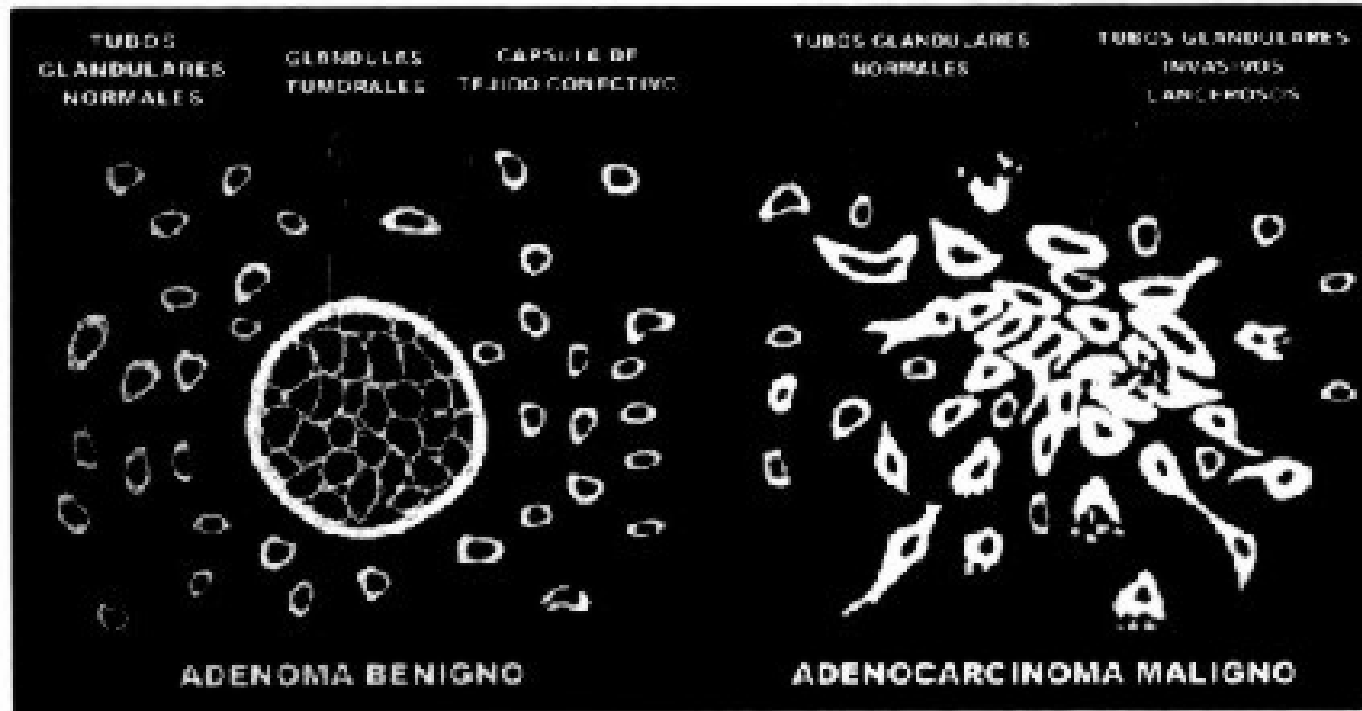


# **BIOLOGÍA DE LA PROGRESIÓN TUMORAL**

**Dra. Elisa Bal de Kier Joffé**  
**Area Investigación**  
**Instituto de Oncología “Angel H. Roffo”**

# BIOLOGIA DE LA CELULA TUMORAL

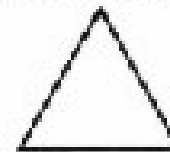


## COMPORTAMIENTO MALIGNO

- \*Crecimiento excesivo
- \*Producción de sustancias bioactivas

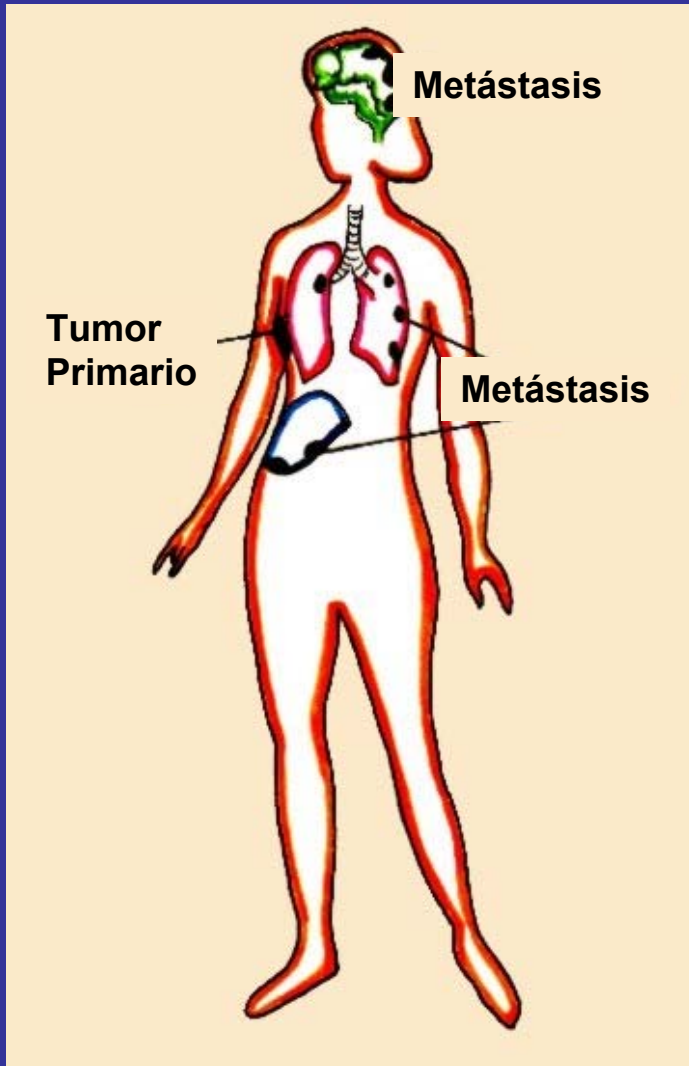
## CRECIMIENTO DESCONTROLADO

INVASIVIDAD



DISEMINACION METASTASICA

# ¿Por qué fracasa el tratamiento del cáncer?



- Diagnóstico tardío
  - Tumores grandes no operables
  - Diseminación precoz
  - Metástasis de primario oculto
- Localización del tumor y/o metástasis en órganos vitales. Daños por compresión o por invasión local, pérdida de función.
- Toxicidad de los tratamientos
- Heterogeneidad tumoral
  - Inestabilidad génica y generación de células más malignas
  - El tumor primario difiere de las metástasis, y éstas entre sí, en respuesta a los tratamientos

# PROGRESIÓN TUMORAL

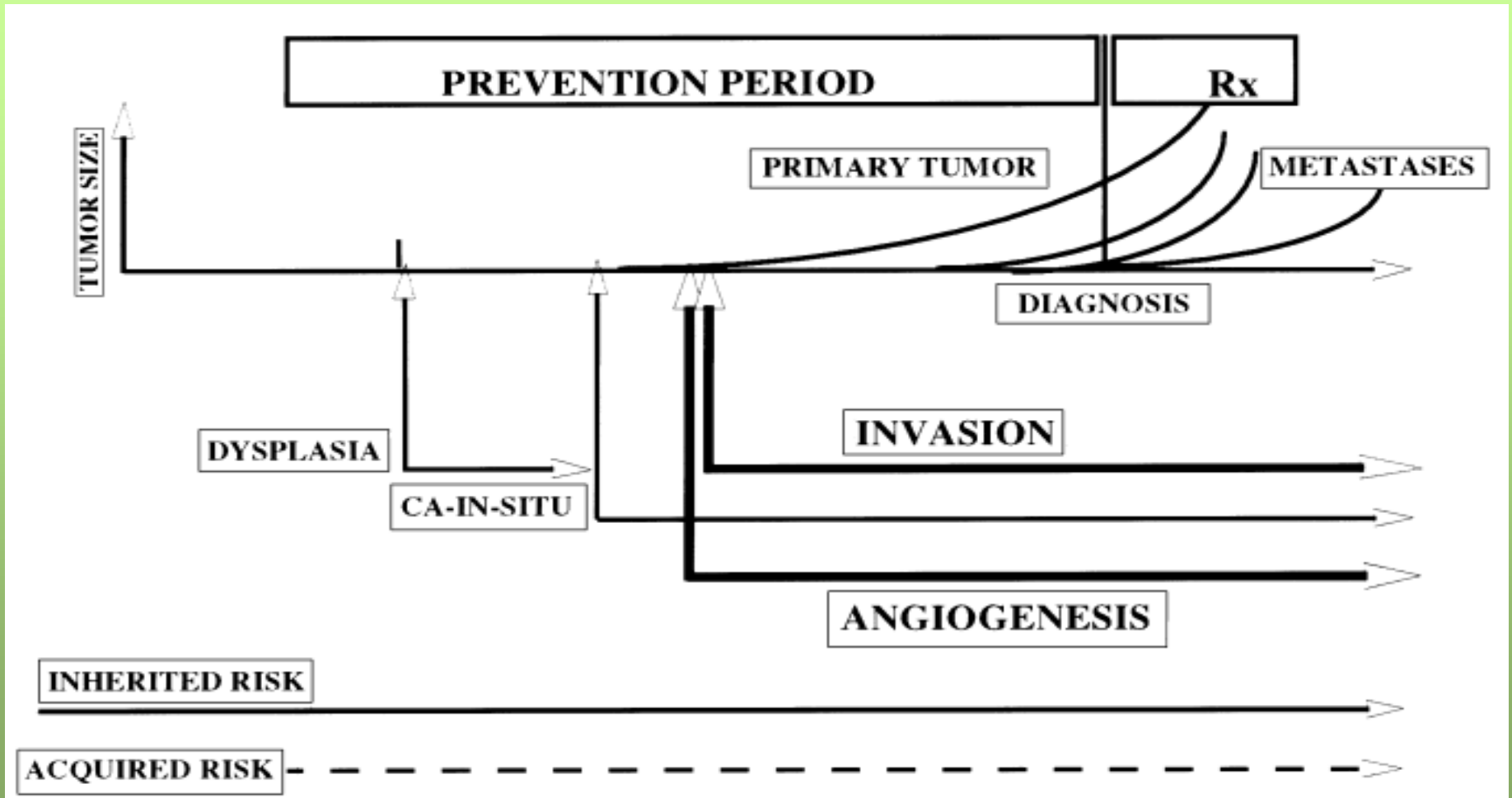
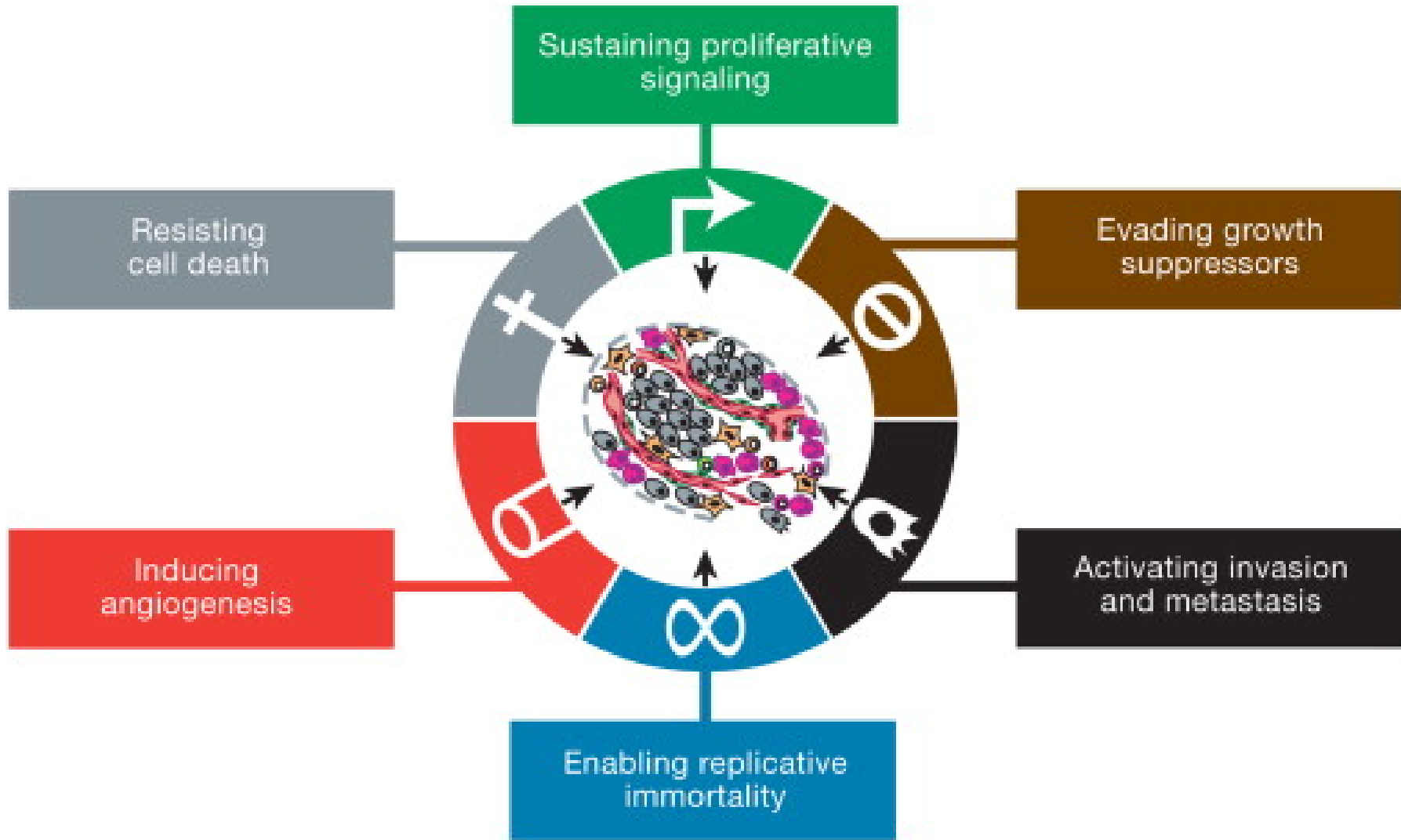


