica un acúmulo de impactos de energía subletales, que son reparables por los mecanismos de reparación celular pero cuyo mecanismo es saturable, es decir, que el acúmulo no reparado de impactos subletales conllevará a un daño celular no reparable y, por tanto, letal (muerte celular indirecta). A medida que aumenta la dosis se produce la saturación en los mecanismos de reparación, por lo que la célula se ve incapaz de reparar todas las lesiones.

La probabilidad de producir un daño letal por impacto único ($P\alpha$) es proporcional a la dosis (d) recibida ($P\alpha = \alpha \cdot d$), mientras que la probabilidad de producir este daño letal por acumulación de impactos subletales ($P\beta$) es proporcional al cuadrado de la dosis recibida ($P\beta = \beta \cdot d^2$), donde α y β son las constantes de proporcionalidad.

Varios modelos se han postulado para explicar la forma de las curvas de supervivencia celular a la radiación ionizante (fracción superviviente - dosis). De ellos, el que mejor describe la respuesta a la radiación en la región de la curva de baja dosis (0 - 3Gy) es el Modelo Lineal-Cuadrático (L-Q). Este modelo es de amplio uso en radiobiología y, en general, funciona bien describiendo respuestas a la radiación tanto “in vitro” como “in vivo”.

Con este modelo L-Q, la fracción celular superviviente (S) tras una dosis/fracción (d) queda manifiesta por la siguiente expresión:

$$S = e^{-(\alpha d + \beta d^2)}$$

donde α y β son constantes características de la población celular estudiada (constantes para cada curva de supervivencia celular). El componente α es el componente lineal de la curva, relacionado con la “muerte celular directa” y el daño no-reparable, mientras que el componente β es el componente cuadrático de la misma, relacionado con la “muerte celular indirecta” y el daño reparable. En una población celular se recibe un promedio de $(\alpha \cdot d + \beta \cdot d^2)$ impactos por célula.

Estudios radiobiológicos han mostrado que cada fracción de dosis sucesiva es igualmente efectiva, por lo que el efecto (E) de (n) fracciones puede ser expresado como:

$$E = -\log_e (S)^n = -n \cdot \log_e S = n \cdot (\alpha d + \beta d^2) = \alpha D + \beta d D$$

donde (D) es la dosis total de radiación, y sea expresada como:

$$D = n \cdot d$$

A partir, pues, de la expresión

$$E = \alpha D + \beta d D$$

obtendremos:

$$E/\alpha = D \cdot \left(1 + \frac{d}{\alpha/\beta} \right) = BED$$

$$BED = n \cdot d \left(1 + \frac{d}{\alpha/\beta} \right)$$

donde BED es la dosis efectiva biológica (medida del efecto de un proceso de irradiación continua o fraccionada).

Cuando el efecto lineal de la radiación sobre las células se iguala al efecto cuadrático tendremos:

$$\alpha d = \beta d^2 \quad \Rightarrow \quad d = \alpha / \beta$$

Efecto lineal = Efecto cuadrático

Así, la relación α / β corresponde a la dosis donde el efecto (muerte celular) está dado por el mecanismo directo e indirecto en la misma proporción, sin que predomine uno sobre otro, es decir, es la dosis en la cual la contribución lineal al daño iguala a la contribución cuadrática al mismo.

Por otro lado, la curva de supervivencia en el modelo L-Q es una curva que se “dobla o curva” continuamente, sin ninguna porción recta a altas dosis de radiación. Su forma o “curvatura” está determinada por la ratio α / β . Cuando el grado de curvatura de la curva de supervivencia celular es más pronunciado, la relación α / β disminuye.

Así, relaciones α / β aumentadas implican una alta tasa de recambio celular (división celular) y una baja capacidad de reparación del daño subletal por parte de las células (“curvatura” de la curva poco pronunciada). Por tanto, en tejidos de respuesta aguda o precoz (alta tasa de recambio celular, por ejemplo en el caso de células epiteliales de piel y mucosas o células tumorales), la expresión de la lesión por radiación se manifiesta en días - semanas después de haber sufrido la irradiación (rango de α / β : 7 - 20 Gy).

Por otro lado, relaciones α / β disminuídas implican una baja tasa de división celular y una mayor capacidad de reparación celular del daño subletal (“curvatura” de la curva más pronunciada). Por tanto, en tejidos de respuesta tardía (baja tasa de recambio celular, por ejemplo en el caso de células del sistema nervioso), la

expresión de la lesión por radiación se manifiesta en meses - años después de la irradiación (rango de α / β : 0.5 - 6 Gy).

Así pues, el valor de la ratio α / β debe ser elegido cuidadosamente al calcular la dosis efectiva biológica (BED) en un determinado tejido. En animales de experimentación se han calculado valores de la ratio α / β para una variedad de tejidos normales de respuesta precoz y tardía a la radiación ionizante. A pesar de las diferencias que puede haber entre los tejidos de los animales de experimentación y los tejidos humanos, la concordancia entre los datos obtenidos de animales y de humanos, teniendo en cuenta las limitaciones éticas, es en general buena. Ello confirma que los tejidos animales son buenos modelos para comparar los efectos de los diferentes esquemas de fraccionamiento que pueden ser usados clínicamente. En base a esto, se han calculado valores del ratio α / β para un efecto en tejidos normales humanos y tumores.

Como hemos dicho anteriormente, la BED es una medida del efecto de un esquema de radiación; es la dosis total teórica que se requeriría para producir un determinado isoeffecto (E), un determinado efecto con una determinada probabilidad. Así, dos esquemas diferentes de fraccionamiento son "isoefectivos" si producen el mismo efecto biológico (BED) en el tejido irradiado. En el modelo L-Q, la respuesta (efecto producido) del tejido normal o del tumor a la radiación viene caracterizada por el parámetro α / β (ver fórmula de la BED). Una desventaja de la BED como medida de la intensidad de tratamiento es que es numéricamente mucho más grande que cualquier dosis de radiación prescribible de radioterapia fraccionada estándar. Una alternativa, pues, al cálculo del isoeffecto es calcular la dosis equivalente en fracciones de 2 Gy (EQD2).

El modelo L-Q asume que hay un tiempo suficiente entre las fracciones para que se lleve a cabo la reparación completa del daño subletal. Este intervalo de reparación completa es de al menos 6h, pero en algunos tejidos (p.e. médula espinal) puede ser de hasta 24h. En cambio, cuando las fracciones de radiación se administran tan próximas en el tiempo que la reparación es incompleta, es necesario ajustar la fórmula de la BED. Mucha menos dosis es necesaria para producir los mismos

efectos cuando el intervalo interfacción se reduce (fenómeno de “reparación incompleta”).

La reparación incompleta tenderá a reducir la dosis isoefectiva y las correcciones deben de ser hechas para la consecuente pérdida de tolerancia.

Referencias:

1. Joiner MC. Models of radiation cell killing. Chapter 7. En: G.G. Steel. Basic Clinical Radiobiology. 2nd Edition. London, UK. and New York, USA: Ed. Arnold; 1997. p. 52-57. ISBN: 0340700203.

(Referencia bibliográfica nº. 211)

2. Joiner MC, van der Kogel AJ. The linear-quadratic approach to fractionation and calculation of isoeffect relationships. Chapter 13. En: G.G. Steel. Basic Clinical Radiobiology. 2nd Edition. London, UK. and New York, USA: Ed. Arnold; 1997. p. 106-122. ISBN: 0340700203.

(Referencia bibliográfica nº. 212)

3. Ciudad J. El efecto de la tasa de dosis. Capítulo 5. En: D. Guirado. Radiobiología Clínica. Grupo de trabajo sobre Radiobiología Clínica de la Sociedad Española de Física Médica. Madrid, España: Ed. Servymagen Union, S.L.; 2003. p. 91-103. ISBN: 84-95074-35-4.

(Referencia bibliográfica nº. 213)

4. Joiner MC, Bentzen SM. Fractionation: the linear-quadratic approach. Chapter 8. En: M. Joiner, A. van der Kogel. Basic Clinical Radiobiology. 4th Edition. London, UK: Ed. Hodder Arnold; 2009. p. 102-119. ISBN: 9780340929667.

(Referencia bibliográfica nº. 214)

5. Bentzen SM, Joiner MC. The linear-quadratic approach in clinical practice. Chapter 9. En: M. Joiner, A. van der Kogel. Basic Clinical Radiobiology. 4th Edition. London, UK: Ed. Hodder Arnold; 2009. p. 120-134. ISBN: 9780340929667.

(Referencia bibliográfica nº. 215)

6. Beyzadeoglu M, Ozyigit G, Ebruli C. Radiobiology. Chapter 2. En: M. Beyzadeoglu, G. Ozyigit, C. Ebruli. Basic Radiation Oncology. Germany: Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2010. p. 71-144. ISBN: 978-3-642-11665-0.

(Referencia bibliográfica nº. 216)

10.3. CÁLCULO DE LA BED PARA TEJIDOS CON DIFERENTE RESPUESTA A LA RADIACIÓN IONIZANTE SOMETIDOS A DIFERENTES ESQUEMAS DE TRATAMIENTO.

Esquema de irradiación			BED (Gy)	
D (Gy)	d (Gy)	n	$\alpha / \beta = 10$	$\alpha / \beta = 3$
8	4	2	11,2	18,7
8	8	1	14,4	29,3
15	5	3	22,5	40
18	3	6	23,4	36
14	7	2	23,8	46,7
16,5	5,5	3	25,6	46,7
16,8	5,6	3	26,2	48,2
17,1	5,7	3	26,8	49,6
21	3	7	27,3	42
20	4	5	28	46,7
16	8	2	28,8	58,7
18	6	3	28,8	54
20	5	4	30	53,3
27	1,8	15	31,9	43,2
25	5	5	37,5	66,7
30	3	10	39	60
30	10	3	60	130




D: Dosis Total nominal ($D = n \cdot d$); **d:** dosis/fracción; **n:** nº de fracciones;

BED: Dosis Efectiva Biológica (válida para dosis/fracción entre 1,5 - 8,0 Gy);

$BED = n \cdot d (1 + d / \alpha/\beta)$

$\alpha/\beta = 10$ para tejidos de respuesta rápida (recambio celular rápido, p.e. tumor).

$\alpha/\beta = 3$ para tejidos de respuesta lenta (recambio celular lento, p.e. tejido nervioso).

-  Esquema clásico de irradiación craneal en humanos con metástasis cerebrales
-  Esquemas pre-seleccionados para irradiación craneal con n = 3 fracciones
-  Esquema seleccionado para irradiación craneal con n = 3 fracciones en el experimento con ratones atómicos

10.4. PUBLICACIONES

10.4.1. ARTÍCULO 1

Simoões RV, Martínez-Aranda A, Martín B, Cerdán S, Sierra A, Arús C.

Preliminary characterization of an experimental breast cancer cells brain metastasis mouse model by MRI/MRS.

MAGMA: Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine. 2008; 21(4): 237-49.

doi:10.1007/s10334-008-0114-6.

10.4.2. ARTÍCULO 2

Martínez-Aranda A, Hernández V, Picón C, Modolell I, Sierra A.

Development of a preclinical therapeutic model of human brain metastasis with chemoradiotherapy.

International Journal of Molecular Sciences. 2013; 14(4): 8306-8327.

doi: 10.3390/ijms14048306.

10.4.3. ARTÍCULO 3

Martínez-Aranda A, Hernández V, Guney E, Muixí L, Foj R, Baixeras N, Cuadras D, Moreno V, Urruticoechea A, Gil M, Oliva B, Moreno F, González-Suárez E, Vidal N, Andreu X, Seguí MA, Ballester R, Castella E, Sierra A.

FN14 and GRP94 expression are prognostic/predictive biomarkers of brain metastasis outcome that open up new therapeutic strategies.

Oncotarget. 2015; 6(42):44254-73.

doi: 10.18632/oncotarget.5471

10.4.4. ARTÍCULO 4

Martínez-Aranda A, Hernández V, Moreno F, Baixeras N, Cuadras D, Urruticoechea A, Gil-Gil M, Vidal N, Andreu X, Seguí MA, Ballester R, Castella E, Sierra A.

Predictive and prognostic brain metastases assessment in luminal breast cancer patients: FN14 and GRP94 from diagnosis to prophylaxis.

Frontiers in Oncology. 2017; 7:283.

doi: 10.3389/fonc.2017.00283.

10.4.1. ARTÍCULO 1

Simoões RV, Martínez-Aranda A, Martín B, Cerdán S, Sierra A, Arús C.

Preliminary characterization of an experimental breast cancer cells brain metastasis mouse model by MRI/MRS.

MAGMA: Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine. 2008; 21(4): 237-49.

doi:10.1007/s10334-008-0114-6.

Factor Impacto (2008): 1.844

Área Conocimiento: Radiology, Nuclear Medicine & Medical Imaging

Rank: 49/92 // Quartil: Q3

(Referencia bibliográfica nº. 204)

Preliminary characterization of an experimental breast cancer cells brain metastasis mouse model by MRI/MRS

R. V. Simões · A. Martinez-Aranda · B. Martín ·
S. Cerdán · A. Sierra · C. Arús

Received: 2 November 2007 / Revised: 28 March 2008 / Accepted: 11 April 2008
© ESMRMB 2008

Abstract

Purpose Chemotherapy increases survival in breast cancer patients. Consequently, cerebral metastases have recently become a significant clinical problem, with an incidence of 30–40% among breast carcinoma patients. As this phenomenon cannot be studied longitudinally in humans, models which mimic brain metastasis are needed to investigate its pathogenesis. Such models may later be used in experimental therapeutic approaches.

Material and methods/results We report a model in which 69% of the animals (9/13 *BALB/c nude* mice) developed MR-detectable abnormal masses in the brain parenchyma within a 20 to 62-day time window post intra-carotid injection of 435-Br1 human cells. The masses detected in vivo were either single (7 animals) or multiple (2 animals). Longitudinal MR (MRI/MRS) studies and post-mortem histological data were

correlated, revealing a total incidence of experimental brain metastases of 85% in the cases studied (11/13 animals). ADC maps perfectly differentiated edema and/or CSF areas from metastasis. Preliminary MRS data also revealed additional features: decrease in *N*-acetyl aspartate (NAA) was the first MRS-based marker of metastasis growth in the brain (micro-metastasis); choline-containing compounds (Cho) rose and creatine (Cr) levels decreased as these lesions evolved, with mobile lipids and lactate also becoming visible. Furthermore, MRS pattern recognition-based analysis suggested that this approach may help to discriminate different growth stages. **Conclusions** This study paves the way for further in vivo studies oriented towards detection of different tumor progression states and for improving treatment efficiency.

Keywords Brain metastasis · Breast cancer · Proton magnetic resonance spectroscopy · Magnetic resonance imaging · Pattern recognition

R. V. Simões (✉) · C. Arús
Grup d'Aplicacions Biomèdiques de la Ressonància Magnètica Nuclear (GABRMN), Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Spain
e-mail: rsimoes@carbon.uab.es

R. V. Simões · C. Arús
Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Cerdanyola del Vallès, Spain

R. V. Simões
Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra (CNC), Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

A. Martinez-Aranda · B. Martín · A. Sierra
Centre d'Oncologia Molecular, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), CSUB, Barcelona, Spain

S. Cerdán
Departamento de Modelos experimentales de enfermedades humanas, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" UAM-CSIC, Madrid, Spain

Abbreviations

ADC	Apparent diffusion coefficient
ASCII	American Standard Code for Information Interchange
CBF	Cerebral blood flow
CBV	Cerebral blood volume
CE-T1 MRI	Contrast-enhanced T1 MRI
DAB	Diaminobenzidine
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium with nutrient mixture F12 Ham
d _{PI}	Days post-injection
DWI	Diffusion weighted imaging
FBS	Fetal bovine serum
FOV	Field of view
GFP	Green fluorescent protein
GUI	Graphical user interface

H&E	Hematoxylin–eosin
IHC	Immunohistochemistry
<i>ic</i>	Intracarotid
<i>ip</i>	Intraperitoneal
LB	Line broadening
HBSS	Hanks' balanced salt solution
¹ H MRS	Proton magnetic resonance spectroscopy
ML	Mobile lipids
MRI	magnetic resonance imaging
MTX	Matrix size
MSME	multi-slice multi-echo
NEX	Number of averages
OCT	Tissue freezing medium
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PRESS	Point resolved spectroscopy
RARE	Rapid acquisition by relaxation enhancement
<i>sc</i>	Subcutaneous
SNR	Signal to noise ratio
SPF	Specific pathogen free
TAT	Total acquisition time
TE	Echo time
TR	Repetition time
VAPOR	Variable pulse power and optimized relaxation delays
$\Delta v_{1/2}$	MRS peak width at half height
Δ	Big delta
δ	Small delta

Introduction

Breast cancer is the leading cause of death in women between the ages of 35 and 55 [1]. At this age range, breast cancers are also very prone to metastasize to lymph nodes, bone, liver, lungs and brain [2,3]. About 30–40% of patients with disseminated breast carcinoma develop metastasis in the CNS, 15% of which with a median survival of 1 year [4] despite the standard treatment. In fact, the metastasis of breast cancer to either the brain parenchyma or the leptomeninges is generally a late feature of metastatic disease.

Metastasis is a complex multistep process [5] which can be studied both *in vitro*, using molecular biology techniques, and *in vivo*. As these pathologies cannot be studied longitudinally in humans, due to evident ethical reasons, *in vivo* follow-up studies require animal models that can accurately recapitulate the process observed in humans.

There is abundant information on animal models of primary breast cancer, e.g. based on the injection of tumor cells in the mammary fat pad [6]. However, models which mimic brain metastasis are needed to help understanding this pathogenesis and for use in experimental therapeutic approaches. In 1988, Schackert and Fidler described an animal model of brain metastasis based on the intracarotid (*ic*) injection of human cell lines in *nude* mice [7]. They used this model to

characterize melanoma brain metastasis and different types of carcinoma [8]. The same model has already been used in immunohistochemical studies of different cell lines [9] and also to study *in vivo* melanoma brain metastasis by magnetic resonance imaging (MRI) [10]. More recently, MRI has been used with another mouse model of human brain metastasis [11] to track single metastatic cells in the brain [12].

The MRI and MR spectroscopy (MRS) are two powerful non-invasive techniques that are normally available at any medical center equipped with a clinical MR scanner. MRI provides structural characterization of brain tissue, e.g. by T2 weighted and CE-T1 images. It can also be used to measure parameters of biophysical interest (to calculate ADC values, measure CBF and CBV, etc.). In contrast, MRS can provide biochemical information, i.e. the metabolomic profile in specific regions of the brain (volumes of interest, VOI) [13–15]. Although both techniques are complementary, normally only MRI is used in hospitals as a routine tool for brain tumor diagnosis and prognosis. Therefore, it appears that the clinical MRS performance needs to be improved. To achieve this, normalized acquisition and post-processing protocols should be established. In addition, robust decision support systems (DSS), which can help in the pattern classification of spectra [16], should be developed and implemented.

The main objective of this study was to optimize a longitudinal MRI/MRS method for analyzing pathogenic aspects of brain metastasis growth. This method could be used to monitor metabolic changes during metastasis development and therapy response. Accordingly, we have characterized *in vivo* the morphologic and metabolic development pattern of brain metastases induced in *nude* mice by *ic* injection of 435-Br1 human mammary carcinoma cells, a brain metastasis variant of the MDA-MB-435 parental cell line (435p in short) [17]. For this, we used different MRI approaches (T2 and CE-T1 weighted images and diffusion imaging) and ¹H MRS (at both short and long echo times, TE). MRI data was then compared with the post-mortem histological analysis of the dissected brains. MRS data was used in a preliminary and tentative pattern classification attempt of the different progression stages observed, using a DSS developed for human brain tumors.

Materials and methods

Cells and animals

Both 435-Br1 human mammary carcinoma cells, originally established from a brain metastasis in a *nude* mouse orthotopically inoculated with the parental cell line (435p), and 435p/GFP cells, from a parental cell line transfected with the pCEP4 expression vector containing the GFP (Invitrogen, San Diego, CA, USA) [18], were used in this work.

These were maintained under standard conditions in 1:1 (v/v) mixture of DMEM and Ham F12 medium, DMEM/F12 (Life Technologies, Inc. Gibco BRL, Gaithersburg, MD), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1 mM pyruvate, and 2 mM L-glutamine in a 5% CO₂ environment at 37°C using a humidified incubator [17]. For *BALB/c nude* mice inoculation, 435-Br1 cells in exponential growth phase were first treated with Trypsine-EDTA (Life Technologies) for 1 min at room temperature. They were then washed twice in HBSS and counted using a Neubauer chamber. Viability was always between 90 and 97%, as measured by Trypan-Blue exclusion. 435-Br1 cells were then resuspended in HBSS to obtain a final concentration of 1×10^6 cells /100 μ l (aliquot used for inoculation).

Thirteen female 22–24 g athymic *BALB/c nude* mice (Charles-River, France) were used in this study of brain metastasis induction. Animals were housed at the IDIBELL animal facility in SFP conditions, at 20–24°C cage temperature, 60% relative humidity, 12–12 h light–dark periods, and were allowed free access to UV irradiated water and an adequate sterile diet. Control experiments were performed with two female 30–40 g *CD1* mice (Charles-River), as described in next section.

Induction of brain metastasis

Brain metastases were generated by inoculation of 1×10^6 435-Br1 cells (resuspended in 100 μ l HBSS) into the internal carotid artery of thirteen mice, using a slight modification of a previously described method [7]. Briefly, mice were anesthetized intraperitoneally (ip) with ketamine/xylazine (100/10 mg/kg) and placed supine under a dissecting microscope. After the right carotid artery was exposed, the common carotid was permanently clamped with 5.0 suture silk proximal to the injection point. Both the external carotid and the occipital branch were temporarily clamped with 7.0 silk suture. A 34G Hamilton needle (Bonaduz, Switzerland) was then used to deliver 1×10^6 cells into the internal carotid lumen. At approximately 20 s post-injection, the suture clamping both the external carotid artery and the occipital branch was removed. This procedure took about 1 h per animal and was performed in sterile conditions (laminar flux cabin) near a dry heat source to prevent body temperature of the animal from dropping during anesthesia. Following surgery, animals received 20 ml/kg subcutaneous (*sc*) isotonic glucosaline solution (0.9% NaCl, 5% glucose) to avoid dehydration and 0.2 mg/kg of buprenorphine (analgesia), both administered for the following 2 days. When mice presented visible signs of cachexia, due to metastasis growth, or other physical evidence of pain and suffering, they were sacrificed by injection of pentobarbital, 200 mg/kg, 60 mg/ml. This procedure was approved by the IDIBELL, UAB and IIB Animal Healthcare Committees.

To optimize surgical conditions, we used two *CD1* mice inoculated with 1×10^6 in 50 μ l 435p/GFP cells injected into the right internal carotid artery. In order to monitor the location of the injected cells in the central nervous system [19] at different time points, one animal was sacrificed at 5 min post-inoculation while the other one was sacrificed right after the inoculation, both with the CO₂-breathing method. The brains were then removed and fixed for histological analyses as explained in the “histological analysis” section.

In vivo set-up

In vivo MR studies were carried out on a high-field horizontal spectrometer (Bruker PharmaScan 7.0 Tesla, Ettlingen, Germany) equipped with actively shielded gradients (300 mT/m) and a 23 mm diameter birdcage resonator specially designed for mouse head studies. Anesthesia was performed using isoflurane at 1–2.5% in O₂, maintaining the respiratory frequency between 40 and 60 breaths/min, as monitored by BioTrigg equipment (Bruker). Animal body temperature was maintained using a heated water blanket. Tumors were studied by MRI/MRS as described in the next section.

MRI acquisition and post-processing

Animals were studied by T2, CE-T1 and diffusion weighted imaging (DWI). Single-voxel proton spectroscopy (¹H-MRS) was also used at two echo times (TE: 35 and 136 ms), as described in more detail in the next section. For this, the voxel was always positioned inside the brain parenchyma and centered in or around the abnormal mass detected by MRI; in the case of longitudinal studies, voxel positions were reproduced as well as possible (visual confirmation). All MR studies were performed at the SIEMAC (NMR facility of the *Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”*, UAM-CSIC, Madrid, Spain), according to protocols approved by the local animal healthcare committee for animal handling in MR experiments.

Acquisition parameters for T2-W MRI were as follows: RARE sequence (turbo factor, 8); field of view (FOV), 20×20 mm; matrix (MTX), 256×256 (78×78 μ m/pixel); number of slices (NS), 14; slice thickness (ST), 1 mm; interslice distance (ISD), 1.1 mm; TR/TE, 2,500/60 ms; number of averages (NEX), 4; total acquisition time (TAT), 5 m 20 s. Acquisition parameters for CE-T1 MRI (Gd-DTPA bolus injection in the tail vein at 0.2 mmol/kg previous to MR acquisition): MSME sequence; FOV, 20×20 mm; MTX, 256×256 (78×78 μ m/pixel); NS, 14; ST, 1 mm; IST, 1.1 mm; TR/TE, 350/11.5 ms; NEX, 4; TAT, 5 m 41 s. The volume rendering of tumor masses detected in CE-T1 images was obtained by post-processing as follows: abnormal mass(es) were highlighted in each image of the T1 sequence using a manually defined region of interest (ROI) for each individual mass.

The given areas for each ROI were then added and multiplied by the inter-slice distance. This process was performed using Image-J software [20]. Acquisition parameters for DWI were as follows: Stejskal-Tanner sequence, one gradient for diffusion (read); 3 b values (100, 400, 800 s/mm²); Δ/δ , 8.52/5.00 ms; FOV, 20×20 mm; MTX, 128×128 (156×156 μ m/pixel); NS, 6; slice thickness, 1 mm; IST, 1.1 mm; TR/TE, 3,000/20 ms; NEX, 1; TAT, 19 m15 s. The images obtained were then processed to generate ADC maps with interactive data language (IDL) home written software [21].

MRS acquisition and post-processing

¹H-MRS acquisition parameters were as follows: PRESS sequence with VAPOR for water suppression; voxel volume, 3×3×3 mm (27 μ l); TR/TE, 3,000/35 or 136 ms (short and long TE, respectively); number of scans (NS), 128; TAT, 6 m5 s; receiver gain (RG), constant value (40,000). Spectra were then processed using MestReC software [22]: zero filling of 4,096 to 8,192 points, 1, 3 or 7 Hz line broadening (for $\Delta\nu_{1/2}$ measurement of non-suppressed water peaks and metabolite peaks in water-suppressed spectra and displayed spectra, respectively) and zero order phase correction. For the spectral analysis, absolute intensity values were depicted for the peaks of interest. A prototype version of a DSS developed for pattern recognition of human brain tumor spectra, SV INTERPRET v1.2 [23,24], was used to tentatively follow the pattern evolution of spectra acquired at short and long TEs in a longitudinal study of metastasis progression. To attain this, the ASCII format of each spectrum (obtained with MestRe-C) was normalized to unit length using the following formula (strategy already applied to human brain tumor data analyzed for the DSS development [16]):

$$I_{\text{norm } i} = \frac{I_{\text{real } i}}{\sqrt{\sum_{\text{ppm}=-2.7}^{7.1} I_{\text{real } i}^2}} \quad (1)$$

I_{norm} and I_{real} refer to the intensities at each data point in the normalized spectra and in the real part of the acquired spectra, respectively. Subsequently, the normalized ASCII file was fed into the DSS and evaluated as described in [24].

Histological analysis

Mice brains were fixed after sacrifice in 4% paraformaldehyde for 24 h, followed by 30% sucrose for another 24 h. The tissue was then OCT-embedded (tissue freezing medium, Sakura Tissue-Tek[®]) before being frozen in dry ice. Samples, which were kept at -80°C , were cut into 5 μ m coronal sections for evaluation (cryostat at -27°C). In immunofluorescence control studies (*CDI* mice), sections were directly analyzed on a fluorescence microscope (Olympus IX70) with two filters: one for visible light (morphological analysis) and

one for fluorescence (GFP-labeled tumor cell detection). In MR longitudinal cases (*nude* mice), metastatic involvement was explored in each section after classic hematoxylin–eosin (H&E) staining.

The proliferation state of metastasis was assessed by immunohistochemistry (IHC) using specific PCNA (proliferating cell nuclear antigen) antibody sc-56 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), clone PC10 at 1:50 dilution (PBS–BSA 2% solution incubated overnight at 4°C). A biotinylated anti-mouse secondary antibody diluted in PBS–BSA 2% at 1/2,000 (Pierce, Perbio Science Ltd., Cheshire, UK) was incubated for 30 min at room temperature, following DAB (diaminobenzidine) staining and counterstaining with hematoxylin. IHC were visualized on an Olympus BX60 microscope (Olympus Optical Co., LTD, Japan) and digitalized with a camera and using the Spot 4.2 software (Diagnostic Instruments, Inc, Sterling Heights, MI, USA). For each sample, three fields containing 200 cells were counted for positive PCNA cells (results shown in results section as average percentage).

Results

Control fluorescence studies

Fluorescence histological analysis from two *CDI* mouse brains (previously inoculated with 435-Br1/GFP cells and sacrificed at 0 and 5 min post-injection), showed cells in the lumen of parenchymatous microvessels in both cases, revealing that they had reached the brain parenchyma microvessels, as expected (Fig. 1a).

MRI and histological analysis

Approximately 2 weeks after injection of 435/Br-1 cells in *nude* mice, animals recovered their original weight and MR monitoring was started. Longitudinal MRI/MRS studies were performed in mice up to 32–92 days post-injection of cells, days_PI (except for the case of *Nude* 2, studied for 265 days). The number of explorations carried out ranged between 1 and 6, depending on the availability of spectrometer time and overall survival of the animals investigated. T2 and CE-T1 weighted images were used to detect metastasis and localize them in the brain parenchyma. Metastases were first detected between 20 and 62 days post-injection in different brain regions for each afflicted animal (*Nude* 1, 5, 6, 7, 9, 11, 13: hypothalamus; *Nude* 3: cerebellum-right hemisphere region; *Nude* 8: cortex, hippocampus, ventricle, frontal lobe and hypothalamus). This is summarized in Table 1.

In some animals, tumor masses were found in other regions of the body besides the brain. These included the right jaw (7 animals, 6 also with a brain tumor detected) and soft tissue in the neck (1 animal: *Nude* 10). Tumors detected in

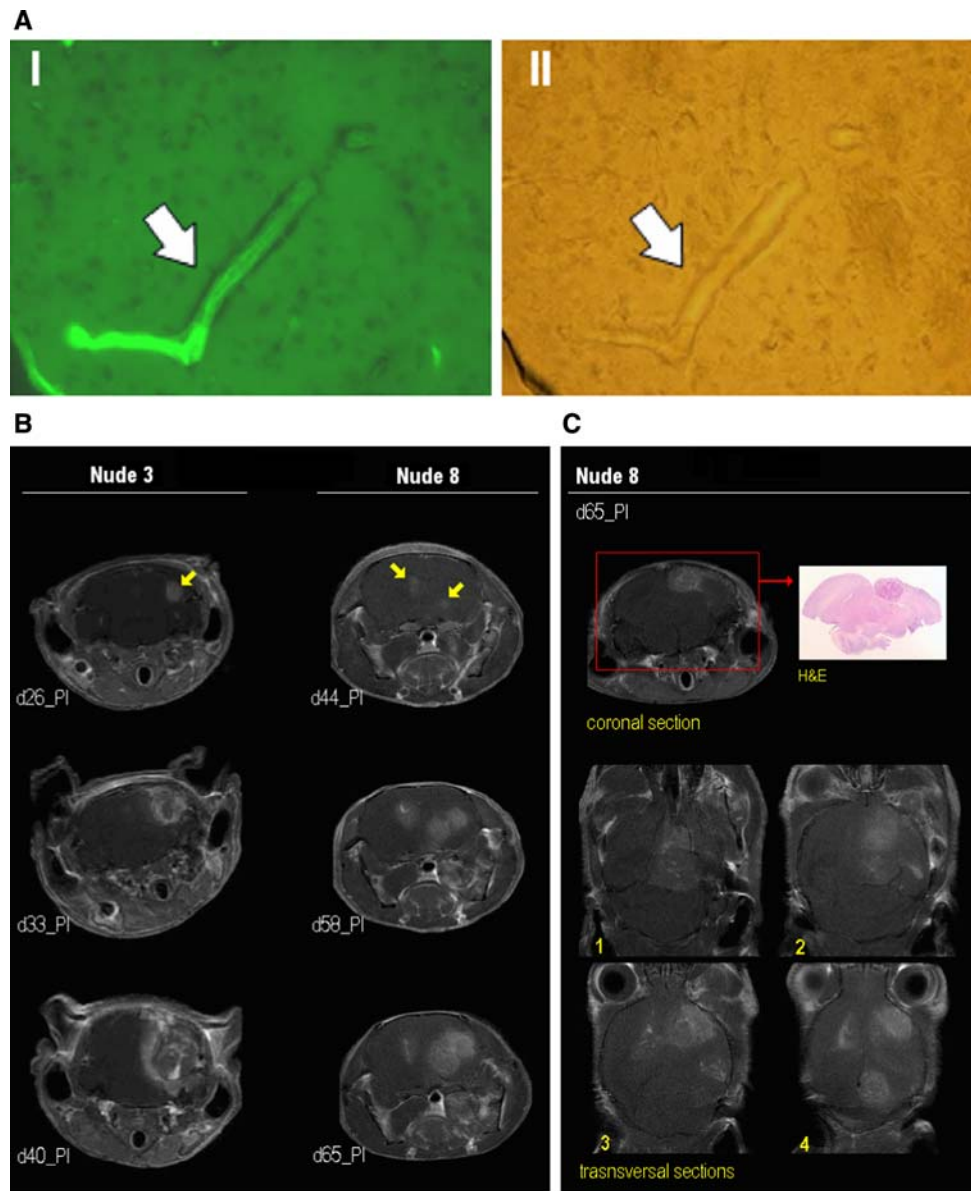


Fig. 1 **a** Histological analysis of *CD1* mouse brain: animal sacrificed 5 min post-*i.c.* inoculation of 435-Br1 human breast cancer cells transfected with GFP (435-Br1/GFP). Injected tumor cells reached the cerebral parenchyma microvessels (*white arrow*): (I) fluorescent signal from cells (bright green over a darker background); (II) capillary morphology in brain parenchyma, same slice as in “I” but using visible light. Images: 20 μm thickness/40 \times enlargement. **b** Longitudinal studies of tumor progression using CE-T1. Metastases are seen in coronal sections as bright spots inside the brain parenchyma. *Nude 3*: images obtained at days 26, 33 and 40 post-injection (*d_PI*) from top to bottom; metastasis

first detected at *d26_PI* as a single mass (highlighted by *yellow arrow*). *Nude 8*: coronal sections obtained at days 44, 58 and 65 *PI*; metastasis first detected at *d44_PI* as multiple masses that infiltrate through the brain parenchyma (two highlighted by a *yellow arrow*). **c** post-mortem histology studies. *Nude 8* at *d65_PI*. *Top*: CE-T1 MRI coronal section (*left*) obtained in vivo from the position highlighted below and post-mortem hematoxylin–eosin (H&E) staining of a 5 μm slice from that region (*insert at right*, 10 \times magnification). *Bottom*: four transversal sections (1–4, anterior to posterior) obtained by CE-T1 MRI

the jaw (28–38 days *PI*), normally evolved rapidly, causing feeding problems in the afflicted animals. This eventually led to ending the MR studies before brain tumor masses could be further monitored (in 5 cases: *Nudes* 3, 7, 8, 9, 11) or even detected (*Nude* 12). Furthermore, we cannot discard effects of repeated and long-term anesthesia contributing to death in 6 of the 13 cases studied (*Nudes* 1, 2, 4, 5, 6 and 13).

Figure 1b shows two examples of longitudinal studies at different days post-injection of metastatic cells. The growth of brain metastases is well observed in both cases, either as one localized mass whose size increased with time (*Nude* 3), or as multiple masses that spread over the brain parenchyma (*Nude* 8). Post-mortem histological analyses in transversal and coronal slices were carried

Table 1 Summary of first detection of in vivo brain and jaw metastases for each *BALB/c nude* mouse at different days post-injection of 435-Br1 cells (d_PI)

Mouse (<i>Nude</i>)	MR monitoring				Death (d_PI)	Histology		
	(#)	(Metastasis, d_PI)				(Metastasis, Yes/No)		
		Hyp	Jaw	uBP		Brain	Lung	Liver
1	5	35	28	–	54b			
2	4	–	–	–	265b	Yes	No	No
3	3	26	–	26	42	Yes	No	No
4	3	–	–	–	45a	No	Yes	No
5	1	20	–	–	32b			
6	8	62	–	62	92	Yes	No	No
7	4	46	30	46	51	Yes	Yes	No
8	6	30	37	37	61	Yes	Yes	No
9	3	48	31	48	52	Yes	No	No
10	2	–	–	–	48	Yes	Yes	No
11	1	38	38	–	50	Yes	Yes	No
12	3	–	34	–	45	No	Yes	No
13	1	27	27	–	36a			

“#”, number of MR explorations per animal; *uBP*, upper brain parenchyma; *Hyp*, hypothalamus; “–”, metastasis no detected. With respect to death (time shown as d_PI), animals were sacrificed because of symptoms or, in some cases, died during the MR exploration (a) or while recovering from anesthesia (b). Metastases presence in the brain, lung and liver, as detected by post-mortem histological analysis, is also summarized for the cases studied (“empty cells”, sample not available)

in most cases to confirm the extension of the disease (Fig. 1c).

CE-T1 images were further used for volume rendering of metastasis at each progression stage (Fig. 2a). This enabled us to determine growth kinetics curves for each afflicted animal. Each time series was adjusted to a polynomial function (linear when only two points were available). When taken together, this allowed us to generate an average growth curve, as shown in Fig. 2b. Thus, 69% of the animals (9/13 mice) developed MR-detectable abnormal masses in the brain parenchyma within a 20–62 days time window PI. These masses were either single (7 animals) or multiple (2 animals).

Diffusion weighted images (DWI) were also acquired. Only one diffusion axis gradient was used (G_{read}), assuming for the calculations an isotropic diffusion in metastatic regions. The DWI were used to generate apparent diffusion coefficient (ADC) maps in different coronal slices from neck to snap (Fig. 3). Metastatic regions in the brain parenchyma (color coded in green) had higher ADC values than non-afflicted tissues (blue color): 0.88 ± 0.07 vs. $0.54 \pm 0.05 \times 10^3 \text{ mm}^2/\text{s}$, respectively, for the example cases shown. Furthermore, ADC maps perfectly differentiated edema and/or CSF areas (bright regions shown in T2 brain images and color coded in green–yellow–red in ADC maps) from metastases.