Figure 8.1. Temporal progression of cancer. Diagnosis and treatment of cancer occurs generally late in the course of disease. At this time, a high proportion of patients have obvious or occult metastases. Acquisition of the invasive and angiogenic phenotypes occur very early, in some cancers perhaps more than 5 to 10 years prior to presentation. This demonstrates a window of opportunity to intervene with anti-invasive and antimetastasis therapies.

# THE HALLMARKS OF CANCER

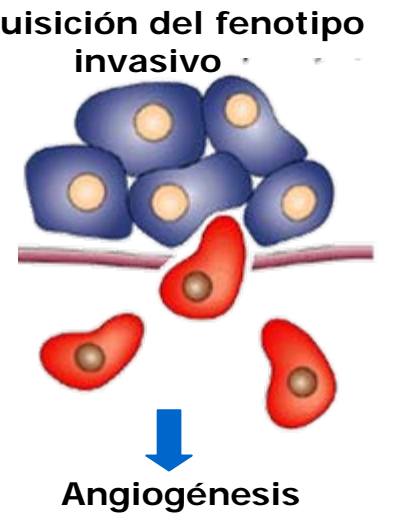
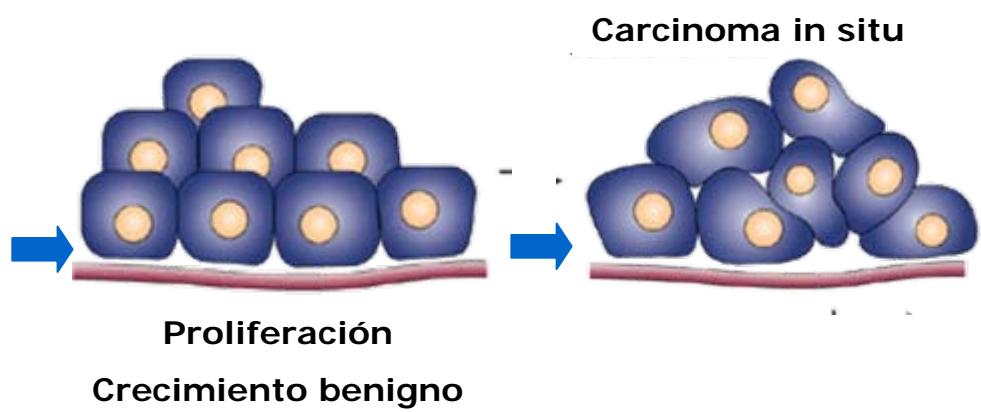
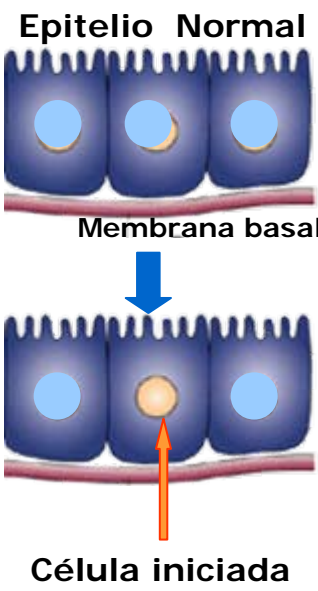


# DEFINICIONES

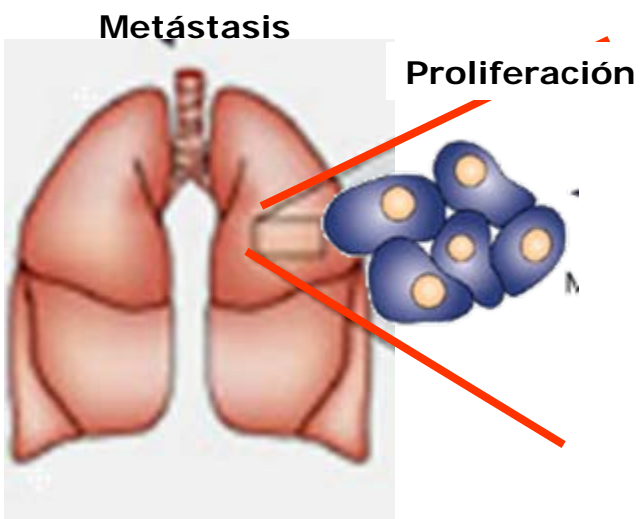
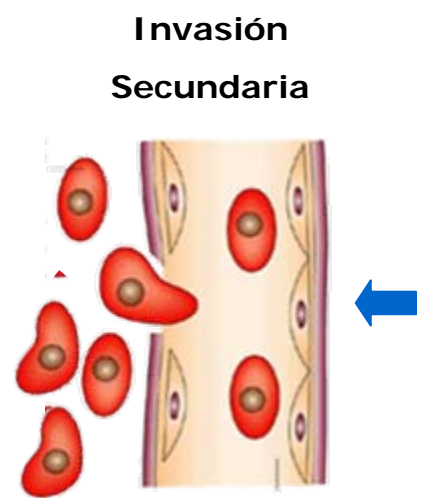
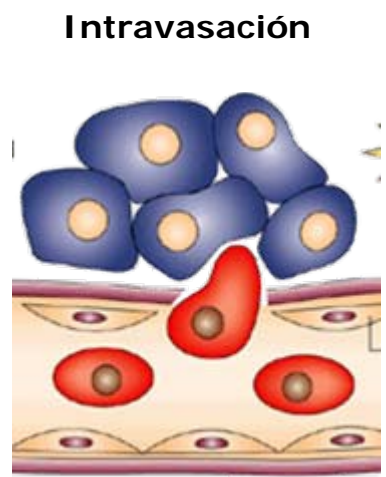
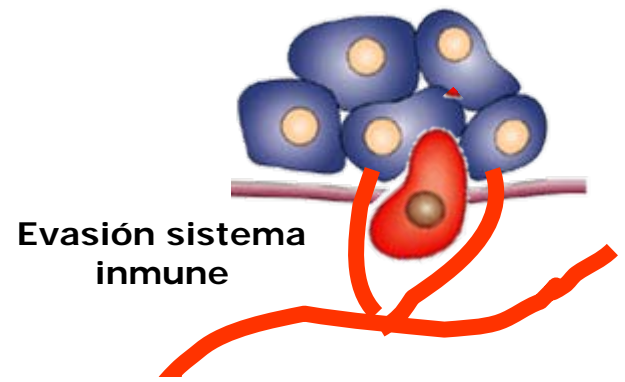
Se conoce como **PROGRESIÓN TUMORAL** al proceso por el cual el comportamiento del tumor va empeorando gradualmente hasta alcanzar la diseminación a distancia. Se acepta que, salvo excepciones, la tendencia de los tumores es la de ir “de mal en peor”

La **METÁSTASIS** (Recamier 1829) es la diseminación de las células neoplásicas a sitios distantes del tumor primario, donde proliferan para formar tumores secundarios (> de 50 células).

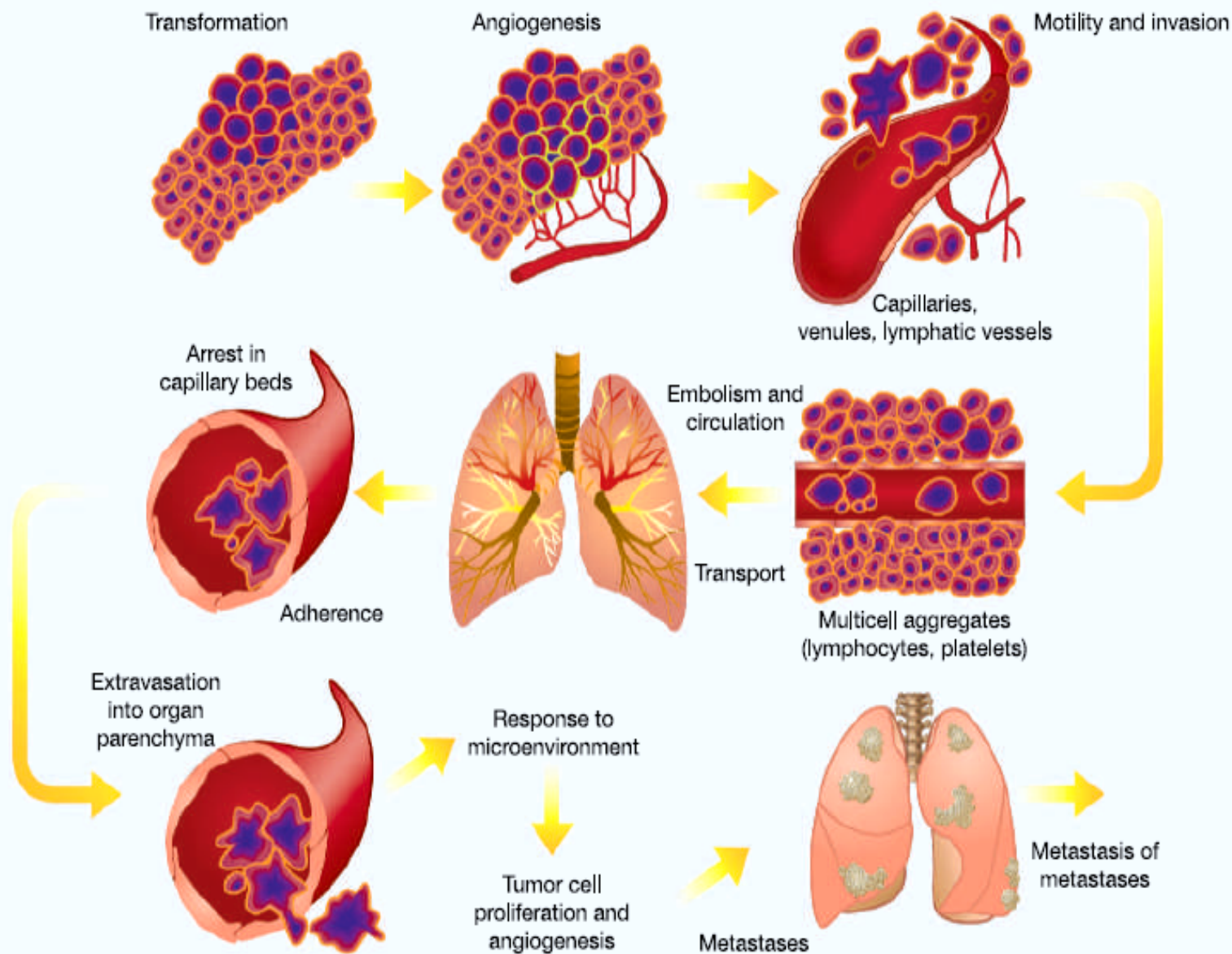
**METASTASIS no es = a CAPACIDAD METASTÁSICA  
(DORMANCY)**



# CASCADA METASTÁSICA



# The Sequential Process of Metastasis

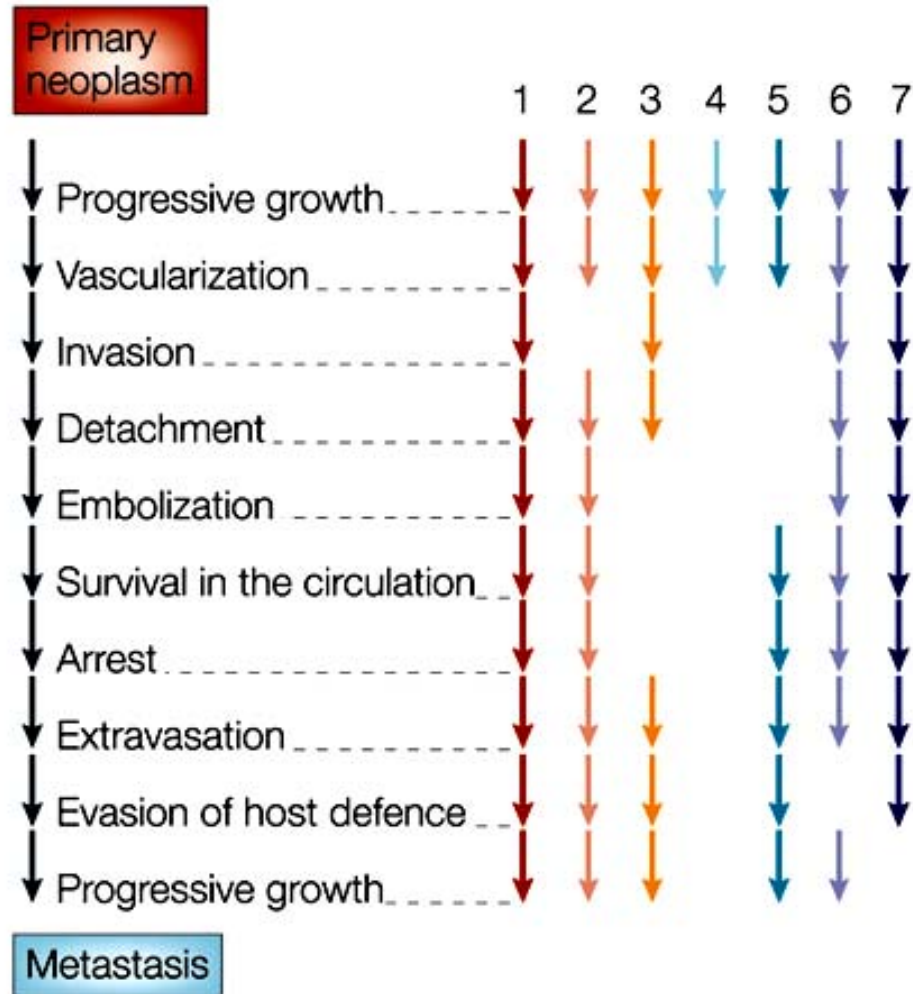




# PRINCIPIOS DE LA METASTASIS

- ❑ Consiste en una compleja serie de pasos limitantes
- ❑ Todos los pasos deben completarse con éxito para dar origen a un tumor metastásico
- ❑ Multifactorial
- ❑ Depende de propiedades de la célula tumoral y del huésped. Regulación genética y epigenética
- ❑ Proceso predominantemente selectivo y parcialmente adaptativo
- ❑ Ineficiente
- ❑ Convencionalmente, para ser considerada una MTS, debe ser extracelular y tener más de 50 células

# Cada paso es limitante



## ¿Qué hace únicas a las células metastásicas?

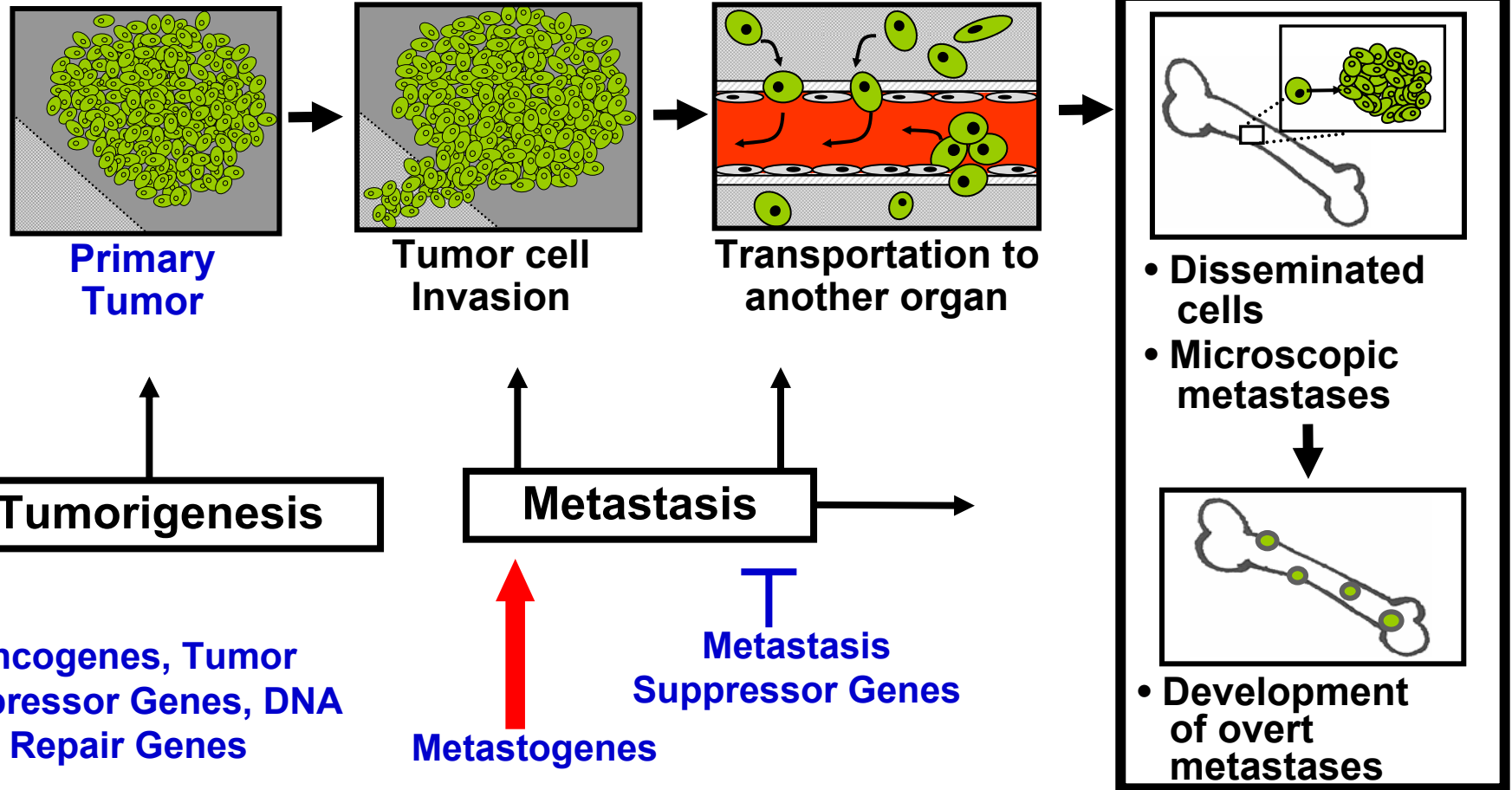
- invasión
- adhesión
- resistencia a la anoikis
- modulación del sitio secundario
- proliferación en el sitio secundario
- **persistir en la proliferación sin diferenciarse.**

◆ SIENDO LAS METÁSTASIS DE ORIGEN MONOCLONAL, TODAS ESTAS PROPIEDADES, DEPENDIENTES DE LA MODULACIÓN DE DIFERENTES GENES, DEBEN ESTAR A LA VEZ EN UNA SOLA CELULA.

◆ SU HALLAZGO EN UN TUMOR NO IMPLICA QUE CADA UNA DE LAS CÉLULAS QUE LO COMPONENTEN SEA CAPAZ DE CUMPLIR CON DICHA CARACTERÍSTICA (limitaciones de los microarrays)

# **GENES REGULADORES DE LA METASTASIS**

# Genes that regulate metastasis



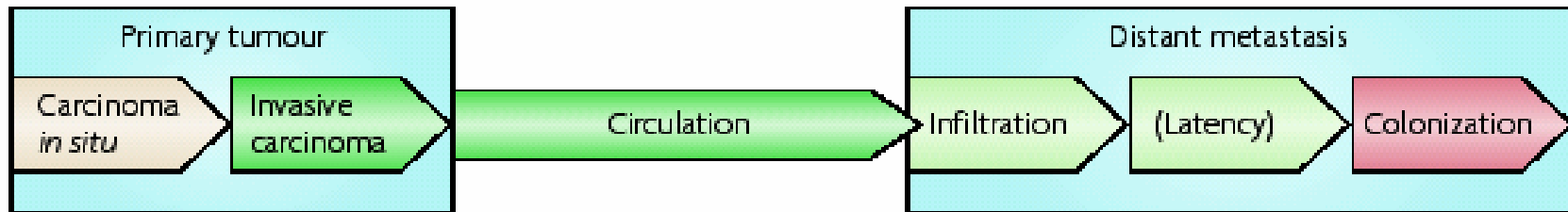
# De Oncogenes, Metastogenes y otros genes

- Si bien los oncogenes y los genes supresores de tumores pueden modular propiedades celulares asociadas a la diseminación metastásica, se ha demostrado la existencia de **genes específicos moduladores de la metástasis, que no afectan el crecimiento del tumor primario.**
- Según su función se han clasificado en:
  - METASTOGENES** o genes promotores de la metástasis (p.e. Ras, src).
  - GENES SUPRESORES DE LA METÁSTASIS** (p.e. e-cad, Nm23, Brms1, MKK4).