Correlation of in vivo MRI analysis with post-mortem histology results of sequential coronal tumor sections was performed for the fixed brains of 10 of the 13 cases studied

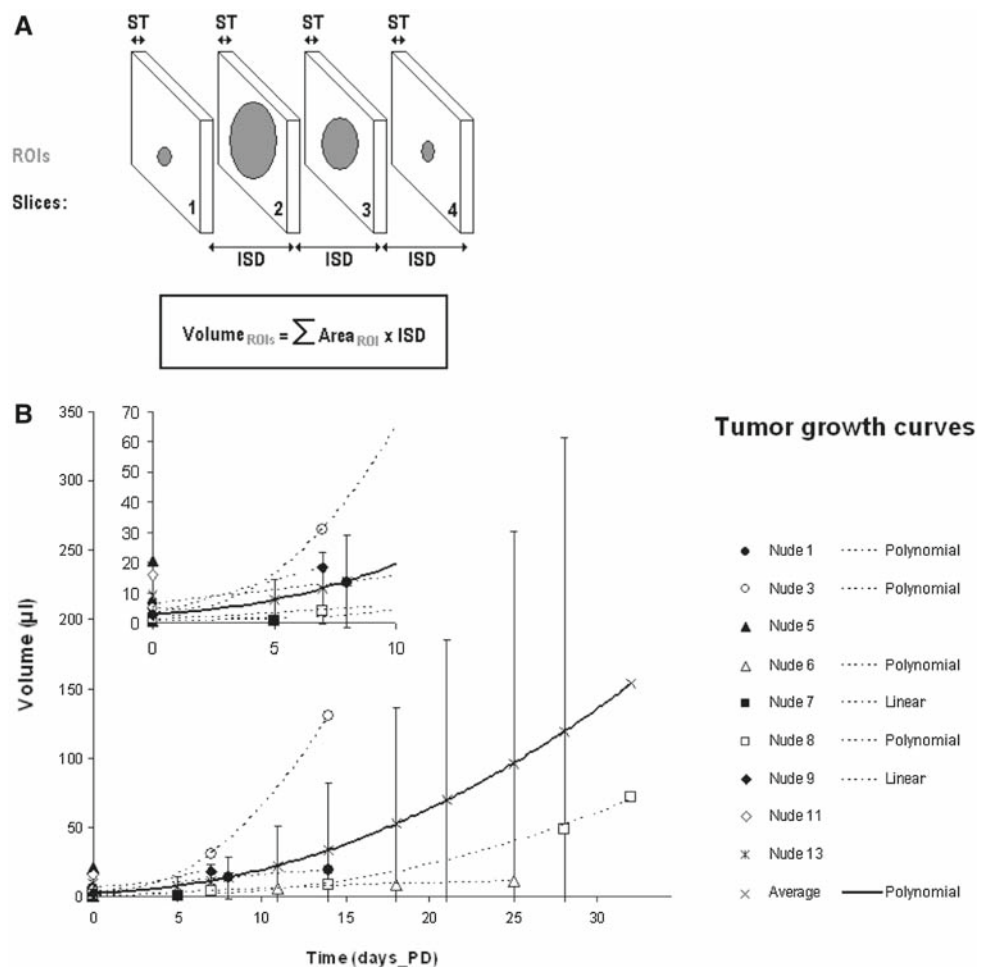
(3 samples could not be used for histological analysis purposes). These included 6 of the 9 MRI-detected metastases cases (Fig. 4), which presence was confirmed in all cases. Occurrence of metastases was also confirmed in 2 of the 4 non MRI-detected metastases cases. Altogether, in vivo and post-mortem data indicates occurrence of metastases in 11 of 13 animals studied (85% incidence). Histology results also indicate lung metastasis presence in 6 cases (4 with brain metastasis), not (yet) affecting the lobules in any of the studied cases, while no liver metastases were detected in any case. The jaw masses seen in vivo were confirmed (for one case) as metastases.

Additional PCNA analysis in 20 μm slides showed some heterogeneity in the proliferation pattern of these metastases, particularly when comparing masses seen in hypothalamus (*Hyp*) with those detected in the upper brain parenchyma (*uBP*)—*Nude* 3 (Fig. 4a): 82% of PCNA positive cells (*Hyp*); *Nude* 8 (Fig. 4b): 40% (*uBP*), 29% (*uBP*) and 15% (*Hyp*); *Nude* 9 (Fig. 4c): 79% (*uBP*) and 65% (*Hyp*).

MRS

The MRS was conducted in a total of 10 animals, 8 of which harboring brain metastases. This was performed by single voxel ^1H -MRS, at short and long TE (35 and 136 ms, respectively). Due to field homogeneity problems and/or difficulties in fitting the metastasis region(s) inside the voxel (e.g., masses in hypothalamus), the metabolic pattern of these

Fig. 2 a Protocol used for volume rendering of abnormal masses found inside the brain parenchyma. **b** Metastasis growth patterns (volume in μl) inside the brain parenchyma at different days post-detection (PD) for nine animals (fitting curves shown as *dotted lines*): three animals with single point MR monitoring (no fitting) — *Nude 5*, *Nude 11* and *Nude 13*; two cases with 2-point MR monitoring (linear fitting)—*Nude 7* and *Nude 9* (shown with more detail on the enlarged region displayed as an insert in the upper part of the plot); four cases with more than 2 points (squared polynomial fitting, $r^2 = 0.99 - 1$)—*Nude 1*, *Nude 3*, *Nude 6* and *Nude 8*. The average growth curve for the monitored masses was calculated from all the fitting curves and was also fitted to a squared polynomial function (*solid line* error bars, $\pm\text{SD}$) to calculate the average tumor duplication time (4–5 days after first detection), $r^2 = 1$



lesions was analyzed in detail in only two cases. As shown in Figs. 5 and 6, good quality spectra were obtained (*Nudes 7* and *8*—SNR for the tallest resonance in the spectral range of 4.5–0.0 ppm: 36–70), with $\Delta\nu_{1/2}$ generally around 18–20 Hz for both the non-suppressed water (LB = 1 Hz) and metabolite peaks (creatine was used as a reference, LB = 3 Hz).

As shown in Fig. 5a, where the apparent tumor volume for *Nude 7* was only 0.74% and 2.2% of the total voxel volume used (27 μl) at days 46 and 51 post-injection of cells, respectively, there was some decrease in NAA while Cho and Cr levels did not seem to be affected: Fig. 5b, c (a small increase in Cho and Cr was observed, although we cannot rule out here an effect of voxel repositioning in those minor changes). In the 5-week longitudinal study shown in Fig. 6, the spectral changes clearly indicate that, as the tumor volume sampled by the voxel increases, there is a decrease in both *N*-acetyl aspartate (NAA) and creatine (Cr) peak heights and an increase in choline containing compounds (Cho) and mobile lipids (ML) both seen at short TE, as well as lactate (Lac) detection at long TE.

To complement these qualitative analyses, an evolving DSS (SV INTERPRET GUI v1.2) [23,24] was used to

tentatively follow the evolution of the spectral pattern detected in our animal model at both long and short TE, as shown in Fig. 6. The normalized spectra of the metastatic human cells growing in *nude* mice detectable at 7.0 T seem compatible with the human brain tumor patterns obtained at 1.5 T, represented in this DSS. In addition, the evolving pattern of the sampled voxels was concordant with the replacement of normal brain parenchyma (lower right corner of the GUI display) by aggressive tumor cells (upper right corner of the GUI).

Discussion

Preliminary characterization of brain metastasis growth

Control fluorescence studies, carried out in the initial experiments with *CD1* mice, confirmed from the initial experiments that the inoculation technique was being performed properly. In our experimental model, brain metastasis progressed in 69% of the cases (9 of 13 animals studied) within a 20 to 62-day time window post-injection, as detected

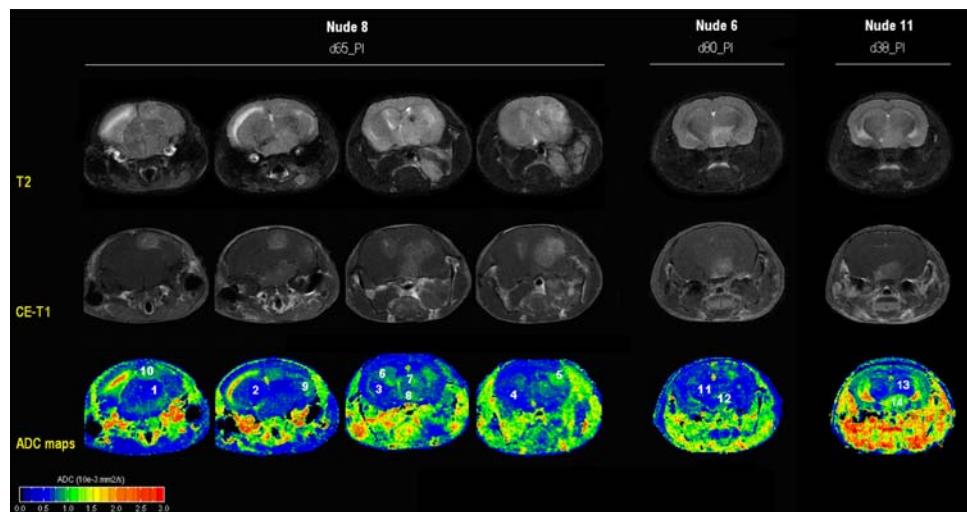


Fig. 3 T2-W, CE-T1 and ADC maps for the same slices. In *Nude 8*, different coronal slices obtained from neck to snap (*left to right*). ADC maps perfectly differentiate edema and/or CSF areas (seen in T2-weighted images as brighter areas) from metastasis (regions 5–10, white numbers seen by CE-T1 also as brighter areas), as regions of ADC values higher than the normal brain parenchyma regions (1–4). One metastasis located in the hypothalamus of *Nude 6* and *Nude 11*

is shown in a coronal section both by CE-T1 and ADC maps (regions 12 and 14, respectively). ADC values measured ($10^{-3}\text{mm}^2/\text{s}$) were: 1, 0.54 ± 0.08 ; 2, 0.54 ± 0.08 ; 3, 0.58 ± 0.06 ; 4, 0.55 ± 0.07 ; 5, 1.02 ± 0.09 ; 6, 0.84 ± 0.06 ; 7, 0.9 ± 0.12 ; 8, 0.92 ± 0.07 ; 9, 0.88 ± 0.10 ; 10, 0.88 ± 0.11 ; 11, 0.56 ± 0.11 ; 12, 0.81 ± 0.09 ; 13, 0.45 ± 0.1 ; 14, 0.79 ± 0.12

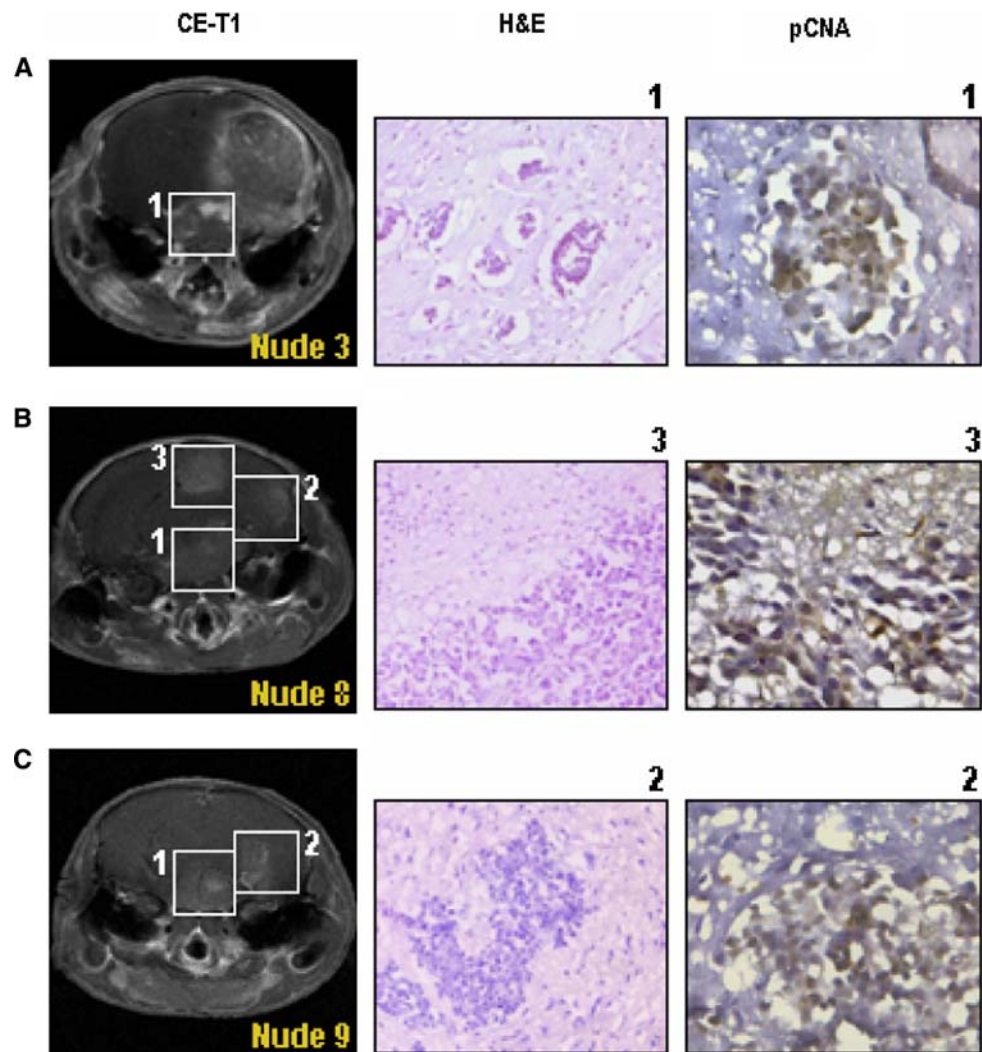
in vivo by MR and summarized in Table 1 and Fig. 2b. Metastasis had a heterogeneous distribution when first detected by MRI experiments. This may be correlated with the initial entry point of the cells in the brain parenchyma. Thus, there may be regions where metastatic cells are more prone to extravasate and invade through the blood brain barrier (BBB), although further experiments should be undertaken to test this assumption. Furthermore, the histological analysis of samples, apart from confirming the metastatic origin of the in vivo-detected brain masses, revealed that two additional animals had brain metastasis (Table 1: *Nude 2* and *Nude 10*). This indicates a total incidence of brain metastasis of 85% among the population studied (11/13). Therefore, brain micrometastases that were not compromising the BBB integrity at the time of imaging were not detected in vivo by CE-T1 MRI, as expected [10]. Accordingly, they could not be taken into account for MRI-derived volume measurements.

The hypothalamus region seems less prone to allowing metastatic cells to invade the nearby parenchyma, since metastasis growth in this region was slow in the different animals investigated (Fig. 2b, i.e., *Nude 6*). This may also be related to the presence of other metastases present in the body which could perhaps simulate the effect of a primary tumor that endogenously inhibits the growth of dormant (silent) brain metastatic cells, as proposed by others [30]. Assuming this possibility, the metastatic masses detected in the jaw of 7 animals (54%, confirmed by histology in one case),

6 of which with MR-detected brain metastasis, are potential sources of such effect. These type of lesions, well-documented in human breast cancer brain metastasis [25–27] and in animal models [28,29], should have originated in our case from some of the inoculated cells that reached the homolateral masticatory muscles through the palatine branch, which derives from the internal carotid artery just before the base of the skull. As the hypothalamus-detected metastases are in close proximity to the circle of Willis, and all its major arterial branches, they could perhaps be influenced by cytokines from nearby jaw tumors. Therefore, an endogenous inhibition effect of brain metastasis growth may explain why the incidence of brain metastases detected here was lower than that reported in previous work [8], although additional experiments would be required to confirm this assumption.

Despite the limitations in the MRI contrast method used, PCNA proliferation indexes (Fig. 4) correlated positively with the in vivo growth rates observed in the cases studied at the time of inspection (although in the case of *Nude 9* there are not enough time point inspections to assure that, Fig. 2b seems to suggest it). The PCNA expression profiles therefore suggest that the proliferation of hypothalamus masses in mice without jaw metastases (*Nude 3*, 82% proliferation index) was higher than in mice with jaw metastases (*Nude 8* and *Nude 9*, 15% and 65% proliferation index, respectively) and also that hypothalamus masses displayed higher proliferation arrest as compared to other cerebral metastases present

Fig. 4 Correlation between in vivo studies and the post-mortem analysis of selected tumor sections (from left to right): CE-T1, H&E staining (10 × magnification) and PCNA nuclear expression to measure the proliferative status of brain metastasis (40 × magnification). **a** *Nude 3*, CE-T1 image with the corresponding H&E section and 82% of PCNA positive cells. **b** *Nude 8*, CE-T1 image with three different regions analyzed: *section 1* and *2* with 15 and 29% of PCNA positive cells, respectively; *section 3* with 40% of positive cells and the corresponding H&E. **c** *Nude 9*, CE-T1 image with two different regions analyzed: *section 1* with 65% of PCNA positive cells, and *section 2* with 79% of PCNA positive cells and the corresponding H&E



(PCNA proliferation index: *Nude 8*, 29 and 40%; *Nude 9*, 79%). Nevertheless, a larger animal cohort would be needed to investigate this possibility.

According to diffusion imaging data (Fig. 3), metastases had higher ADC values than apparently non-afflicted tissues (0.89 ± 0.07 vs. $0.56 \pm 0.02 \times 10^3 \text{ mm}^2/\text{s}$, respectively). This would suggest that these are lesions with relatively low cellularity, which is in agreement with other literature on animal models of human tumors [31,32]. Histology studies confirmed this assumption by demonstrating lower cell packing in these masses than in surrounding brain parenchyma (Fig. 4a, H&E), which should allow water to diffuse more freely.

Regarding MRS monitoring, only cases with good field homogeneity and correct positioning of the voxel inside the lesion were further analyzed (i.e., brain metastases located away from the ear cavities or meninges, which affect shimming due to susceptibility artifacts). Among the 10 cases investigated by MRS, only 8 had brain metastases and just

2 fulfilled this requirement; the field homogeneity was not sufficient to produce good quality spectra in 3 cases, while in other 3 metastases were located in the hypothalamus region of the brain parenchyma, forcing us to sample only a small fraction of the lesion which was sufficiently away from to the ear cavities (voxels containing mostly non-afflicted brain parenchyma).

Even though large voxels were used (27 μl), relatively small tumoral masses detected by MRI (micrometastasis 0.2–0.6 μl), along with possibly associated peritumoral effects from the nearby brain parenchyma included in the voxel (i.e., edema [33] and vascular changes [10]), seemed to perturbate the MRS pattern (Fig. 5). In this case, a decrease of 21% in N-acetyl aspartate (NAA, marker of neuron viability) was the first MRS-based sign of early metastasis growth in the brain. As these lesions increased in size and infiltrated the brain parenchyma (Fig. 6), the spectral changes seen at both short and long TE clearly indicate a substitution of the healthy tissue pattern by a malignant tumor pattern (meta-

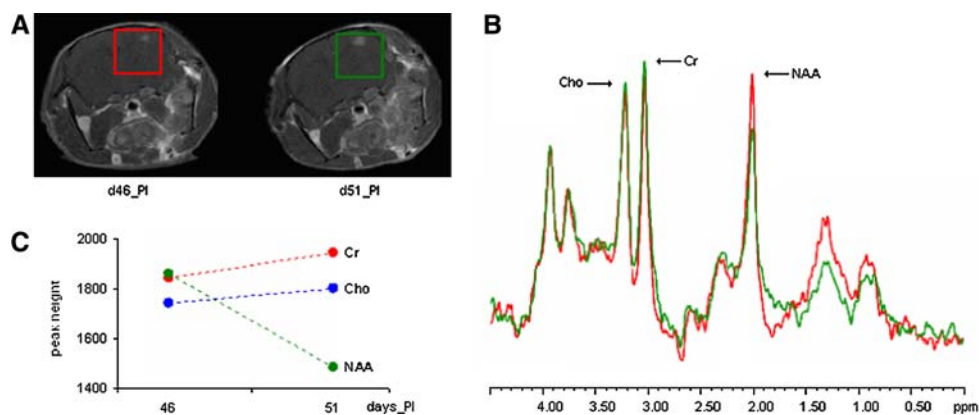


Fig. 5 Longitudinal MRS studies of *Nude 7*. **a** Voxel position at each day of study (d46_PI, red square, and d51_PI, green square) shown overlaid into CE-T1 coronal sections obtained at each day of inspection (volume rendering of the metastasis mass gave 0.2 and 0.6 μl , respec-

tively). **b** Short TE ¹H-MRS spectra acquired from the voxels shown in **a**. **c** Absolute intensity of selected peaks, arbitrary units (Cho, 3.21 ppm; Cr, 3.03 ppm; NAA, 2.03 ppm) at each day PI

static cells): choline-containing compounds (Cho, marker of cell proliferation) increased while creatine levels (Cr, total creatine, bioenergetics spatial-temporal buffer) decreased, as already described in single time point explorations of human patients [13]. In addition, mobile lipids (ML) were observed at short TE after a certain period of growth, while lactate (Lac, a well known marker of an activated glycolytic pathway in tumors [13]) was detected at long TE, in agreement with other studies of stereotactically induced murine glial tumors [34,35]. Comparing the behavior of the ML resonance at both short and long TE (present and absent, respectively, at 1.3 ppm) we could assume that these ML are mostly located in small lipid droplets (1–2 μm diameter), which accumulate inside viable tumor cells [36], and not in big lipid droplets generally found in necrotic regions [37]. Therefore, metastasis progression seems to occur in this case without major necrosis in the time frame followed by MR. In the last MRS analysis shown in Fig. 6, a decrease in Cho and ML at short TE was found. This may be related to a reduction in tumor growth rate due to increased tumor size and lack of adequate perfusion. However, tumoral signaling from the jaw mass present and/or other metastases in the body (like lung metastases, identified post-mortem in 6 of the cases studied) could also play a role, according to the “endogenous inhibition hypothesis” previously referred.

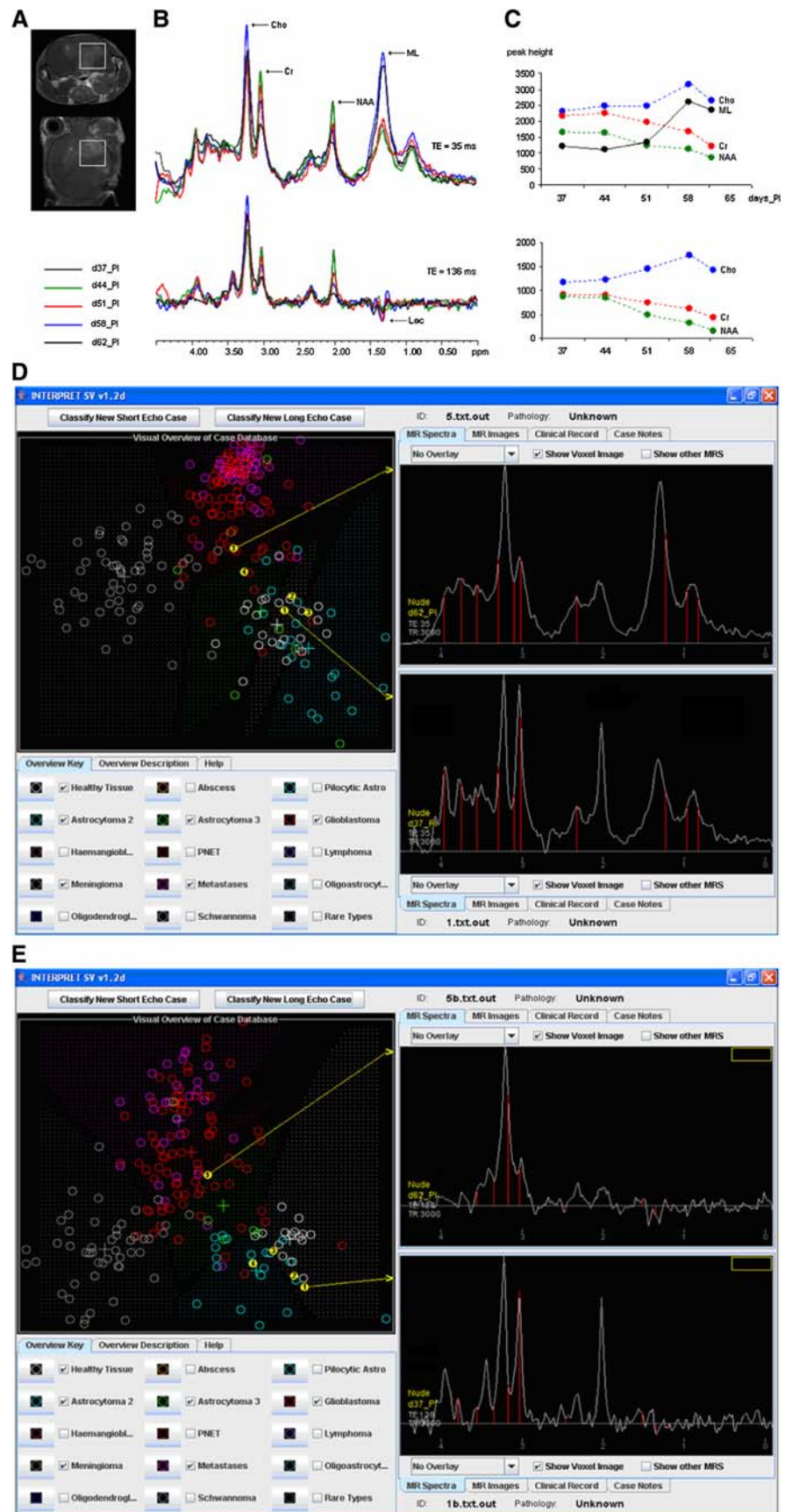
An alternative to the qualitative MRS analysis just described (observing the spectral changes of selected peaks) is to use the complete spectral pattern for classification in tumor types or grades. To this end, the use of a decision support system (DSS) for pattern recognition analysis is required. Here we show that a DSS developed for human brain tumor spectra, obtained with clinical spectrometers (1.5T) [24] seems to produce compatible results when used to analyze spectra obtained in our animal model at both short and long TE (Fig. 6). Even though this classifier is not optimized for our

tumor model, it is still able to track the expected change in the sampled spectral pattern from mostly normal brain parenchyma to mostly aggressive tumor. Furthermore, in the last progression stage detected by MRS (day 65 post-injection) the DSS was able to differentiate well the metastasis pattern (human cells growing in *nude* mice) from non glial tumors, such as meningiomas or low grade glial tumors, positioning the spectra in the glioblastoma–metastasis region, as expected.

Additional remarks and future perspectives

The MDA-MB-435 human breast cancer cell lines have served as the mainstay of brain metastasis work. They have been used to produce brain metastases in experimental assays via infusion into either the carotid artery or the left cardiac ventricle [6,11]. The tissue of origin has been a matter of debate since analysis of DNA microarray data indicated that MDA-MB-435 might be of melanocytic origin, due to their similarity to melanoma cell lines [38]. However, our results provide information about the pathogenesis of brain metastasis regardless of the primary tumor location. Another model described for generating brain metastases in *nude* mice is based on intracardiac injection of the cells. This model has been used to report the occurrence of different metastatic cell populations in the brain [12]. In this case, at day 28 post-injection of MDA-MB-431 mammary carcinoma cells, only 1.5% of the initially detected cells (day 0) were proliferating, while 4.5% remained as solitary non-proliferating cells. Something similar could also have happened in our work, where we were limited to conventional T2 and Gd-DTPA CE-T1 MRI methods for detecting areas of compromised BBB, thus missing single cell detection [12] or small cellular tumor masses that had not yet compromised the BBB [10]. As for MRS, spectroscopy techniques with higher resolution should

Fig. 6 Longitudinal MRS studies of *Nude* 8. **a** Voxel position (white squares) shown in both coronal and transversal sections of CE-T1 images obtained at d62_PI. **b** ^1H -MRS spectra at both short and long TE (top and bottom, respectively), acquired from the voxel shown in **a** at different days PI (37, 44, 51, 58 and 62, color legend at the left of the long TE spectra). **c** Absolute intensity of selected peaks, arbitrary units (Cho, 3.21 ppm; Cr, 3.03 ppm; NAA, 2.03 ppm; ML, 1.30 ppm, for short TE) at each day PI. Lac is also visible in long TE spectra (1.32 ppm) at days 58 and 62 PI. **d, e** Pattern recognition-based visualization of normalized spectra. Normalized MRS spectra of *Nude* 8 were entered into the *INTERPRET SV DSS v1.2* both for short (**a**) and long (**b**) TEs. Each spectrum is represented by two discriminant scores (x and y axis) calculated by a linear combination of weighted selected peak heights and visualized as a yellow dot on the interface (top-left). On the right, spectra corresponding to days 37 and 62 PI are shown (bottom and top, respectively). Six classification groups are shown on the interface section (left): healthy tissue, white; meningioma, grey; astrocytoma II, blue; astrocytoma III, green; glioblastoma multiforme, red; metastases, pink. The DSS screen suggests a different pattern for the metastasis (human cells growing in *nude* mice) from non-gliar tumors, such as meningiomas, and places the consecutive spectra in a clear progression towards malignancy. Initially, the spectra resemble human cases of healthy tissue, d51_PI. This is then replaced by low grade glial and finally evolves towards an aggressive pattern (Glioblastoma/Metastasis), d62_PI



be used. This involves increasing voxel resolution by switching from single-voxel to multi-voxel spectroscopy (chemical shift imaging), as recently described [39].

Conclusions

The metastasis induction protocol used has demonstrated that MRI and MRS can be used to follow brain metastasis growth kinetics, as confirmed by histological analysis. The qualitative agreement between the PCNA-based proliferation rate and MRI-measured growth kinetics, along with the preliminary pattern recognition analysis of a longitudinal MRS series, opens the way for metastasis growth classification into distinct progression stages and ultimate correlation with human brain metastasis diagnosis and therapy response. In this regard, it is worth considering the potential of the repeated intra-cardiac injection method [11] for further studies. In addition, more sensitive contrast methods should be used for in vivo MRI (intracellular or extracellular iron oxide particles, for single cell detection [12] or as a blood pool agent [10], respectively). Furthermore, localized multi-voxel spectroscopy (chemical shift imaging), already described for the mouse brain [39], should improve the MRS study of this model.

Acknowledgments The authors would like to acknowledge Dr. M.L. García-Martín for her support in MRS acquisition work and IDL processing, and Rebeca Sanz for her technical support. This study was funded by the Spanish *Ministerio de Ciencia y Tecnología* (SAF 2002-0440 and SAF 2005-03650), the Portuguese *Fundação para a Ciência e a Tecnologia* (SFRH/BD/17643/2004), the Spanish *Ministerio de Salud y Consumo-Instituto de Salud Carlos III* (FIS/PI041937), *EC MetaBre* (LSHC-CT-2004-506049), and CIBER-BBN (an initiative of Instituto de Salud Carlos III).

References

1. International Agency for Research on Cancer (WHO). <http://www.iarc.fr/>. Accessed: 16 Oct, 2007
2. Weil RJ, Palmieri DC, Bronder JL, Stark AM, Steeg PS (2005) Breast cancer metastasis to the central nervous system. *Am J Pathol* 167:913–920
3. Sierra A (2005) Metastases and their microenvironments: linking pathogenesis and therapy. *Drug Resist Updat* 8:247–257
4. Carey LA, Ewend MG, Metzger R, Sawyer L, Dees EC, Sartor CI, Moore DT, Graham ML (2004) Central nervous system metastases in women after multimodality therapy for high risk breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 88:273–280
5. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC (2002) Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2:563–572
6. Zhang RD, Fidler IJ, Price JE (1991) Relative malignant potential of human breast cancer carcinoma cell lines established from pleural effusions and a brain metastasis. *Invas Metast* 11:204–215
7. Schackert G, Fidler IJ (1988) Development of in vivo models for studies of brain metastasis. *Int J Cancer*. 41:589–594
8. Schackert G, Price JE, Bucana CD, Fidler IJ (1989) Unique patterns of brain metastasis produced by different human carcinomas in athymic nude mice. *Int J Cancer* 44:892–897
9. Dome B, Timar J, Paku S (2003) A novel concept of glomeruloid body formation in experimental cerebral metastases. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:655–661
10. Leenders W, Kusters B, Pikkemaat J, Wesseling P, Ruiter D, Heerschap A, Barentsz J, de Waal RM (2003) Vascular endothelial growth factor-A determines detectability of experimental melanoma brain metastasis in GD-DTPA-enhanced MRI. *Int J Cancer* 105:437–443
11. Yoneda T, Williams PJ, Hiraga T, Niewolna M, Nishimura R (2001) A bone-seeking clone exhibits different biological properties from the MDA-MB-231 parental human breast cancer cells and a brain-seeking clone in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res* 16:1486–1495
12. Heyn C, Ronald JA, Ramadan SS, Snir JA, Barry AM, MacKenzie LT, Mikulis DJ, Palmieri D, Bronder JL, Steeg PS, Yoneda T, MacDonald IC, Chambers AF, Rutt BK, Foster PJ (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
13. Howe FA, Opstad KS (2003) ^1H MR spectroscopy of brain tumors and masses. *NMR Biomed* 16:123–131
14. Griffin JL, Kauppinen RA (2007) A metabolomics perspective of human brain tumours. *FEBS J* 274:1132–1139
15. Griffin JL, Kauppinen RA (2007) Tumour metabolomics in animal models of human cancer. *J Proteome Res* 6:498–505
16. Tate AR, Griffiths JR, Martinez-Perez I, Moreno A, Barba I, Cabañas ME, Watson D, Alonso J, Bartumeus F, Isamat F, Ferrer I, Vila F, Ferrer E, Capdevila A, Arús C (1998) Towards a method for automated classification of ^1H MRS spectra from brain tumors. *NMR Biomed* 11:177–191
17. Sierra A, Price JE, García-Ramirez M, Mendez O, Lopez L, Fabra A (1997) Astrocyte-derived cytokines contribute to the metastatic brain specificity of breast cancer cells. *Lab Invest* 77:357–368
18. Paris S, Sesboue R (2004) Metastasis models: the green fluorescent revolution? *Carcinogenesis* 25:2285–2292
19. Schmidt CM, Settle SL, Keene JL, Westlin WF, Nickols GA, Griggs DW (1999) Characterization of spontaneous metastasis in an aggressive breast carcinoma model using flow cytometry. *Clin Expr Metastasis* 17:537–544
20. Al-Attar SA, Pollex RL, Robinson JF, Miskie BA, Walcarius R, Rutt BK, Hegele RA (2006) Semi-automated segmentation and quantification of adipose tissue in calf and thigh by MRI: a preliminary study in patients with monogenic metabolic syndrome. *BMC Med Imaging* 6:11–19
21. García-Martín ML, Martínez GV, Raghunand N, Sherry AD, Zhang S, Gillies RJ (2006) High resolution pH(e) imaging of rat glioma using pH-dependent relaxivity. *Magn Reson Med* 55:309–315
22. Navarro-Vazquez A, Cobas JC, Sardina FJ, Casanueva J, Diez E (2004) A graphical tool for the prediction of vicinal proton-proton 3J(HH) coupling constants. *J Chem Inf Comput Sci* 44:1680–1685
23. Interpret Project: <http://azizu.uab.es/INTERPRET/>. Accessed: 16 Oct 2007
24. Tate AR, Underwood J, Acosta DM, Julià-Sapé M, Majós C, Moreno-Torres A, Howe FA, van der Graaf M, Lefournier V, Murphy MM, Loosemore A, Ladroue C, Wesseling P, Luc Bosson J, Cabañas ME, Simonetti AW, Gajewicz W, Calvar J, Capdevila A, Wilkins PR, Bell BA, Rémy C, Heerschap A, Watson D, Griffiths JR, Arús C (2006) Development of a decision support system for diagnosis and grading of brain tumours using in vivo magnetic resonance single voxel spectra. *NMR Biomed* 19:411–434

25. Pilheu FR, Fefer SA (1961) Mandibular metastasis secondary to a cancer of the breast. *Sem Med* 118:95–97
26. van der Waal RI, Buter J, van der Waal I (2003) Oral metastases: report of 24 cases. *Br J Oral Maxillofac Surg* 41:3–6
27. Guise TA, Kozlow WM, Heras-Herzig A, Padalecki SS, Yin JJ, Chirgwin JM (2005) Molecular mechanisms of breast cancer metastases to bone. *Clin Breast Cancer* 5:S46–53
28. Sasaki A, Yoneda T, Terakado N, Alcalde RE, Suzuki A, Matsumura T (1998) Experimental bone metastasis model of the oral and maxillofacial region. *Anticancer Res* 18:1579–1584
29. Bandyopadhyay A, Elkahloun A, Baysa SJ, Wang L, Sun LZ (2005) Development and gene expression profiling of a metastatic variant of the human breast cancer MDA-MB-435 cells. *Cancer Biol Ther* 4:168–174
30. Kirsch M, Schackert G, Black PM (2000) Angiogenesis, metastasis, and endogenous inhibition. *J Neurooncol* 50:173–180
31. Kauppinen RA (2002) Monitoring cytotoxic tumor treatment response by diffusion magnetic resonance imaging and proton spectroscopy. *NMR Biomed* 15:6–17
32. Sun Y, Mulkern RV, Schmidt K, Doshi S, Albert MS, Schmidt NO, Ziu M, Black P, Carrol R, Kieran MW (2004) Quantification of water diffusion and relaxation times of human U87 tumors in a mouse model. *NMR Biomed* 17:399–404
33. Lu S, Ahn D, Johnson G, Cha S (2003) Peritumoral diffusion tensor imaging of high-grade gliomas and metastatic brain tumors. *AJNR Am J Neuroradiol* 24:937–941
34. García-Martín ML, Herigault G, Rémy C, Farion R, Ballesteros P, Coles JA, Cerdán S, Ziegler A (2001) Mapping extracellular pH in rat brain gliomas in vivo by ¹H magnetic resonance spectroscopic imaging: comparison with maps of metabolites. *Cancer Res* 61:6524–6531
35. Rémy C, Arús C, Ziegler A, Lai ES, Moreno A, Le Fur Y, Decorps M (1994) In vivo, ex vivo, and in vitro one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy of an intracerebral glioma in rat brain: assignment of resonances. *J Neurochem* 62:166–179
36. Barba I, Cabañas ME, Arús C (1999) The relationship between nuclear magnetic resonance-visible lipids, lipid droplets, and cell proliferation in cultured C6 cells. *Cancer Res* 59:1861–1868
37. Rémy C, Fouilhe N, Barba I, Sam-Lai E, Lahrech H, Cucurella MG, Izquierdo M, Moreno A, Ziegler A, Massarelli R, Decorps M, Arús C (1997) Evidence that mobile lipids detected in rat brain glioma by ¹H nuclear magnetic resonance correspond to lipid droplets. *Cancer Res* 57:407–414
38. Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, Iyer V, Jeffrey SS, Van de Rijn M, Waltham M, Pergamenschikov A, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Myers TG, Weinstein JN, Botstein D, Brown PO (2000) Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet* 24:227–235
39. Diekman C, Simões RV, Pohman R, Cerdán S, Arús C (2006) Proton chemical shift imaging of mouse brain tumors at 7T. *Bruker SpinReport*. 2006; 157:18–21 http://www.bruker-biospin.com/spin_report.html

10.4.2. ARTÍCULO 2

Martínez-Aranda A, Hernández V, Picón C, Modolell I, Sierra A.