**La activación temprana de un metastogen, previa a la adquisición de un fenotipo tumorigénico completo, podría explicar la detección de metástasis con primario desconocido**

# Basic steps of metastasis and hypothetical classes of metastasis genes.

Nguyen et al. Nature Rev Cancer, April 2009



**Tumour initiation functions: growth, survival, progenitor-like state and genomic instability**

Oncogenes: *ERBB2*, *CTNNB1* ( $\beta$ -catenin), *KRAS*, *PI3K*, *EGFR*, *MYC*

Tumour suppressors: *APC*, *TP53*, *PTEN*, *BRCA1*, *BRCA2*

**Metastasis initiation functions: invasion, angiogenesis, marrow mobilization and circulation**

Gain of *TWIST1*, *SNAI1*, *SNAI2*, *MET*, *ID1*,

Loss of *KISS1*, *miR-126*, *miR-335*, *DARC*, *GPR56*

**Metastasis progression functions: extravasation, survival and reinitiation**

*PTGS2*, *EREG*, *MMP1*, *LOX*, *ANGPTL4*, *CCL5* targets

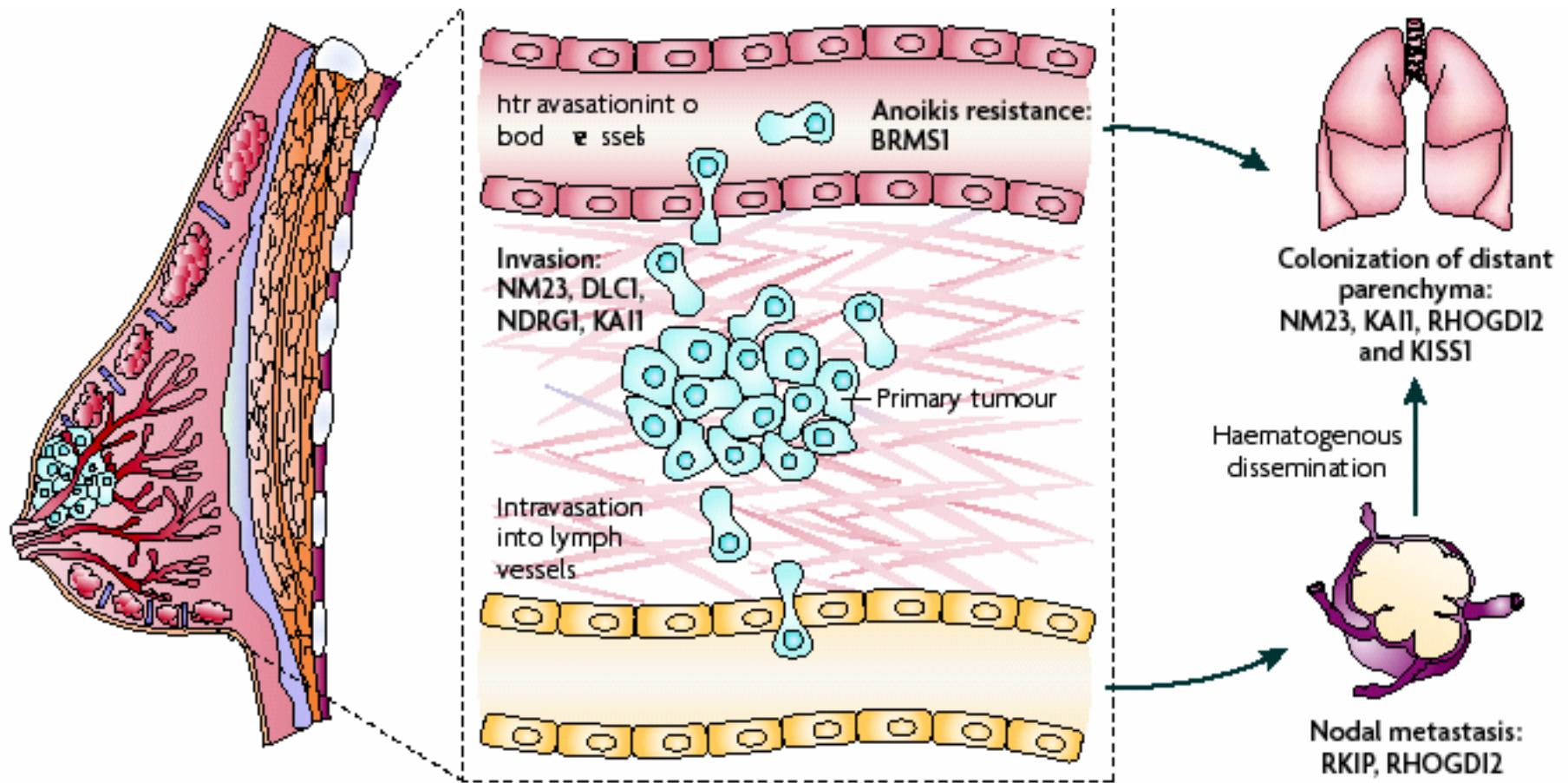
**Metastasis virulence functions: organspecific colonization**

*PTHrP*, *IL11*, *CSF2RB* (GM-CSF), *IL6*, *TNF $\alpha$*

## Genes supresores de metástasis

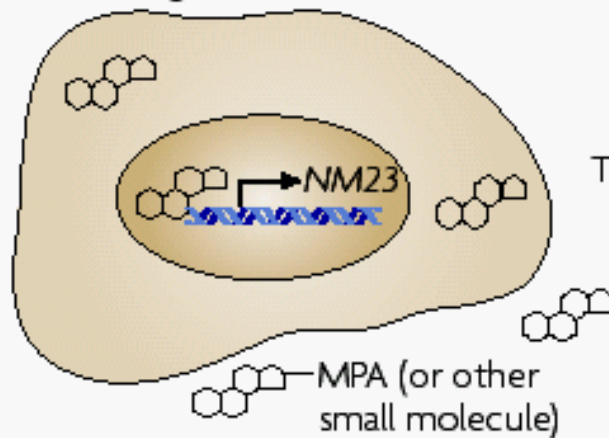
Gen	Tipo celular tumoral	Función
NM23	Melanoma, Mama, Colon	Histidin-quinasa: fosforila KSR
MMK4	Próstata, Ovario	MAPKK: fosforila y activa JNK
BRMS 1	Mama, Melanoma	Comunicación: Gap-junctions
KAI 1	Próstata, Mama	Interacción con integrinas
KiSS 1	Mama, Melanoma	Ligando de receptor acoplado a prot. G
RHOGD12	Vejiga	Regula funciones de RHO y RAC
CRSP 3	Melanoma	Co-activador transcripcional
VDUP 1	Melanoma	Inhibe thioredoxina
FN	Mama	Modula migración y proteasas
GPC3	Mama	Modula adhesión y sobrevida



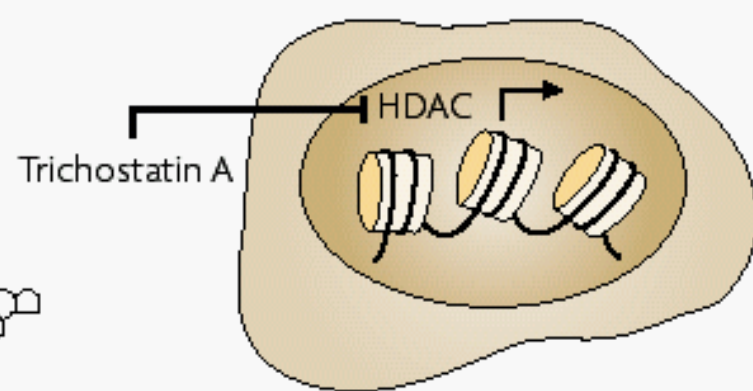


**Rol de genes supresores de la metástasis en diferentes etapas de la cascada metastásica. Prevención de aparición clínica de las MTS**

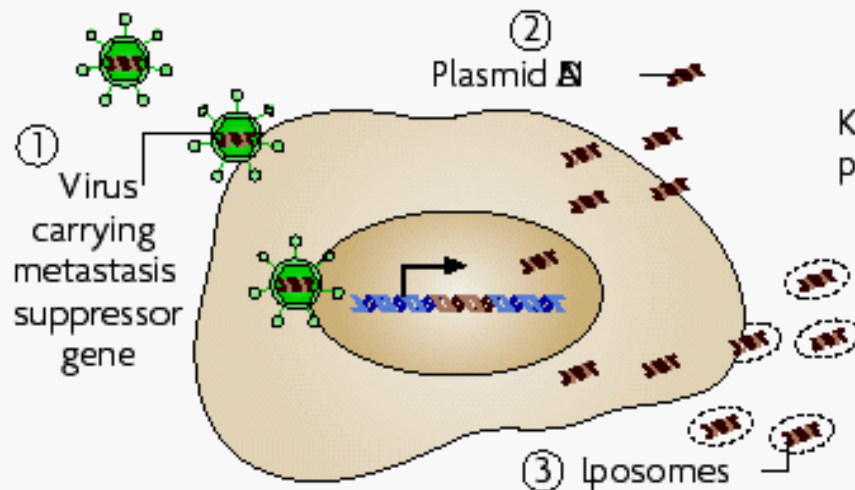
**a** Specific reactivation of endogenous locus



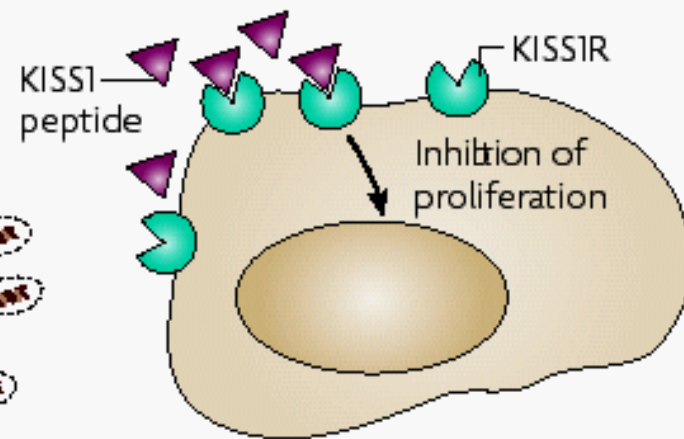
**b** Epigenetic reactivation of endogenous locus