Development of a preclinical therapeutic model of human brain metastasis with chemoradiotherapy.

International Journal of Molecular Sciences. 2013; 14(4): 8306-8327.

doi: 10.3390/ijms14048306.

Factor Impacto (2013): 2.339

Área Conocimiento: Chemistry, Multidisciplinary

Rank: 52/148 // Quartil: Q2

(Referencia bibliográfica nº. 364)

Article

Development of a Preclinical Therapeutic Model of Human Brain Metastasis with Chemoradiotherapy

Antonio Martínez-Aranda ^{1,2}, Vanessa Hernández ¹, Cristina Picón ³, Ignasi Modolell ³ and Angels Sierra ^{1,*}

¹ Biological Clues of the Invasive and Metastatic Phenotype Group, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L' Hospitalet de Llobregat, Barcelona 08907, Spain;

E-Mails: amartinez@idibell.cat (A.M.-A.); vhernandez@idibell.cat (V.H.)

² Autònoma University of Barcelona (UAB), Faculty of Biosciences, Campus Bellaterra, Building C, Cerdanyola del Vallés, Barcelona 08193, Spain

³ Medical Physics Service, Oncology Catalan Institut, Duran I Reynals Hospital, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona 08907, Spain; E-Mails: cpicon@iconcologia.net (C.P.); imodolell@iconcologia.net (I.M.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: asierra@idibell.cat; Tel.: +34-93-260-7429, Fax: +34-93-260-7426.

Received: 30 November 2012; in revised form: 16 March 2013 / Accepted: 26 March 2013 /

Published: 16 April 2013

Abstract: Currently, survival of breast cancer patients with brain metastasis ranges from 2 to 16 months. In experimental brain metastasis studies, only 10% of lesions with the highest permeability exhibited cytotoxic responses to paclitaxel or doxorubicin. Therefore, radiation is the most frequently used treatment, and sensitizing agents, which synergize with radiation, can improve the efficacy of the therapy. In this study we used 435-Br1 cells containing the fluorescent protein (*eGFP*) gene and the photinus luciferase (*PLuc*) gene to develop a new brain metastatic cell model in mice through five *in vivo/in vitro* rounds. BR-eGFP-CMV/Luc-V5 brain metastatic cells induce parenchymal brain metastasis within 60.8 ± 13.8 days of intracarotid injection in all mice. We used this model to standardize a preclinical chemoradiotherapy protocol comprising three 5.5 Gy fractions delivered on consecutive days (overall dose of 16.5 Gy) which improved survival with regard to controls (60.29 ± 8.65 vs. 47.20 ± 11.14). Moreover, the combination of radiotherapy with temozolomide, 60 mg/Kg/day orally for five consecutive days doubled survival time of the mice 121.56 ± 52.53 days (Kaplan-Meier Curve, $p < 0.001$). This new preclinical

chemoradiotherapy protocol proved useful for the study of radiation response/resistance in brain metastasis, either alone or in combination with new sensitizing agents.

Keywords: brain metastasis; breast cancer; experimental models; radiation; temozolomide; therapy

1. Introduction

Although breast cancer metastasis to either the brain parenchyma or the leptomeninges is generally a late feature of the disease, metastasis to the central nervous system (CNS) is associated with a dismal prognosis [1] and causes significant morbidity and mortality in breast cancer patients [2]. Indeed, 30%–40% of patients with disseminated breast carcinoma develop metastasis in the CNS, with survival ranging from 2 to 16 months [3].

The high rate of CNS metastasis may be related to the greater survival in patients receiving chemotherapy and to the difficulty that current systemic treatments have in overcoming the blood brain barrier (BBB) [3–5]. The amplification of the ErbB2 receptor tyrosine kinase or triple negative tumors (negative estrogen and progesterone receptors and normal ErbB2 expression) increases the incidence of brain metastases, which may exceed 30% of patients [6,7].

The mechanistic process in the pathogenesis of brain metastasis is complex because cancer cells have to cross the blood brain barrier (BBB) located in the brain vascular endothelium [8]. The brain places different demands on the invading tumor cells, which are obliged to establish glial interactions in order to colonize it [9]. Many issues such as the mechanism of arrest and the role of cell extravasation, angiogenesis, and dormancy remain controversial [10]. The essential step takes place at the vascular branch point, where the persistent close contact between metastatic cells and microvessels induces perivascular growth via vessel cooption [11]. The extracellular matrix, pericytes and astrocyte foot processes mediate the impermeability of the BBB, which is increased by the high electrical resistance in brain capillaries hindering the entrance of polar and ionic substrates [12].

The BBB remains a significant impediment to the delivery and efficacy of standard chemotherapy for brain metastasis of breast cancer [13]. Experimental brain metastasis studies showed that most metastases exhibit increased BBB permeability, which is poorly correlated with lesion size, and that only 10% of lesions with the highest permeability exhibited cytotoxic responses to paclitaxel or doxorubicin [14]. This evidence reinforces the need for brain-permeable molecular therapeutics and radiation-sensitizing agents able to synergize with radiation therapy, thus improving the treatment of established brain metastases and minimizing the cognitive losses suffered by a proportion of patients after radiotherapy [15,16].

In this scenario, models mimicking brain metastasis are needed to examine the pathogenesis in more depth and to develop experimental therapeutic approaches able to improve our understanding of antimetastatic activity and toxicity of numerous experimental agents [17,18]. The major problem is that tumor foci occasionally grow in the brain and successive rounds of systemic injections are needed to increase the propensity of breast cancer cells to metastasize in brain [19]. Schackert and Fidler (1988) described an animal model of brain metastasis, based on intracarotid (CA) injection of human

cell lines in *nude mice* [20], which they used to characterize melanoma brain metastasis and various types of carcinoma [13]. In earlier work we modified this method, which progressed within a 20 to 62-day time window post-injection in 69% of cases, as detected by *in vivo* MR and further confirmed by the histological analysis of samples [21].

Mouse models of breast cancer and advanced metastatic disease are needed in order to be able to carry out preclinical therapeutic studies. Since radiation therapy is the most commonly used procedure for the treatment of brain metastasis, we used triple negative 435-Br1 cells containing the fluorescent protein (*eGFP*) gene and the photinus luciferase (*PLuc*) gene, in order to develop a new brain metastatic cell variant which induced parenchymal brain metastasis within a 60-day time window post-injection in all cases. BR-eGFP-CMV/Luc cells were injected in the left ventricle and their further isolation from mouse brain was repeated five times, obtaining BR-eGFP-CMV/LucV5 cells through these cycles (BRV5).

Temozolomide (TMZ) has been broadly used in glioblastoma experimental therapeutic models and in clinical settings, objectivizing regression or delay of tumor progression [22–25]. Studies in patients show that association of whole brain radiation plus TMZ for brain metastasis treatment is well tolerated [26]. As an oral anticancer agent, has a favorable toxicity and pharmacokinetic profile, allowing its clinical investigation for brain metastasis from solid tumors in combination with other treatments, such as radiotherapy [27]. Using BRV5 cells and BRV5CA1 cells (obtained from brain metastasis after intracarotid, *IC*, injection of BRV5 cells), we standardized a preclinical protocol combining radiotherapy and TMZ, as radiosensitizer, that can be used to assess new drugs and/or new radiation protocols to combat breast cancer brain metastasis. This versatile model mimics triple negative breast cancer clinical brain metastasis growth, which can be analyzed *in vivo* when mice are submitted to different therapeutic protocols.

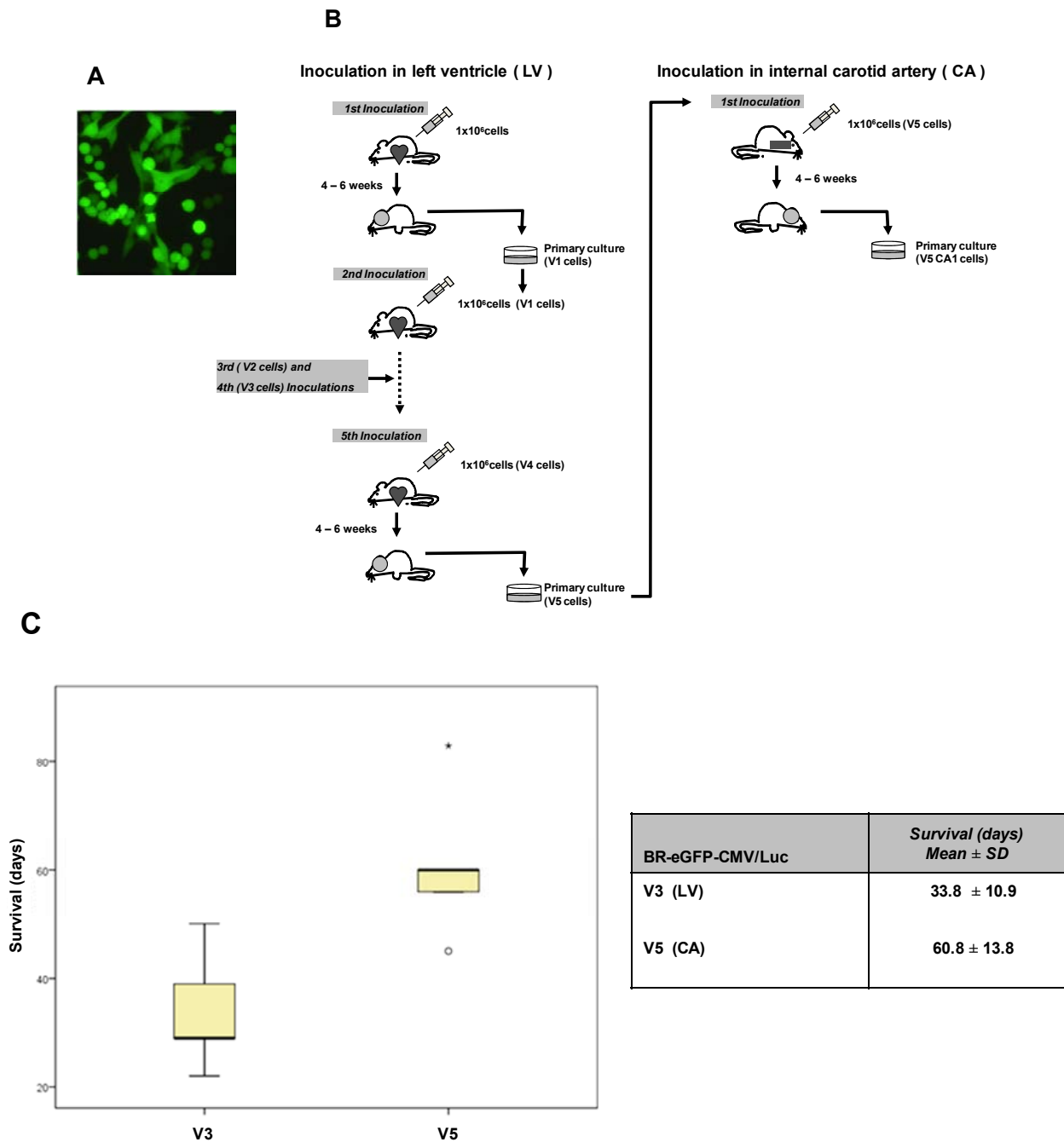
2. Results

2.1. BR-eGFP-CMV/Luc-V5 Brain Metastatic Cells

A cell population that uniformly expressed the highest levels of eGFP (BR-eGFP-CMV/Luc) was selected by FACS and was used as a starting point for the selection of more specific brain metastatic cells (Figure 1A). We started by injecting BR-eGFP-CMV/Luc cells into the left ventricle and continued until five *in vivo/in vitro* rounds, before intracarotid injection (Figure 1B).

435-Br1 cells have been the mainstay of experimental brain metastasis via infusion into either the carotid artery or the left cardiac ventricle [20,28]. In previous work we reported that 435Br1 metastatic cells have a heterogeneous distribution, secondary to the entry points of the cells in the brain parenchyma, which was confirmed by the histological analysis of *ex vivo* samples [21]. Five minutes after *CA* injection of BRV5 cells their presence in vessels was confirmed by fluorescence microscopy, which identified them in the lumen of the intraparenchymal brain arteries (see Figure 2A). These results are in agreement with reports of a strong bioluminescence signal immediately after carotid injection of MDA-BM-435 cells, which was detected in the hemisphere of the brain and persisted at the same level of intensity through days 5 to 7 before the exponential increase [29].

Figure 1. BR-eGFP-CMV/Luc brain metastatic cells. (A) Cells viewed under fluorescence microscopy in culture (20×); (B) Flow work chart of Inoculation of BR-eGFP-CMV/Luc cells in left ventricle. The diagram shows the steps followed to obtain cells that have been inoculated five times in the left ventricle of female athymic mice. The cells obtained from the brain when mice were injected for the first time in the left ventricle are named V1 cells, and those obtained after the fifth injection are named V5 cells (BRV5 cells). Further intracarotid injection experiments were performed using these V5 cells and then isolated from brain tissue (BRV5CA1 cells); (C) Statistical analysis comparing survival of mice injected with BRV3 and BRV5 cells (Mann-Whitney Test, 2-tailed, $p = 0.016$).



The fourth round we injected BR-eGFP-CMV/Luc-V3 (BRV3) cells into the left ventricle inducing mainly mediastinal lymph node metastases that killed five out of five mice 33.8 ± 10.9 days after cells

inoculation. Fluorescent cells were found in the brain of two of five mice, in the lungs in five, in the liver in four, in the ovaries in two, in suprarenal glands in one and in mediastinal lymph nodes in five (Table 1). BR-eGFP-CMV/Luc-V5 (BRV5) cells that were injected intracarotid induced symptoms of brain disabilities in five mice, consisting in lateralization of the movements and asymmetry in addition to loss of weight. We found fluorescent cells in the brain of all five mice studied, in the lungs in five, in the liver in one, in the ovaries in two, in suprarenal glands in three and in mediastinal lymph nodes in three (Table 1). All mice showed symptoms of brain disabilities with a median of survival of 60.8 ± 13.8 days after cells inoculation (Figure 1C). Since the mice died without symptoms of breathing difficulties and without macroscopic metastasis in lungs or lymph nodes, the brain metastasis observed in histological slides indicated that brain metastasis progression was the cause of death. Differences in the survival evolution of mice inoculated with BRV3 cells with regard to those inoculated with BRV5 cells were statistically significant (Mann-Whitney Test, 2-tailed $p = 0.016$).

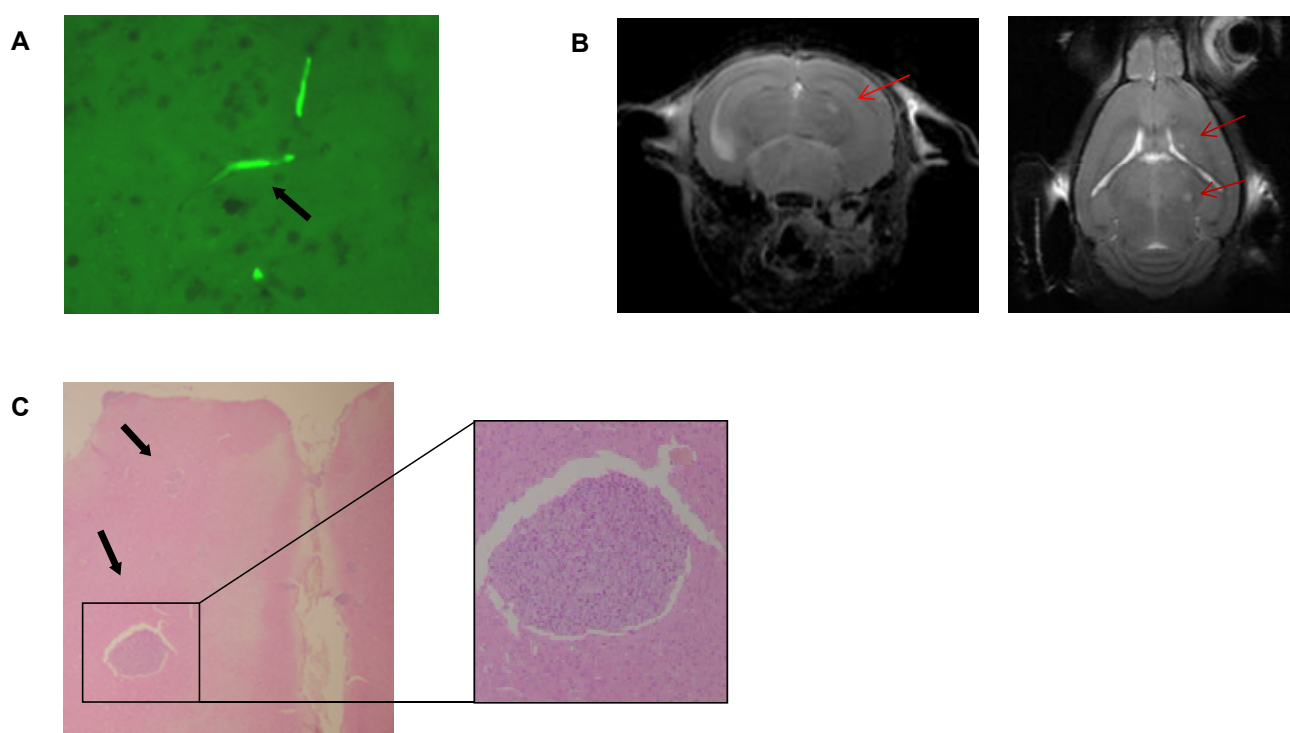
Table 1. Distribution of organs with progressive metastatic colonization in BRV3 vs. BRV5 cells inoculated mice.

	Via left ventricle	Via internal carotid artery
	V3 (n = 5)	V5 (n = 5)
	positive GFP-Luc cells	positive GFP-Luc cells
Brain	2/5 (40%)	5/5 (100%)
Lungs	5/5 (100%)	5/5 (100%)
Liver	4/5 (80%)	1/5 (20%)
Suprarenal glands	1/5 (20%)	3/5 (60%)
Ovaries	2/5 (40%)	2/5 (40%)
Mediastinic Lymph Nodes	5/5 (100%)	3/5 (60%)
Abdominal Lymph Nodes	1/5 (20%)	1/5 (20%)

The perioperative mortality following *LV* injection was 11% vs. 8% in mice in which brain metastases were induced via *IC*.

We used MRI for *in vivo* visualization of the parenchymal location of brain metastases (Figure 2B). As expected, the longitudinal studies of metastatic progression in coronal (Figure 2B left) and axial sections (Figure 2B right) identified metastasis mainly in the brain parenchyma. After inoculation in the right carotid artery, MRI scans (T2w and high resolution sequences) on coronal and axial planes were acquired weekly. Images obtained at day 7, 14 and 21 post-inoculation showed no abnormal signal in the brain, and no clinical symptoms were observed. At day 29 when the animals showed some external signs of illness, such as a slight increase in the size of the right eye and hypoactivity, MRI showed small lesions in the right hemisphere of the brain. Post-mortem histological analyses in transversal and coronal slices were carried out in most cases to confirm the extension of the disease, staining the slides with hematoxylin and eosin (Figure 2C).

Figure 2. Histological view of cells inoculated in mice by intracarotid injection. (A) 20 μm slice from CD1 female mouse brain 5 min after intracarotid injection of cells seen under fluorescence microscope (40 \times). Note the fluorescence from the inoculated cells in the lumen of the brain vessels (see black arrow); (B) Magnetic resonance imaging scans (T2w and high resolution sequences) on coronal (left) and axial (right) planes respectively from a mouse skull 29 days post-injection of BR-eGFP-CMV/Luc (V5CA1) cells. In both scans several small lesions can be seen in the right hemisphere of the brain (see red arrows); (C) H&E staining of a 5 μm histological slice (4 \times) from right brain hemisphere 30 days post-injection in the right carotid artery of BR-eGFP-CMV/Luc (V5CA1) cells. Note the two metastases of different sizes (see black arrows). On the right is the largest metastasis at (20 \times).



2.2. The Therapeutic Irradiation Model

Radiation therapy is the most commonly used clinical procedure for the treatment of brain metastases. We aimed to standardize an experimental radiation model for application in preclinical radiation therapies. We used a scalpel to mold several beds on the bolus (one for each mouse's head) in order to keep all the heads in the supine position during CT scanning and treatment. When mice were anesthetized in the flux chamber, they were laid on the bolus surface in the supine position, with their heads fitted in the molded beds after securing their bodies in position with sticking-plaster (Figure 3A–E). A piece of molded bolus covered their heads; care was taken not to disturb the breathing.

Figure 3. Standardization of the experimental radiation model box. (A) The molded bolus was placed in the plastic box. Black lines are drawn on the four sides of the box indicating the position of the bolus. In the treatment room, laser lines used for alignment (red brackets) pass through the black lines to ensure good and reproducible alignment throughout the treatment; (B) Anesthetized mice laid on the bolus surface in supine position, with their heads fitted in the molded beds and their bodies kept in position by means of sticking-plaster; (C) Placement of bolus with fixed animals according to the position of the black marks. Yellow rectangle indicates the projection of the treatment field size and the red crossline the direction of the alignment laser lights on the treatment table; (D) Other molded bolus covering the heads of the mice for CT scanning and treatment. (E) The depths at which brains are placed with regard to the box surface (between 2.3 and 3.0 cm depth) and the isodose curve distribution at these depths. SSD: Source Surface Distance = 100 cm. The figure also shows how the brains are irradiated.

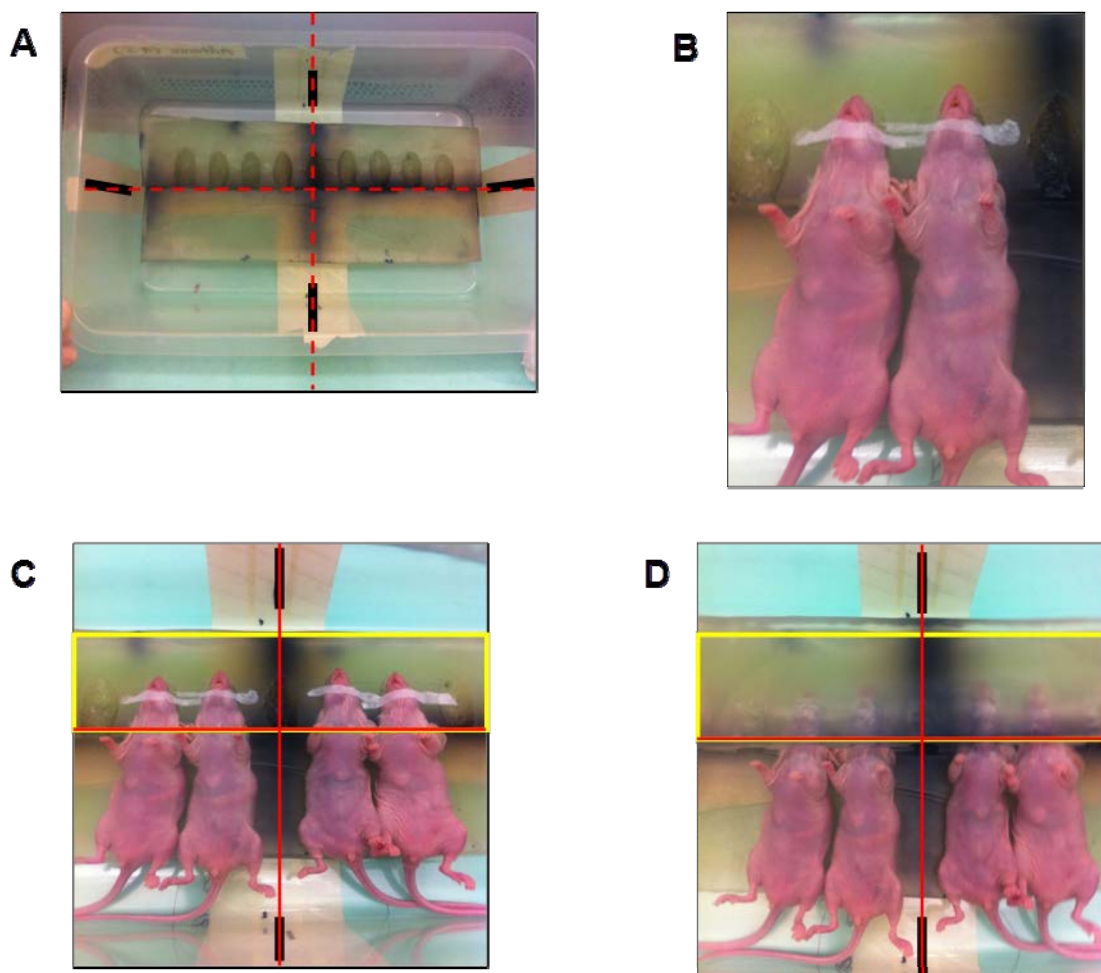
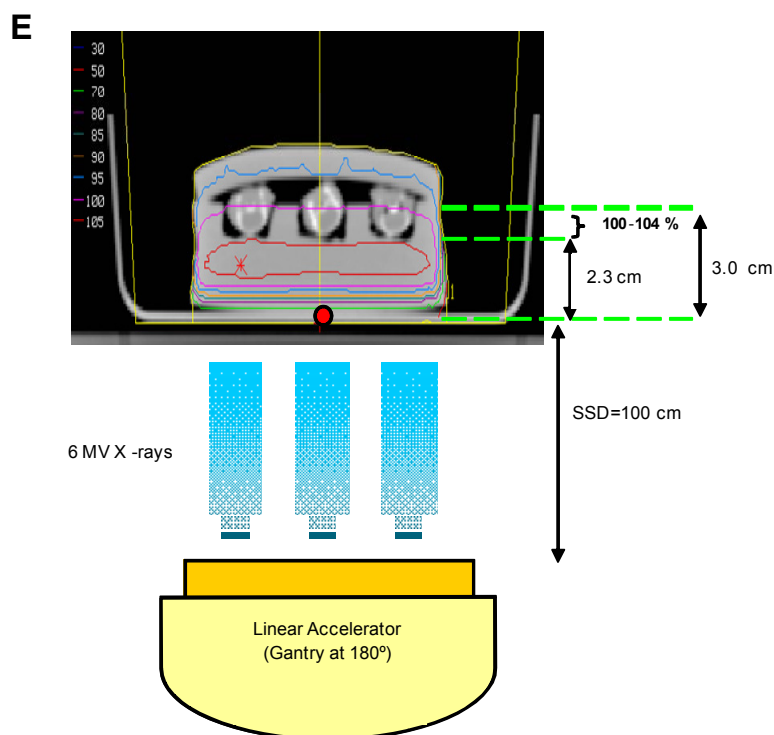


Figure 3. Cont.



After the head CT scans were performed, they were processed by the planning software by calculating the dose distribution (isodose curves) of ionizing radiation in brain tissue from the CT slices. This procedure provided precise information about the relevant physical parameters, the dose distribution, the energy value of the chosen X-rays and prescription data (Figure 3E). The radiation treatment schedule was then planned to ensure that the dose delivered to the brain was always the same throughout all the treatment sessions.

For radiobiological assessments in radiotherapy, the linear–quadratic model (L–Q model) is widely used [30]. This mathematical model provided a way to calculate the change of fractionation between two treatment schedules needed to maintain the same isoeffect in both the tumor and healthy tissue, taking into account the number of fractions and the dose per fraction. The balance between antitumoral efficacy and tolerance in healthy tissues permitted the assessment of the isoeffect in different treatment schedules. We selected the schedule based on 5.5 Gy/fx \times 1 fx/day \times 3 days (overall dose: 16.5 Gy) firstly because the dose delivered to the healthy brain was smaller than those delivered with the 3 Gy/fx \times 1 fx/day \times 10 days schedule (overall dose: 30 Gy), reducing the risk of early death by brain toxicity, and secondly because the treatment period was shorter and animals received intraperitoneal anaesthesia for only three consecutive days.

The experimental protocol was accordance with the role of whole brain radiotherapy (WBRT) in preventing brain metastasis. In humans, the treatment of choice for brain metastasis in most cases is WBRT, regardless of the histological type. One of the standard schedules is 3 Gy/fraction, delivering one fraction/day for ten days, with an overall delivered dose (OD) of 30 Gy (3 Gy/fx \times 1 fx/day \times 10 day). We tested this treatment schedule in several preliminary studies by delivering it to the whole brain of mice with variable degrees of immunodeficiency. First, we checked the survival of CD1 and Nude Balb/c female mice exposed to this schedule, and found that CD1 mice survived more than five months

without clinical signs of brain damage or loss of weight; only corneal opacity was observed. The Nude Balb/c female mice treated with the same protocol died two months after the radiation therapy (data not shown).

The treatment schedule was performed in brains of female Athymic Nude-Foxn1nu mice at a depth of between 2.3 and 3.0 cm from the bolus surface. Taking into account the balance between efficacy/tolerance, one fraction (5.5 Gy) was delivered for three days (overall dose: 16.5 Gy); the dose rate was 240 Monitor Units (MU/min). The results showed improved survival of mice treated with radiotherapy with regard to controls (60.29 ± 8.65 vs. 47.20 ± 11.14 , Kaplan-Meier, Log Rank: Chi-Square 2.456; df = 1; $p = 0.117$).

The apparent differences between BRV5 and BRV5CA1 controls were not significant (Kaplan-Meier. Log-Rank test; $p = 0.228$) and may have been due to the biological variability through *in vivo* experiments and the more aggressive phenotype obtained with BRV5CA1 cells.

These schedule based on a 5.5 Gy/fraction delivered in one fraction/day for three days, with an overall dose of 16.5 Gy was tested in several kinds of immunodeficient mice. Female athymic mice survived at least six months after radiotherapy without loss of weight, while NOD/SCID female mice died within eight days of radiotherapy which induced extreme weight loss (data not shown). This evidence suggests that radiosensitivity is dependent on the mouse model used, particularly on the immunological status of mice.

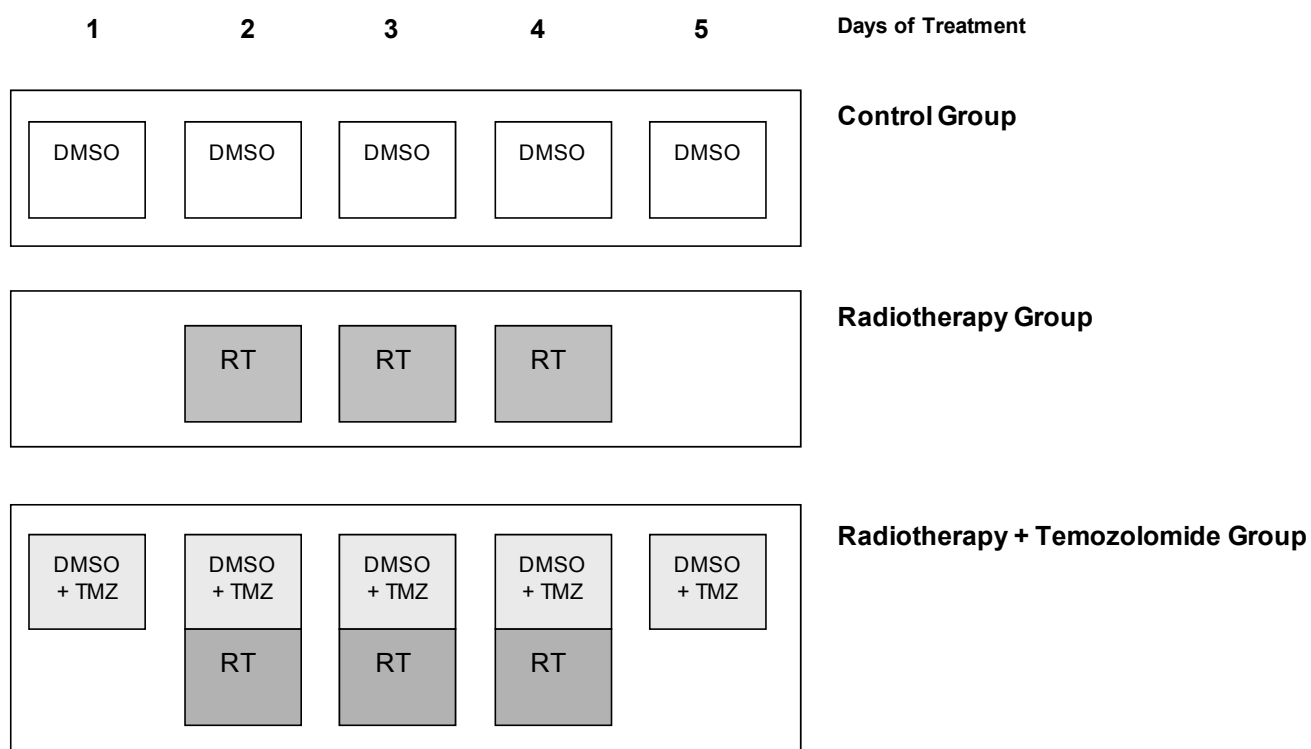
2.3. Combined Irradiation and Chemotherapy to Treat Experimental Brain Metastasis

Most clinical trials for brain metastasis enroll patients who have progressed after WBRT treatment, or test the therapy in combination with WBRT. In order to optimize the therapeutic model, we performed experiments combining radiation with radiosensitization by the DNA methylation agent temozolomide, which is currently undergoing clinical evaluation for cancer therapy [6]. As temozolomide has been shown to increase survival rates of patients with malignant gliomas when combined with radiation [31], we investigated its possible enhancing effect on radiosensitivity (Figure 4).

The TMZ dose was selected on the basis of previous studies on glioma models using TMZ at a dose of 100 mg/Kg/day delivered intraperitoneally [32]. Since other tumour xenograft model studies evaluated TMZ at 200 mg/Kg/week (100 mg/Kg/day for two days a week) intragastrically for several weeks, the maximum tolerated dose was not studied. Moreover, in humans a reduction in the daily dose of TMZ is needed when the drug is delivered concurrently with radiotherapy due to TMZ's concomitant toxicity [33]. Thus, in our model, in which TMZ was administered concomitantly with radiotherapy, we decided to use a reduced dose of TMZ (60 mg/Kg/day) to decrease the risk of death due to toxicity.

Figure 4. Schedule of treatment for each group of study: dimethyl sulfoxide (DMSO) vehicle alone for control group ($n = 5$); radiotherapy alone for radiotherapy group ($n = 7$); and concomitant chemoradiotherapy for radiotherapy plus temozolomide (TMZ) group ($n = 9$). The first day of treatment was 26 days after *IC* injection of cells when bioluminescence analysis showed brain metastasis growth. The treatment was applied on five consecutive days.

Schedule of Treatment



Mice began the treatment on day 26 after brain metastases were induced, when the follow-up bioluminescence indicated metastasis development. The control group received DMSO solution orally on five consecutive days. Radiotherapy (cranial irradiation 5.5 Gy) was administered on three consecutive days starting on the 27th day after the *IC* injection of cells. In addition, DMSO + TMZ solution was delivered orally from day 26 post-*IC* inoculation of cells on five consecutive days. On days 2–4 TMZ was administered one hour before cranial irradiation (cranial irradiation 5.5 Gy), as described in the protocol (Figure 5).

Brain metastasis evolution in mice treated with 5.5 Gy/fraction, delivered one fraction/day for three days (days 2–4, overall dose: 16.5 Gy), were compared with mice treated with radiotherapy plus chemotherapy (RT + TMZ), which received 20 μ L DMSO + TMZ and 180 μ L saline orally (final volume delivered: 200 μ L), every day for five days (days 1–5) and 5.5 Gy/fraction, delivered one fraction/day for three days (days 2–4, overall dose: 16.5 Gy). Brain metastases were followed by luminescence and the evolution of the treated groups was compared with that of a control group which received the vehicle orally (Figure 5A, Table 2). Indeed, 42 days after starting the treatment differences were recorded in brain metastasis burden between RT alone and RT + TMZ (Figure 5B).

By the end of the experiment survival was significantly higher in the RT + TMZ group (121.56 ± 52.53 days) than in the RT alone group (60.28 ± 8.65 days), RT vs. RT + TMZ, Log Rank: Chi-Square 13.669; df = 1; $p < 0.001$. These results demonstrate the benefit of chemoradiotherapy for treating breast cancer brain metastasis (Figure 5C).

Table 2. Comparison of controls, treated with radiotherapy alone or in combination with chemotherapy.

Day	26	31	34	39	42
control vs. RT	0.2039	0.2348	0.0526	-	-
control vs. RT+TMZ	0.2639	0.0552	0.0115 (*)	-	-
RT vs. RT+TMZ	0.7024	0.1813	0.3024	0.3337	0.0589

* p -value is obtained according the median metastatic burden in the brain in each group: controls $N = 5$, RT $N = 7$ and RT + TMZ $N = 9$ (Student “ t ” test; 2-tailed).

Figure 5. Combined irradiation and chemotherapy to treat brain metastasis. (A) Control mice, mice treated with radiotherapy and mice treated with chemoradiotherapy were compared from day 26 to 42 after injecting cells in CA. The evolution of metastasis growth is shown according the signal of luminescent cells; (B) The median of metastatic burden of mice treated with radiotherapy and treated with chemoradiotherapy was compared from the starting point of the induction of metastasis; (C) The survival evolution is indicated in the Kaplan-Meier Curve (Log Rank -Mantel-Cox-: Chi-Square 22.022; df = 2; $p < 0.001$). Control vs. RT: Log Rank (Mantel-Cox): Chi-Square 2.456; df = 1; $p = 0.117$. RT vs. RT + TMZ: Log Rank (Mantel-Cox): Chi-Square 13.669; df = 1; $p < 0.001$. Control vs. RT + TMZ: Log Rank (Mantel-Cox): Chi-Square 16.649; df = 1; $p < 0.001$.

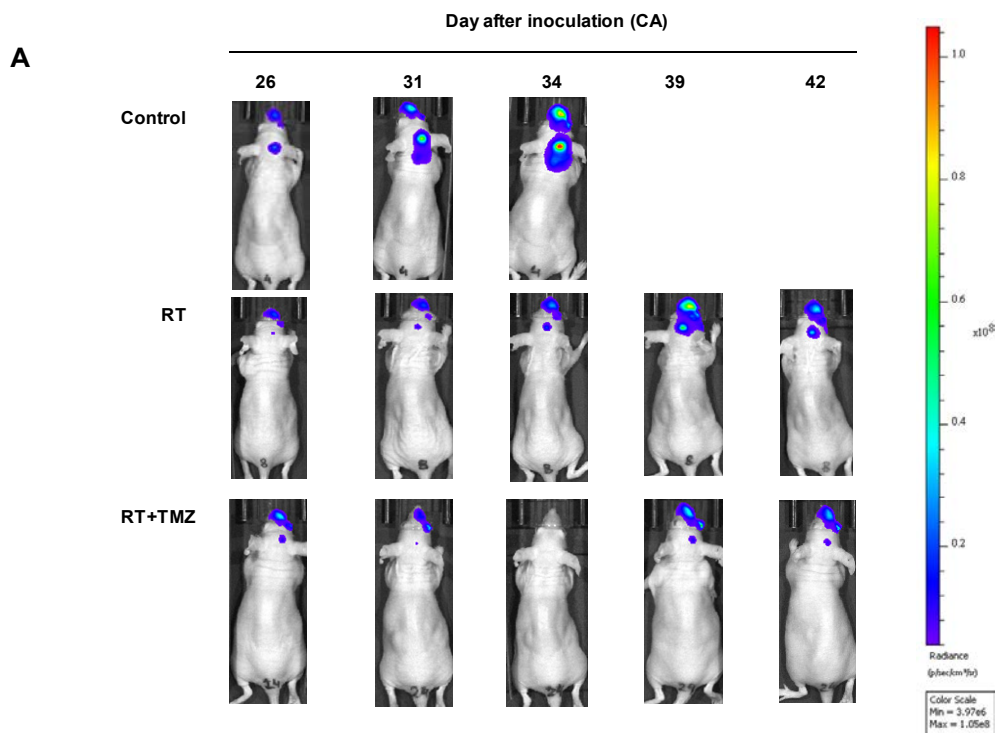
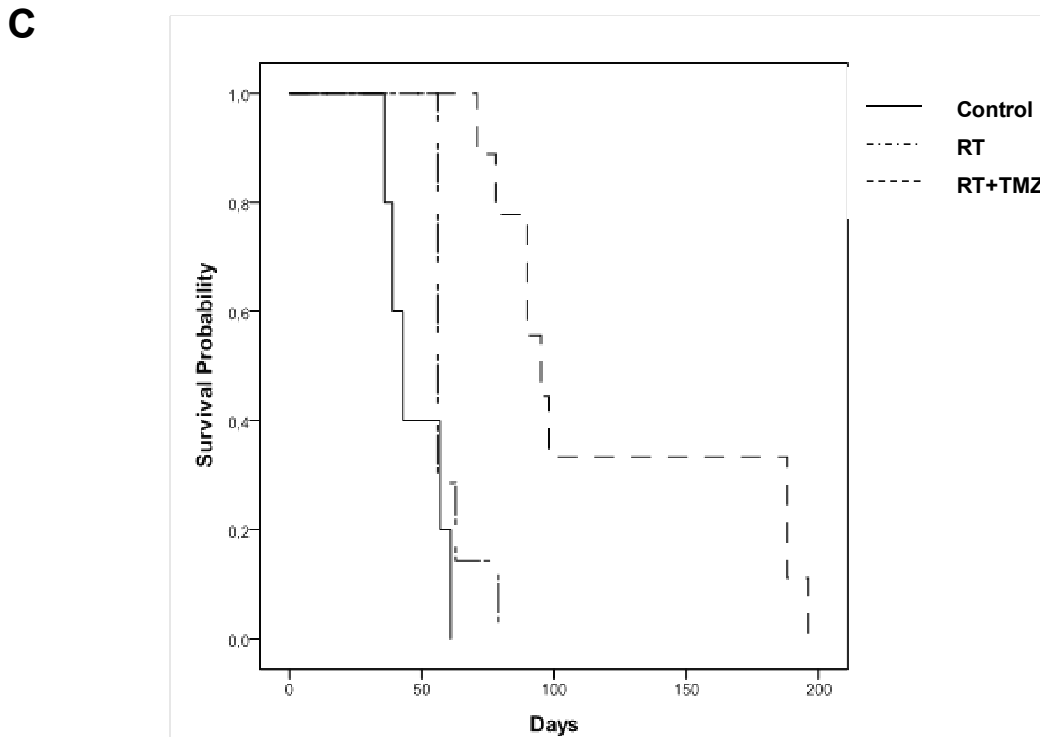
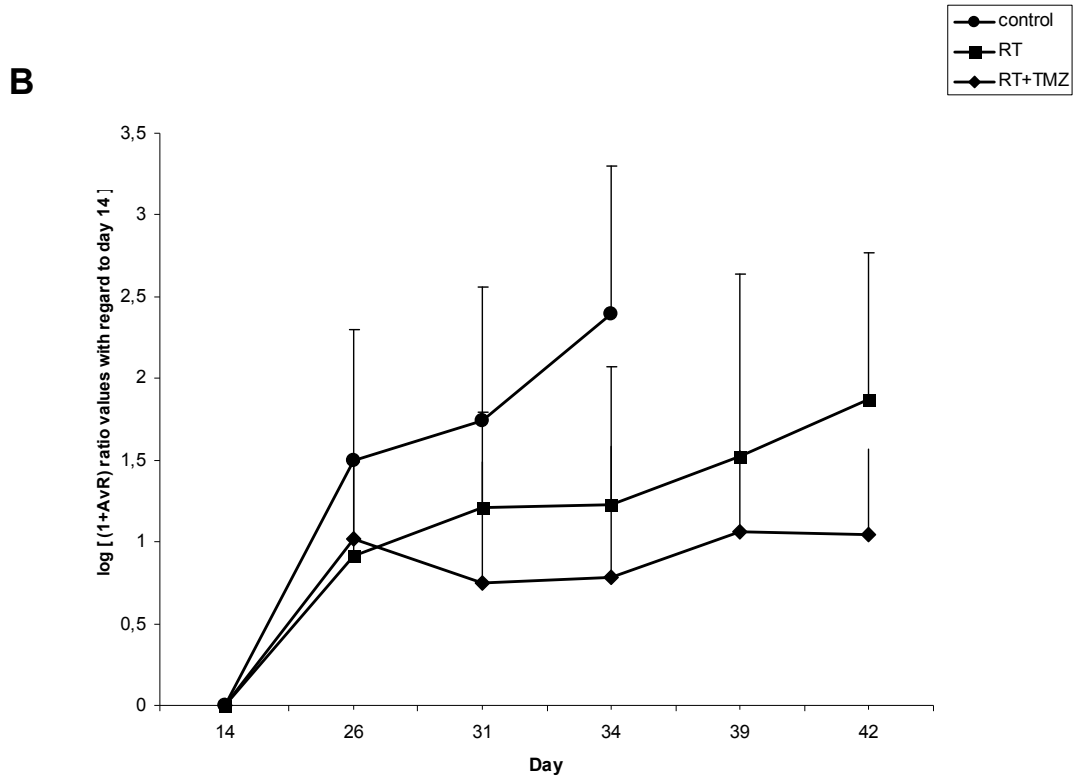


Figure 5. Cont.



3. Discussion

Metastasis research is highly dependent on reliable animal models that allow different aspects of metastasis initiation and progression to be studied *in vivo*. As these pathologies cannot be studied longitudinally in humans for evident ethical reasons, *in vivo* follow-up studies require animal models that can accurately reflect the process observed in humans [16,17]. To develop a more efficient model

of brain metastasis from advanced breast cancer we used 435-Br1 brain metastatic cells, established from brain metastasis in nude mice, which has been functionally characterized elsewhere [34]. Thus, by injecting cells into the *LV* and recover them from the brain metastasis we increased specificity due to the selection of cells that are able to cross the blood brain barrier and to adapt to the brain microenvironment.

The BRV5CA1 cells injected via the IC induced histologically confirmed metastases in 100% of animals, but no large masses developed either in the jaw or the neck. Moreover, in our study, bioluminescence images showed cranial signals in 19/23 animals (83%) on day 26 post-injection (just before the start of the treatment protocol). These results significantly improve the brain metastasis evolution of 435Br1 cells, since in our previous magnetic resonance imaging (MRI)/spectroscopy (MRS) characterization [21] brain lesions were localized in different brain regions in 69% of animals, which were further histologically confirmed in 61% of cases. Since other metastases appeared in the neck and the right jaw, progressing rapidly and causing feeding problems in mice, the global procedure was inefficient. The selection procedure through five *in vivo/in vitro* passages of 435Br1 cells induced BRV5CA1 cells with a better efficiency and specificity for developing clinical brain metastasis.

It is known that arrest of individual tumor cells in brain capillaries induces diverse astrocytic and microglial responses, resulting in heterogeneous local changes of the initial tumor microenvironment, which in turn could restrict the progression of metastatic cells into macrometastases [29]. The survival of arrested cancer cells within brain capillaries may be a rate-limiting step in metastatic progression, since cancer cell penetration of the vessel wall in the brain is much slower than in progression and impacts the success of tumor cells to survive and grow within the brain [35–37].

The current incidence of brain metastasis seems to be the paradoxical result of the effectiveness of drugs that do not cross the blood brain barrier (BBB). In this study of the effectiveness of an experimental approach combining radiation and chemotherapy we selected temozolomide, an alkylating agent which to our knowledge has not been fully introduced in treatment protocols for breast cancer brain metastasis although in patients with brain metastatic breast cancer no responses have been reported when was used as a single agent [38]. Different response degrees have been reported in patients with melanoma or non-small cell lung cancer brain metastasis treated with TMZ concomitant with whole brain radiation [39–41]. Further studies are needed to demonstrate the benefits of TMZ concomitant with radiation therapy on breast cancer brain metastasis.

Trials with TMZ as a radiosensitizer to treat breast cancer brain metastasis are underway [42]. The treatment schedule is based on whole brain radiotherapy at 3 Gy/day administered over a two-week period and an induction with TMZ 75 mg/m²/day during this period, following TMZ 750 mg/m² (fractionated). Moreover, in a phase II study, Siena, *et al.* [43] reported a dose-dense temozolomide regimen for treatment of brain metastasis in which patients had median progression-free survivals of 56, 58, and 66 days for melanoma, breast cancer, and non-small cell lung. New clinical trials are underway to supplement the action of temozolamide with pegylated liposomal doxorubicin, showing an overall response rate of 36.8% and a significant improvement in quality of life [44]. Furthermore, drug pharmacokinetics and biodistribution may be increased using nanocarriers to enhanced drug delivery into the brain improving drug accumulation [45,46].

The role of systemic chemotherapy other organs [47]. Moreover, it is well established that the host microenvironment affects metastasis in patients with brain metastases remains unclear [48]. Treatment

of brain metastasis in breast cancers includes surgery and radiation therapy, since the efficacy of chemotherapy for brain metastases remains disappointing [49]. In clinical studies, particularly in non-small-cell lung cancer radiotherapy reduced the incidence of brain metastasis, but did not achieve any substantial survival benefit [16,50]. Although reported response rates range from 56% to 82% in patients with primary cancer of the lung and breast the associated adverse events are severe [50,51]. Clearly, a chemotherapeutic agent that is both efficacious and well tolerated would hold great potential for the treatment of patients with brain metastases from solid tumors [52].

Most clinical trials for brain metastases enroll patients with diagnosed brain metastasis and test an experimental therapy in combination with WBRT. Little effect on patient survival has been achieved. This experimental chemoradiotherapy model of brain metastasis provides a reproducible method for checking new drugs and can help to establish new therapeutic protocols.

4. Experimental Section

4.1. Cells and Primary Cultures

435-Br1 human mammary carcinoma cells (originally established from a brain metastasis in a *nude* mouse orthotopically inoculated with the triple negative parental cell line, MDA-MB-435, kindly supplied by Dr. Fabra, IDIBELL, in 1992) were maintained under standard conditions in 1:1 (*v/v*) mixture of DMEM and Ham F12 medium, DMEM/F12 (Life Technologies, Inc. Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA). This mixture was supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1 mM pyruvate, and 2 mM L-glutamine in a 5% CO₂ environment at 37 °C in a humidified incubator [9]. Although a controversial point, it has recently been demonstrated that MDA-MB-435 cells represent a useful breast cancer model and that they express both epithelial and melanocytic markers [53].

435-Br1 cells in exponential growth phase were first treated with Trypsine-EDTA (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) for 1 min at room temperature for inoculation. They were then washed twice in HBSS and counted using a Neubauer chamber. Viability (measured by Trypan-Blue exclusion) was always between 90% and 97%. 435-Br1 cells were then resuspended in HBSS (Hanks' Buffer Saline Solution) to obtain a final concentration of 1×10^6 cells/100 μ L for inoculation either into the left ventricle (*LV*) or into the internal carotid artery (*CA*) of mice, using a slight modification of a previously described method [21].

Primary cultures were performed in DMEM F-12 with 50% FBS (Fetal Bovine Serum) (*v/v*), 2% L-glutamine plus pyruvate (*v/v*), Penicillin 1 mg/mL, Streptomycin 1 mg/mL, Neomycin 2 mg/mL (from antibiotic PSN 100 \times solution, Gibco, Gaithersburg, MD, USA), Gentamicin 0.2 mg/mL and Amphotericin-B (Fungizone) 2.5 μ g/mL. After culture, if cells showed optimum growth, we reduced FBS to 20% and gradually removed the antibiotic solution. Finally, we worked with the standard medium DMEM F-12 10% FBS with L-glutamine and pyruvate without bacterial or fungal contamination. Mycoplasma-free status was checked before preparing the cells for the next inoculation, in order to obtain metastatic cells with a greater affinity to seed in the mouse brain after five cycles of inoculation in *LV*.

4.2. Retroviral Transduction

To label 435-Br1 brain metastatic cells we used the retroviral vector preGFP-CMV-PLuc, which contained the enhanced green fluorescent protein (*eGFP*) gene, under control of the 5' LTR, and the photinus luciferase (*PLuc*) gene, under control of the cytomegalovirus (CMV) promoter. Retroviral transduction was used to label 435-Br1 brain metastatic cells. Vector preparation and packaging of viral particles was performed as described previously [54]. A cell population that uniformly expressed the highest levels of eGFP (BR-eGFP-CMV/Luc) was selected by FACS (MoFlo, Cytomation, Dako, Denmark).

4.3. Brain Metastasis Model and in Vivo Experiments

Athymic Nude-Foxn1nu female mice 22–28 g weight were purchased from Charles-River Laboratories (Wilmington, MA, USA) and were housed at the IDIBELL facility in SPF conditions, with 20–24 °C cage temperature, 60% relative humidity, and 12–12 h light-dark periods. Animals were allowed free access to UV irradiated water and an adequate sterile diet. All animal-related procedures were performed in accordance with the National Institute of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals, with the approval of the animal care committee.

Briefly, mice were anesthetized with ketamine and xilacine solution (ketamine: 100 mg/Kg; xilacine: 10 mg/Kg) injected intraperitoneally before to inoculate cells into the *LV*. The procedure was performed under sterile conditions in a flux chamber and after cleaning the skin with antiseptic iodine solution. The ribs were visualized by opening the skin lengthwise at the left parasternal line, and 1×10^6 BR-eGFP-CMV/Luc cells/100 μ L HBSS were injected between the third and fourth ribs perpendicularly to the chest surface. Finally, we closed the skin with staples. Animals were sacrificed by means of intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (Dolethal[®]), according to their weight, when clinical signs of illness or weight loss were detected. The brain and other organs such as lungs, liver, suprarenal glands, ovaries, mediastinal and abdominal lymph nodes were then removed and examined under a fluorescent microscope for the presence of BR-eGFP-CMV/Luc cells. Cells isolated from brain tissue underwent primary culture processes. *LV* injection of cells and their further isolation from mouse brain was repeated five times, obtaining BR-eGFP-CMV/Luc-V1 to V5 cells through these cycles.

To induce brain metastases by *CA* inoculation, supine mice were anesthetized with inhalatory anesthesia under sterile conditions in a flux chamber using a mixture of O₂ and isoflurane at 5% (with a flux of 4 L/min) for induction, and isoflurane at 1.5%–2.0% (with a flux of 0.3 L/min) for maintenance. The whole neck was then disinfected with antiseptic iodine solution and glucosaline *s.c.* (20 mL/Kg per day for two days) was injected to maintain good hydration and meloxicam 5% *s.c.* (100 μ L/20 gr per day for two days), to achieve an optimum analgesic/anti-inflammatory effect. The neck skin was then opened with an incision like an “inverted seven” (first lengthwise and then sideways to the right), thus obtaining a wide surgical field. All soft tissues were dissected, releasing the structures carefully to identify clearly the right carotid artery with its main branches. Then, we clamped (Vascular Clamps F.S.T. ref.00396-01–S&T, Switzerland) the root of the external carotid artery, under the origin of its occipital branch, and then the stapelial branch, located cranially and deep

in the neck. In this way we ensured that most of the inoculated cells (1×10^6 of BR-eGFP-CMV/Luc (V5) cells/100 μ L HBSS) with a Hamilton[®] syringe (100 μ L Bonaduz, Switzerland) and a Hamilton[®] needle (33 Gauge, PK6) would slowly access the brain through the internal carotid artery. Using a pair of tweezers, we grasped the common carotid artery caudally near the base of the neck and maintained it immobile during the injection. The injection point of the cellular suspension was chosen just above this site. Once the needle was inside the common carotid artery lumen, we inserted it in the internal carotid branch lumen and then delivered the cellular suspension, pushing slowly at the point of injection until the bleeding stopped. Finally, we finished applying the iodine solution in the surgical bed and clamped the skin by means of staples. We then stopped the isoflurane mixture and delivered a high concentration of O₂ for a few seconds before placing the mice under a dry hot source.

Animals were sacrificed by means of intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (Dolethal[®]) according to their weight when clinical signs of illness or loss of weight were detected.

BR-eGFP-CMV/Luc-V5CA cells were inoculated into CA of mice for the chemoradiotherapy experiment.

4.4. In Vivo Set-up

Athimic mice inoculated with BR-eGFP-CMV/Luc (V5CA) cells in right carotid artery were explored with magnetic resonance imaging sequences in a high-field (7T) horizontal spectrometer at 29 days post-injection. These studies were carried out at the joint NMR facility of the Universitat Autònoma de Barcelona and CIBER-BBN (Cerdanyola del Vallès, Spain), using a 7 T horizontal magnet (BioSpec 70/30; Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany) equipped with actively shielded gradients (B-GA12 gradient coil inserted into a B-GA20S gradient system) and a quadrature receive surface coil, actively decoupled from a volume resonator with 72 mm inner diameter.

Anesthesia was performed using isoflurane and O₂ mixture (2.5%–3.0% for induction, and 0.7%–2.5% for maintenance). Respiratory frequency was maintained between 40 and 60 breaths/min. Body temperature was maintained between 36.5 and 37.5 °C with a recirculating water system incorporated in the animal bed, and measured with a rectal probe. Breathing rate and temperature were constantly monitored (SA Instruments, Inc., New York, NY, USA). All animals were explored in coronal and axial planes with T2-weighted high resolution MR images. For this, a RARE sequence was chosen; field of view (FOV), 19.2 \times 19.2 mm; matrix (MTX), 256 \times 256 (0.075 \times 0.075 mm/pixel); number of slices (NS), 10; slice thickness (ST), 0.50 mm; echo time (TE), 12 ms (effective TE, 36 ms); recycling time (TR) 4.2 s; number of averages (NA), 4; total acquisition time (TAT), 6 min 43 s.

4.5. Bioluminescence Analysis

Inhalatory anesthesia with O₂ and isoflurane mixture was delivered to athymic mice before image acquisition: induction was performed outside the bioluminescence chamber (isoflurane 4% at 2 L/min) and maintenance inside the chamber (isoflurane 2% at 2 L/min) during acquisition. Animals were placed in prone position. The photons recorded in the images were quantified and analyzed using Living Image 4.1 image analysis software (Caliper, LifeSciences Hopkinton, MA, USA). The number of photons was expressed as photon counts per second (p/s). The parameter chosen for treatment evaluation was the Average Radiance (p/s/cm²/sr). Luciferin solution (D-Luciferin Firefly potassium

salt, L-8220–Biosynth AG) was prepared according to the data sheet. Intraperitoneal injection of luciferin solution (200 μ L/20 g) was applied 10 min before imaging. The planned period of time for image acquisition was the same for all animal groups (control, radiotherapy and radiotherapy plus temozolomide) before and after treatment.

Background signals were subtracted from all the bioluminescence cranial measurements as part of image analysis. To this end, a healthy mouse (not inoculated with tumoral cells) received luciferin solution (200 μ L/20 g) intraperitoneally 10 min before imaging.

4.6. Histological Analysis

During the organ-specific selection procedure, after the mice had been sacrificed we examined the presence of green fluorescent cells in lungs, liver, suprarenal glands, ovaries, lymph nodes and brain under fluorescent microscopy. Finally, soft tissues were fixed with formalin and embedded in paraffin. Brains were optionally fixed in 4% paraformaldehyde 24 h, followed by 30% sucrose 24 h and OCT-embedded (tissue freezing medium, Sakura Tissue-Tek[®]) before being frozen in dry ice. Samples, which were kept at -80 °C, were cut into 5 μ m coronal sections for evaluation. The cryostat was at -27 °C.

Metastatic involvement was explored in each section by classic hematoxylin-eosin (H&E).

4.7. Therapeutic Protocols

We used a combination of radiotherapy and chemotherapy to standardize a preclinical model which mimicked the clinical situation of brain metastasis development, in order to assess the efficacy of both treatments.

4.8. Radiotherapy

Under sterile conditions in a flux chamber, we anesthetized mice by intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/Kg) and xylazine (10 mg/Kg). For irradiation mice were transported in a hermetically closed plastic box from the flux chamber to the scanner, where CT slices were performed in the head placed in a helical CT scanner device (Oncology Radiotherapy Service of the Catalan Oncology Institute, ICO, Hospital Duran i Reynals, L'Hospitalet de Llobregat, Spain), and then to the radiation treatment unit. A flexible and solid silicone gel, Bolus (Lorca Marín, S.A., 30007-Murcia, Spain), which has the same density as the body tissues, was used to obtain a reliable dose distribution of ionizing radiation at the prescribed depth.

We used the Cadplan Treatment Planning Software (Varian dosimetry software, Darmstadt, Germany), to calculate the dose distribution (isodose curves) of ionizing radiation from the CT slices (Servei de Física Mèdica, ICO, L'Hospitalet de Llobregat, Spain). All treatment sessions were performed with a Linear Accelerator CLINAC-2100 device (Varian Oncology Systems, Darmstadt, Germany) for radiotherapy at the Oncology Radiotherapy Service, which allowed us to deliver 6 MV X-ray energy (SOR, ICO, L'Hospitalet de Llobregat, Spain).

4.9. Chemotherapy

Mice were treated with temozolomide (TMZ), a novel oral alkylating agent with proven clinical activity in primary and recurrent gliomas and metastatic melanoma [32,55,56]. 100 mg TMZ ($\geq 98\%$ HPLC, solid T2577, Sigma-Aldrich Química, St. Louis, MO, USA) were resuspended in 0.5 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO, D5879 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as vehicle with a final concentration of 200 mg/mL. To achieve homogeneity the solution was sonicated (UP50H Ultrasonic Processor, Hielscher, Ultrasound Technology, Teltow, Germany), delivering four 5 s pulses (each one with a 30% amplitude) every five seconds. Aliquots were frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Mice were orally administered 60 mg/Kg/day in a 200 μL final volume (20 μL of TMZ + DMSO solution and 180 μL of saline) using a flexible and sterile intragastric catheter (Instech Solomon, Plymouth, PA, USA). The control group comprised mice orally administered 20 μL DMSO and 180 μL saline solution every day for five days (days 1–5).

4.10. Statistics

For survival times for V3 (LV) and V5 (CA) groups, we used the non-parametric Mann-Whitney test.

The bioluminescence data were transformed using the $\log(1 + x)$ function (where $x = AvR$), in order to obtain a more regular and positive distribution. Subsequently, these data were normalized by subtracting the first observation (day 14) from each of the following ones. The Student t test was used to compare the treatment groups. Survival curves for each treatment were estimated via the Kaplan-Meier method, and the Log-Rank test was used to assess if they were significantly different.

p -values lower than 0.05 were considered significant.

5. Conclusions

In conclusion we have generated a new breast cancer brain metastatic cellular model, which induced parenchymal brain metastasis within a 60-day time window post-injection in carotide in all cases. This versatile model mimics clinical brain metastasis growth and can be analyzed *in vivo* when mice are submitted to therapeutic protocols. Moreover, we have optimized a new preclinical chemoradiotherapy protocol proved useful for the study of radiation response/resistance in brain metastasis, either alone or in combination with new sensitizing agents.

Acknowledgments

We would like to thank Ana Paula Candiota from Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Grup d'Aplicacions Biomèdiques de la RMN, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona for her expert technical assistance in the magnetic resonance analysis. The authors also acknowledge the technical support provided by Ms. Eva Zardoya from Servei Física Mèdica and all technicians from Oncology Radiotherapy Service of the Catalan Oncology Institute (ICO). We are grateful to Michael Maudsley for expert language advice. This study was supported by grants from the Spanish Ministry of Health and Consumer Affairs (FIS/PI10/00057).

References

1. Villa, S.; Weber, D.C.; Moretones, C.; Manes, A.; Combescure, C.; Jove, J.; Puyalto, P.; Cuadras, P.; Bruna, J.; Verger, E. Validation of the new Graded Prognostic Assessment scale for brain metastases: A multicenter prospective study. *Radiat. Oncol.* **2011**, *6*, 23.
2. Berghoff, A.; Bago-Horvath, Z.; de Vries, C.; Dubsy, P.; Pluschnig, U.; Rudas, M.; Rottenfusser, A.; Knauer, M.; Eiter, H.; Fitzal, F. Brain metastases free survival differs between breast cancer subtypes. *Br. J. Cancer* **2012**, *106*, 440–446.
3. Carey, L.A.; Ewend, M.G.; Metzger, R.; Sawyer, L.; Dees, E.C.; Sartor, C.I.; Moore, D.T.; Graham, M.L. Central nervous system metastases in women after multimodality therapy for high risk breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2004**, *88*, 273–280.
4. Slimane, K.; Andre, F.; Delalogue, S.; Dunant, A.; Perez, A.; Grenier, J.; Massard, C.; Spielmann, M. Risk factors for brain relapse in patients with metastatic breast cancer. *Ann. Oncol.* **2004**, *15*, 1640–1644.
5. Nathoo, N.; Chahlavi, A.; Barnett, G.H.; Toms, S.A. Pathobiology of brain metastases. *J. Clin. Pathol.* **2005**, *58*, 237–242.
6. Steeg, P.S.; Camphausen, K.A.; Smith, Q.R. Brain metastases as preventive and therapeutic targets. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 352–363.
7. Musolino, A.; Ciccolallo, L.; Panebianco, M.; Fontana, E.; Zanoni, D.; Bozzetti, C.; Michiara, M.; Silini, E.M.; Ardizzoni, A. Multifactorial central nervous system recurrence susceptibility in patients with HER2-positive breast cancer: Epidemiological and clinical data from a population-based cancer registry study. *Cancer* **2011**, *117*, 1837–1846.
8. Grant, G.A.; Abbott, N.J.; Janigro, D. Understanding the physiology of the blood-brain barrier: *In vitro* models. *News Physiol. Sci.* **1998**, *13*, 287–293.
9. Sierra, A.; Price, J.E.; Garcia-Ramirez, M.; Mendez, O.; Lopez, L.; Fabra, A. Astrocyte-derived cytokines contribute to the metastatic brain specificity of breast cancer cells. *Lab. Invest.* **1997**, *77*, 357–368.
10. Fidler, I.J.; Yano, S.; Zhang, R.D.; Fujimaki, T.; Bucana, C.D. The seed and soil hypothesis: Vascularisation and brain metastases. *Lancet Oncol.* **2002**, *3*, 53–57.
11. Kienast, Y.; von Baumgarten, L.; Fuhrmann, M.; Klinkert, W.E.; Goldbrunner, R.; Herms, J.; Winkler, F. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat. Med.* **2010**, *16*, 116–122.
12. Deeken, J.F.; Loscher, W. The blood-brain barrier and cancer: Transporters, treatment, and Trojan horses. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 1663–1674.
13. Motl, S.; Zhuang, Y.; Waters, C.M.; Stewart, C.F. Pharmacokinetic considerations in the treatment of CNS tumours. *Clin. Pharmacokinet.* **2006**, *45*, 871–903.
14. Lockman, P.R.; Mittapalli, R.K.; Taskar, K.S.; Rudraraju, V.; Gril, B.; Bohn, K.A.; Adkins, C.E.; Roberts, A.; Thorsheim, H.R.; Gaasch, J.A. Heterogeneous blood-tumor barrier permeability determines drug efficacy in experimental brain metastases of breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 5664–5678.
15. Orive, G.; Ali, O.A.; Anitua, E.; Pedraz, J.L.; Emerich, D.F. Biomaterial-based technologies for brain anti-cancer therapeutics and imaging. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1806*, 96–107.

16. Pesce, G.A.; Klingbiel, D.; Ribbi, K.; Zouhair, A.; von Moos, R.; Schlaeppli, M.; Caspar, C.B.; Fischer, N.; Anchisi, S.; Peters, S. Outcome, quality of life and cognitive function of patients with brain metastases from non-small cell lung cancer treated with whole brain radiotherapy combined with gefitinib or temozolomide. A randomised phase II trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK 70/03). *Eur. J. Cancer* **2012**, *48*, 377–384.
17. Clarke, R. Animal models of breast cancer: Their diversity and role in biomedical research. *Breast Cancer Res. Treat.* **1996**, *39*, 1–6.
18. Clarke, R. Human breast cancer cell line xenografts as models of breast cancer. The immunobiologies of recipient mice and the characteristics of several tumorigenic cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.* **1996**, *39*, 69–86.
19. Yoneda, T.; Williams, P.J.; Hiraga, T.; Niewolna, M.; Nishimura, R. A bone-seeking clone exhibits different biological properties from the MDA-MB-231 parental human breast cancer cells and a brain-seeking clone *in vivo* and *in vitro*. *J. Bone Miner Res.* **2001**, *16*, 1486–1495.
20. Schackert, G.; Fidler, I.J. Site-specific metastasis of mouse melanomas and a fibrosarcoma in the brain or meninges of syngeneic animals. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 3478–3484.
21. Simoes, R.V.; Martinez-Aranda, A.; Martin, B.; Cerdan, S.; Sierra, A.; Arus, C. Preliminary characterization of an experimental breast cancer cells brain metastasis mouse model by MRI/MRS. *Magma* **2008**, *21*, 237–249.
22. Bower, M.; Newlands, E.S.; Bleehen, N.M.; Brada, M.; Begnet, R.J.H.; Calvert, H.; Colquhoun, I.; Lewis, P.; Brampton, M.H. Multicentre CRC phase II trial of temozolomide in recurrent or progressive high-grade glioma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1997**, *40*, 484–488.
23. Paulsen, F.; Hoffmann, W.; Becker, G.; Belka, C.; Weinmann, M.; Classes, J.; Kortmann, R.D.; Bamberg, M. Chemotherapy in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme: Ifosfamide *versus* temozolomide. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1999**, *125*, 411–418.
24. Yung, W.K.A.; Prados, M.D.; Yaya-Tur, R.; Rosenfeld, S.S.; Braba, M.; Friedman, H.S.; Albright, J.; Olson, J.; Chang, S.M.; O'Neill, A.M.; *et al.* Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with anaplastic astrocytoma or anaplastic oligoastrocytoma at first relapse. *J. Clin. Oncol.* **1999**, *12*, 2762–2771.
25. Osoba, D.; Braba, M.; Yung, W.K.A.; Prados, M.D. Health-related quality of life in patients treated with temozolomide versus procarbazine for recurrent glioblastoma multiforme. *J. Clin. Oncol.* **2000**, *18*, 1481–1491.
26. Addeo, R.; Caraglia, M.; Faiola, V.; Capasso, E.; Vincenzi, B.; Montella, L.; Guarrasi, R.; Caserta, L.; Del Prete, S. Concomitant treatment of brain metastasis with whole brain radiotherapy [WBRT] and temozolomide [TMZ] is active and improves quality of life. *BMC Cancer* **2007**, *25*, 18.
27. Tentori, L.; Graziani, G. Recent approaches to improve the antitumor efficacy of temozolomide. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 245–257.
28. Zhang, R.D.; Fidler, I.J.; Price, J.E. Relative malignant potential of human breast carcinoma cell lines established from pleural effusions and a brain metastasis. *Invasion Metastasis* **1991**, *11*, 204–215.
29. Lorger, M.; Felding-Habermann, B. Capturing changes in the brain microenvironment during initial steps of breast cancer brain metastasis. *Am. J. Pathol.* **2010**, *176*, 2958–2971.

30. *Basic Clinical Radiobiology*, 4th ed.; Joiner, M.; van der Kogel, A., Eds.; Hodder-Arnold: London, UK, 2009; pp. 102–118.
31. Kil, W.J.; Cerna, D.; Burgan, W.E.; Beam, K.; Carter, D.; Steeg, P.S.; Tofilon, P.J.; Camphausen, K. *In vitro* and *in vivo* radiosensitization induced by the DNA methylating agent temozolomide. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 931–938.
32. Tentori, L.; Leonetti, C.; Scarsella, M.; D’Amati, G.; Vergati, M.; Portarena, I.; Xu, W.; Kalish, V.; Zupi, G.; Zhang, J.; *et al.* Systemic administration of GPI 15427, a novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, increases the antitumor activity of temozolomide against intracranial melanoma, glioma, lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 5370–5379.
33. Mikkelsen, T.; Anderson, J.; Doyle, T.J.; Croteau, D.; Avedissian, R.; Ryu, S.; Schultz, L. Phase I/II dose escalation trial of concurrent temozolomide and whole brain radiation therapy for multiple brain metastasis. *J. Neurooncol.* **2010**, *100*, 241–247.
34. Price, J.E. Metastasis from human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.* **1996**, *39*, 93–102.
35. Lorgier, M.; Lee, H.; Forsyth, J.S.; Felding-Habermann, B. Comparison of *in vitro* and *in vivo* approaches to studying brain colonization by breast cancer cells. *J. Neurooncol.* **2010**, *104*, 689–696.
36. Fidler, I.J.; Balasubramanian, K.; Lin, Q.; Kim, S.W.; Kim, S.J. The brain microenvironment and cancer metastasis. *Mol. Cells* **2010**, *30*, 93–98.
37. Puduvalli, V.K. Brain metastases: Biology and the role of the brain microenvironment. *Curr. Oncol. Rep.* **2001**, *3*, 467–475.
38. Trudeau, M.E.; Crump, M.; Charpentier, D.; Yelle, L.; Bordeleau, L.; Matthews, S.; Eisenhauer, E. Temozolomide in metastatic breast cancer (MBC): A phase II trial of the National Cancer Institute of Canada-Clinical Trials Group (NCIC-CTG). *Ann. Oncol.* **2006**, *17*, 952–956.
39. Devito, N.; Yu, M.; Chen, R.; Pan, E. Retrospective study of patients with brain metastases from melanoma receiving concurrent whole-brain radiation and temozolomide. *Anticancer Res.* **2011**, *31*, 4537–4543.
40. Addeo, R.; de Rosa, C.; Faiola, V.; Leo, L.; Cennamo, G.; Montella, L.; Guarrasi, R.; Vincenzi, B.; Caraglia, M.; del Prete, S. Phase 2 trial of temozolomide using protracted low-dose and whole-brain radiotherapy for nonsmall cell lung cancer and breast cancer patients with brain metastases. *Cancer* **2008**, *113*, 2524–2531.
41. Addeo, R.; Sperlongano, P.; Montella, L.; Vincenzi, B.; Carraturo, M.; Iodice, P.; Russo, P.; Parlato, C.; Salzano, A.; Cennamo, G.; *et al.* Protracted low dose of oral vinorelbine and temozolomide with whole-brain radiotherapy in the treatment for breast cancer patients with brain metastases. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2012**, *70*, 603–609.
42. Addeo, R.; Montella, L.; Guarrasi, R.; Dello Russo, A.; Faiola, V.; del Prete, S. Temozolomide (TMZ) and radiation (XRT) for brain metastasis of solid tumors. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 1543.
43. Siena, S.; Crino, L.; Danova, M.; del Prete, S.; Cascinu, S.; Salvagni, S.; Schiavetto, I.; Vitali, M.; Bajetta, E. 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.* **2010**, *21*, 655–661.

44. Caraglia, M.; Addeo, R.; Costanzo, R.; Montella, L.; Faiola, V.; Marra, M.; Abbruzzese, A.; Palmieri, G.; Budillon, A.; Grillone, F.; *et al.* Phase II study of temozolomide plus pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of brain metastases from solid tumours. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2006**, *57*, 34–39.
45. De Rosa, G.; Salzano, G.; Caraglia, M.; Abbruzzese, A. Nanotechnologies: A strategy to overcome blood–brain barrier. *Curr. Drug Metab.* **2012**, *13*, 61–69.
46. Caraglia, M.; de Rosa, G.; Salzano, G.; Santini, D.; Lamberti, M.; Sperlongano, P.; Lombardi, A.; Abbruzzese, A.; Addeo, R. Nanotech revolution for the anti-cancer drug delivery through blood-brain barrier. *Curr. Cancer Drug Targets* **2012**, *12*, 186–196.
47. Paku, S.; Dome, B.; Toth, R.; Timar, J. Organ-specificity of the extravasation process: An ultrastructural study. *Clin. Exp. Metastasis* **2000**, *18*, 481–492.
48. Maher, E.A.; Mietz, J.; Arteaga, C.L.; DePinho, R.A.; Mohla, S. Brain metastasis: Opportunities in basic and translational research. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 6015–6020.
49. Preusser, M.; Winkler, F.; Collette, L.; Haller, S.; Marreaud, S.; Soffietti, R.; Klein, M.; Reijneveld, J.C.; Tonn, J.C.; Baumert, B.G. Trial design on prophylaxis and treatment of brain metastases: Lessons learned from the EORTC Brain Metastases Strategic Meeting. *Eur. J. Cancer* **2012**, *48*, 3439–3447.
50. Lester, J.F.; MacBeth, F.R.; Coles, B. Prophylactic cranial irradiation for preventing brain metastases in patients undergoing radical treatment for non-small-cell lung cancer: A Cochrane Review. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2005**, *63*, 690–694.
51. Aragon-Ching, J.B.; Zujewski, J.A. CNS metastasis: An old problem in a new guise. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 1644–1647.
52. Antonadou, D.; Paraskevaïdis, M.; Sarris, G.; Coliarakis, N.; Economou, I.; Karageorgis, P.; Throuvalas, N. Phase II randomized trial of temozolomide and concurrent radiotherapy in patients with brain metastases. *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 3644–3650.
53. Chambers, A.F. MDA-MB-435 and M14 cell lines: Identical but not M14 melanoma? *Cancer Res.* **2009**, *69*, 5292–5293.
54. Roman, I.; Vilalta, M.; Rodriguez, J.; Matthies, A.M.; Srouji, S.; Livne, E.; Hubbell, J.A.; Rubio, N.; Blanco, J. Analysis of progenitor cell-scaffold combinations by *in vivo* non-invasive photonic imaging. *Biomaterials* **2007**, *28*, 2718–2728.
55. Brada, M.; Judson, I.; Beale, P.; Moore, S.; Reidenberg, P.; Statkevich, P.; Dugan, M.; Batra, V.; Cutler, D. Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of temozolomide (SCH 52365) for refractory or relapsing malignancies. *Br. J. Cancer* **1999**, *81*, 1022–1030.
56. Kato, Y.; Okollie, B.; Raman, V.; Vesuna, F.; Zhao, M.; Baker, S.D.; Bhujwala, Z.M.; Artemov, D. Contributing factors of temozolomide resistance in MCF-7 tumor xenograft models. *Cancer Biol. Ther.* **2007**, *6*, 891–897.