**c** Gene therapy



**d** Direct administration of metastasis suppressor

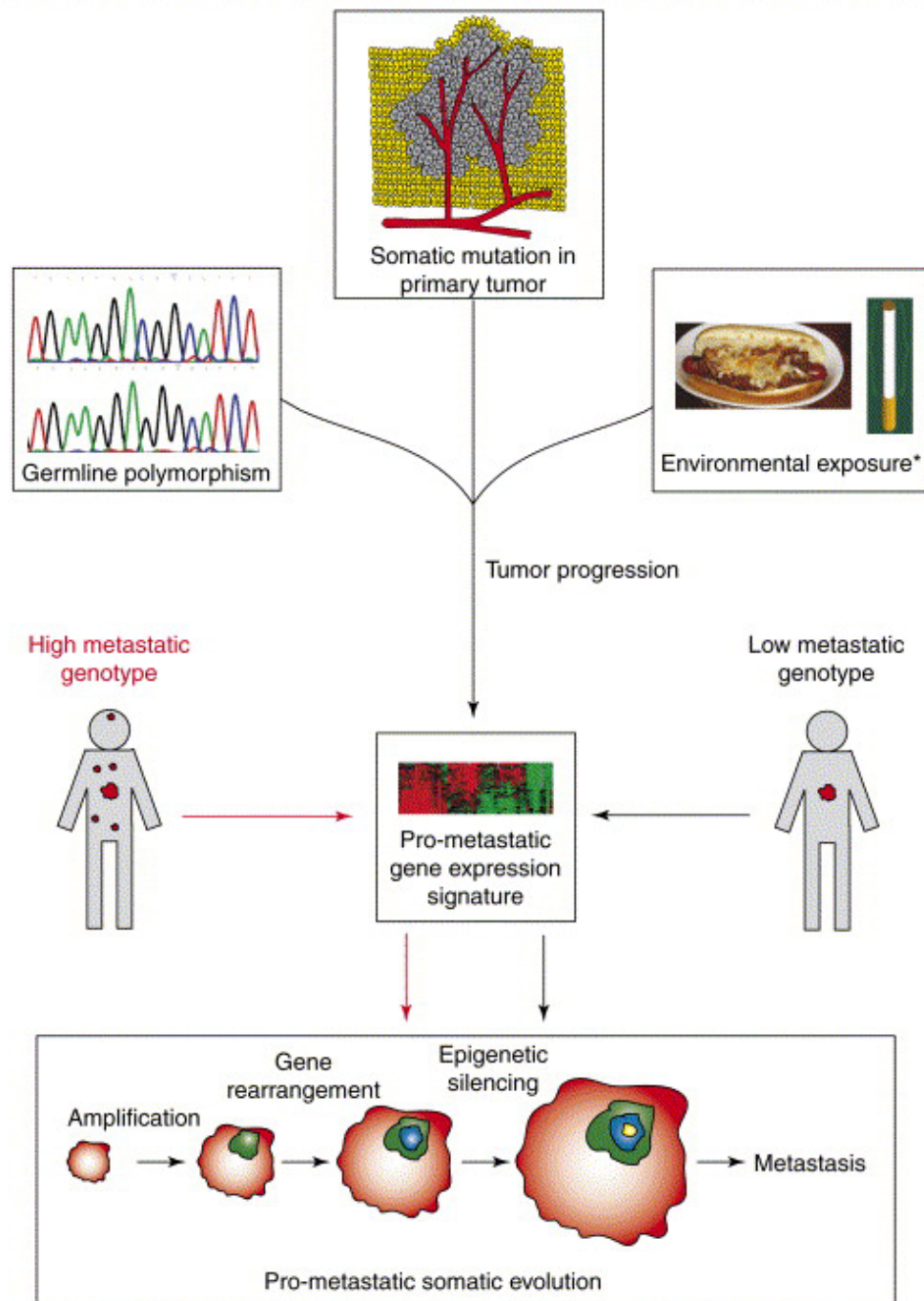


## Estrategias para restaurar la función supresora de metástasis

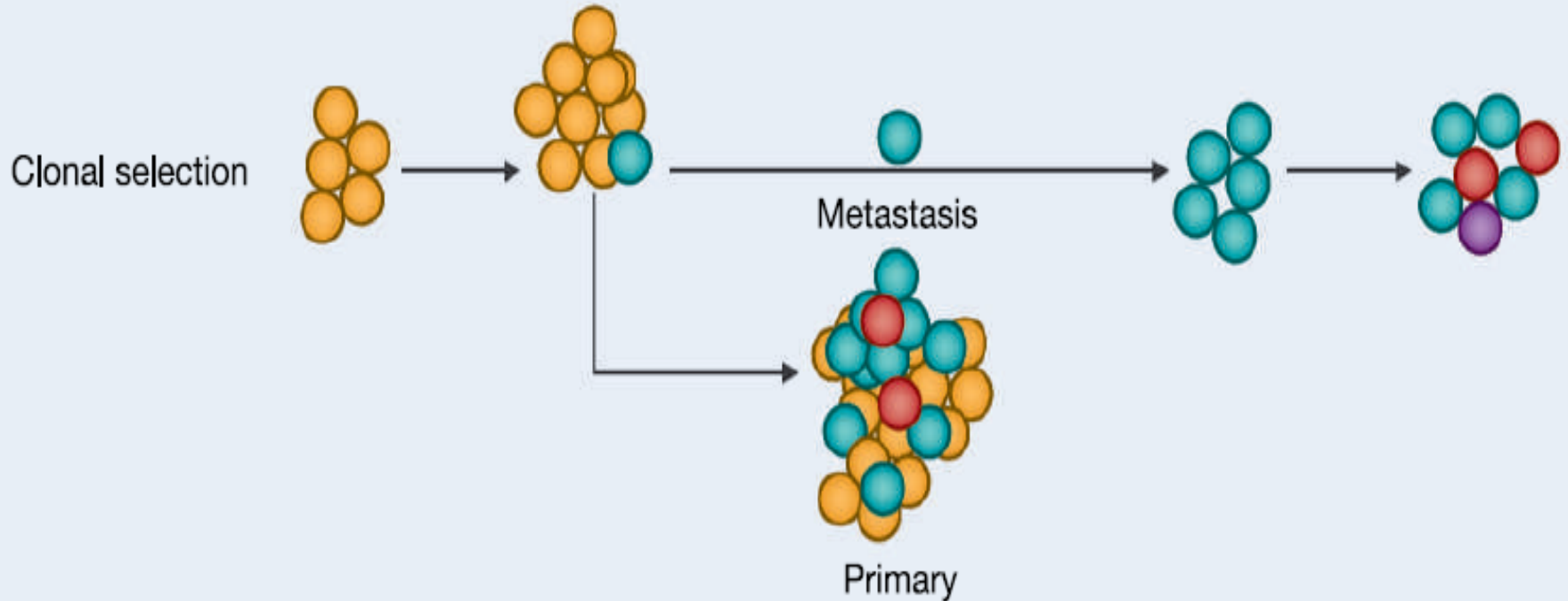
*Nature Reviews | Cancer (Christofer & Theodorescu, April 2009)*

El background genético puede modular la capacidad metastásica de un tumor primario.

Se identificaron 70 genes que constituyen el perfil molecular indicador de la predisposición genética para desarrollar metástasis

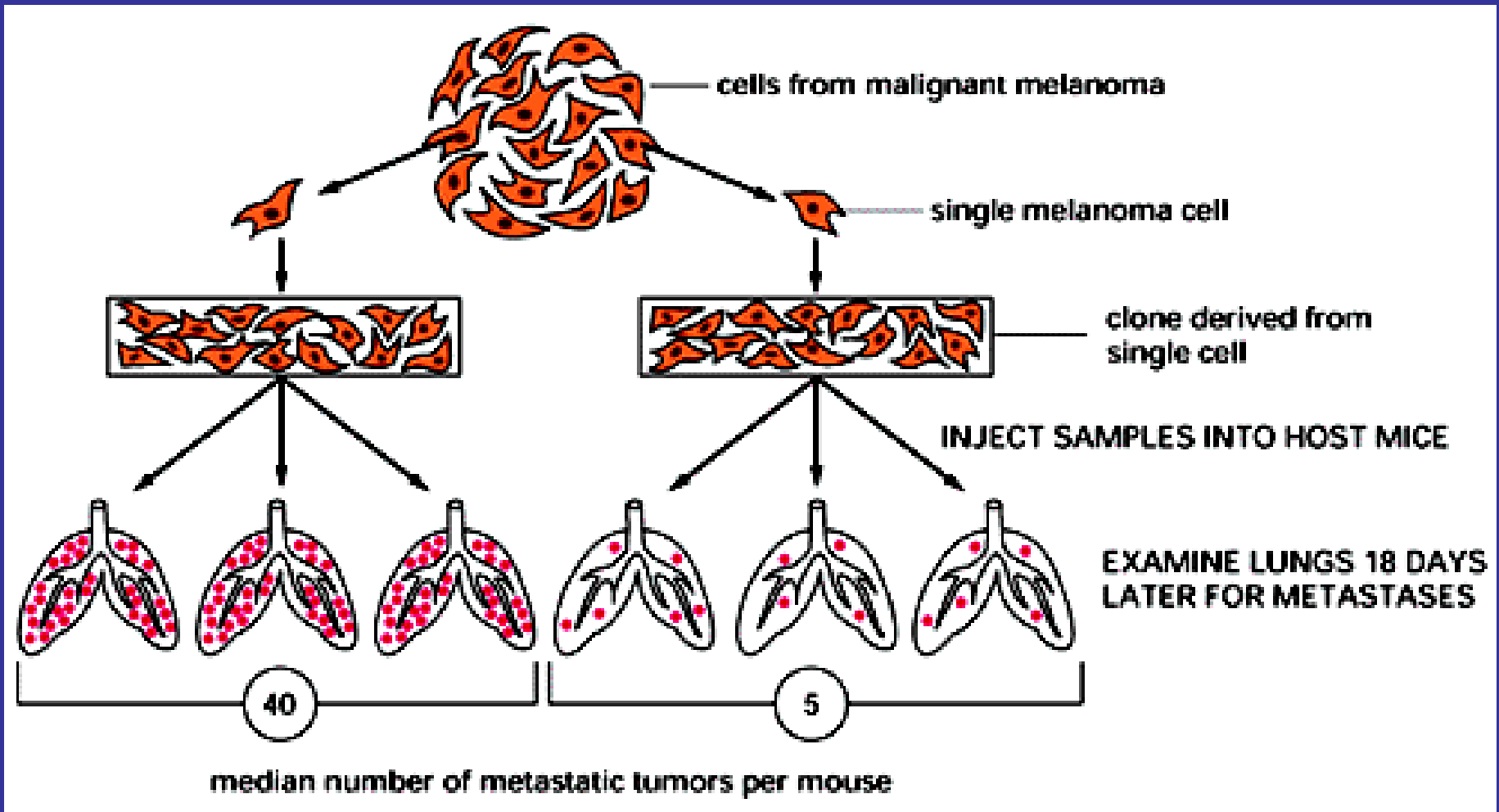


# **HETEROGENEIDAD TUMORAL**



Los tumores malignos están constituidos por subpoblaciones heterogéneas para muchas características, incluida la de diseminarse a distancia. Las metástasis difieren del tumor primario y entre sí. La heterogeneidad metastásica es dinámica y se puede modificar con el tiempo y por presiones selectivas externas. Las poblaciones metastásicas clonadas son más inestables y sensibles a la mutagénesis.