10.4.3. ARTÍCULO 3

Martínez-Aranda A, Hernández V, Guney E, Muixí L, Foj R, Baixeras N, Cuadras D, Moreno V, Urruticoechea A, Gil M, Oliva B, Moreno F, González-Suárez E, Vidal N, Andreu X, Seguí MA, Ballester R, Castella E, Sierra A.

FN14 and GRP94 expression are prognostic/predictive biomarkers of brain metastasis outcome that open up new therapeutic strategies.

Oncotarget. 2015; 6(42):44254-73.

doi: 10.18632/oncotarget.5471

Factor Impacto (2015): 5.008

Área Conocimiento: Oncology

Rank: 36/213 // Quartil: Q1

(Referencia bibliográfica nº. 225)

FN14 and GRP94 expression are prognostic/predictive biomarkers of brain metastasis outcome that open up new therapeutic strategies

Antonio Martínez-Aranda^{1,2}, Vanessa Hernández¹, Emre Guney³, Laia Muixí¹, Ruben Foj^{1,2}, Núria Baixeras⁴, Daniel Cuadras⁵, Víctor Moreno⁵, Ander Urruticoechea⁶, Miguel Gil⁷, Baldo Oliva³, Ferran Moreno⁸, Eva González-Suarez⁹, Noemí Vidal⁴, Xavier Andreu¹⁰, Miquel A. Seguí¹¹, Rosa Ballester¹², Eva Castella¹³, Angels Sierra^{1,14}

¹Biological Clues of the Invasive and Metastatic Phenotype Group, Molecular Oncology Department, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

²Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Biochemistry and Molecular Biology Department, Faculty of Biosciences, Campus Bellaterra, Edifici C, Cerdanyola del Vallés, 08193 Barcelona, Spain

³Structural Bioinformatics Laboratory, Experimental Sciences Department, Universitat Pompeu Fabra-IMIM, Barcelona Research Park of Biomedicine, 08003 Barcelona, Spain

⁴Servei d'Anatomia Patològica, Hospital Universitari de Bellvitge, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

⁵Biomarkers and Susceptibility Unit, Institut Català d'Oncologia - IDIBELL, Hospital Duran i Reynals, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

⁶Breast Cancer Unit and Neurooncology Unit, Institut Català d'Oncologia - IDIBELL, Hospital Duran i Reynals, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

⁷Oncology Service, Institut Català d'Oncologia - IDIBELL, Hospital Duran i Reynals, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

⁸Radiation Oncology Service, Institut Català d'Oncologia - IDIBELL, Hospital Duran i Reynals, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

⁹Transformation and Metastasis Grup, Cancer Epigenetics and Biology Department, IDIBELL, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

¹⁰Pathology Service, Corporació Sanitaria Parc Taulí, 08208 Sabadell, Spain

¹¹Oncology Service, Corporació Sanitaria Parc Taulí, 08208 Sabadell, Spain

¹²Radiation Oncology Service, Institut Català d'Oncologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, 08916 Badalona, Spain

¹³Pathology Service, Institut Català d'Oncologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, 08916 Badalona, Spain

¹⁴Molecular and Translational Oncology Laboratory, Biomedical Research Center CELLEX-CRBC Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer-IDIBAPS 08036 Barcelona, Spain

Correspondence to:

Angels Sierra, e-mail: asierrajim@gmail.com, masierra@clinic.ub.es

Keywords: biomarkers, brain metastasis, breast cancer, FN14, GRP94

Received: April 17, 2015

Accepted: October 09, 2015

Published: October 19, 2015

ABSTRACT

Brain metastasis is a devastating problem in patients with breast, lung and melanoma tumors. GRP94 and FN14 are predictive biomarkers over-expressed in primary breast carcinomas that metastasized in brain. To further validate these brain metastasis biomarkers, we performed a multicenter study including 318 patients with breast carcinomas. Among these patients, there were 138 patients with metastasis, of whom 84 had brain metastasis. The likelihood of developing brain metastasis increased by 5.24-fold (95%CI 2.83–9.71) and 2.55- (95%CI 1.52–4.3) in the presence of FN14 and GRP94, respectively. Moreover, FN14 was more sensitive than ErbB2 (38.27 vs. 24.68) with similar specificity (89.43 vs. 89.55) to predict brain metastasis and had identical prognostic value than triple negative patients ($p < 0.0001$). Furthermore, we used GRP94 and FN14 pathways and GUILD, a network-based disease-gene prioritization program, to pinpoint the genes likely to be therapeutic targets, which resulted in FN14 as the main modulator and thalidomide as the best scored drug. The treatment of mice with brain metastasis improves survival decreasing reactive astrocytes and angiogenesis, and down-regulate FN14 and its ligand TWEAK. In conclusion

our results indicate that FN14 and GRP94 are prediction/prognosis markers which open up new possibilities for preventing/treating brain metastasis.

INTRODUCTION

Brain metastasis (BrM) occurs mainly after the diagnosis of systemic metastases in up to 30% of cancer patients [1, 2]. Despite the improvement in systemic therapies and the availability of more frequent imaging, central nervous system (CNS) relapse is emerging as an increasing clinical problem in up to 40% of cancer patients [3, 4]. The mean survival of these patients is 7 months [5, 6], posing CNS relapse a key research challenge.

The cross-subtype comparison involving both wet-lab and clinical studies reflects the heterogeneity of carcinomas to brain metastasis progression [7]. It is now recognized that breast cancer is composed of several subtypes [8–10]. The large numbers of differentially expressed genes in the five molecular subtypes of breast carcinoma confirm the diversity of the underlying biology [11]. These biomarkers include the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and human epidermal growth factor receptor 2 (ErbB2 or HER2). ER and PR positivity define Luminal tumors A and B, whereas ErbB2 expression occurs in hormone positive and in negative tumors and basal tumors are characterized by the absence of these biomarkers. Moreover, the clear differences in metastatic potential between subtypes raise the question as to whether some tumors are “hardwired” to metastasize to the brain [12, 13]. Known predictive factors for BrM are: (i) overexpression of ErbB2, (ii) lack of hormone receptor expression, (iii) triple-negative subtype (TNBC) with ER and PR-negative and normal ErbB2, (iv) patient age under 50 years and (v) the presence of positive regional lymph nodes and lung metastases [14, 15]. The basal subtype has the worst prognosis (3–4 months) and ErbB2-negative/hormone receptor positive disease has the best prognosis (over 20 months). In a retrospective series of metastatic breast carcinoma (MBC) patients treated with trastuzumab, 52% of them succumbed to CNS progression although the non-CNS disease was stable or responsive [16].

Different primary tumor types exhibit remarkable differences in developing BrM. Both small cell and non-small cell lung carcinomas, kidney cancer and melanoma are the principal tumors with brain metastasis ability [3]. Alterations in the expression of several genes, including ST6GALNAC5, transforming growth factor- β , vascular endothelial growth factor, Serpine 1 and Timp 1 have been implicated in brain metastasis [17]. In lung cancer the genes mostly associated with brain metastasis are EGFR, KRAS mutation at codon 12 and several chromosomal imbalances [18].

Therefore, understanding the properties of brain-trophic tumor cells is essential to identify patients with risk of brain metastasis and to effectively prevent it [19]. A research priority is to delineate pathogenic mechanisms of metastasis to the brain that would enable the heterogeneity among tumors to differentiate between indolent and aggressive lesions.

Patients with ErbB2-positive or TNBC have an increased risk of BrM development [20, 21]. A recent study reported that both basal-like and claudin-low breast cancers exhibited a high probability of metastasizing to the brain and lung, while ErbB2-enriched tumors preferentially colonized the liver [12]. It has been observed that active WNT/b-catenin signaling contributes to the metastasis of basal breast tumors to the brain, whereas the absence of WNT/beta-catenin signaling allows luminal B-type tumors to metastasize to bone [13]. Moreover, a 13-gene signature predicting rapid development of brain metastases in patients with ErbB2-positive advanced breast cancer may be useful in the design of preventive therapies [19]. We identified an expression signature based on breast cancer BrM cells mapped onto an experimental protein–protein interaction network, which found 37 proteins differentially expressed in brain metastases [23]. The combination of GRP94, FN14 and TRAF2 expression, and the absence of Inhibin in breast carcinomas, referred to as the endoplasmic reticulum stress resistance phenotype (ERSRP), was the best signature for discriminating between breast carcinomas according to their BrM progression, regardless of whether or not they expressed ErbB-2 [24].

Bearing in mind that metastasis could already be underway at the time of diagnosis [25], ERSRP provides a predictive tool to help decide on treatment under the risk of BrM progression. We performed a multicenter study with breast carcinomas provided from three different hospitals and assessed ERSRP expression in tissue microarrays to independently validate it. Over-expression of GRP94 and FN14 in primary breast cancer was confirmed as a BrM predictor and the presence of FN14 and GRP94 in pairs of tumor/brain metastasis of lung and clear cell kidney carcinomas suggest that this phenotype might indicate BrM in tumors from different tissues. Moreover, we used bioinformatics tools such as BIANA [26] and GUILD [27] to prioritize genes implicated in BCBrM progression, and based on the network topology we assessed the level of association of genes with BCBrM (GUILD scores). We then ranked drugs using the GUILD score of their targets and produced a list of candidate drugs with high therapeutic potential, which were validated in preclinical experiments. Moreover, the preliminary experimental results suggested that the therapeutic activity of thalidomide derivatives might be dependent on brain organ-specific microenvironmental factors produced by reactive astrocytes.

RESULTS

GRP94 and FN14 are biomarkers that predict brain metastasis progression in breast cancer patients

On the basis of retrospective observations, risk factors for the development of CNS metastases from breast cancer

included patient characteristics and biological features of tumors such as ER negativity, ErbB2 positivity, a large primary tumor and loss of histopathological differentiation [35]. Among clinical parameters the presence of lymph-node metastasis is intrinsic to establishing the breast cancer prognosis [36]. We took all of these parameters into account when evaluating the contribution of the previously defined breast cancer brain metastasis biomarkers (BCBrMBK): GRP94, TRAF2, FN14 and Inhibin [24].

The overexpression of BCBrMBK was categorized as positive when strong expression was detected in more than 70% of tumor cells (Figure 1A). On this basis, GRP94 was overexpressed in 48.2% (151/313), FN14 in 17.9% (55/308) and TRAF2 in 31.4% (97/309) of tumors. Inhibin expression, which was inversely associated with brain metastasis progression, was found in only 3.57% (11/308) of samples. The variation in the denominators is the result of taking into account the missing values in the immunohistochemistry data (tissue lost, unviable staining, background, etc.).

We first analyzed the association between the overexpression of proteins and the clinico-pathological features of the patients (Table 1). Patients with infiltrated axillary lymph nodes overexpressed GRP94 (Chi-square test, $p = 0.049$), whereas tumors with a high histological grade (III) were associated with FN14 expression (Chi-square test $p = 0.004$). The expression of both markers was associated with ErbB2 positivity ($p = 0.013$ and $p = 0.005$, respectively). Moreover, the expression of biomarkers was not associated with hormone receptors. The combination of negative hormone receptors and ErbB2 expression in TNBC patients was independent from the expression of GRP94 ($p = 0.481$) and FN14 ($p = 0.914$).

Statistical analysis of the data showed significant associations between BrM progression and high expression of GRP94 ($p = 0.0004$) and FN14 ($p < 0.0001$). The expression of TRAF2 was marginally associated with brain metastasis ($p = 0.084$). Inhibin was not correlated with BrM relapse ($p = 0.428$).

As expected, the ErbB2 expression detected in 14.4% (42/292) of patients (26 missing values) was significantly associated with BrM ($p = 0.003$): 24.7% (19/77) of breast cancers that progressed to brain metastasis were positive *versus* 12.8% (6/47) and 10.1% (17/168) of breast carcinomas that relapsed in other locations (such as lung, liver, bone or non-regional lymph nodes) or without metastasis, respectively. The incidence of BrM in patients with hormone receptors that expressed ErbB2 was 11.5%.

A total of 15.5% (46/297) of patients (21 missing values) were triple-negative (TNBC) with an increased risk of BrM progression ($p < 0.0001$). The incidence of BrM in this group was 58.7% (27/46); 15.2% (7/46) of patients had non-brain metastasis (lung, liver, bone or non-regional lymph nodes) and 26.1% (12/46) of patients did not progress to metastasis ($p < 0.0001$).

We found no correlation between lung, bone or liver metastasis and high levels of expression of BCBrMBK.

The overexpression of GRP94 in patients who developed brain metastasis was 65.1% (54/83), whereas GRP94 overexpression was found in 42.2% (97/230) in the other and non-metastasis group. FN14 was overexpressed in 38.3% (31/81) of brain metastasis relapse patients and only in 10.6% (24/227) of the others and non-metastasis group. The variation in the denominators is the result of taking into account the missing values of clinicopathological data.

The multivariate analysis comparing samples from patients who relapsed in the brain versus those who relapsed in other organs and without metastasis, indicated that the likelihood of relapse in patients with GRP94-positive tumors was 2.55-fold higher (95% CI 1.52–4.3, $p = 0.0003$) and increased to up to 5.24-fold higher (95% CI 2.83–9.71, $p < 0.0001$) if the tumors expressed FN14 (Table II). The combination of both markers was significantly associated to brain metastasis ($p = 0.0014$). These results indicated the predictive potential of both molecules for establishing the risk associated with a tumor that shows these characteristics. The overexpression of TRAF2 in tumors was associated with a 1.60-fold increased likelihood of relapse in the brain, although this increase was not significant ($p = 0.086$).

When multivariate analysis was corrected by the covariables tumor size, histological grade, lymph nodes, hormone receptors, ErbB2, therapy (adjuvant chemotherapy and hormones), the best predictive markers for the presence of BrM were FN14 ($p < 0.0001$) followed by GRP94 ($p = 0.0017$). These results confirmed the independence of both biomarkers from the classical categorization of breast carcinomas and from the five breast cancer subtypes, and reinforce their intrinsic value as biomarkers for predicting BrM relapse, whereas TRAF2 and Inhibin were no longer significant ($p = 0.481$ and $p = 0.736$, respectively).

A multivariate analysis based on stepwise logistic regression retained GRP94 and FN14 as the best combination for predicting brain metastasis (Figure 1B). We calculated the positive and negative likelihood ratios to assess the predictive accuracy of each molecule as a BrM marker, considering the sensitivity and specificity of each. GRP94 was the most sensitive (0.65) and FN14 the most specific (0.89), and the combination of both increased the predictability of brain metastasis risk (AUC = 0.69) above that ascribed to ErbB2 overexpression (AUC = 0.57). Since FN14 had better sensitivity than ErbB2 (38.27% *vs.* 24.68%), the additional information on ErbB2 status did not improve the prediction of BrM in breast cancer patients (AUC = 0.69). Therefore, the expression of FN14 in primary tumors was by far the strongest predictor of the likelihood of BrM in breast cancer patients and could be used to stratify patients according to their risk of developing BrM, both for therapeutic decision making at first diagnosis and to indicate preventive treatments.

GRP94 and FN14 were also expressed in tumor metastasis brain pairs from non-small cell lung carcinoma

and clear cell kidney carcinoma patients (Figure 1C). Both, FN14 and GRP94 expression in primary tumors and the corresponding brain metastasis, being GRP94 more sensitive to distinguish brain metastasis ability. In lung tumors FN14 expression might be only circumscribed to a subtype from those which develop brain metastasis.

The expression of FN14 is a prognostic marker in breast cancer patients

The unpredictable clinical behavior of TNBC and ErbB2-positive tumors reflects the biological heterogeneity of the disease [19, 33, 37, 38]. We analyzed BrM-free survival (Figure 2A), the number of months from diagnosis of primary tumor to diagnosis of brain metastasis, and we correlated with patients according to whether the tumors were TNBC (bottom-right panel) or expressed ErbB2 (bottom-left panel), FN14 (upper-left panel) or GRP94 (upper-right panel). Patients with FN14-positive tumors (81/308, 10 deleted due to missingness), Figure 2A, had a shorter BrM-free survival than patients with negative tumors ($p < 0.0001$) and 31 developed brain metastasis; similar to that of TNBC patients (77/301, $p < 0.0001$). Patients with ErbB2-positive tumors (77/297, $p = 0.002$) and GRP94-positive tumors (83/313, $p = 0.002$)

also had a significantly shorter BrM-free survival than patients whose tumors did not express the protein. These results confirmed that FN14 and GRP94 have prognostic value as widely accepted breast cancer prognostic markers.

Since adjuvant therapy is selected according to the biological features of the primary tumor, and as long-term efficacy implies the lack of disease relapse, we assessed whether FN14 and GRP94 predicted the response to adjuvant therapy by evaluating overall survival (Figure 2B). Interestingly, patients treated with taxanes survived a shorter period with regard to other therapeutic regimens (upper-left panel) when tumors expressed FN14 (16/37, $p = 0.048$). In contrast, the survival of patients with FN14-negative tumors (upper-right panel) was similar in those treated with taxanes or with other therapeutic regimens (36/150, $p = 0.360$). These results show that FN14 predicted taxane protocol failure in breast cancer patients, suggesting a relationship between FN14 expression and the shortening of BrM-free survival ($p = 0.066$) in patients treated with taxanes (bottom-left panel). In contrast, BrM-free survival was not associated with the therapeutic protocol in patients with FN14-negative tumors (bottom-right panel).

The association between FN14 expression and the efficacy of taxanes against breast cancer *in vivo* was

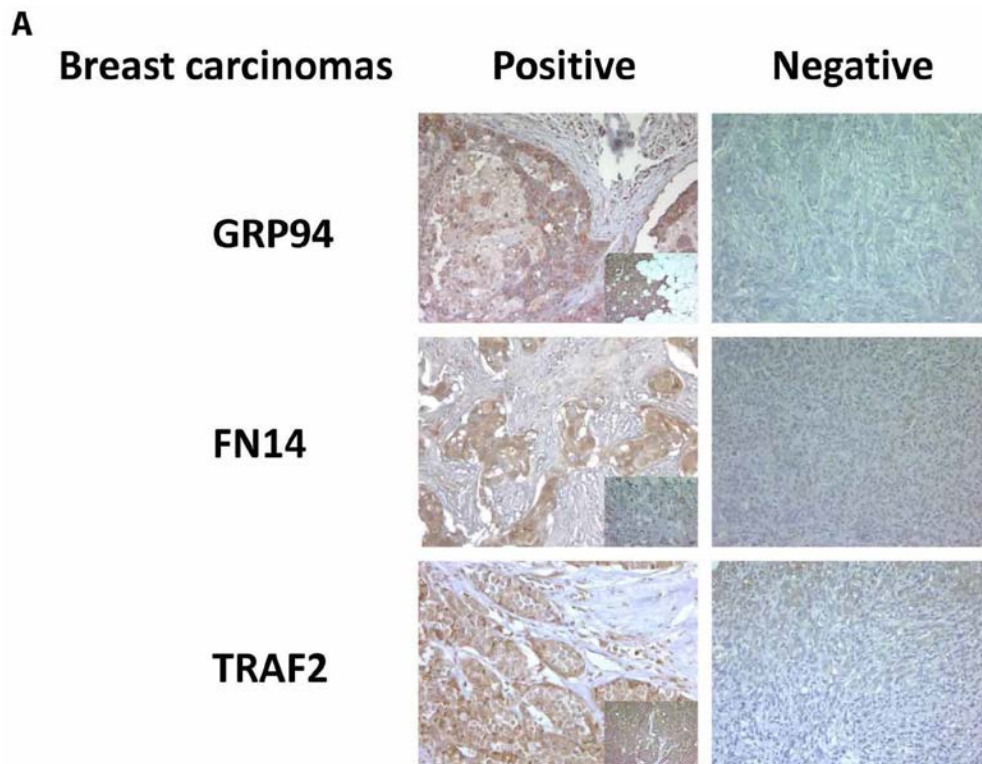
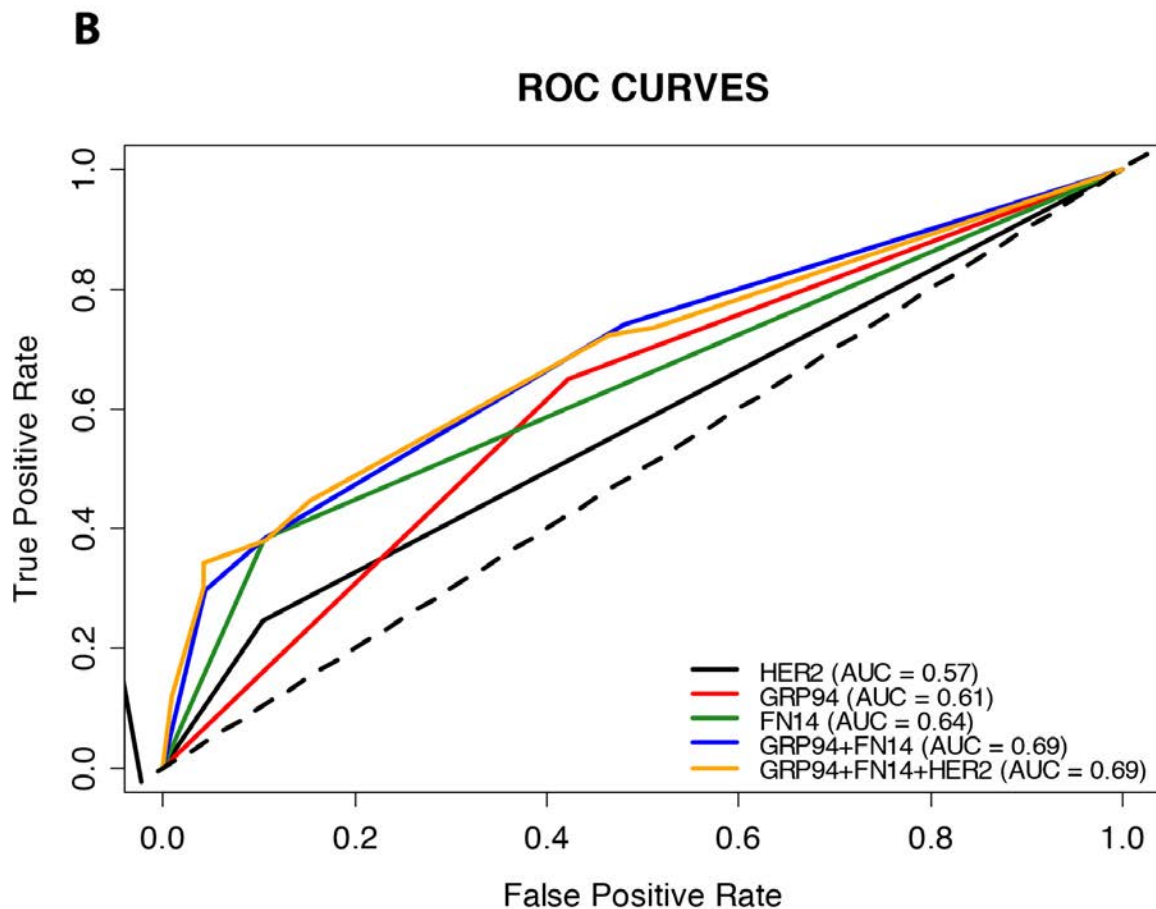


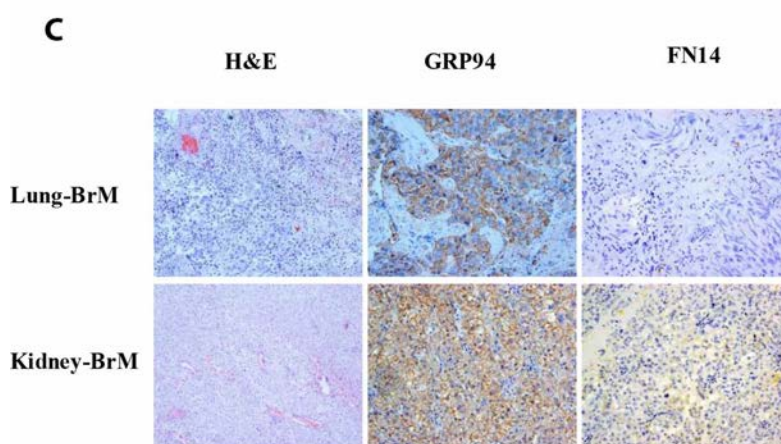
Figure 1: GRP94 and FN14 expression predict brain metastasis progression in breast cancer patients. A. TMA were used to identify the indicated proteins by IHC analysis in paraffin-embedded primary breast carcinomas (x 20). To score the positivity of the three proteins we considered samples with more than 70% of tumor positive cells with high levels of staining to represent positive control samples (small squares in the left column), ignoring samples with less intense staining or fewer positive cells. (Continued)



Brain Biomarkers	Sensitivity %	Specificity %
GRP94	65.06	57.83
FN14	38.27	89.43
ErbB2	24.68	89.55
GRP94 + FN14	74.07	51.98
GRP94 + FN14 + ErbB2	72.37	53.49

Figure 1: (Continued) GRP94 and FN14 expression predict brain metastasis progression in breast cancer patients.

B. The area under the ROC curve obtained with the integrated predictive indexes. Markers were assessed in a multivariate logistic regression model using a forward stepwise procedure to identify the best combination for predicting brain metastasis. The area under the ROC curve obtained for ErbB2 alone (AUC = 0.57), for GRP94 (AUC = 0.61), FN14 (AUC = 0.64) and the combination of GRP94 and FN14 (AUC = 0.69) and for ErbB2, GRP94 and FN14 (AUC = 0.69), is represented in the upper part of the figure. The sensitivity and specificity of the markers are shown in the lower part of the figure, indicating the most specific GRP94 and the most sensitive FN14, which was similar to ErbB2 in terms of sensitivity and specificity. (Continued)



	GRP94		FN14	
	Tumor	BrMets	Tumor	BrMets
Lung	4/4	4/4	1/4	1/4
kidney	4/4	4/4	3/4	3/4

Figure 1: (Continued) GRP94 and FN14 expression predict brain metastasis progression in breast cancer patients. C. Expression of GRP94 and FN14 in four pairs tumor/BrM of lung and clear cell kidney carcinomas. Representative IHC of BrM are showed in the upper part of the figure and at the bottom the relation of positive samples of each protein.

explored by performing experiments with two TNBC breast cancer xenografts obtained from breast cancer patients that expressed (TNBC-EG) or did not express (TNBC-1070) FN14 (Supplementary Figure S1A, right panel and left panel, respectively). Although docetaxel treatment diminished the growth of tumors with regard to controls after 15 days of treatment in both models (Supplementary Figure S1B), the rate of increase of the tumor volume was reduced only 50% ($p = 0.003$) in FN14-positive tumors, whereas the rate of increase was reduced by 85% ($p < 0.001$) in FN14-negative tumors with regard to the control.

The survival of patients given adjuvant treatments, either taxanes or other chemotherapeutic protocols (Supplementary Figure S2), was not correlated with GRP94 expression in tumors, whether positive ($N = 98$) or negative ($N = 92$), $p = 0.31$ and $p = 0.29$, respectively. These results indicate GRP94 and FN14 are involved in different pathways and functions in BrM progression, suggesting that both biomarkers might be therapeutically inhibited.

Modeling personalized therapies to prevent brain metastases using GRP94 and FN14 pathways

The remarkable diversity in breast cancer dictates that adjuvant management must be biologically driven [39], and

thus early breast cancer assessment with tools for prognosis and prediction of treatment benefit may aid clinical decision making. Indeed, an important question is how to identify the specific adjuvant interventions that would improve the prognosis of BC patients with risk of BrM progression. Since the pathophenotype is the outcome of perturbations in the underlying regulatory pathways, we designed experiments to highlight the usefulness of BCBrMBK expression in choosing the most appropriate adjuvant therapy.

We have previously cataloged the organ-specific metastasis signature (BOSMS) with a hierarchical clustering containing 1,193 genes after one-versus-all (ONA) class comparisons, which clearly distinguished between the different metastases [40]. These datasets, under the identification number GSE11078, are freely available from the Gene Expression Omnibus (GEO) repository. The BOSMS mapped human brain metastasis expression profiles with a PPIN to maximize accuracy in the classification of brain metastasis proteins and permitted the identification of protein folding and chaperones connecting different functions and performing the endoplasmic reticulum stress resistance phenotype (ERSRP) [24]. Indeed, rather than having random connections through the network, the interaction of proteins encoded by genes implicated in such phenotypes involves partners from similar diseases [26]. We used these

Table 1: Association between clinical and pathological characteristics and the expression of breast cancer brain metastasis biomarkers

	GRP94 (N = 313)*	FN14 (N = 308)*	TRAF2 (N = 309)*
	No. Patients (%)**	No. Patients (%)**	No. Patients (%)**
	151 (48.2)	55 (17.9)	97 (31.4)
Tumor Size			
≤ 2 cm	78 (45.6)	24 (14.2)	55 (32.7)
> 2 cm	65 (52.8)	25 (20.7)	34 (27.7)
	<i>Chisq2 test p = 0.269</i>	<i>Chisq2 test p = 0.198</i>	<i>Chisq2 test p = 0.422</i>
Axillary Lymph Node			
0	78 (50.7)	23 (15.0)	44 (28.8)
1–3	30 (37.0)	13 (16.5)	25 (31.7)
≥4	37 (56.1)	15 (23.4)	22 (33.9)
	<i>Chisq2 test p = 0.049</i>	<i>Chisq2 test p = 0.320</i>	<i>Chisq2 test p = 0.738</i>
Histological Grade			
I	5 (31.3)	3 (18.8)	6 (37.5)
II	74 (51.8)	14 (9.8)	43 (30.5)
III	66 (50.0)	32 (25.2)	41 (31.5)
	<i>Chisq2 test p = 0.298</i>	<i>Chisq2 test p = 0.004</i>	<i>Chisq2 test p = 0.848</i>
Steroid Receptors			
Estrogen +	104 (46.9)	34 (15.5)	70 (31.8)
Estrogen –	37 (48.7)	18 (24.3)	23 (31.1)
	<i>Chisq2 test p = 0.886</i>	<i>Chisq2 test p = 0.124</i>	<i>Chisq2 test p = 0.979</i>
Progesterone +	87 (45.1)	33 (17.3)	57 (29.8)
Progesterone –	52 (51.5)	19 (19.4)	35 (35.4)
	<i>Chisq2 test p = 0.356</i>	<i>Chisq2 test p = 0.779</i>	<i>Chisq2 test p = 0.411</i>
ErbB2			
Positive	27 (65.9)	14 (35.0)	17 (42.5)
Negative	110 (43.7)	38 (15.1)	75 (29.9)
	<i>Chisq2 test p = 0.013</i>	<i>Chisq2 test p = 0.005</i>	<i>Chisq2 test p = 0.158</i>
Subtypes			
Triple Negative	18 (41.9)	7 (16.2)	12 (27.9)
Others	125 (49.0)	46 (18.3)	82 (32.5)
	<i>Chisq2 test p = 0.481</i>	<i>Chisq2 test p = 0.914</i>	<i>Chisq2 test p = 0.671</i>

*The variation in the denominators is the result of taking into account the missing values in the IHC data (tissue lost, unviable staining, background, etc.).

**The percentages of positive tumors distributed according to clinical and pathological characteristics of patients.

data, together with systems biology and computational approaches, to create treatment strategies using the BCBrMBK. First we listed the brain organ-specific genes/proteins [24, 41], including up- and downstream molecules of signaling pathways connected functionally

with GRP94 and FN14 (Supplementary Table S1). Using GUILD, a bioinformatics software [28], the brain organ-specific genes and the PPIN, we prioritized the genes for BCBrMK based on the network topology. The best-positioned molecule in the ranking was FN14, followed

Table 2: Odds ratio for brain metastasis according to the expression of breast cancer brain metastasis biomarkers in primary tumors

	Metastases Incidence		OR	(95% CI)	p - value
	BRAIN	OTHERS & NON MET			
GRP94	54/83 (65.1%)	97/230 (42.2%)	2.55	(1.52 - 4.3)	0.0003
FN14	31/81 (38.3%)	24/227 (10.6%)	5.24	(2.83 - 9.71)	< 0.0001
TRAF2	32/82 (39.0%)	65/227 (28.6%)	1.60	(0.94 - 2.71)	0.0859

* The variation in the denominators is the result of taking into account the missing values in the IHC data (tissue lost, unviable staining, background, etc.).

by TRAF2, TANK, TP53 and HSP90B1 (GRP94) in fifth position (Supplementary Table S2).

Candidate drugs in brain metastatic breast cancer were retrieved from the DrugBank and drugs were ranked using the score for brain metastasis proteins (Figure 3). As shown at the bottom of Figure 3, the most specific drugs intercepting the BCBBrMBK pathways are thalidomide, overall score (*o.s.*) = 0.195, vorinostat *o.s.* = 0.095 and bevacizumab *o.s.* = 0.078.

The ranking of molecules under thalidomide therapeutic action included TNF α as the best therapeutic target in position 194. Other proteins linked to thalidomide therapy were positioned downstream: PTGS2 (246), NFKB1 (1326), and FGFR2 (5800), (Supplementary Table S3).

Other drugs retrieved from the DrugBank for the drugs in the Medtrack file were: cytarabine, lomustine and methotrexate, which mechanism of action involved POLB, STMN4 and DHFR, respectively (Supplementary Table S3). Temozolamide was retrieved without a known molecule. Heat shock inhibitors were retrieved from the DrugBank below position 8659, the rank of bevacizumab action over the VEGFA protein.

Targeting FN14 with thalidomide derivatives improves brain metastasis outcome in preclinical experimental models

Since GUILD retrieved FN14 as the main regulator of BrM protein-protein interacting network, we hypothesized that thalidomide therapy could impair FN14/TWEAK function in the BrM.

It is well known that FN14 belongs to the TNFR family and is activated by its specific ligand TWEAK and by TNF α [42]. Among other cytokines TWEAK is expressed in brain, mainly produced by astrocytes and microglial cells [43]. The binding of TWEAK to FN14 has a direct effect on the composition of the basal lamina (BL) and on the perivascular astrocytes (PA), regulating their interaction with endothelial cells (EC)

and regulating the function of the BBB in the EC-BM-astrocyte interface [44].

To analyze if LND can impair FN14/TWEAK *in vivo*, we performed experiments to inhibit BrM growth in a classical model of brain metastasis [30], where the proprietary cells BRV5eGFP-CMV/Luc (BrV5), obtained from 435Br1 cells by *in vivo/in vitro* selection, were injected intra-cranially by stereotaxia to homogenize the groups of treatment. The cellular burden was followed by luminescence to assess the volume slope of intracranial masses in animals treated with the vehicle or with a thalidomide derivative lenalidomide (LND), the weight of the animals was monitored three times a week (m-w-f) and the bioluminescence analysis was done twice a week (m-f) until the symptoms of metastasis appeared. The differences observed in the increasing rate of bioluminescence between the two groups (treated or not with LND) were not statistically significant (Student test, $p = 0,39$), due in part to the heterogenic growth of cells (Figure 4A). In addition, we analyzed mice survival and the results showed moderate differences (Figure 4B) between treated and non-treated mice ($p = 0.080$). The IHC analysis of brain tissues showed that LND decreased the expression of FN14 in tumoral cells (Figure 4C).

These results fit with the survival of 435Br1 cells stimulated with TWEAK (Supplementary Figure S3A and S3B), which increased with regard to parental cells, suggesting the high functionality of the FN14/TWEAK pathway. Moreover, we found an $IC_{50} > 100 \mu M$ when challenged 435Br1 cells with LND. Therefore, LND does not exert *in vitro* cytotoxicity against carcinoma cells, as was the case in human myeloma cell lines challenged *in vitro* with the cell-extrinsic component of the antineoplastic activity of LND, which prevails over its cell-intrinsic counterpart [45]. In contrast, 435Br1 cells overexpressed GRP94 (Supplementary Figure S4A), and the heat shock protein inhibitor (NVP-AUY922) [46] was highly cytotoxic and the IC_{50} was 10–20 nM (Supplementary Figure S4B).