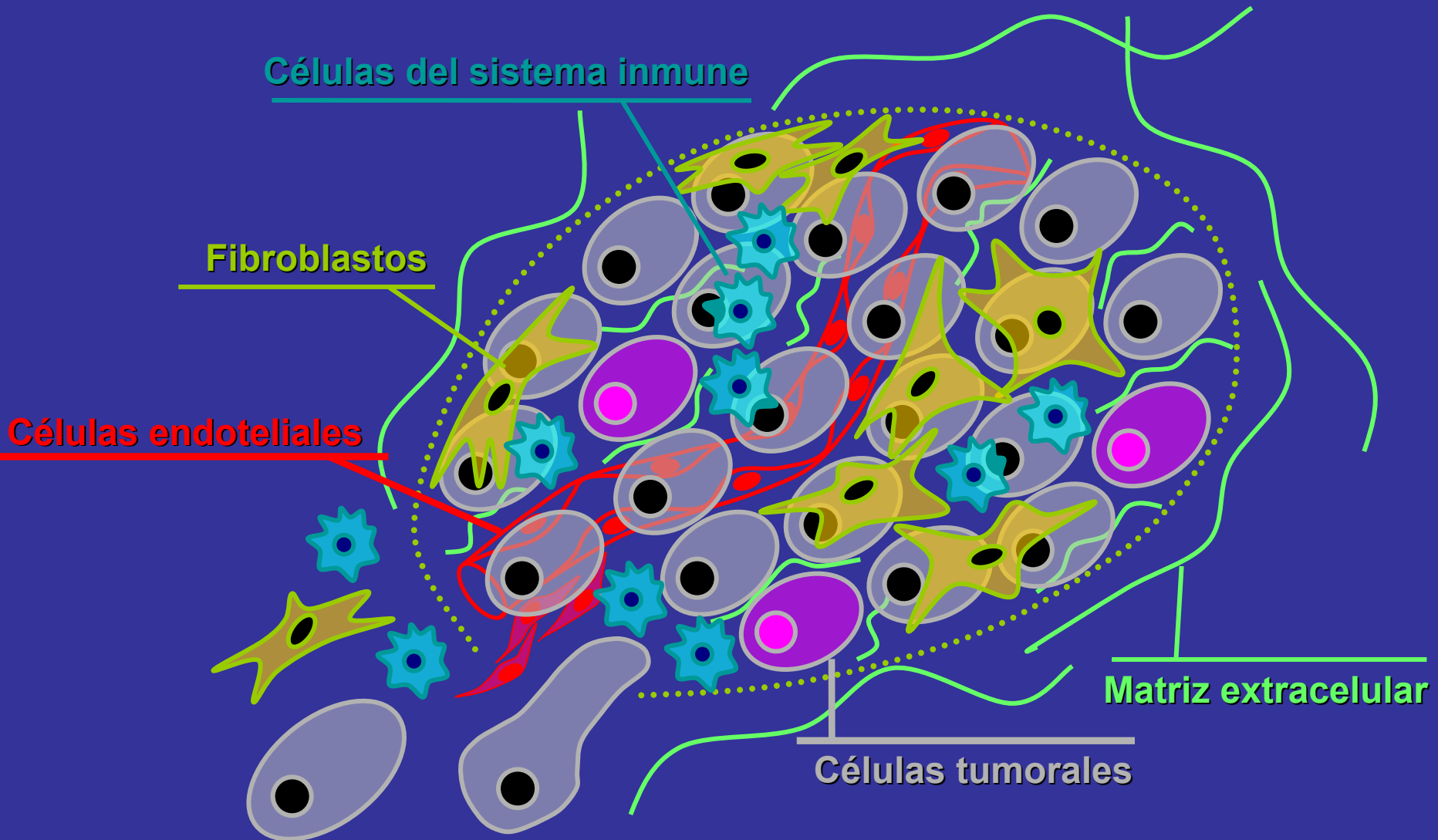
# Selección de clones con diferente capacidad **metastásica** a partir del melanoma murino B16



**INTERACCIONES CELULARES**

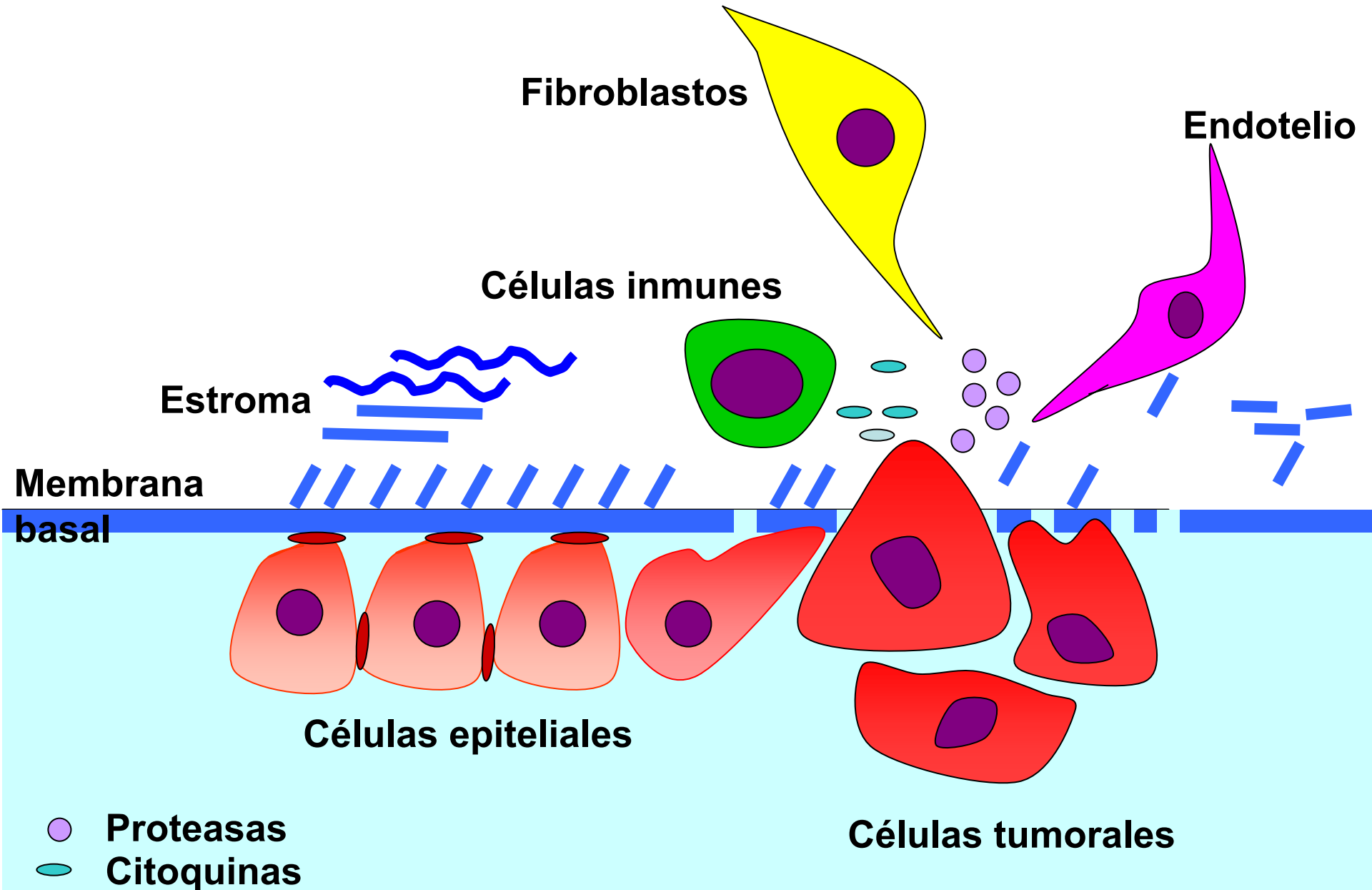
**UNIDAD TUMOR-ESTROMA**

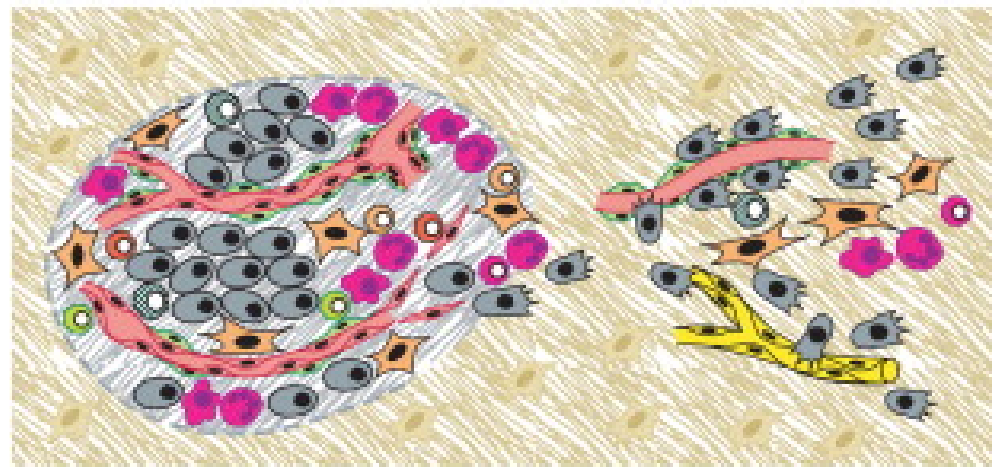
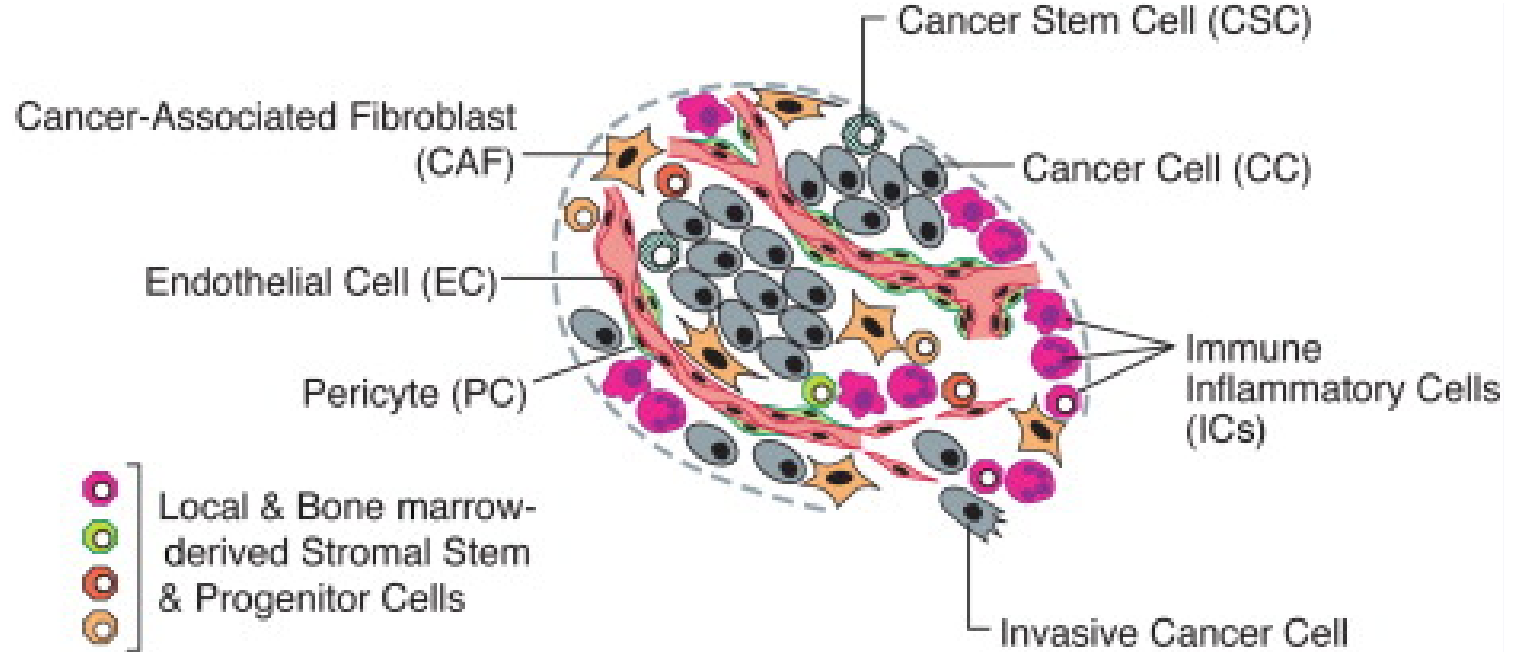
# Cambio de paradigma en la visión de los tumores



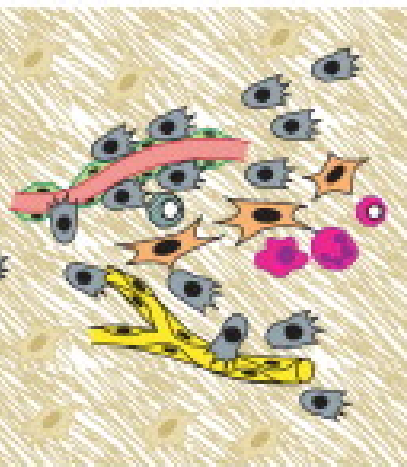


# Microambiente en la zona de invasión tumoral: interacción entre células normales y tumorales





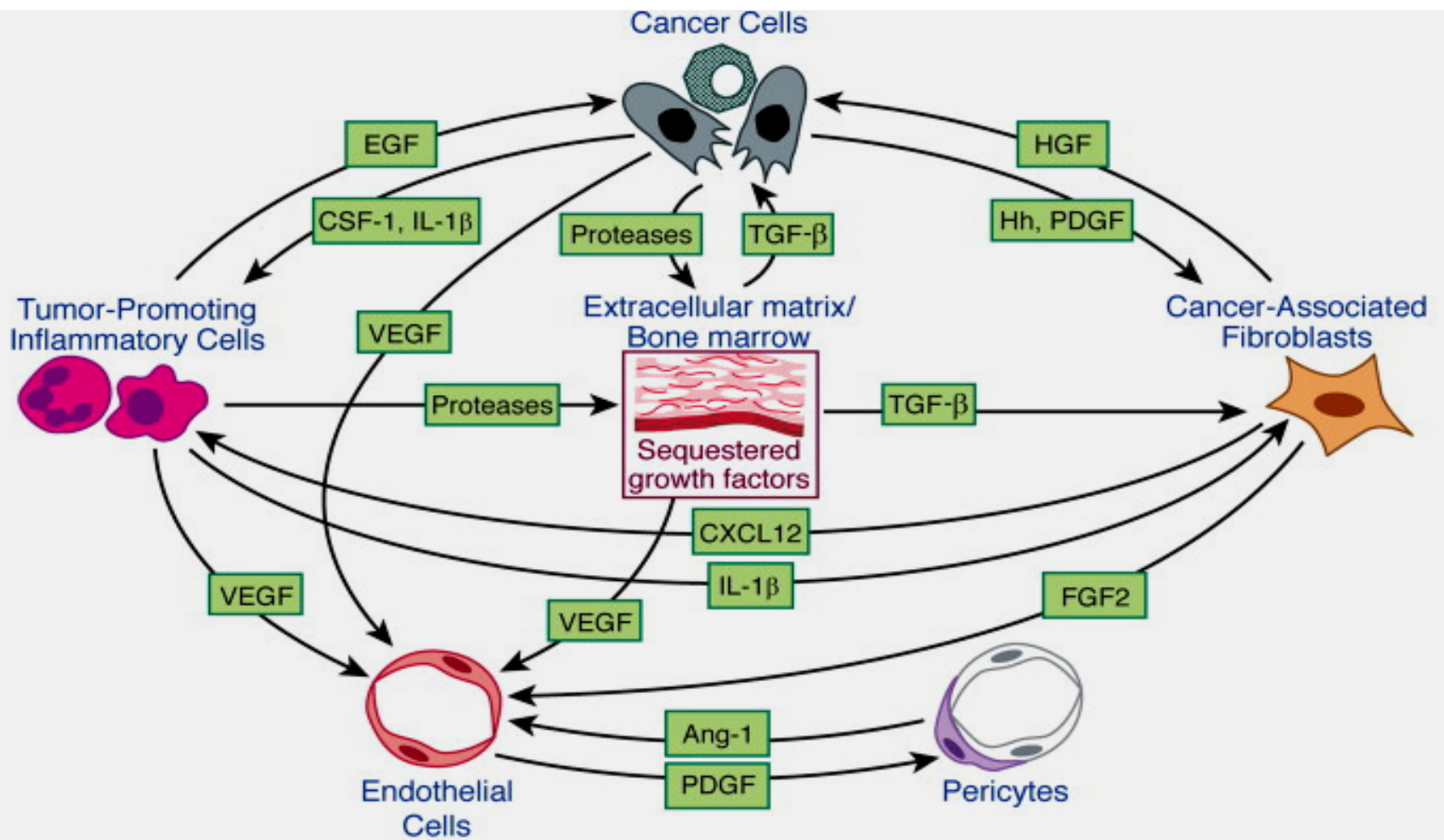
Core of Primary Tumor  
microenvironment



Invasive Tumor  
microenvironment



Metastatic Tumor  
microenvironment

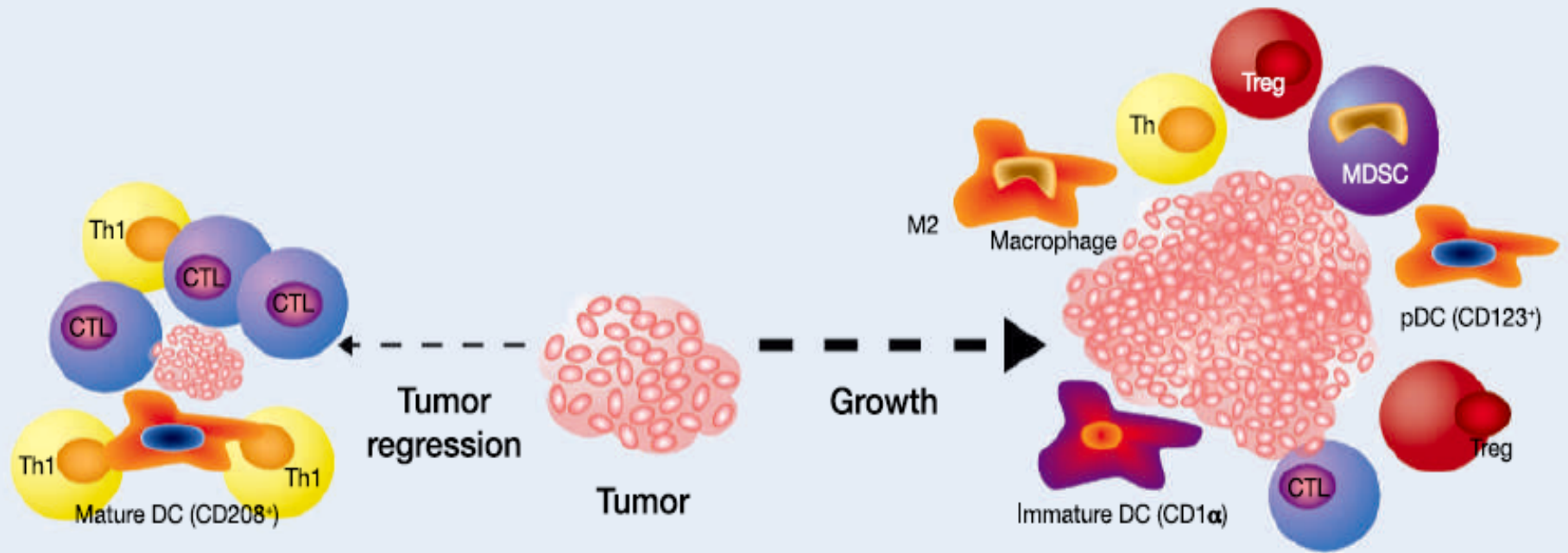


# Fibroblastos Asociados a Carcinoma (CAFs)

- Células estromales intratumorales (origen del hospedador) que producen GFs y proteasas.
- Son **fibroblastos activados**.
- Son positivos para  $\alpha$ SMA.  
¿miofibroblastos?
- Poseen aromatasas y pueden producir estrógenos localmente

# Sistema Inmune

## ¿Amigo o enemigo?



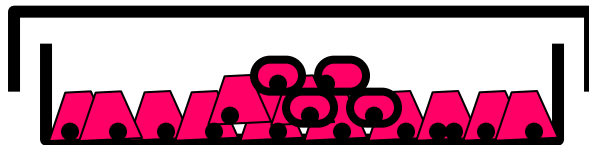
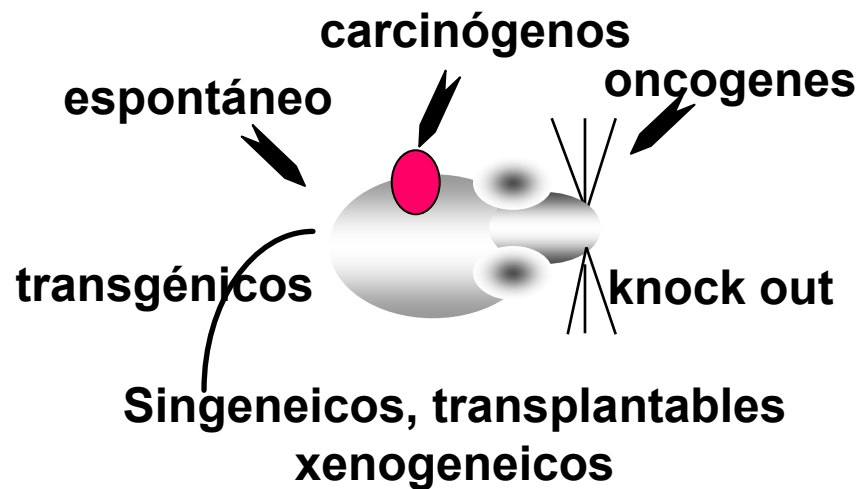
Las células inmunes que infiltran los tumores pueden regular su regresión así como su crecimiento, progresión y metástasis.