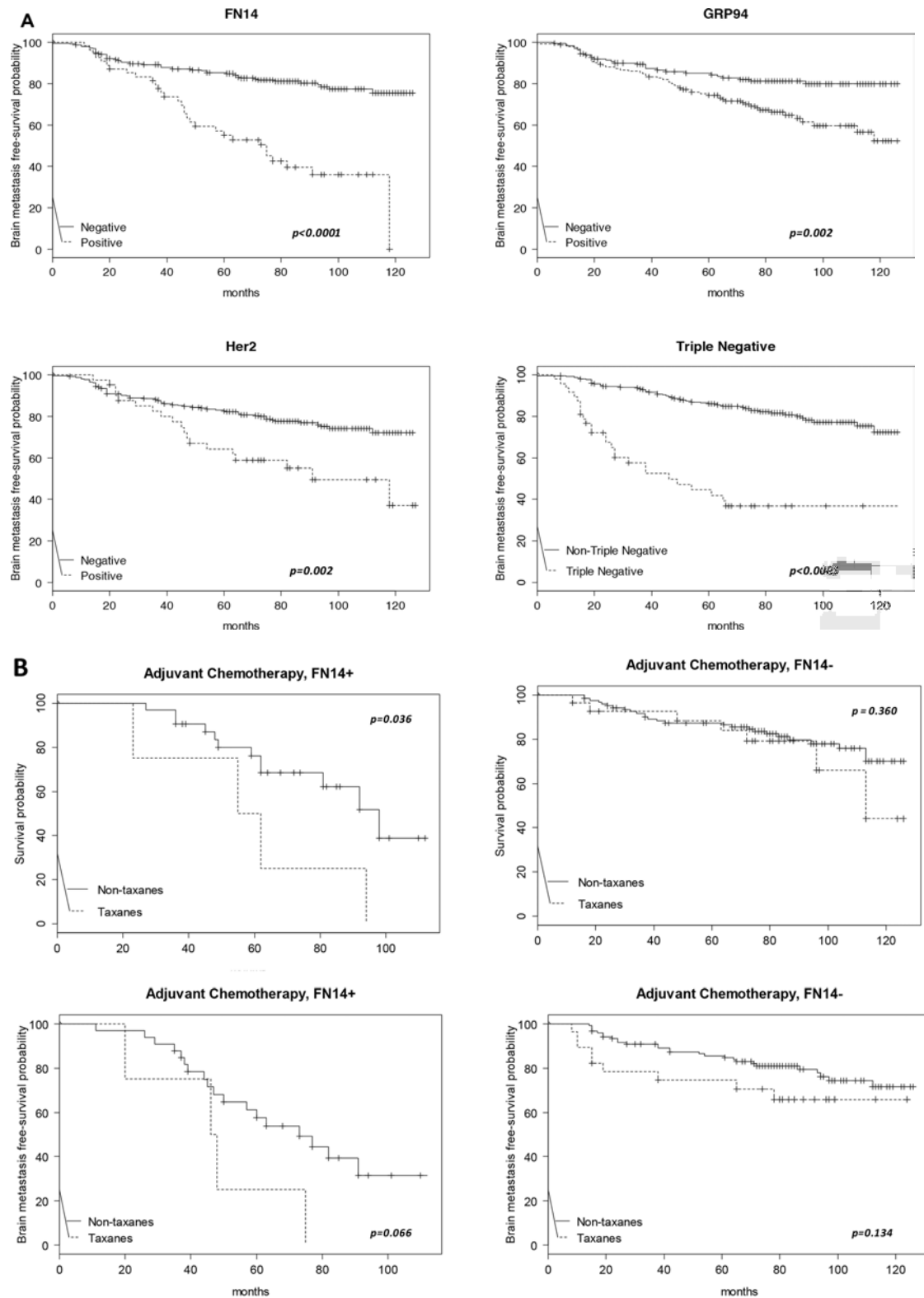
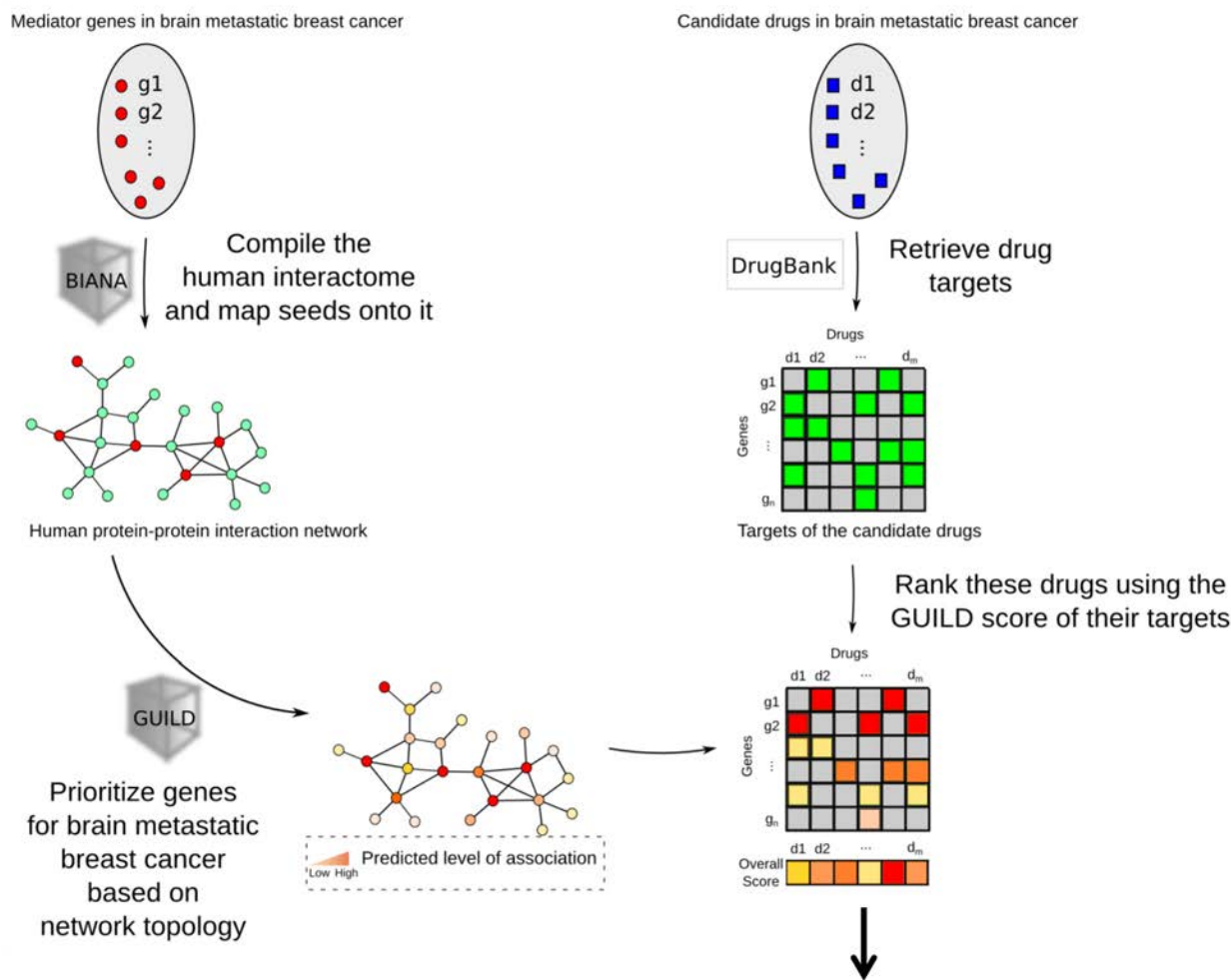


Figure 2: Kaplan-Meier survival estimates of brain metastasis-free survival among patients. A. According to the expression of FN14 (total $N = 308$, events $N = 81$), GRP94 (total $N = 313$, events $N = 83$), ErbB2 (total $N = 297$, events $N = 77$) and TNBC (total $N = 301$, events $N = 77$). The p values were obtained from the log-rank test. B. Kaplan-Meier survival estimates of overall free survival (both upper panels) and brain metastasis-free survival (both bottom panels) among patients who received chemoadjuvant therapy, with or without taxanes, according to the FN14 expression in tumors.



Drug	Overall score*	Rank among candidates
thalidomide	0,195113361	1
vorinostat	0,095460724	2
bevacizumab	0,077942467	3
cytarabine	0,039935	4
methotrexate	0,034064	5
lomustine	0,021451	6

Figure 3: Modeling personalized therapies to prevent brain metastases using GRP94 and FN14 pathways as targets. Workflow chart describing the process of prioritizing genes involved in breast cancer brain metastasis based on network topology, retrieval of drugs from the DrugBank and ranking of these drugs using the GUILD score to determine the best treatment. The list of targets prioritized is shown at the bottom, indicating that thalidomide is the best drug to target FN14.

We analyzed the contribution of the CNS micro-environment in brain metastasis from treated and control mice. The expression of reactive astrocytes around cancer cells diminished together with the down regulation of TWEAK and CD31 expression in treated mice with regard to controls (Figure 4D). These results indicated that LND had a microenvironmental action in BrM that can involve astrocyte response and angiogenesis.

Furthermore, we analyze LND activity in adjuvancy with the cytotoxic drug, synchronizing the same scheme of LND treatment with NVP-AUY922 (Figure 4E and 4F). The mice had a significantly lower tumor burden slope than those treated with the vehicle or with NVP-AUY922 alone and the survival of mice differed significantly between groups (NVP-AUY922 + LND vs. CTR, $p = 0.012$; NVP-AUY922 + LND vs. NVP-AUY922, $p = 0.033$). In contrast, the survival of mice treated with NVP-AUY922 alone

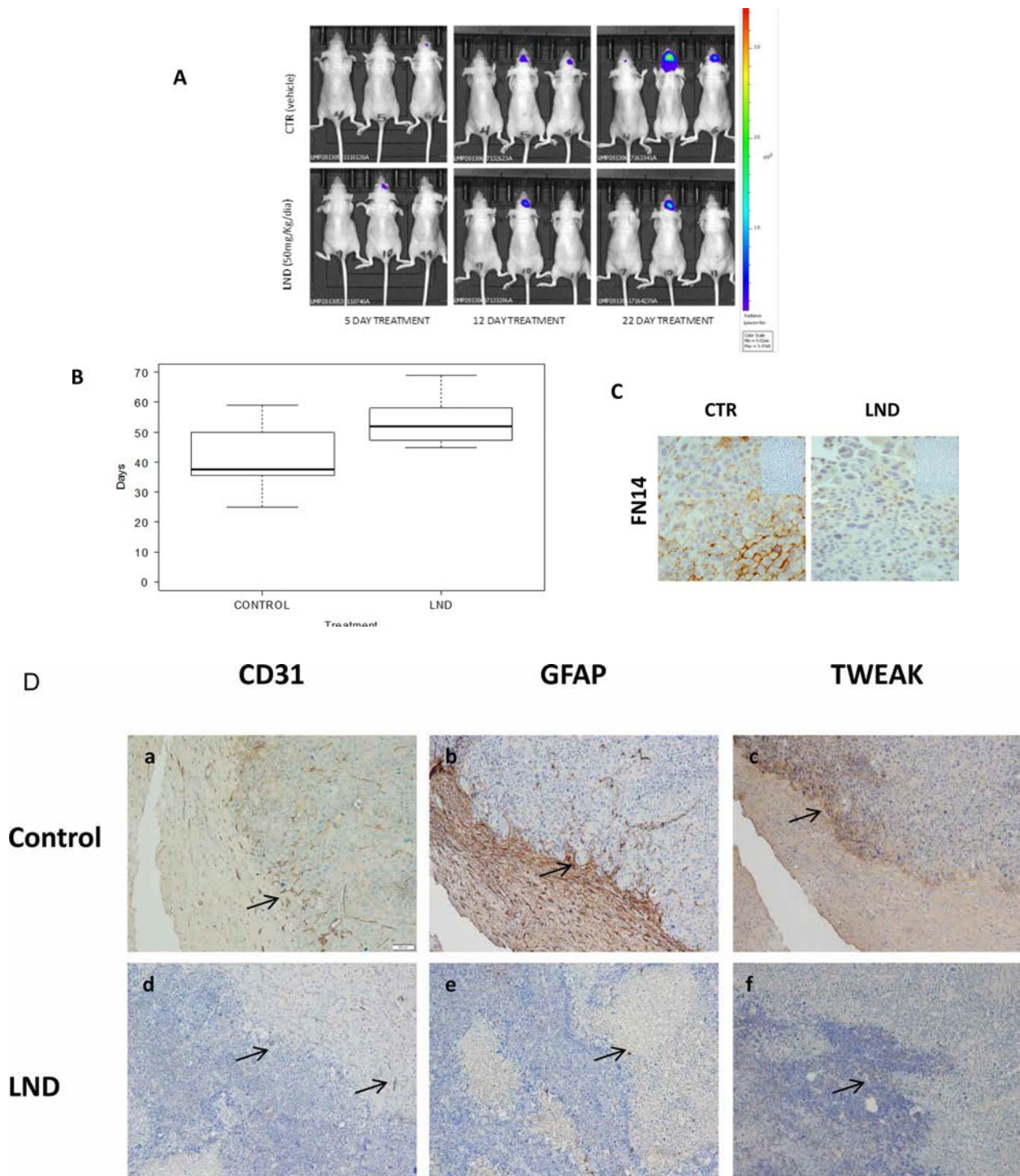


Figure 4: Experimental brain metastasis models to validate the therapeutic effect of a thalidomide derivative. Lenalidomide, 50 mg/Kg/day, alone or in combination with Docetaxel 15 mg/Kg/day and NVP-AUY922 (NVP) 30 mg/Kg/day. Docetaxel was administered every 4 days for 2 weeks and NVP-AUY922 every 2 days for 2 weeks. **A.** Representative images show bioluminescence in animals at day 5, 12 and 22 from the start of LND treatment 50 mg/Kg/day every day (Celgene Corporation, Summit, NJ). **B.** The survival time (box plot) of mice treated with LND ($N = 8$) or with vehicle (Control, $N = 8$) was evaluated using the log-rank test ($p = 0.0802$) and the differences observed in the survival rate between the two groups (treated or not with LND) are represented. **C.** IHC analysis in paraffin-embedded experimental brain metastasis ($\times 20$) shows the downregulation of FN14 in mice treated with LND. **D.** IHC analysis in paraffin-embedded experimental brain metastasis ($\times 20$). Representative figures showing the upfront of the metastasis invading the brain tissue in controls (upper part of the figure). Each protein expressed is indicated. CD31 **a.** GFAP **b.** and TWEAK **c.** Decreased angiogenesis **d.** few reactive astrocytes **e.** and downregulation of TWEAK **f.** indicated with arrows in tissues from mice treated with LND with regard to controls (lower part of the figure). (*Continued*)

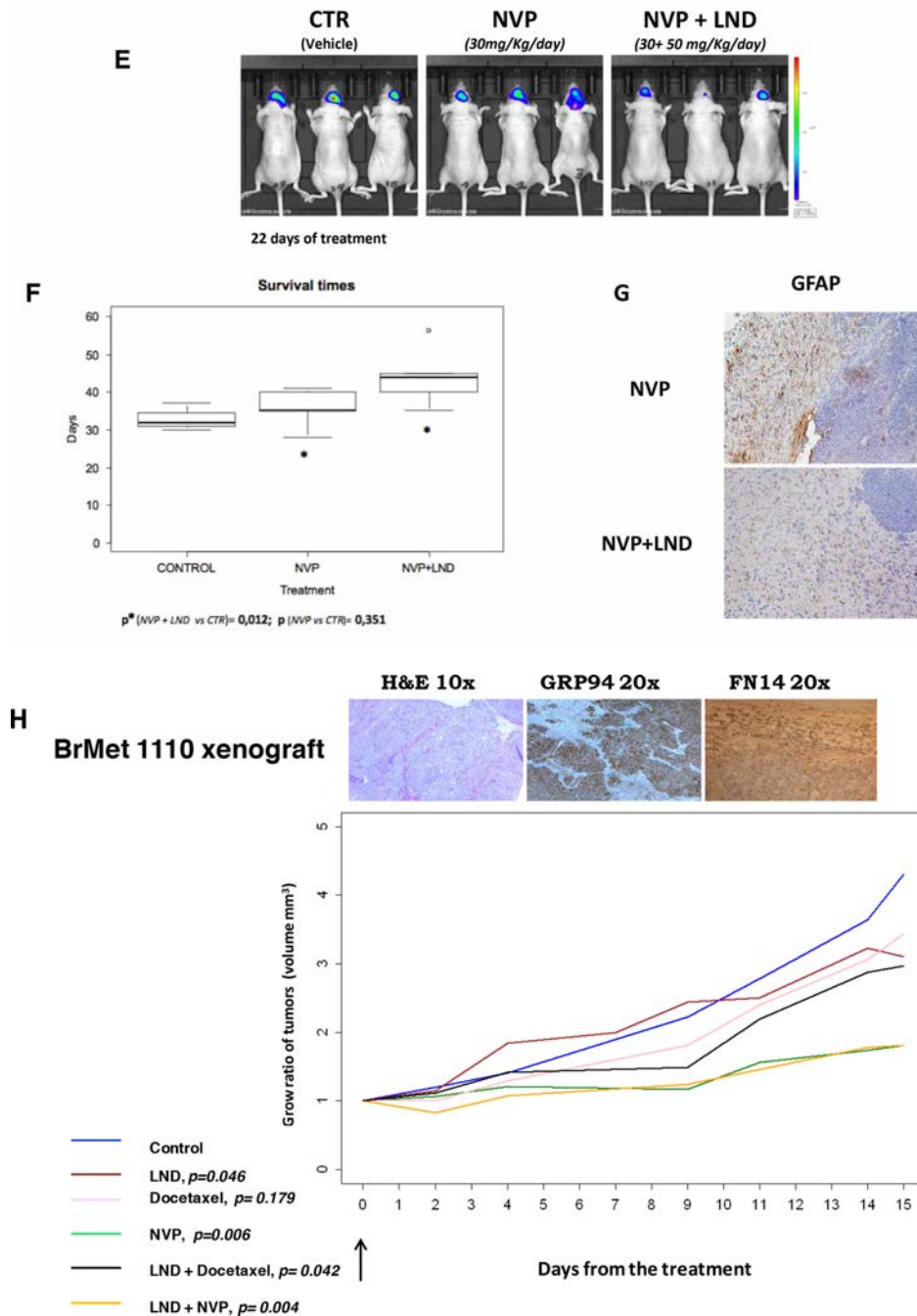


Figure 4: (Continued) Experimental brain metastasis models to validate the therapeutic effect of a thalidomide derivative. **E.** Representative images show bioluminescence in animals at day 22 from the start of indicated treatments. The bioluminescence data were transformed using the $\log(1+x)$ function (where $x = AvR$), in order to obtain a more regular and positive distribution. Subsequently, these data were normalized by subtracting the first observation (day 14) from each of the following observations. **F.** The survival time (box plot) of mice treated with NVP-AUY922 ($N = 6$) alone or in combination with LND ($N = 6$) are shown. The differences in mouse survival were statistically significant in NVP-AUY922 + LND vs. CTR ($p = 0.012$) and NVP-AUY922 alone vs NVP-AUY922 + LND ($p = 0.033$); but the survival of mice treated only with NVP-AUY922 and controls was similar ($p = 0.351$). **G.** IHC of brain metastasis from mice treated with NVP-AUY922 alone and in combination with LND. The expression of GFAP indicative of reactive astrocytes is higher in NVP-AUY922 + LND group than in brain metastasis from mice treated with NVP-AUY922 alone. **H.** Athymic Nude-Foxn1nu female mice. The xenograft expression of GRP94 and FN14 is shown in the upper part, in tumoral cells (GRP94) and in tumor and estromal cells (FN14). The statistical differences between groups of treatment (*): control treated with vehicle ($N=17$), Docetaxel ($N=10$), LND ($N=16$), NVP ($N=15$), NVP+LND ($N=9$) and Docetaxel+LND ($N=20$) according the volume slope are indicated at the bottom of the figure.

and control mice was similar (NVP-AUY922 vs. CTR, $p = 0.351$). Reactive astrocytes decreased according to the expression of GFAP in NVP-AUY922 + LND with regard to NVP alone (Figure 4G). These results suggested that the therapeutic effect of LND might contribute to the success of adjuvant treatment by decreasing reactive astrocytes and/or modifying the BBB penetration [44].

In addition, to avoid BBB permeability maintaining the stromal and phenotypic characteristic of brain metastasis tissue, we treated a group of mice with a subcutaneously engrafted brain metastasis biopsy, which expressed both GRP94 and FN14 proteins, obtained from a woman with primary lung carcinoma that metastasized in the brain. We compared tumor growth in mice treated with LND, docetaxel and NVP-AUY922 alone or in combination with LND (Figure 4H). LND alone ($p = 0.046$) reduced the engrafted brain metastasis in mice, even more in combination with docetaxel ($p = 0.004$), in contrast to docetaxel alone ($p = 0.179$). These preliminary results showed that LND might improve therapy responses in brain metastatic tissue. Moreover, NVP-AUY922 decreased graft development alone ($p = 0.006$) and in combination with LND ($p = 0.004$). In this case the high cytotoxicity of the drug is manifested when BBB is avoided.

These preliminary results suggested that the action of thalidomide derivatives could impair FN14/TWEAK axis through its reactive astrocytes activity. In fact, LND did not reduce the tumor slope of i.m.f.p. breast cancer tumors induced with EG and 1070 TNBC breast carcinomas (Supplementary Figure S5), even though decreased the expression of FN14 positive EG tumors, probably intercepting other stromal cytokines production.

DISCUSSION

To our knowledge, this study is the first to report that fibroblast growth factor-inducible protein 14 (FN14) expression and GRP94 expression in a patient diagnosed with breast cancer (BC) indicates a high risk of brain metastasis (BrM) progression, offering the opportunity to develop therapeutic strategies either to prevent the disease or facilitate early detection. Moreover, other tumors like lung carcinomas and clear cell kidney carcinomas might express these biomarkers according to their ability to develop BrM.

The major challenge for both primary and secondary prevention studies is the identification of patients at highest risk of developing brain metastasis due to tumor and host factors. For cancers of the breast, BrM occurs after diagnosis of systemic metastases from tumors belonging to one of two categories: tumors with amplification of ErbB2 or TNBC; the incidence of both exceeds one-third of patients [47, 48]. We demonstrate that FN14 and GRP94 are independent prognostic factors and give information on the likelihood that patients

will develop brain metastasis, either in ErbB2 or TNBC patients.

FN14 positivity was associated with ErbB2 expression in our series, consistent with reports that high FN14 expression levels were significantly correlated with several poor prognostic indicators, being higher particularly in ErbB2-positive breast cancer [49]. Moreover, FN14 positive tumors might have a poor survival because they are likely to develop brain metastasis. On the other hand, GRP94 correlates with ErbB2 expression and poor BrM free survival of breast cancer patients. Indeed, GRP94 specific inhibitors provided evidence for the role of GRP94 in maintaining the architecture of high-density ErbB2 formations at the plasma membrane, which is vital for proper ErbB2 functioning [50].

FN14 is a small cell-surface protein that might modulate cell-extracellular matrix interactions, the expression of which is frequently found to be strongly enhanced in tumor tissue compared to non-transformed tissue [49]. The tumor microenvironment typically contains many factors implicated in the upregulation of FN14 expression [51]. High FN14 has been found in tissues damaged by different insults including hypoxia, oxidative stress, chemical and mechanical injuries and tumor growth [52]. Although the regulatory elements involved in FN14 gene activation have not yet been elucidated, the human FN14 promoter region contains several potential transcription factor binding sites, including AP-1 sites and the NF κ B site [53]. RNA interference-mediated inhibition of FN14 expression in metastatic MDA-MB-231 breast cancer cells reduces invasion through activation of the NF- κ B pathway [49]. Moreover, FN14 has been shown to promote breast cancer cell migration, invasion and MMP9 expression [54]. These data illustrate the importance of FN14 expression in mechanistic pathways of metastasis progression.

Brain colonization involves many factors implicated in the upregulation of FN14 expression. Among them, reactive astrocytes [55] represent a bona fide source of TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis), its only known signaling-competent receptor [51]. Further work is required to unraveling the important role that FN14/TWEAK axis in different pathogenic steps of brain metastasis progression, including BBB permeability.

Consistent with the hypothesis that LND action might involve the physical and tropic interaction between cancer cells and the CNS environment, the treatment of experimental brain metastasis resulted in a reduction in tumor volume with reactive astrocytes and angiogenesis decrease and down-regulation of FN14 and TWEAK expression. A similar therapeutic effect has been reported with the use of immunotoxins targeting the FN14 receptor [56]. Indeed, a phase I study of RG7212, a humanized anti-TWEAK IgG1k monoclonal antibody, was conducted in patients with advanced solid tumors expressing FN14

resulting in tumor regression and prolonged stable disease [57]. This is the first evidence of a specific treatment against FN14/TWEAK that encourage the use of these molecules as a therapeutic target to develop new drugs to treat/prevent brain metastasis.

LND is a synthetic derivative of thalidomide currently approved by the US Food and Drug Administration for use in patients affected by multiple myeloma (in combination with dexamethasone) and low or intermediate-1 risk myelodysplastic syndromes that harbor 5q cytogenetic abnormalities [58]. Therefore, our results illustrate a new indication of LND for the treatment of brain metastasis when the primary tumor expresses FN14. Pomalidomide (CC4047) is a new thalidomide derivative with high *in vitro* potency. A first phase 1b, single-center, ascending dose study was conducted to identify the maximum tolerated dose (MTD) and evaluate the safety and efficacy of CC-4047 in relapsed or refractory LND-treated MM patients (<http://ClinicalTrials.gov>, number NCT01311687, and with EudraCT, number 2010-019820-30), showing a significantly longer median overall survival time with refractory or relapsed multiple myeloma patients [59].

BrM are remarkably heterogeneous in permeability to the chemotherapeutic agents, typically undergo higher levels of drug penetration than surrounding normal tissue, but far lower levels of penetration than metastases to other organs [60], due of drug efflux pumps for chemotherapeutic and molecular therapeutic agents [17]. Since St Gallen Consensus [61] is indicating cytotoxic drugs in TNBC, due to the limit distribution of taxanes to subtherapeutic levels in brain, it could be beneficial to treat FN14 positive tumors with drugs that have better penetration to CNS. This consideration might prevent to render the brain a “sanctuary site” for metastatic cells in TNBC patients.

On the other hand, in all meta-analyses involving taxane-based regimens or anthracycline-based regimens [62], the proportional reductions in early recurrence, any recurrence, and breast cancer mortality appeared largely independent of age, nodal status, tumor diameter, tumor differentiation (poorly or moderately differentiated, relatively few were well differentiated) or ER status (ER-poor or ER-positive). Indeed, for a patient with early-stage breast cancer, recommendations regarding systemic therapy and the most appropriate choice of agent(s) are often difficult (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG)). In this scenario, FN14 over-expression is an early event, which reflects specific mechanisms of breast cancer progression, correlates with clinico-pathological features and predicts BrM outcome in patients treated with protocols including taxanes. Therefore, FN14 combines prediction and prognostic information to stratify patients at first diagnosis according to the likelihood of BrM with accuracy similar to ErbB2, and thus it might help clinicians in deciding the therapeutic protocols to be adopted.

To date only ErbB2-positive breast cancer patients have entered prevention trials to clarify the role of lapatinib [63]. Most patients with BrM are suffering from terminal cancer, and control of brain metastasis is crucial for their quality of life. ErbB2-positive BC has seen more therapeutic progress than TNBC. The LANDSCAPE trial is a phase II study testing lapatinib plus capecitabine in previously untreated BCBrM and was positive for its primary endpoint, with 65.9% of patients presenting a partial response. In the light of these results we suggest that patients with triple-negative tumors and pulmonary metastasis might be the most suitable group for prospective trials investigating strategies for BrM screening and prevention. Indeed, FN14 and GRP94 might be a companion diagnostic markers that could identify patients who are likely to respond to drugs interfering with these specific targets.

Progress in treating brain metastases has been hampered by a lack of model systems, a lack of human tissue samples, and the exclusion of brain metastatic patients from many clinical trials. The Response Assessment in NeuroOncology (RANO) group has recently published the endpoints and trial consideration in brain metastases clinical trials [64]. This is clearly but the beginning of such considerations.

BrM therapy faces the challenge of efficiently targeting cancer cells or/and their supportive relationship with the brain parenchyma. Nowadays, the treatment armamentarium consists of a multimodality approach, selected according to the patient's symptoms and extent of disease. A systemic therapy might even prevent brain colonization altogether or at least arrest single cells or micrometastases in the dormant state. The role of thalidomide derivatives in preventing BrM progression is an ongoing investigation in our laboratory, with a particular focus on their hypothetical mechanism of action which might be associated with the regulation of immunoreactive astrocytes in the area surrounding BrM cells.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

We recruited samples from 318 patients diagnosed between 1989–2009 in three hospitals: 252 samples from the Catalan Institute of Oncology (I.C.O.) – Hospital Duran i Reynals and the Hospital Universitari de Bellvitge (L'Hospitalet de Llobregat, Spain); 24 samples from the Consorci Hospitalari Parc Taulí (Sabadell, Spain) and 42 samples from I.C.O. – Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (Badalona, Spain). The patients were between 24–88 years old at diagnosis and 61% were diagnosed when in/older than their fifties (mean: 55 years). Follow-up ranged from 8 to 146 months (mean: 76.6 months). Metastasis relapse occurred in 43.4% (138/318) of patients; of these, 84 patients (60.9%) developed BrM,

47 (34.1%) lung metastasis, 54 (39.1%) liver metastasis, 40 (29.0%) non-regional lymph node metastasis and 89 (64.5%) bone metastasis. Just over half (56.6%; 180/318) of the patients had no metastatic progression after a minimum follow-up of 5 years.

In terms of histological type, the ductal type was identified in 94.1% ($n = 299$) of patients, followed by lobular in 5% ($n = 16$), mucinous in 0.6% ($n = 2$) and medullary in 0.3% ($n = 1$). Estrogen receptors (ER) were analyzed in 304 patients, being positive in 74.7% ($n = 227$); relevant data were missing in 14 patients. Progesterone receptors (PR) were evaluated in 299 patients (missing in 19), being positive in 65.9% ($n = 197$). ErbB2 scoring was obtained for 296 patients (22 cases missing), only 14.2% ($n = 42$) of whom were positive. The triple-negative status was analyzed in 302 patients (16 cases missing), with only 15.6% of them ($n = 47$) being identified as triple-negative.

Sixty-three percent (193/307) received adjuvant chemotherapy: schedules with CMF ($n = 68$), anthracyclines ($n = 32$), anthracyclines plus CMF ($n = 60$), taxanes ($n = 21$) and anthracyclines plus taxanes ($n = 12$); 6 patients were missing and 5 were not undergone to surgery. Only 3 patients received trastuzumab as adjuvant therapy. Twenty-nine percent (91/314) of patients received neoadjuvant chemotherapy and adjuvant hormone therapy was prescribed in 65.1% (203/312); 1 case was missing and 5 not undergone to surgery. The variation in the denominators is the result of taking into account the missing values in the clinical-pathological parameters.

Tissue microarrays (TMAs) and immunohistochemistry (IHC)

TMAs were prepared from three representative areas of the tumor that were carefully selected from hematoxylin-eosin-stained sections of the donor blocks. Core cylinders of 1 mm diameter were punched from each tumor using a skin-biopsy punch and deposited into recipient paraffin blocks using a specific arraying device (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI) as described elsewhere [24]. Three- μ m sections of the resulting tissue microarray block were cut and used for IHC analysis after being transferred to glass slides.

To optimize each immunohistochemical analysis, the corresponding control tissues for the expression of each protein were also used. Antigens were retrieved by heating in a pressure cooker for 7 minutes in the appropriate buffer. Primary antibodies anti-GRP94 at 1/2000 (sc-1794) and anti-FN14 at 1/3000 (sc-27143), both Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) and anti-TRAF2 at 1/100 (SM7106P, Acris Antibodies, Herford, Germany) were diluted in Dako Real™ Antibody Diluent Buffer (Dakocytomation; Dako, Glostrup, Denmark); Tris buffer, pH 7.2, 15 mM Na₃N. LSAB+System-HRP (Dakocytomation) was used, including biotinylated anti-

rabbit, anti-mouse and anti-goat immunoglobulins in PBS; streptavidin conjugated to HRP in PBS; and liquid 3–3' diaminobenzidine in chromogen solution. The polyclonal antibody anti-ErbB2, A0485 (Dako) was used with the Ultraview detection kit in an automatic staining system (Benchmark XT, USA).

Staining optimization, evaluation parameters and analyses were established by two pathologists who were blinded to the clinical status. The overexpression of GRP94, FN14 and TRAF2 was categorized as positive when strong expression was detected and negative when no or weak expression was detected, in order to avoid false positives (Figure 1A), taking into account the known expression in a control tissue, as previously reported [24].

Four tumor-metastasis pairs of kidney and lung carcinoma from paraffin archives were used to explore the expression of biomarkers in tumors different from breast.

Prioritization of brain metastasis candidates using protein–protein interactions

First, a protein–protein interaction subnetwork (PPIN) of the whole human interactome was built around a set of proteins known to be crucial for brain metastatic growth (i.e., root proteins). All the interactions of root proteins were retrieved from BIANA, provided that the interaction had been identified using an experimental method other than a pull-down method. Though suitable for defining protein complexes, interactions from pull-down methods might introduce spurious binary interactions between proteins. Then, gene expression levels were mapped onto the network. A protein was considered to be differentially expressed if the gene encoding for it was differentially expressed in the tissue microarray experiment. This mapping allowed us to find the active subnetworks: clusters of the network with a significant proportion of proteins produced by up- and down-regulated genes. Next, we calculated a brain metastasis likelihood score for all the nodes in the human interactome using GUILD [27], a network-based disease-gene prioritization software. GUILD assigns a disease-implication score to each node in the network by disseminating information about roots (known metastatic growth proteins) to other nodes through the links in the network. It can also be used to prioritize drugs for their potential to intervene in a given disease by considering the scores of the drug targets [28]. We used 15 root proteins (selected from those identified by proteomics analysis) for which we found interactions in the human interactome (see Supplementary Table S1). We applied the NetCombo algorithm implemented in GUILD, which produces a consensus score that considers the distance from the nodes to the roots in the network.

Next, we used the GUILD scores assigned to proteins to rank candidate drugs (listed in

Supplementary Table S4). For each drug, we calculated the average GUILD score of its known targets. Drug-protein information was retrieved from the DrugBank database [29].

Animal models

Athymic Nude-Foxn1nu female mice weighing 22–28 g were purchased from Harlan Laboratories S.A. (Barcelona, Spain) and were housed in the IDIBELL facility in SFP conditions, at 20–24°C, 60% relative humidity, and 12–12-hour light-dark periods. Animals were allowed free access to UV-irradiated water and an adequate sterile diet. All animal-related procedures were performed in accordance with the National Institute of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals, with the approval of the animal care committee.

Xenografts from primary tumors and brain metastasis biopsies

Samples were collected at Hospital Universitari de Bellvitge (L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain). The study was approved by the Institutional Review Board. Written informed consent was collected from patients. Non-necrotic tissue pieces (2–3 mm³) from resected ductal breast carcinoma (TNBC-EG and TNBC-1070) or brain metastasis biopsies (BrM1110) were placed in DMEM (BioWhittaker) supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin. The xenografts were implanted in animals under isoflurane-induced anesthesia, either in the intramammary fat path (i.m.f.p) or subcutaneously when the biopsy belonged to primary breast carcinoma or brain metastasis, respectively. When the i.m.f.p. tumors reached ~1000 mm³, they were excised, dissected into 2–3 mm³ cubes and transplanted into additional mice using the same procedure.

Brain metastasis *in vivo* experiments

To induce brain metastases the highly brain metastatic cell line BR-eGFP-CMV/Luc-V5CA (BRV5) [30] was intracranially implanted [31]. In brief, 435-Br1 cells originally established from a brain metastasis in a *nude* mouse orthotopically inoculated with the triple negative MDA-MB 435 parental cell line [32], contain the retroviral vector preGFP-CMV-PLuc with the enhanced green fluorescent protein (*eGFP*) gene, under the control of the 5' LTR, and the photinus luciferase (*PLuc*) gene, under the control of the cytomegalovirus (CMV) promoter [33]. Vector preparation and packaging of viral particles was performed as described previously. A cell population that uniformly expressed the highest levels of eGFP (BR-eGFP-CMV/Luc) was selected by FACS (MoFlo, Cytomation, Dako, Denmark). Left ventricle (*LV*) injection of cells and their further isolation from mouse brain was repeated five times, obtaining BR-eGFP-CMV/Luc-V1 to V5 cells through these cycles.

The controversial use of MDA-MB 435 cells has been recently clarified, since it has been demonstrated that MDA-MB 435 cells are a useful breast cancer model that expresses both, epithelial and melanocytic markers [34].

Animals were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine/ medetomidine, with a previous subcutaneous injection of buprenorphine, and placed in a stereotactic apparatus. An incision was made over the cranial midline with a scalpel, and a hole 1 mm posterior to the bregma and 2 mm to the right of the midline was made with a 25 gauge needle by hand. Two microliters of the cell suspension at 10⁷ cells/ml in HBSS was infused with a Hamilton® 10 µl syringe (Bonaduz, Switzerland) and a Hamilton® needle (ga26s/51mm/pst2). Finally, the incision was sutured and medetomidine was added as the antidote. Animals were imaged and weighed three times within a week (on Monday, Wednesday and Friday), and were euthanized when they showed signs of declining health and visible body weight loss.

In vivo bioluminescence imaging

Mice were injected subcutaneously with 10 µl/g body weight of D-Luciferin (Biosynth AG) 15 minutes before imaging. We anesthetized the animals with 4% Isoflurane gas in 2 l/min O₂ and maintained anesthesia inside the chamber with 2% Isoflurane at 2 l/min O₂ during acquisition. The animals were placed in the prone position. Cells showing bioluminescence were detected and quantified using the Living Image 4.1 image analysis software (Caliper, LifeSciences Hopkinton, MA). The parameter chosen for treatment evaluation was the total flux (p/s).

The background signal of each mouse (photons emitted by the mouse before the injection of luciferin) was subtracted in every bioluminescence cranial measurement.

The bioluminescence analysis was conducted once a week during the early stages of the disease and twice a week when brain masses began to grow exponentially.

Histology and immunohistochemical tumor characterization in mice

The morphology of the engrafted tumors and brain metastases was analyzed by H&E staining in paraffin-embedded sections. Determination of GRP94, FN14 and TRAF2 was performed as described previously. IHC analysis with anti-CD31 (Dako) at (1/100), anti-TWEAK (Abcam, Cambridge, UK) at (1/300) and anti-GFAP (Dako) at (1/16000) were performed.

Therapeutic protocols

For brain metastasis treatment, we started therapy on day 14 once the mice had recovered from surgery and after checking the success of cell inoculation.

Lenalidomide (LND), a thalidomide derivative, was obtained from the Celgene Corporation (Summit, NJ) and from Sellek Chemicals LLC (Houston, TX). LND was

injected intraperitoneally in DMSO (Sigma-Aldrich) at 50 mg/Kg/day, every day until the end of the experiment. Docetaxel (TXT) and NVP-AUY922 (NVP), both from LC Laboratories, were injected intraperitoneally in DMSO at a dosage of 15 mg/Kg/day and 30 mg/Kg/day respectively. TXT was administered every 4 days for 2 weeks and NVP every 2 days for 2 weeks.

Statistical analysis

To evaluate the correlation between protein expression and brain metastasis in patients, immunostained samples were graded on a three-category scale (negative, weak positive, and strong positive). The marker was classed as being overexpressed in strong positive samples. The association with brain metastasis for each marker was tested using a two-sided Fisher exact test and summarized by calculating the sensitivity among tumors that developed metastasis, and specificity among tumors without metastasis, for strong positive values. Positive and negative likelihood ratios were also calculated as integrated predictive indexes, as was the area under the ROC curve. Markers were assessed using a multivariate logistic regression model in a forward stepwise procedure to identify the best combination for predicting brain metastasis. Since ErbB2 was already a known metastasis risk factor, an analysis including ErbB2 as the baseline was also performed, as well as a stratified analysis of each candidate marker within ErbB2-positive and -negative tumors. In all analyses, associations were considered significant when p was less than 0.05.

To compare survival times for the control and LND in mice groups, we used the non-parametric Mann-Whitney test and the log-rank test.

The bioluminescence data were transformed using the $\log(1 + x)$ function (where $x = AvR$), in order to obtain a more regular and positive distribution. Subsequently, these data were normalized by subtracting the first observation (day 14) from each of the following observations. The Student's t test was used to compare the treatment groups. Survival curves for each treatment were estimated via the Kaplan-Meier method, and the log-rank test was used to assess the significance of differences in both, patients and mice follow-up.

P -values lower than 0.05 were considered significant.

ACKNOWLEDGMENTS AND FUNDING

We would like to thank Dr Gascón for his expert critical reading of the manuscript. We are grateful to Dr. Joanne Ferrier for language advice and to Raquel Bermudez and Monica Marin for their expert technical assistance. This study was supported by grants from the Spanish Ministry of Health and Consumer Affairs FIS-PI10/00057 and FIS-PI14/00336, both from the I+D+I National Plan with the financial support from ISCIII-Subdirección General de Evaluación and the

Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), and by grants from MIIN FIS2008-00114 and BIO2014-57518-R, 2014 SGR 530 and 2009-SGR-159 from the Generalitat de Catalunya, Fundació Privada Cellex Barcelona and the AECC (Spanish Association Against Cancer) Scientific Foundation.

CONFLICTS OF INTEREST

Angels Sierra has received research funding from Celgene Research, S. L.

REFERENCES

1. Tham YL, Sexton K, Kramer R, Hilsenbeck S, Elledge R. Primary breast cancer phenotypes associated with propensity for central nervous system metastases. *Cancer*. 2006; 107:696–704.
2. Stemmler HJ, Heinemann V. Central nervous system metastases in HER-2-overexpressing metastatic breast cancer: a treatment challenge. *Oncologist*. 2008; 13:739–750.
3. Matthias P, Capper D, Ilhan-Mutlu AI, Berghoff AS, Birner P, Bartsch R, Marosi C, Zielinski C, Mehta MP, Winkler F, Wick W, von Deimling A. Brain metastases: pathobiology and emerging targeted therapies. *Acta Neuropathol*. 2012; 123:205–222.
4. Soffietti R, Trevisan E, Ruda R. Targeted therapy in brain metastasis. *Curr. Opin. Oncol*. 2012; 24:679–686.
5. Lockman PR, Mittapalli RK, Taskar KS, Rudraraju V, Gril B, Bohn KA, Adkins CE, Roberts A, Thorsheim HR, Gaasch JA, Huang S, Palmieri D, Steeg PS, et al. Heterogeneous blood-tumor barrier permeability determines drug efficacy in experimental brain metastases of breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2010; 16:5664–5678.
6. Palmieri D, Bronder JL, Herring JM, Yoneda T, Weil RJ, Stark AM, Kurek R, Vega-Valle E, Feigenbaum L, Halverson D, Vortmeyer AO, Steinberg SM, Aldape K, et al. Her-2 overexpression increases the metastatic outgrowth of breast cancer cells in the brain. *Cancer Res*. 2007; 67:4190–4198.
7. Maher EA, Mietz J, Arteaga CL, DePinho RA, Mohla S. Brain metastasis: opportunities in basic and translational research. *Cancer Res*. 2009; 69:6015–6020.
8. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, Speed D, Lynch AG, Samarajiwa S, Yuan Y, Gräf S, Ha G, Haffari G, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. 2012; 486:346–352.
9. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98:10869–10874.

10. Ramaswamy S, Perou CM. DNA microarrays in breast cancer: the promise of personalised medicine. *Lancet*. 2003; 361:1576–1577.
11. Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, Livasy C, Carey LA, Reynolds E, Dressler L, Nobel A, Parker J, Ewend MG, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BRMC Genomics*. 2006; 7:96–108.
12. Harrell JC, Prat A, Parker JS, Fan C, He X, Carey L, Anders C, Ewend M, Perou CM. Genomic analysis identifies unique signatures predictive of brain, lung, and liver relapse. *Breast Cancer Res Treat*. 2012; 132:523–535.
13. Smid M, Wang Y, Zhang Y, Sieuwerts AM, Yu J, Klijn JG, Foekens JA, Martens JW. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res*. 2008; 68:3108–3114.
14. Lin NU, Claus E, Sohl J, Razzak AR, Arnaout A, Winer EP. Sites of distant recurrence and clinical outcomes in patients with metastatic triple-negative breast cancer: high incidence of central nervous system metastases. *Cancer*. 2008; 113:2638–2645.
15. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MCU, Voduc D, Speers CH, Nielsen TO, Gelmon K. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2010; 28:3271–3277.
16. Antoni D, Clavier JB, Pop M, Benoit C, Lefebvre F, Noël G. An Institutional retrospective analysis of 93 patients with brain metastases from breast cancer: treatment outcomes, diagnosis-specific prognostic factors. *Int J Mol Sci*. 2012; 13:16489–16499.
17. Steeg PS, Camphausen KA, Smith QR. Brain metastases as preventive and therapeutic targets. *Nature Rev Cancer*. 2011; 11:352–363.
18. Whitsett TG, Inge LJ, Dhruv HD, Cheung PY, Weiss GJ, Bremner RM, Winkles JA, Tran NL. Molecular determinants of lung cancer metastasis to the central nervous system. *Transl Lung Cancer Res*. 2013; 2:273–283.
19. Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med*. 2006; 12:895–904.
20. Crivellari D, Pagani O, Veronesi A, Lombardi D, Nolè F, Thürlimann B, Hess D, Borner M, Bauer J, Martinelli G, Graffeo R, Sessa C, Goldhirsch A. High incidence of central nervous system involvement in patients with metastatic or locally advanced breast cancer treated with epirubicin and docetaxel. *Ann Oncol*. 2001; 12:353–356.
21. Barnholtz-Sloan JS, Sloan AE, Davis FG, Vigneau FD, Lai P, Sawaya RE. Incidence proportions of brain metastases in patients diagnosed (1973 to 2001) in the Metropolitan Detroit Cancer Surveillance System. *J Clin Oncol*. 2004; 22:2865–2872.
22. Duchnowska R, Biernat W, Szostakiewicz B, Sperinde J, Piette F, Haddad M, Paquet A, Lie Y, Czartoryska-Arlukowicz B, Wysocki P, Jankowski T, Radecka B, Foszczynska-Kłoda M, et al. Correlation between quantitative HER-2 protein expression and risk for brain metastases in HER-2+ advanced breast cancer patients receiving trastuzumab-containing therapy. *Oncologist*. 2012; 17:26–35.
23. Martín B, Aragüés R, Sanz R, Oliva B, Boluda S, Martínez A, Sierra A. Biological pathways contributing to organ-specific phenotype of brain metastatic cells. *J Proteome Res*. 2008; 7:908–920.
24. Sanz-Pamplona R, Aragüés R, Driouch K, Martín B, Oliva B, Gil M, Boluda S, Fernández PL, Martínez A, Moreno V, Acebes JJ, Lidereau R, Reyat F, et al. Expression of endoplasmic reticulum stress proteins is a candidate marker of brain metastasis in both ErbB-2+ and ErbB-2- primary breast tumors. *Am J Pathol*. 2011; 179:564–579.
25. Fidler IJ, Balasubramanian K, Lin Q, Kim SW, Kim SJ. The brain microenvironment and cancer metastasis. *Mol Cells*. 2012; 30:93–98.
26. Garcia-Garcia J, Guney E, Aragüés R, Planas-Iglesias J, Oliva B. Biana: a software framework for compiling biological interactions and analyzing networks. *BRMC Bioinformatics*. 2010; 11:56–68.
27. Guney E, Oliva B. Exploiting protein-protein interaction networks for genome-wide disease-gene prioritization. *PLoS One*. 2012; 7:e43557.
28. Guney E, Garcia-Garcia J, Oliva B. GUILDiFy: a web server for phenotypic characterization of genes through biological data integration and network-based prioritization algorithms. *Bioinformatics*. 2014; 30:1789–1790.
29. Knox C, Law V, Jewison T, Liu P, Ly S, Frolkis A, Pon A, Banco K, Mak C, Neveu V, Djoumbou Y, Eisner R, Guo AC, et al. DrugBank 3.0: a comprehensive resource for ‘omics’ research on drugs. *Nucleic Acids Res*. 2011; 39:D1035–D1041.
30. Martínez-Aranda A, Hernández V, Picón C, Modolell I, Sierra A. Development of a preclinical therapeutic model of human brain metastasis with chemoradiotherapy. *Int J Mol Sci*. 2013; 14:8306–8327.
31. Abdelwahab MG, Sankar T, Preul MC, Scheck AC. Intracranial implantation with subsequent 3D *in vivo* bioluminescent imaging of murine gliomas. *J Vis Exp*. 2011; 57:e3403:1–7.
32. Schackert G, Price JE, Bucana CD, Fidler IJ. Unique patterns of brain metastasis produced by different human carcinomas in athymic nude mice. *Int J Cancer*. 1989; 44:892–897.
33. Román I, Vilalta M, Rodriguez J, Matthies AM, Srouji S, Livne E, Hubbell JA, Rubio N, Blanco J. Analysis of progenitor cell-scaffold combinations by *in vivo* non-invasive photonic imaging. *Biomaterials*. 2007; 28:2718–2728.
34. Chambers AF. MDA-MB-435 and M14 cell lines: identical but not M14 melanoma?. *Cancer Res*. 2009; 69:5292–5293.
35. Musolino A, Ciccolallo L, Panebianco M, Fontana E, Zaroni D, Bozzetti C, Michiara M, Silini EM, Ardizzoni A. Multifactorial central nervous system recurrence susceptibility in patients with HER2-positive breast cancer: epidemiological and clinical data from a population-based cancer registry study. *Cancer*. 2011; 117:1837–1846.

36. Comen EA, Norton L, Massagué J. Breast cancer tumor size, nodal status, and prognosis: biology trumps anatomy. *J Clin Oncol*. 2011; 29:2610–2612.
37. Lin NU, Carey LA, Liu MC, Younger J, Come SE, Ewend M, Harris GJ, Bullitt E, Van den Abbeele AD, Henson JW, Li X, Gelman R, Burstein HJ, et al. Phase II trial of lapatinib for brain metastases in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008; 26:1993–1999.
38. Karam I, Hamilton S, Nichol A, Woods R, Speers C, Kennecke H, Tyldesley S. Population-based outcomes after brain radiotherapy in patients with brain metastases from breast cancer in the Pre-Trastuzumab and Trastuzumab eras. *Radiat Oncol*. 2013; 8:12.
39. Oakman C, Santarpia L, Di Leo A. Breast cancer assessment tools and optimizing adjuvant therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010; 7:725–732.
40. Landemaine T, Jackson A, Bellahcène A, Rucci N, Sin S, Abad BRM, Sierra A, Boudinet A, Guinebretière JM, Ricevuto E, Noguès C, Briffod M, Bièche I, et al. A six-gene signature predicting breast cancer lung metastasis. *Cancer Res*. 2008; 68:6092–6099.
41. Sanz-Pamplona R, García-García J, Franco S, Messeguer X, Driouch K, Oliva B, Sierra A. A taxonomy of organ-specific breast cancer metastases based on a protein-protein interaction network. *Mol Biosyst*. 2012; 8:2085–2096.
42. Winkles JA. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat Rev Drug Discov*. 2008; 7:411–425.
43. Desplat-Jégo S, Varrialea S, Creidya R, Bernarda D, Khrestchatskya M, Izuib S, Chicheportichec Y, Boucraut J. TWEAK is expressed by glial cells, induces astrocyte proliferation and increases EAE severity. *J Neuroimmunol*. 2002; 133:116–123.
44. Yepes M. TWEAK and FN14 in the neurovascular unit. *Frontier Immunol*. 2013; 4:1–6.
45. Semeraro M, Vacchelli E, Eggermont A, Galon J, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L. Lenalidomide-based immunotherapy. *OncoImmunol*. 2013; 2. e26494:1–15.
46. Bao R, Lai CJ, Qu H, Wang D, Yin L, Zifcak B, Atoyán R, Wang J, Samson M, Forrester J, Della Rocca S, Xu GX, Tao X, et al. CUDC-305, a novel synthetic HSP90 inhibitor with unique pharmacologic properties for cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2009; 15:4046–4057.
47. Hung MH, Liu CY, Shiao CY, Hsu CY, Tsai YF, Wang YL, Tai LC, King KL, Chao TC, Chiu JH, Su CH, Lo SS, Tzeng CH, et al. Effect of Age and Biological Subtype on the Risk and Timing of Brain Metastasis in Breast Cancer Patients. *PLoS One*. 2014; 9:e89389.
48. Berghoff A, Bago-Horvath Z, De Vries C, Dubsy P, Pluschnig U, Rudas M, Rottenfusser A, Knauer M, Eiter H, Fitzal F, Dieckmann K, Mader RM, Gnant M, et al. Brain metastases free survival differs between breast cancer subtypes. *Br J Cancer*. 2012; 106:440–446.
49. Willis AL, Tran NL, Chatigny JM, Charlton N, Vu H, Brown SA, Black MA, McDonough WS, Fortin SP, Niska JR, Winkles JA, Cunliffe HE. The Fibroblast Growth Factor-Inducible 14 Receptor is highly expressed in HER2-positive breast tumors and regulates breast cancer cell invasive capacity. *Mol Cancer Res*. 2008; 6:725–734.
50. Patel PV, Yan P, Deidler PM, Patel HJ, Sun W, Yang C, Que NS, Taldone T, Finotti P, Stephani RA, Gewirth DT, Chiosis G. Paralog-selective Hsp90 inhibitors define tumor-specific regulation of Her2. *Nat Chem Biol*. 2013; 9:677–684.
51. Wajant H. The TWEAK-Fn14 system as a potential drug target. *Br J Pharmacol*. 2013; 170:748–764.
52. Burkly LC, Michaelson JS, Zheng TS. TWEAK/Fn14 pathway: an immunological switch for shaping tissue responses. *Immunol Rev*. 2011; 244:99–114.
53. Vince JE, Chau D, Callus B, Wong WW, Hawkins CJ, Schneider P, McKinlay M, Benetatos CA, Condon SM, Chunduru SK, Yeoh G, Brink R, Vaux DL, et al. TWEAK-FN14 signaling induces lysosomal degradation of a cIAP1-TRAF2 complex to sensitize tumor cells to TNFalpha. *J Cell Biol*. 2008; 182:171–184.
54. Asrani K, Keri RA, Galisteo R, Brown SA, Morgan SJ, Ghosh A, Tran NL, Winkles JA. The HER2- and heregulin beta1 (HRG)-inducible TNFR superfamily member Fn14 promotes HRG-driven breast cancer cell migration, invasion, and MMP9 expression. *Mol Cancer Res*. 2013; 11:393–404.
55. Valiente M, Obenaus AC, Jin X, Chen Q, Zhang XH, Lee DJ, Chaff JE, Kris MG, Huse JT, Brogi E, Massagué J. Serpins promote cancer cell survival and vascular co-option in brain metastasis. *Cell*. 2014; 156:1002–1016.
56. Zhou H, Ekmekcioglu S, Marks JW, Mohamedali KA, Asrani K, Phillips KK, Brown SA, Cheng E, Weiss MB, Hittelman WN, Tran NL, Yagita H, Winkles JA, et al. The TWEAK receptor Fn14 is a therapeutic target in melanoma: immunotoxins targeting Fn14 receptor for malignant melanoma treatment. *J Invest Dermatol*. 2013; 133:1052–1062.
57. Lassen UN, Meulendijks D, Siu LL, Karanikas V, Maus-Sorensen M, Schellens JHM, Jonker DJ, Hansen AR, Simcox ME, Schostack KJ, Bottino D, Zhong H, Markus Roessler M, et al. A Phase I Monotherapy Study of RG7212, a First-in-Class Monoclonal Antibody Targeting TWEAK Signaling in Patients with Advanced Cancers. *Clin Cancer Res*. 2015; 21:258–266.
58. Greenberg AJ, Walters DK, Kumar SK, Vincent Rajkumar S, Jelinek DF. Responsiveness of cytogenetically discrete human myeloma cell lines to lenalidomide: lack of correlation with cereblon and interferon regulatory factor 4 expression levels. *Eur J Haematol*. 2013; 91:504–513.
59. San Miguel J, Weisel K, Moreau P, Lacy M, Song K, Delforge M, Karlin L, Goldschmidt H, Banos A, Oriol A, Alegre A, Chen C, Cavo M, et al. Pomalidomide plus low-dose dexamethasone versus high-dose dexamethasone alone for patients with relapsed and refractory multiple myeloma (MM-003): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013; 14:1055–1066.

60. Deeken JF, Löscher W. The blood-brain barrier and cancer: transporters, treatment, and Trojan Horses. *Clin Cancer Res.* 2007; 13:1663–1674.
61. Untch M, Gerber B, Harbeck N, Jackisch C, Marschner N, Möbus V, von Minckwitz G, Loibl S, Beckmann MW, Blohmer JU, Costa SD, Decker T, Diel I, et al. 13th St. Gallen international breast cancer conference 2013: primary therapy of early breast cancer evidence, controversies, consensus - opinion of a german team of experts (Zürich 2013). *Breast Care.* 2013; 8:221–229.
62. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) . Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials. *Lancet.* 2012; 379:432–444.
63. Bachelot T, Romieu G, Campone M, Diéras V, Cropet C, Dalenc F, Jimenez M, Le Rhun E, Pierga JY, Gonçalves A, Leheurteur M, Domont J, Gutierrez M, et al. Lapatinib plus capecitabine in patients with previously untreated brain metastases from HER2-positive metastatic breast cancer (LANDSCAPE): a single-group phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2013; 14:64–71.
64. Lin NU, Lee EQ, Aoyama H, Barani IJ, Baumert BG, Brown PD, Camidge DR, Chang SM, Dancey J, Gaspar LE, Harris GJ, Hodi FS, Kalkanis SN, et al. Challenges relating to solid tumour brain metastases in clinical trials, part 1: patient population, response, and progression. A report from the RANO group. Response Assessment in Neuro-Oncology (RANO) group. *Lancet Oncol.* 2013; 14:e396–406.

10.4.4. ARTÍCULO 4

Martínez-Aranda A, Hernández V, Moreno F, Baixeras N, Cuadras D, Urruticoechea A, Gil-Gil M, Vidal N, Andreu X, Seguí MA, Ballester R, Castella E, Sierra A.
Predictive and prognostic brain metastases assessment in luminal breast cancer patients: FN14 and GRP94 from diagnosis to prophylaxis.

Frontiers in Oncology. 2017; 7:283.

doi: 10.3389/fonc.2017.00283.

Factor Impacto (2017): 4.416

Área Conocimiento: Oncology

Rank: 65/223 // Quartil: Q2

(Referencia bibliográfica nº. 224)



Predictive and Prognostic Brain Metastases Assessment in Luminal Breast Cancer Patients: FN14 and GRP94 from Diagnosis to Prophylaxis

OPEN ACCESS

Edited by:

Haim Werner,
Tel Aviv University, Israel

Reviewed by:

Ronit I. Yarden,
Georgetown University, United States
Leonard Girmata,
Karolinska Institute (KI), Sweden

*Correspondence:

Angels Sierra
asierrajim@gmail.com,
masierra@clinic.ub.es

†Present address:

Angels Sierra,
Laboratory of Molecular and
Translational Oncology, Institut
d'Investigacions Biomèdiques
August Pi i Sunyer – IDIBAPS,
Centre de Recerca Biomèdica
CELLEX, Barcelona, Spain
<http://www.hospitalclinic.org/>,
<http://www.idibaps.org/>

Specialty section:

This article was submitted to
Cancer Endocrinology,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 03 August 2017

Accepted: 09 November 2017

Published: 01 December 2017

Citation:

Martínez-Aranda A, Hernández V,
Moreno F, Baixeras N, Cuadras D,
Urruticoechea A, Gil-Gil M, Vidal N,
Andreu X, Seguí MA, Ballester R,
Castella E and Sierra A (2017)
Predictive and Prognostic Brain
Metastases Assessment in Luminal
Breast Cancer Patients: FN14 and
GRP94 from Diagnosis to
Prophylaxis.
Front. Oncol. 7:283.
doi: 10.3389/fonc.2017.00283

Antonio Martínez-Aranda^{1,2}, Vanessa Hernández¹, Ferran Moreno³, Núria Baixeras⁴, Daniel Cuadras⁵, Ander Urruticoechea⁶, Miguel Gil-Gil⁷, Noemí Vidal⁴, Xavier Andreu⁸, Miquel A. Seguí⁹, Rosa Ballester¹⁰, Eva Castella¹¹ and Angels Sierra^{12,13*}

¹Biological Clues of the Invasive and Metastatic Phenotype Group, Bellvitge Biomedical Research Institute – IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, ²Departament de Medicina, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ³Servei d'Oncologia Radioteràpica, Institut Català d'Oncologia (ICO), Hospital Duran i Reynals, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, ⁴Servei d'Anatomia Patològica, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, ⁵Statistical Service, Sant Joan de Déu Research Foundation, Barcelona, Spain, ⁶Breast Cancer Unit, Institut Català d'Oncologia – IDIBELL, Hospital Duran i Reynals, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, ⁷Neuroncology Unit, Institut Català d'Oncologia – IDIBELL, Hospital Duran i Reynals, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, ⁸Servei d'Anatomia Patològica, Consorci Hospitalari Parc Taulí, Barcelona, Spain, ⁹Servei d'Oncologia Mèdica, Consorci Hospitalari Parc Taulí, Barcelona, Spain, ¹⁰Servei d'Oncologia Radioteràpica, Institut Català d'Oncologia (ICO), Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Barcelona, Spain, ¹¹Servei d'Anatomia Patològica de Can Ruti, Institut Català d'Oncologia (ICO), Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Barcelona, Spain, ¹²Laboratory of Molecular and Translational Oncology, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer-IDIBAPS, Centre de Recerca Biomèdica CELLEX, Barcelona, Spain, ¹³Faculty of Medicine, Universitat de VIC-Universitat Central de Catalunya, Barcelona, Spain

FN14 has been implicated in many intracellular signaling pathways, and GRP94 is a well-known endoplasmic reticulum protein regulated by glucose. Recently, both have been associated with metastasis progression in breast cancer patients. We studied the usefulness of FN14 and GRP94 expression to stratify breast cancer patients according to their risk of brain metastasis (BrM) progression. We analyzed FN14 and GRP94 by immunohistochemistry in a retrospective multicenter study using tissue microarrays from 208 patients with breast carcinomas, of whom 52 had developed BrM. Clinical and pathological characteristics and biomarkers expression in *Luminal* and *non-Luminal* patients were analyzed using a multivariate logistic regression model adjusted for covariates, and brain metastasis-free survival (BrMFS) was estimated using the Kaplan-Meier method and the Cox proportional hazards model. FN14 expression was associated with BrM progression mainly in *Luminal* breast cancer patients with a sensitivity (53.85%) and specificity (89.60%) similar to Her2 expression (46.15 and 89.84%, respectively). Moreover, the likelihood to develop BrM in FN14-positive *Luminal* carcinomas increased 36.70-fold (3.65–368.25, $p = 0.002$). Furthermore, the worst prognostic factor for BrMFS in patients with *Luminal* carcinomas was FN14 overexpression (HR = 8.25; 95% CI: 2.77–24.61; $p = 0.00015$). In these patients, GRP94 overexpression also increased the risk of BrM (HR = 3.58; 95% CI: 0.98–13.11; $p = 0.054$ —Wald test). Therefore, FN14 expression in *Luminal* breast carcinomas is a predictive/prognostic biomarker of BrM, which combined with GRP94 predicts BrM progression in *non-Luminal* tumors 4.04-fold

(1.19–8.22, $p = 0.025$), suggesting that both biomarkers are useful to stratify BrM risk at early diagnosis. We propose a new follow-up protocol for the early prevention of clinical BrM of breast cancer patients with BrM risk.

Keywords: biomarkers, brain metastasis, breast cancer, FN14, GRP94, prediction, prevention, prognosis

INTRODUCTION

Identification of molecular subtypes has enhanced our understanding of breast cancer biology (1), overcoming one of the main barriers to improving the progression, prognosis, and treatment of breast cancer, namely, its clinical and genetic heterogeneity. The gene expression patterns derived from cDNA microarrays of primary breast carcinomas have made it possible to correlate tumor characteristics with clinical outcome (2) and support the idea that breast tumor subtypes represent biologically distinct disease entities with different survival rates (3). The main recognized breast cancer subtypes are as follows: *Luminal A*, estrogen-receptor (ER) positive, Ki-67 < 14%, and normal expression of Her2; *Luminal B*, ER-positive, Ki-67 \geq 14%, and normal expression of Her2; *Luminal/Her2+*, ER-positive and Her2 overexpression; *Her2-enriched*, ER-negative and Her2 overexpression; and *triple negative (TN)*, ER-negative, progesterone receptor (PR) negative, and normal expression of Her2. One of the important differences between subtypes as regards clinical progression is that hormone receptor-positive tumors, such as *Luminal A*, have a better prognosis for survival compared with Her2 overexpression and TN subtypes (4, 5) and the lowest risk of lymph node metastasis, whereas the *Luminal/Her2+* subtype has the highest risk (6). Moreover, hormone receptor-positive subtypes such as *Luminal A* and *Luminal B* should be considered different oncologic entities sharing similarities when studying their pattern of response to therapy (7). Breast cancer molecular subtypes are used to stratify patients at increased risk of recurrence, who may benefit from more aggressive local treatment (8–10). For example, the *Luminal/Her2+* and *Her2-enriched* subtypes are associated with a significantly higher rate of brain, lung, and liver metastases in comparison with the *Luminal A* subtype, whereas TN patients are associated with a higher rate of brain, lung and distant nodal metastases (11–14).

Despite improvements in diagnosis and novel adjuvant therapies, brain metastasis (BrM) is becoming a serious clinical problem, with a higher incidence in patients with histological grade (HG) 3, high Ki-67 expression (15), age younger than 50 years old (11, 16), ER-negative and Her2-positive (11, 17). Breast cancer subtypes also determine the prognosis and survival of a patient with BrM (18, 19). Patients with *Luminal* tumors have a better survival rate than those with TN tumors (20), whereas those with the *Her2-enriched* subtype have a significantly poorer prognosis than those with *Luminal/Her2+* or *Luminal* tumors

(21). Patients with TN tumors have worse overall and disease-free survival rates (22), especially in patients with lung metastases. Even patients with non-metastatic TN breast cancer have a high early risk of developing BrM as a first site of recurrence (23), and worse survival after brain radiotherapy (24) than those with the *non-TN* phenotype. In these patients, BrM represents a significant adverse prognostic factor not only to overall survival but also to neurologic and radiosurgical survival (25).

We recently reported BrM biomarkers that discriminate breast carcinomas according to their likelihood of BrM progression, regardless of whether or not they expressed Her2 (26, 27). Of these, GRP94 (94 kDa glucose-regulated protein), a signaling regulator and a major endoplasmic reticulum chaperone and FN14 (fibroblast growth factor-inducible protein) implicated in many intracellular signaling pathways, both have been implicated in the promotion of tumor proliferation and metastasis.

GRP94 has calcium binding properties that are conferring its major function in protein folding, assembly and degradation (28, 29). Tumor hypoxia activates endoplasmic reticulum stress upregulating the unfolded protein response (30). The expression of GRP94 correlates with advanced stage and poor survival in many cancers (31, 32).

In addition, FN14 is implicated in several signaling pathways that control the cancer hallmarks (33). Typically, reactive astrocytes produce proinflammatory cytokines, among them TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis), a type II membrane protein which activates FN14 (34). The binding of TWEAK to FN14 is involved in regulating perivascular astrocytes and the blood–brain barrier interface (35). Moreover, FN14 has been involved in cachexia and the treatment with anti-FN14 antibodies improves body and muscle mass and adipose tissue in mice, increasing survival and general welfare (36).

Given these results, we hypothesized that the expression of FN14 and GRP94 could be used for early identification of the risk of breast cancer brain metastasis, whatever the molecular subtype. Thus, we studied their expression in breast cancer primary tumors according to their molecular subtype defined by Her2, ER, PR, and Ki-67 expression. Our results indicate that FN14 is the most useful predictive/prognostic biomarker of BrM in breast cancer patients with *Luminal* (*Luminal A*, *Luminal B*, and *Luminal/Her2+*) carcinomas. Moreover, in combination with GRP94, FN14 predicts also BrM progression in *non-Luminal* tumors.

MATERIALS AND METHODS

Patients

We obtained 211 samples from patients diagnosed between 1989 and 2009 (Table S1 in Supplementary Material) at the

Abbreviations: BrM, brain metastasis; ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor; TN, triple negative; BCBrM, breast cancer brain metastasis; BrMFS, brain metastasis-free survival; NBrM, non-brain distant metastases; WoM, without metastases; NBrWoM, non-brain distant metastases and without metastases; HG, histological grade.

following institutions: Catalan Institute of Oncology (I.C.O.), Hospital Duran i Reynals and the Hospital Universitari de Bellvitge (L'Hospitalet de Llobregat, Spain); Consorci Hospitalari Parc Taulí (Sabadell, Spain); and I.C.O., Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (Badalona, Spain). A final total of 208 patients were included in this study, whose clinical (Table S2 in Supplementary Material), pathological parameters and molecular subtype status were as follows (Table S3 in Supplementary Material): 40.3% *Luminal A* (ER-positive, Ki-67 < 14%); 18.5% *Luminal B* (ER-positive, Ki-67 ≥ 14%); 9.0% *Luminal/Her2+* (ER-positive and Her2 overexpressed), 10.0% *Her2-enriched* (ER-negative and Her2 overexpressed), and 22.2% *TN* tumors (ER-negative, PR-negative, and normal expression of Her2). Some missing values from these variables discarded three patients, two from *Luminal* tumors and one from *non-Luminal* tumors.

For this work involving databases of human information we followed the Spanish National law on the protection of Personal Data “Ley 15/1999, 13 Dec.”

Histology and Immunohistochemistry

Tissue microarrays (TMAs) were prepared from three representative areas of the tumor, as described previously (27). Primary antibodies anti-GRP94 at 1/2,000 and anti-FN14 at 1/3,000 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) were diluted in Dako Real™ Antibody Diluent Buffer (Dakocytomation, Dako, Denmark): Tris buffer, pH 7.2, 15 mM Na₃N. LSAB + System-HRP (Dakocytomation) was used for staining, including secondary antibodies in PBS, streptavidin conjugated to HRP in PBS, and liquid 3,3′ diaminobenzidine in chromogen solution.

The overexpression of GRP94 and FN14 was categorized as positive when strong expression was detected and negative when no or weak expression was detected, to avoid false positives

(Figure 1). Morphologic diagnosis was performed with classical hematoxylin–eosin staining.

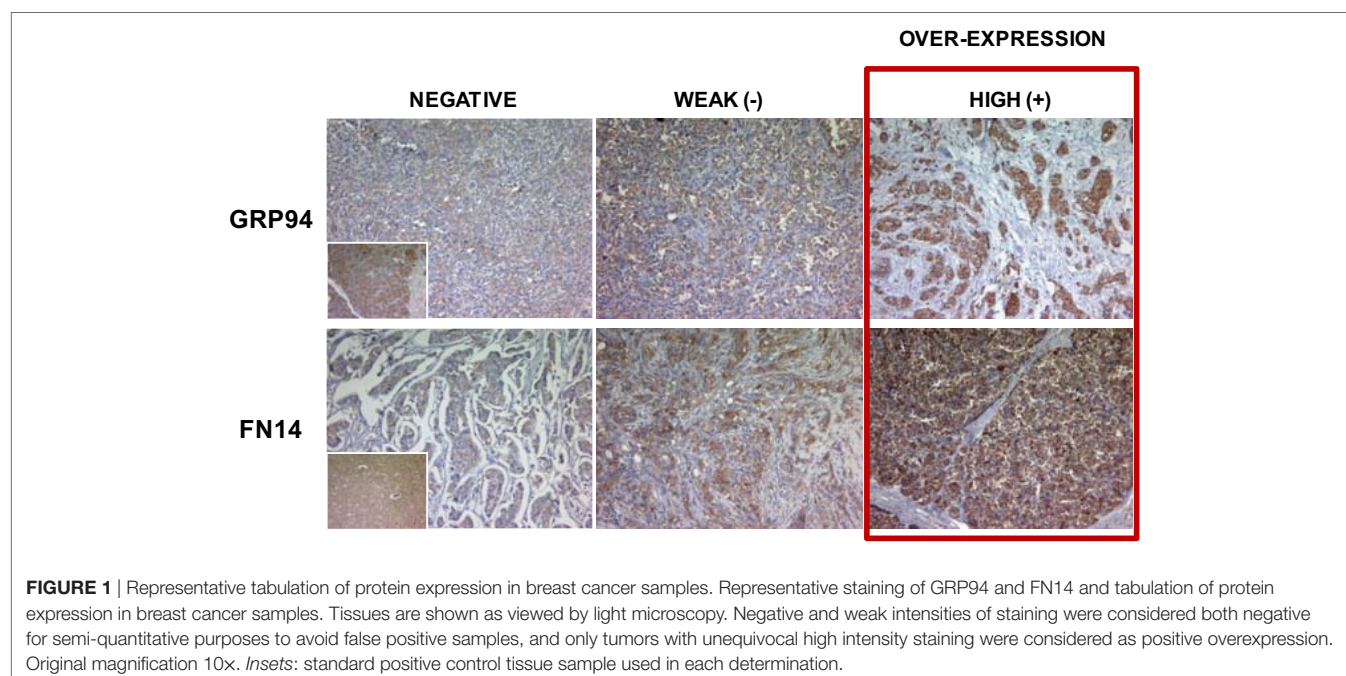
Statistics

Frequencies of categorical variables were compared among groups using the χ^2 -test or Fisher's exact test where appropriate. Brain metastasis-free survival (BrMFS) was estimated for each group using the Kaplan–Meier method and was compared among them using the Cox proportional hazards model, estimating their hazard ratio and 95% CI.

To evaluate the correlation between BrM and protein expression, immunostained samples were graded on a three-category scale as follows: negative, weak positive, and strong positive. The marker was classified as overexpressed only in strong positive samples to avoid false positives. Biomarker sensitivity and specificity, both singly and in combination, was assessed in both *Luminal* and *non-Luminal* patients. The biomarkers combinations were considered positive when at least one of them was positive and negative when all of them were negative.

A multivariate logistic regression analysis adjusted for covariates was carried out in both *Luminal* and *non-Luminal* groups to study in patients with BrM vs. NBrM the presence of biomarkers (GRP94 and FN14) in their primary tumor. The covariates used were as follows: age (≥50, 40–49, and <40), positive axillary nodes (0, 1–3, and ≥4), Her2 status (negative and positive), and presence of lung metastasis (no and yes), where the first category mentioned for each variable was the reference. We calculated the OR associated with the biomarker, its 95% CI and *p*-value.

In this analysis, the variable “triple negative (no, yes)” was not included as a covariate because all patients belonging to the *Luminal* group were “no” for this variable. Moreover, Her2 status was not included as a covariate when the combination (GRP94 + FN14 + Her2) was used as the biomarker.



Values were considered significant when p was less than 0.05. Software used: R Core Team (37).

RESULTS

Clinical Characteristics of Breast Carcinoma Subtypes and BrM Involvement

We studied patient characteristics according to three different groups of progression patterns (Table S1 in Supplementary Material): *brain metastases* (BrM), with or without metastases (WoM) at other sites; *non-brain distant metastases* (NBrM), patients with metastasis in bones and/or liver and/or lungs and/or non-regional lymph nodes, but not in brain; and patients WoM. The distribution of breast cancer molecular subtypes changed across the three groups of patients. The main distinctive parameters that characterized the BrM group were *age*, whereby below 50 years old was significantly different ($p = 0.001$); *hormone receptor negativity* [both ER ($p < 0.0001$) and PR ($p < 0.0001$)], an attribute of tumors that developed BrM in contrast to tumors from NBrM and WoM patients; and *Her2 positivity* and a *high Ki-67 index* ($p = 0.01$ and $p < 0.0001$, respectively). Other parameters, such as *tumor size* ($p = 0.001$), *HG* ($p < 0.0001$), and *lymph node involvement* ($p < 0.0001$) were similar among BrM and NBrM patients, but different in WoM patients.

More than 50% of BrM patients had *TN* tumors. By contrast, only 20.6% of NBrM and 9.8% of WoM patients had *TN* tumors (χ^2 -test: $p < 0.0001$). Important differences were observed in the *Her2-enriched* subtype with regard to metastasis progression, occurring in 23.1% of BrM, 8.8% of NBrM, and 4.9% of WoM groups. Moreover, the distribution of *Luminal/Her2+* tumors was different in patients according metastasis involvement, being 11.5% in BrM, 8.8% in NBrM, and 8.2% in WoM groups. Therefore, according to the clinical and pathological characteristics of breast cancer patients, we established two main groups due to limited size of our sample: the *Luminal group* (*Luminal A*, *Luminal B*, and *Luminal/Her2+* subtypes), which encompassed 25% (13/52) of patients with BrM, 70.6% (24/34) with NBrM and 85.3% (104/122) of WoM patients; and the *non-Luminal group* (*TN* and *Her2-enriched* subtypes), encompassing 75% (39/52) of patients with BrM, 29.4% (10/34) with NBrM, and 14.7% (18/122) of WoM patients. The clinical and pathological parameters of the *Luminal* and *non-Luminal* groups are described in Supplementary Table S4 in Supplementary Material: *tumor size*, ≥ 21 mm in 32.61 vs. 55.56%, respectively ($p = 0.002$); *HG* 3, 32.12 and 81.25%, respectively ($p < 0.0001$); and *regional lymph node involvement* (affected ≥ 4), in 14.39 vs. 35.39%, respectively ($p = 0.0008$).

As expected, significant differences were related to the therapeutic approach adopted: 81.82% of *Luminal* patients vs. 58.21% of *non-Luminal* patients did not receive neoadjuvant chemotherapy ($p = 0.0002$); 83.22 vs. 55.88% ($p < 0.0001$) received conservative surgery; 44.76 vs. 18.03% ($p = 0.001$) did not receive adjuvant chemotherapy; and 85.92 vs. 6.06% ($p < 0.0001$) received tamoxifen or another antiestrogen as hormonal therapy, respectively. Moreover, clinical relapses, with the presence of local (8.39 vs.

19.12%, $p = 0.024$), regional (1.40 vs. 16.18%, $p < 0.0001$), or distant relapses (27.27 vs. 73.53%, $p < 0.0001$) were less frequent in patients from the *Luminal* group than in those in the *non-Luminal* group, respectively.

The incidence of BrM (Table 1) was significantly higher in the *non-Luminal* group than in the *Luminal* group [58.21% (39/67) vs. 9.22% (13/141), $p < 0.0001$]. Furthermore, patient outcomes corroborated the clinical and pathological characteristics, with an increase in metastasis-free survival when tumors were *Luminal* in both BrM and NBrWoM groups (Figures S1A,B in Supplementary Material). Moreover, the worst prognosis was found in patients with *non-Luminal* tumors (HR = 10.57, 95% CI: 5.60–19.96; and HR = 4.01, 95% CI: 2.52–6.38; respectively, $p < 0.0001$). These results indicate that the assessment of subtypes in our series provided an effective subclassification according to BrM progression in patients, similar to other reported series (11, 14).

FN14 and GRP94 Stratify Breast Cancer Molecular Subtypes According to Their BrM Progression Risk

Since molecular subtypes in NBrM (tumors with bone, liver, lung, skin, etc.) and WoM had a similar clinic-pathological parameters distribution (Fisher's exact test, $p = 0.230$; data not shown), we considered both as a single group (NBrWoM) to better compare the expression of BrM biomarkers between *Luminal* ($N = 141$) and *non-Luminal* ($N = 67$) tumors (see Table 2). FN14 was overexpressed in 14.5% (20/138) of *Luminal* tumors and in 23.1% (15/65) of *non-Luminal* tumors. Moreover, in *Luminal* tumors, FN14 expression was significantly different between the BrM and NBrWoM groups, at 53.8% (7/13) vs. 10.4% (13/125), respectively (Fisher's exact test, $p = 0.0005$). FN14 expression in *non-Luminal* tumors differed between BrM and NBrWoM patients, being 31.6% (12/38) vs. 11.1% (3/27), respectively, although not significantly (Fisher's exact test, $p = 0.07$). Therefore, we concluded that FN14 expression in *Luminal* breast tumors was associated with BrM progression.

TABLE 1 | Distribution of patients with brain metastasis, other metastases (NBrM), and non-metastasis (without metastases) according to molecular subtype of the primary breast tumor.

Characteristics	Brain metastases	Non-brain distant metastases	Without metastases	p -Value (χ^2 -test)
	<i>N</i> (%)	<i>N</i> (%)	<i>N</i> (%)	
Patients (<i>N</i> = 208)^a	52 (25.0)	34 (16.3)	122 (58.7)	
Molecular subtypes				
Triple negative	27 (51.9)	7 (20.6)	12 (9.8)	
Her2-enriched	12 (23.1)	3 (8.8)	6 (4.9)	
Lum/Her2+	6 (11.5)	3 (8.8)	10 (8.2)	
Luminal B	5 (9.6)	8 (23.6)	25 (20.5)	
Luminal A	2 (3.9)	13 (38.2)	69 (56.6)	<0.0001

^aPatients included in these three categories ($N = 208/211$). Three patients were missing (not suitable for biomarkers assessment).

TABLE 2 | Distribution of biomarkers in brain metastasis (BrM) and NBrWoM patients in both *Luminal* and *non-Luminal* groups.

Patients (N = 208)				
Biomarker	Luminal group (N = 141)		Non-Luminal group (N = 67)	
	BrM	NBrWoM ^a	BrM	NBrWoM ^a
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
FN14+ ^b	7/13 (53.8)	13/125 (10.4)	12/38 (31.6)	3/27 (11.1)
	Fisher's exact test ($p = 0.0005$)		Fisher's exact test ($p = 0.07$)	
GRP94+ ^c	10/13 (76.9)	56/126 (44.4)	22/38 (57.9)	11/28 (39.3)
	Fisher's exact test ($p = 0.04$)		Fisher's exact test ($p = 0.21$)	

^aThis category encompasses those patients "without metastases" and those with "non-brain distant metastases" [bone, lung, liver, and non-regional lymph node metastases; in this category, five patients were previously excluded because they only had skin metastasis ($n = 2$), pleural metastasis ($n = 2$), or meningeal metastasis ($n = 1$)].

^bFN14 biomarker was assessed in 138 patients belonging to the *Luminal* group (this was not possible in 3 of them) and in 65 from the *non-Luminal* group (this was not possible in 2 of them).

^cGRP94 biomarker was assessed in 139 patients belonging to the *Luminal* group (this was not possible in 2 of them) and in 66 from the *non-Luminal* one (this was not possible for 1 of them).

Differences shown in number of patients (N) in each group are due to patients whose biomarkers were not available.

GRP94 was overexpressed in 47.5% (66/139) of *Luminal* and 50% (33/66) of *non-Luminal* tumors. Biomarkers expression in *Luminal* tumors was also significantly different between BrM and NBrWoM patients, being 76.9% (10/13) vs. 44.4% (56/126) (Fisher's exact test; $p = 0.04$), whereas GRP94 expression in the *non-Luminal* group was similar for BrM, at 57.9% (22/38) of patients, and NBrWoM at 39.3% (11/28) (Fisher's exact test; $p = 0.21$). These results highlight the intrinsic value of FN14 and GRP94 as organ-specific BrM biomarkers mainly in patients with tumors from the *Luminal* subtype.

Furthermore, we analyzed in tumors with BrM progression if the expression of BrM biomarkers were associated with Her2 overexpression. We found that FN14 expression was independent of Her2 status in patients with BrM from the *Luminal* group (Fisher's exact test; $p = 0.59$). By contrast, FN14 expression in the *non-Luminal* group was associated in 63.6% of cases with the *Her2-enriched* subtype (Table S5 in Supplementary Material), differing from *TN* tumors, of which 18.5% were positive for FN14 (Fisher's exact test, $p = 0.017$).

GRP94 expression in tumors from BrM affected patients was independent of Her2 status (Table S5 in Supplementary Material) in the *Luminal* (Fisher's exact test; $p = 1.00$) and *non-Luminal* groups (Fisher's exact test, $p = 0.30$).

FN14 and GRP94 Are Prognostic Biomarkers for BrM in Luminal Tumors

First, we studied metastasis-free survival in our series according to molecular subtype (Figure S2 in Supplementary Material), using the Kaplan-Meier method and the Cox proportional hazards model. The *TN* subtype was used as a reference group for comparative purposes. We analyzed the distribution of subtypes in NBrM patients (Figure S2A in Supplementary

Material). Differences between the *TN* and *Her2-enriched* subtypes were not statistically significant (HR = 0.81; 95% CI: 0.41–1.60; $p = 0.53$). By contrast, *Luminal/Her2+* (HR = 0.41; 95% CI: 0.18–0.96; $p = 0.039$), *Luminal B* (HR = 0.33; 95% CI: 0.17–0.64; $p = 0.0012$), and *Luminal A* (HR = 0.16; 95% CI: 0.08–0.30; $p < 0.0001$) showed a significantly lower incidence of NBrM than *TN* breast carcinomas. Furthermore, in BrM patients, we found significant differences in BrMFS with regard to molecular subtype, using the *TN* subtype as the reference group (Figure S2B in Supplementary Material): *Her2-enriched* did not differ significantly from *TN* (HR = 0.79; 95% CI: 0.40–1.55; $p = 0.49$), but the remaining subtypes showed a significantly lower risk than *TN*: *Luminal/Her2+*: HR = 0.33; 95% CI: 0.13–0.80; $p = 0.014$. *Luminal B*: HR = 0.13; 95% CI: 0.05–0.33; $p < 0.0001$ and *Luminal A*: HR = 0.02; 95% CI: 0.005–0.09; $p < 0.0001$.

Next, we studied BrMFS in the *Luminal* group according to whether the tumor expressed FN14 or not (Figure 2A), and we found that overexpression of FN14 was associated with a reduction in BrMFS (HR = 8.25; 95% CI: 2.77–24.61; $p = 0.00015$). Although, different stratification of the *non-Luminal* group (Figure 2B) according to FN14 expression was not statistically significant (HR = 1.74; 95% CI: 0.87–3.47; $p = 0.11$).

In addition, we analyzed BrMFS in the *Luminal* group according to GRP94 expression (Figure 2C) and observed that GRP94 was overexpressed in tumors from patients with reduced BrMFS (HR = 3.58; 95% CI: 0.98–13.11; $p = 0.054$ —Wald test), although this finding did not reach statistical significance either. Meanwhile, BrMFS according to GRP94 expression in *non-Luminal* tumors was not significantly different (HR = 1.22; 95% CI: 0.64–2.32; $p = 0.55$) (Figure 2D).

FN14 Is a Predictive Biomarker of BrM in Luminal Tumors

Since overexpression of the Her2 gene is associated with a higher risk to develop BrM, we analyzed the sensitivity and specificity of FN14 and GRP94 expression to predict BrM and compared these parameters to the prediction given by Her2 in these patients (Table 3). In patients belonging to the *Luminal* group (low risk of BrM *a priori*), FN14 and Her2 showed more specificity (89.60 and 89.84%, respectively) than GRP94 (55.56%) to predict BrM progression. However, GRP94 expression showed more sensitivity (76.92%) than FN14 and Her2 (53.85 and 46.15%, respectively) to predict BrM involvement.

On the other hand, in patients with a higher risk of BrM, such as *non-Luminal* ones, FN14 (88.89%) was the most specific protein to discriminate tumors that developed BrM, followed by Her2 (67.86%) and GRP94 (60.71%). GRP94 sensitivity was again higher (57.89%) than that obtained with FN14 or Her2 (31.58 and 30.77%, respectively).

Expression of the biomarker combination FN14 + GRP94 improved BrM risk assessment in *Luminal* patients compared with *non-Luminal* ones (sensitivity: 84.62 and 68.42%, specificity: 50 and 57.14%, respectively). The addition of Her2 yielded 84.62 and 71.79% sensitivity, and 45.24 and 42.86% specificity in *Luminal* with regard to *non-Luminal*, respectively (Table 3). The

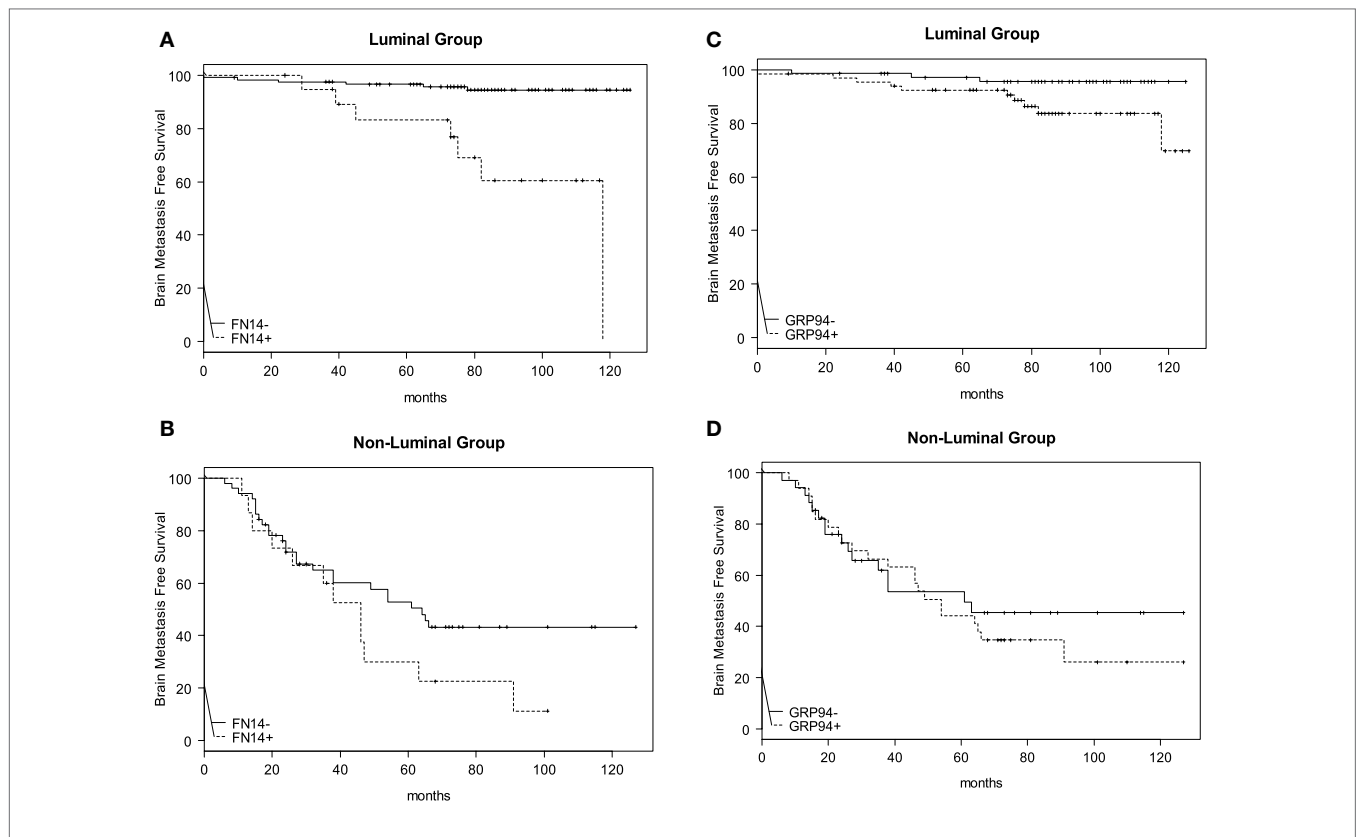


FIGURE 2 | Brain metastasis-free survival (BrMFS) in breast cancer patients according to expression of FN14 and GRP94 biomarkers. Comparisons between *Luminal* (A) and *non-Luminal* (B) groups, according to FN14 positivity in primary tumors revealed a shortened BrMFS that was statistically significant in the *Luminal* group (HR = 8.25; 95% CI: 2.77–24.61; $p = 0.00015$) but not in the *non-Luminal* one (HR = 1.74; 95% CI: 0.87–3.47; $p = 0.11$). With regard to GRP94 positivity, shortened BrMFS in *Luminal* (C) and *non-Luminal* (D) groups was not statistically significant (HR = 3.58; 95% CI: 0.98–13.11; $p = 0.054$ and HR = 1.22; 95% CI: 0.64–2.32; $p = 0.55$, respectively).

TABLE 3 | Sensitivity and specificity of biomarkers, singly or in combination, with regard to brain metastases in *Luminal* and *non-Luminal* patients.

Patients (N = 208)

Biomarker	Luminal group (N = 141)			Non-Luminal group (N = 67)		
	N ^b	Sensitivity (%)	Specificity (%)	N ^b	Sensitivity (%)	Specificity (%)
FN14	138	(53.85)	(89.60)	65	(31.58)	(88.89)
GRP94	139	(76.92)	(55.56)	66	(57.89)	(60.71)
Her2	141	(46.15)	(89.84)	67	(30.77)	(67.86)
FN14 + GRP94 ^a	139	(84.62)	(50.00)	66	(68.42)	(57.14)
FN14 + GRP94 + Her2 ^a	139	(84.62)	(45.24)	67	(71.79)	(42.86)

^aIn each case, these combinations were considered positive when at least one of the assessed molecules was positive and negative when all of them were negative.

^bDifferences in number or patients (N) are due to those patients whose biomarker assessment (singly or in combination) was unknown.

combination of FN14 + GRP94 + Her2 increased sensitivity to predict BrM in both *Luminal* and *non-Luminal* cases, covering a wide range of patients.

The high specificity shown by FN14 and Her2 when evaluated singly was lost in combination, suggesting that both biomarkers stratified different patient subgroups of BrM risk.

To assess the usefulness of FN14 and GRP94 as independent risk factors of BrM, a multivariate analysis was performed, including age, axillary node involvement, Her2 status, and presence of lung metastasis as covariates in the analysis (Table 4).

Outcomes showed that patients belonging to the *Luminal* group (ER+) had a statistically significant higher risk to develop BrM if the tumor expressed FN14 compared with those with FN14 negative tumors (OR: 36.70; 95% CI: 3.65–368.25; $p = 0.002$). The likelihood of these patients to develop BrM increased 36.70-fold. By contrast, when tumors overexpressed GRP94, the risk to develop BrM (OR = 5.74; 95% CI: 0.87–37.66) remained non-significant ($p = 0.069$), either in combination with FN14 ($p = 0.066$) or Her2 ($p = 0.071$) positivity (OR = 7.10, 95% CI: 0.88–57.51; and OR = 5.80, 95% CI: 0.86–39.08, respectively).

TABLE 4 | Multivariate analysis of biomarkers in patients with brain metastasis from the *Luminal* and *non-Luminal* groups.

Biomarker	Patients (N = 199) ^a			
	Luminal group (N = 136)		Non-Luminal group (N = 63)	
	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
FN14	36.70 (3.65–368.25)	0.002	3.29 (0.64–16.79)	0.153
GRP94	5.74 (0.87–37.66)	0.069	3.23 (0.98–10.63)	0.053
FN14 + GRP94 ^b	7.10 (0.88–57.51)	0.066	4.04 (1.19–13.65)	0.025
FN14 + GRP94 + Her2 ^b	5.80 (0.86–39.08)	0.071	2.45 (0.73–8.22)	0.147

The covariates used in this study were as follows: age, axillary lymph node involvement, Her2 status, and presence of lung metastasis. Her2 was not included as a covariate when we used the combination GRP94 + FN14 + Her2 as biomarker.

^aThe number of patients (N) obtained in each group corresponds to those patients who presented all the required covariates.

^bIn each case, these combinations were considered positive when at least one of the assessed molecules was positive and negative when all of them were negative.

In *non-Luminal* patients, only the combination of FN14 and GRP94 positivity was significantly predictive of BrM progression (95% CI: 1.19–13.65, $p = 0.025$), with a 4.04-fold likelihood to develop BrM (Table 4). These results are in consonance with our previous results reporting the usefulness of both biomarkers to predict BrM in *TN* breast cancer patients (27).

In summary, our study reveals that (1) A subset of breast cancer patients with a better prognosis *a priori*, such as estrogen-receptor positive with or without Her2 positivity, develop brain metastases if FN14 and/or GRP94 biomarkers are positive in their primary tumor. (2) FN14-positive status impairs the prognosis of breast cancer patients by shortening the length of BrMFS. (3) The likelihood to develop BrM in patients with FN14-positive tumors increases 36.70-fold ($p = 0.002$). (4) The combined assessment of biomarkers (FN14 + GRP94) shows a higher benefit in risk evaluation of BrM in patients with *non-Luminal* tumors.

Since stratification impairs statistical consistency, further multicentre studies with wider amount of patients are needed to reinforce the results.

DISCUSSION

The routine analysis of ER, PR, Ki-67, and Her2 status in breast tumors can predict relapse, providing the standard approach for clinical decision-making in the adjuvant setting (17–19). However, these procedures are insufficient to predict BrM.

This study provides evidence that a subset of breast cancer patients with a better prognosis *a priori*, such as patients with *Luminal* carcinomas, with or without Her2 positivity, can be stratified by their likelihood to develop BrM if FN14 is overexpressed (OR = 36.70). Thus, the clinical use of FN14 expression might facilitate a preventive strategy for patients at high risk for BrM progression and will improve the design of trials aimed at its prevention. Moreover, the combined assessment of both FN14 and GRP94 proteins shows a higher benefit in risk evaluation of

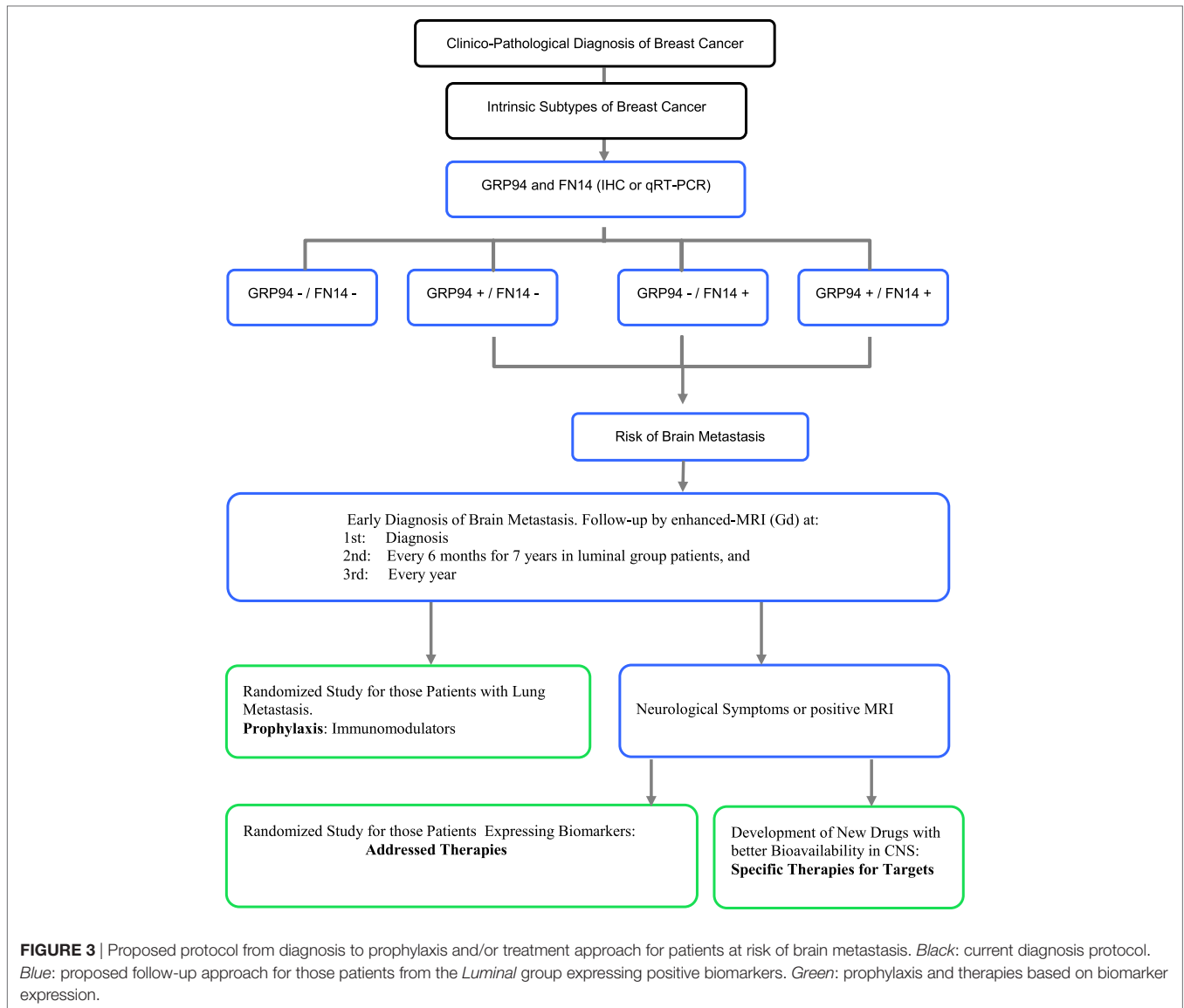
BrM progression, especially in *non-Luminal* patients (4.04-fold), independently of Her2 status (OR = 2.45). Therefore, the use of FN14 and GRP94 expression at early diagnosis might stratify those BrM patients prone to BrM.

Many studies have reported risk factors for BrM, including Her2 positivity, ER negativity, high proliferative activity, young age and lymph node involvement (38, 39). FN14 and GRP94 comprise a diagnostic tool capable of predicting BrM independently of these classical clinical and pathological parameters. The long-term BrM-free survival of *Luminal* group patients when biomarkers are negative suggests the usefulness of including both biomarkers to stratify patients that might benefit from magnetic resonance imaging (MRI-Gd) follow-up. This should be considered for at least 7 years (about 80 months) after diagnosis, the period after which BrM relapse in the *Luminal* group stabilizes (Figure 2). Therefore, we suggest that intrinsic subtypes of breast cancer plus FN14 and GRP94 expression can provide a reliable assessment of BrM risk, facilitating early diagnosis through follow-up of the patient's evolution (Figure 3). Even patients from the *non-Luminal* group could benefit from stratification using FN14 and GRP94 biomarkers. This is not surprising because in combination, they are good predictors of BrM progression in *TN* breast carcinomas (27). Consequently, if these findings were confirmed in further studies, it would also enable us to apply a specific clinical and therapeutical algorithm to improve breast cancer patients' follow-up.

Although the armamentarium available for BrM treatment is limited, there are reasons to be optimistic because emerging therapies have shown promise in preclinical and early clinical settings (40–42). Moreover, a protocol that included an MRI procedure might provide indications for early surgery and/or radiosurgery when BrM is small to minimal and/or for the design of a new approach in prophylactic systemic protocols (e.g., to replace or add another drug and/or biological compound that crosses the blood–brain barrier to avoid the growth of a clinical BrM) as well as for the design of a new protocol as a prophylactic approach.

Patients with Her2 positivity in primary tumor are usually treated with trastuzumab after delivering chemotherapy, obtaining a better systemic response (43). In our series, 99% of patients did not receive trastuzumab as adjuvant therapy. Thus, an interesting approach would be to study the relationship between FN14 and GRP94 expression and BMFS in those patients belonging to the *Lum/Her2+* and *Her2-enriched* subtypes who have received trastuzumab. In our multicenter series, GRP94 and FN14 expression might improve breast cancer survival by predicting BrM. In particular, FN14 has a similar sensitivity and specificity to that of Her2.

Immunophenotypic changes associated with antitumor activity have been observed with anti-TWEAK antibody treatment in mice and a phase I multicenter trial of RG7212 monotherapy in patients with FN14-expressing advanced solid tumors has been initiated, with good tolerability and favorable pharmacokinetics (44). Therefore, these molecules might be good candidates to develop new drugs to treat or prevent BrM according to the tumor-associated risk of breast cancer patients.



In itself, BrM is an exclusion criterion for most prospective trials, limiting the possibility of developing new therapies (45). Moreover, therapies are usually started when symptoms appear, limiting treatment options and success (41). We propose a new classification that provides a standard approach for clinical decision-making about CNS metastases at early diagnosis when adjuvant chemotherapy and radiosurgery are more effective (46). Furthermore, evaluation of new and more specific biomarkers in primary tumor may be a promising field of research due to the high impact that these might have in the future as regards facilitating the design of new therapeutic strategies to either prevent or treat this life-threatening event.

ETHICS STATEMENT

This study was approved by Comité ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico de Barcelona.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AM-A designed the study hypothesis according to both ER status and biomarkers expression, collecting all available clinical and pathological information from patients' reports and designing the several clinicopathological variables in a new wider and more complete database. VH participated in the follow-up of tissue microarrays and collecting and organizing the whole information emerged from biomarkers expression. FM and RB, as radiation oncologists, and AU, MG-G, and MS, as medical oncologists, contributed with a wide registered clinical follow-up of patients and they offered important clinical data from clinical reports. NB, NV, XA, and EC, as pathologists, contributed with the tissue microarrays analysis and categorizing the level of expression of biomarkers in all studied patients. DC carried out all statistic analysis. AS is the leader and responsible of the project, leading, coordinating,

and checking the different steps of the study and assisted in writing the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Toffa Evans from Assessorament Lingüístic i Terminologia Universitat de Barcelona for language advice.

FUNDING

This study was supported by grants from the Spanish Ministry of Health and Consumer Affairs FIS-PI14/00336 from the

I+D+I National Plan with the financial support from ISCIII-Subdirección General de Evaluación and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), by grant 2014 SGR 530 from the Generalitat de Catalunya and from Fundació Privada Cellex Barcelona.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2017.00283/full#supplementary-material>.

REFERENCES

- Cadoo KA, Traina TA, King TA. Advances in molecular and clinical subtyping of breast cancer and their implications for therapy. *Surg Oncol Clin N Am* (2013) 22:823–40. doi:10.1016/j.soc.2013.06.006
- Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) 98:10869–74. doi:10.1073/pnas.191367098
- Sørli T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) 100:8418–23. doi:10.1073/pnas.0932692100
- Engström MJ, Opdahl S, Hagen AI, Romundstad PR, Akslen LA, Haugen OA, et al. Molecular subtypes, histopathological grade and survival in a historic cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* (2013) 140:463–73. doi:10.1007/s10549-013-2647-2
- Puig-Vives M, Sánchez MJ, Sánchez-Cantalejo J, Torrella-Ramos A, Martos C, Ardanaz E, et al. Distribution and prognosis of molecular breast cancer subtypes defined by immunohistochemical biomarkers in a Spanish population-based study. *Gynecol Oncol* (2013) 130:609–14. doi:10.1016/j.ygyno.2013.05.039
- Howland NK, Driver TD, Sedrak MP, Wen X, Dong W, Hatch S, et al. Lymph node involvement in immunohistochemistry-based molecular classifications of breast cancer. *J Surg Res* (2013) 185:697–703. doi:10.1016/j.jss.2013.06.048
- Ades F, Zardavas D, Bozovic-Spasojevic I, Pugliano L, Fumagalli D, de Azambuja E, et al. Luminal B breast cancer: molecular characterization, clinical management, and future perspectives. *J Clin Oncol* (2014) 32:2794–803. doi:10.1200/JCO.2013.54.1870
- Lowery AJ, Kell MR, Glynn RW, Kerin MJ, Sweeney KJ. Locoregional recurrence after breast cancer surgery: a systematic review by receptor phenotype. *Breast Cancer Res Treat* (2012) 133:831–41. doi:10.1007/s10549-011-1891-6
- Wang Y, Yin Q, Yu Q, Zhang J, Liu Z, Wang S, et al. A retrospective study of breast cancer subtypes: the risk of relapse and the relations with treatments. *Breast Cancer Res Treat* (2011) 130:489–98. doi:10.1007/s10549-011-1709-6
- Hernández-Aya LF, González-Angulo AM. Adjuvant systemic therapies in breast cancer. *Surg Clin North Am* (2013) 93:473–91. doi:10.1016/j.suc.2012.12.002
- Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MCU, Voduc D, Speers CH, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol* (2010) 28:3271–7. doi:10.1200/JCO.2009.25.9820
- Fountzilas G, Dafni U, Bobos M, Batistatou A, Kotoula V, Trihia H, et al. Differential response of immunohistochemically defined breast cancer subtypes to anthracycline-based adjuvant chemotherapy with or without paclitaxel. *PLoS One* (2012) 7:e37946. doi:10.1371/journal.pone.0037946
- Harrell JC, Prat A, Parker JS, Fan C, He X, Carey L, et al. Genomic analysis identifies unique signatures predictive of brain, lung, and liver relapse. *Breast Cancer Res Treat* (2012) 132:523–35. doi:10.1007/s10549-011-1619-7
- Smid M, Wang Y, Zhang Y, Sieuwerts AM, Yu J, Klijn JG, et al. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res* (2008) 68:3108–14. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5644
- Rudat V, El-Sweilmeen H, Brune-Erber I, Nour AA, Almasri N, Altuwajiri S, et al. Identification of breast cancer patients with a high risk of developing brain metastases: a single-institutional retrospective analysis. *BMC Cancer* (2014) 14:289. doi:10.1186/1471-2407-14-289
- Hung MH, Liu CY, Shiau CY, Hsu CY, Tsai YF, Wang YL, et al. Effect of age and biological subtype on the risk and timing of brain metastasis in breast cancer patients. *PLoS One* (2014) 9:e89389. doi:10.1371/journal.pone.0089389
- Minisini AM, Moroso S, Gerrata L, Giangreco M, Iacono D, Poletto E, et al. Risk factors and survival outcomes in patients with brain metastases from breast cancer. *Clin Exp Metastasis* (2013) 30:951–6. doi:10.1007/s10585-013-9594-5
- Kaplan MA, Arslan UY, Işıkdoğan A, Dane F, Oksuzoglu B, Inanc M, et al. Biological subtypes and distant relapse pattern in breast cancer patients after curative surgery. *Breast Care* (2016) 11(4):248. doi:10.1159/000448186
- Kuba S, Ishida M, Nakamura Y, Yamanouchi K, Minami S, Taguchi K, et al. Treatment and prognosis of breast cancer patients with brain metastases according to intrinsic subtype. *Jpn J Clin Oncol* (2014) 44:1025–31. doi:10.1093/jjco/hyu126
- Wiens AL, Martin SE, Bertsch EC, Vance GH, Stohler RA, Cheng L, et al. Luminal subtypes predict improved survival following central nervous system metastasis in patients with surgically managed metastatic breast carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* (2014) 138:175–81. doi:10.5858/arpa.2012-0541-OA
- Berghoff AS, Bago-Horvath Z, De Vries C, Dubsky P, Pluschnig U, Rudas M, et al. Brain metastases free survival differs between breast cancer subtypes. *Br J Cancer* (2012) 106:440–6. doi:10.1038/bjc.2011.597
- Ishihara M, Mukai H, Nagai S, Onozawa M, Nihei K, Shimada T, et al. Retrospective analysis of risk factors for central nervous system metastases in operable breast cancer: effects of biologic subtype and Ki67 overexpression on survival. *Oncology* (2013) 84:135–40. doi:10.1159/000345321
- Dawood S, Lei X, Litton JK, Buchholz TA, Hortobagyi GN, Gonzalez-Angulo AM. Incidence of brain metastases as a first site of recurrence among women with triple receptor-negative breast cancer. *Cancer* (2012) 118:4652–9. doi:10.1002/cncr.27434
- Wu X, Luo B, Wei S, Luo Y, Feng Y, Xu J, et al. Efficiency and prognosis of whole brain irradiation combined with precise radiotherapy on triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Ther* (2013) 9(Suppl):S169–72. doi:10.4103/0973-1482.122518
- Xu Z, Schlesinger D, Toulmin S, Rich T, Sheehan J. Impact of triple-negative phenotype on prognosis of patients with breast cancer brain metastases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2012) 84:612–8. doi:10.1016/j.ijrobp.2011.12.054
- Sanz-Pamplona R, Aragüés R, Driouch K, Martín B, Oliva B, Gil M, et al. Expression of endoplasmic reticulum stress proteins is a candidate marker of brain metastasis in both ErbB2+ and ErbB2- primary breast tumors. *Am J Pathol* (2011) 179:564–79. doi:10.1016/j.ajpath.2011.04.037
- Martínez-Aranda A, Hernández V, Guney E, Muixí L, Foj R, Baixeras N, et al. FN14 and GRP94 expression are prognostic/predictive biomarkers of brain metastasis outcome that open up new therapeutic strategies. *Oncotarget* (2015) 6:44254–73. doi:10.18632/oncotarget.5471
- Zhu G, Lee AS. Role of the unfolded protein response, GRP78 and GRP94 in organ homeostasis. *J Cell Physiol* (2015) 230:1413–20. doi:10.1002/jcp.24923

29. Lee AS. Glucose-regulated proteins in cancer: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Cancer* (2014) 14:263–76. doi:10.1038/nrc3701
30. Gutiérrez T, Simmen T. Endoplasmic reticulum chaperones and oxidoreductases: critical regulators of tumor cell survival and immunorecognition. *Front Oncol* (2014) 4:291. doi:10.3389/fonc.2014.00291
31. Ansa-Addo EA, Thaxton J, Hong F, Wu BX, Zhang Y, Fugle CW, et al. Clients and oncogenic roles of molecular chaperone gp96/grp94. *Curr Top Med Chem* (2016) 16:2765–78. doi:10.2174/1568026616666160413141613
32. Wu BX, Hong F, Zhang Y, Ansa-Addo E, Li Z. GRP94/gp96 in cancer: biology, structure, immunology, and drug development. *Adv Cancer Res* (2016) 129:165–90. doi:10.1016/bs.acr.2015.09.001
33. Winkles JA. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat Rev Drug Discov* (2008) 7:411–25. doi:10.1038/nrd2488
34. Saas P, Boucraut J, Walker PR, Quiquerez AL, Billot M, Desplat-Jego S, et al. TWEAK stimulation of astrocytes and the proinflammatory consequences. *Glia* (2000) 32:102–7. doi:10.1002/1098-1136(200010)32:1<102::AID-GLIA100>3.0.CO;2-U
35. Yepes M. TWEAK and FN14 in the neurovascular unit. *Front Immunol* (2013) 4:367. doi:10.3389/fimmu.2013.00367
36. Johnston AJ, Murphy KT, Jenkinson L, Laine D, Emmrich K, Faou P, et al. Targeting of Fn14 prevents cancer-induced cachexia and prolongs survival. *Cell* (2015) 162:1365–78. doi:10.1016/j.cell.2015.08.031
37. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing (2016). Available from: <https://www.R-project.org/>
38. Berghoff AS, Bartsch R, Wöhrer A, Streubel B, Birner P, Kros JM, et al. Predictive molecular markers in metastases to the central nervous system: recent advances and future avenues. *Acta Neuropathol* (2014) 128:879–91. doi:10.1007/s00401-014-1350-7
39. Preusser M, Winkler F, Collette L, Haller S, Marreaud S, Soffietti R, et al. Trial design on prophylaxis and treatment of brain metastases: lessons learned from the EORTC Brain Metastases Strategic Meeting 2012. *Eur J Cancer* (2012) 48:3439–47. doi:10.1016/j.ejca.2012.07.002
40. Steeg PS, Camphausen KA, Smith QR. Brain metastases as preventive and therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* (2011) 11:352–63. doi:10.1038/nrc3053
41. Kodack DP, Askoxylakis V, Ferraro GB, Fukumura D, Jain RK. Emerging strategies for treating brain metastases from breast cancer. *Cancer Cell* (2015) 27:163–75. doi:10.1016/j.ccell.2015.01.001
42. Freedman RA, Gelman RS, Wefel JS, Melisko ME, Hess KS, Connolly RM, et al. Translational Breast Cancer Research Consortium (TBCRC) 022: a phase II trial of neratinib for patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer and brain metastases. *J Clin Oncol* (2016) 34:945–52. doi:10.1200/JCO.2015.63.0343
43. Crown J, Kennedy MJ, Tresca P, Marty M, Espie M, Burris HA, et al. Optimally tolerated dose of lapatinib in combination with docetaxel plus trastuzumab in first-line treatment of HER2-positive metastatic breast cancer. *Ann Oncol* (2013) 24:2005–11. doi:10.1093/annonc/mdt222
44. Lassen UN, Meulendijks D, Siu LL, Karanikas V, Mau-Sorensen M, Schellens JH, et al. A phase I monotherapy study of RG7212, a first-in-class monoclonal antibody targeting TWEAK signaling in patients with advanced cancers. *Clin Cancer Res* (2015) 21:258–66. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1334
45. Lin NU, Lee EQ, Aoyama H, Barani IJ, Baumert BG, Brown PD, et al. Challenges relating to solid tumour brain metastases in clinical trials, part 1: patient population, response, and progression. A report from the RANO group. Response Assessment in Neuro-Oncology (RANO) group. *Lancet Oncol* (2013) 14:e396–406. doi:10.1016/S1470-2045(13)70311-5
46. Bernstein MB, Krishnan S, Hodge JW, Chang JY. Immunotherapy and stereotactic ablative radiotherapy (ISABR): a curative approach? *Nat Rev Clin Oncol* (2016) 13:516–24. doi:10.1038/nrclinonc.2016.30

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Martínez-Aranda, Hernández, Moreno, Baixeras, Cuadras, Urruticoechea, Gil-Gil, Vidal, Andreu, Seguí, Ballester, Castella and Sierra. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