**METODOS DE ESTUDIO**

**Y**

**MODELOS EXPERIMENTALES**

# ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA CARCINOGENESIS Y PROGRESION TUMORAL

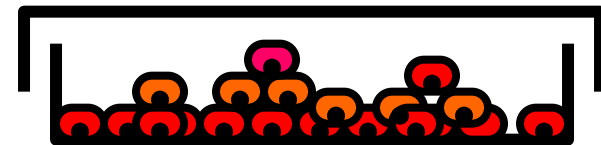


CELULAS TUMORALES

CELULAS NORMALES



AGENTES CARCINOGENOS



CELULAS TRANSFORMADAS

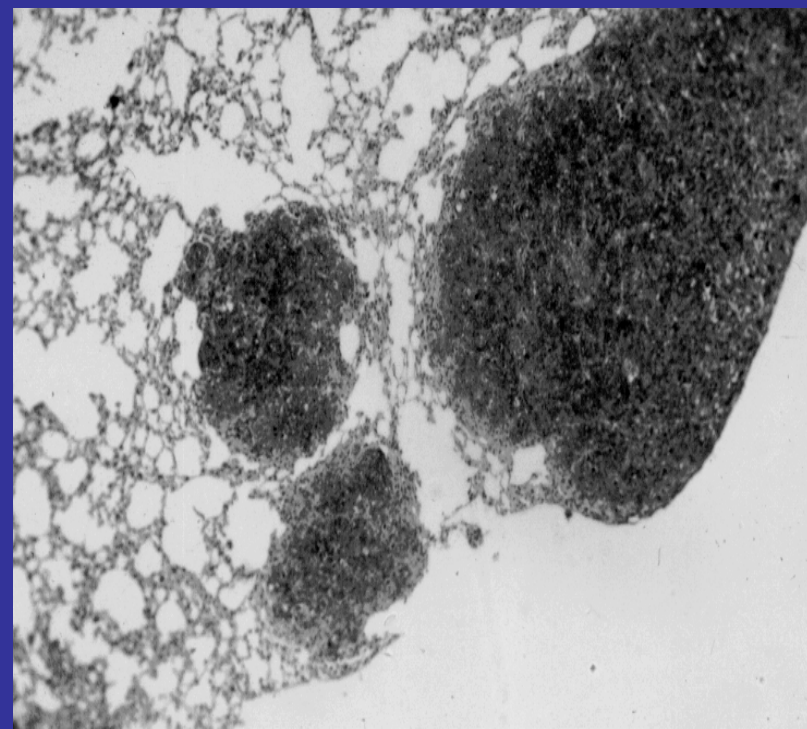
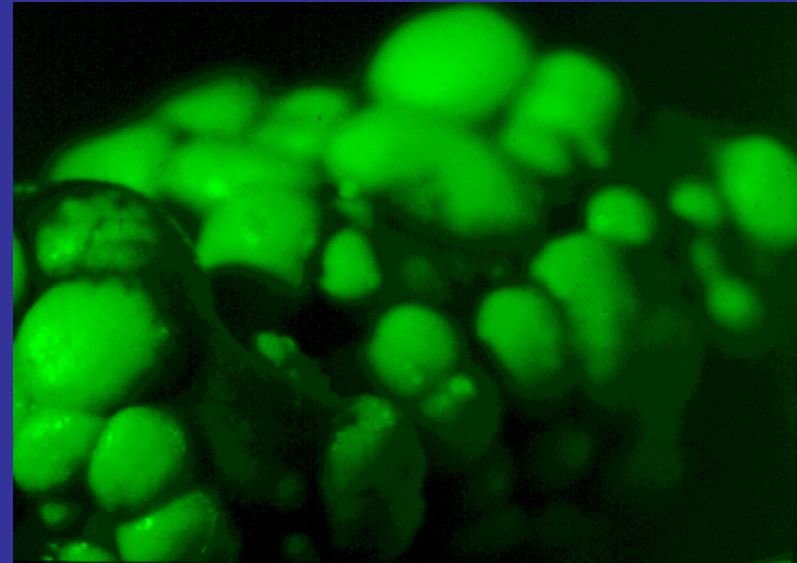
# ENSAYOS IN VIVO

- **CRECIMIENTO LOCAL DEL TUMOR PRIMARIO**  
(heterotópico u ortotópico)
- **INVASIÓN LOCAL**
- **METASTASIS ESPONTÁNEAS**
- **METÁSTASIS EXPERIMENTALES**  
(inyección endovenosa)
- **ANGIOGÉNESIS**

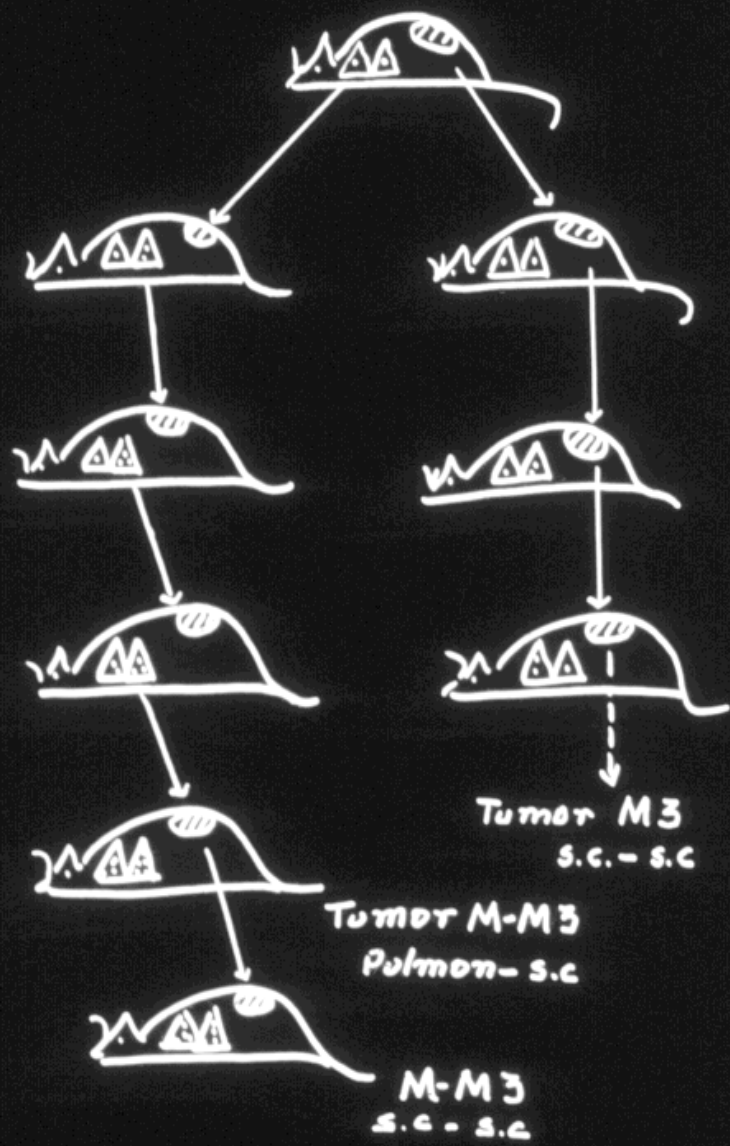




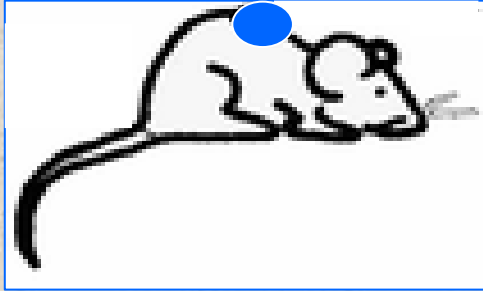
# Adenocarcinoma Mamario MM3



Selección de la línea más, metastatizante en pulmón

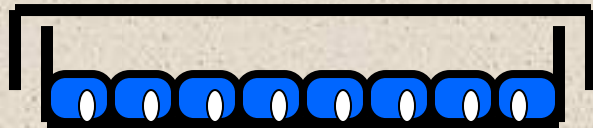


# MODELO DE ESTUDIO



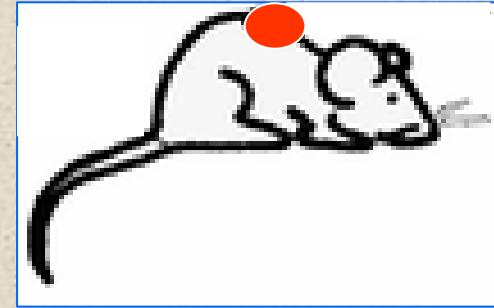
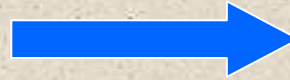
**TUMOR M3**

Moderadamente Metastásico



**LINEA LM3**

Altamente Metastásica  
e invasiva local



**TUMOR MM3**

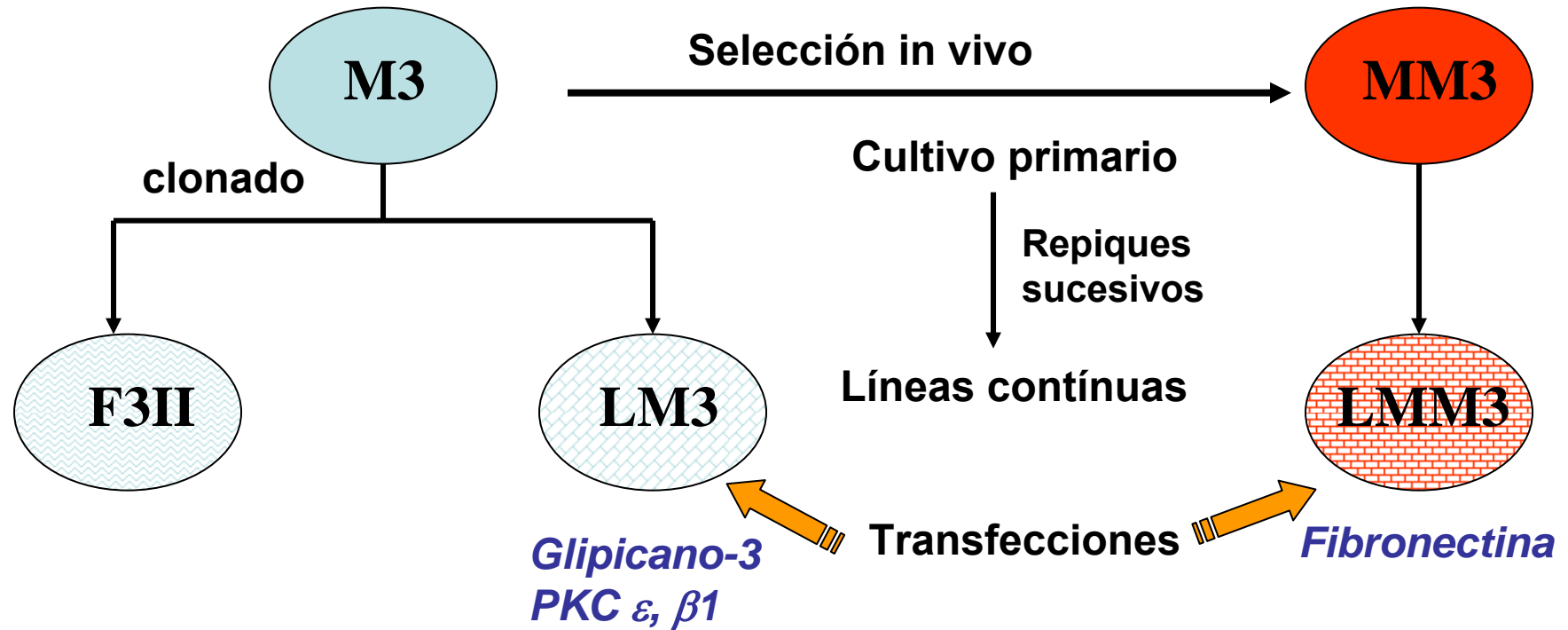
Altamente Metastásico



**LINEA LMM3**

Altamente Metastásica  
e invasiva local

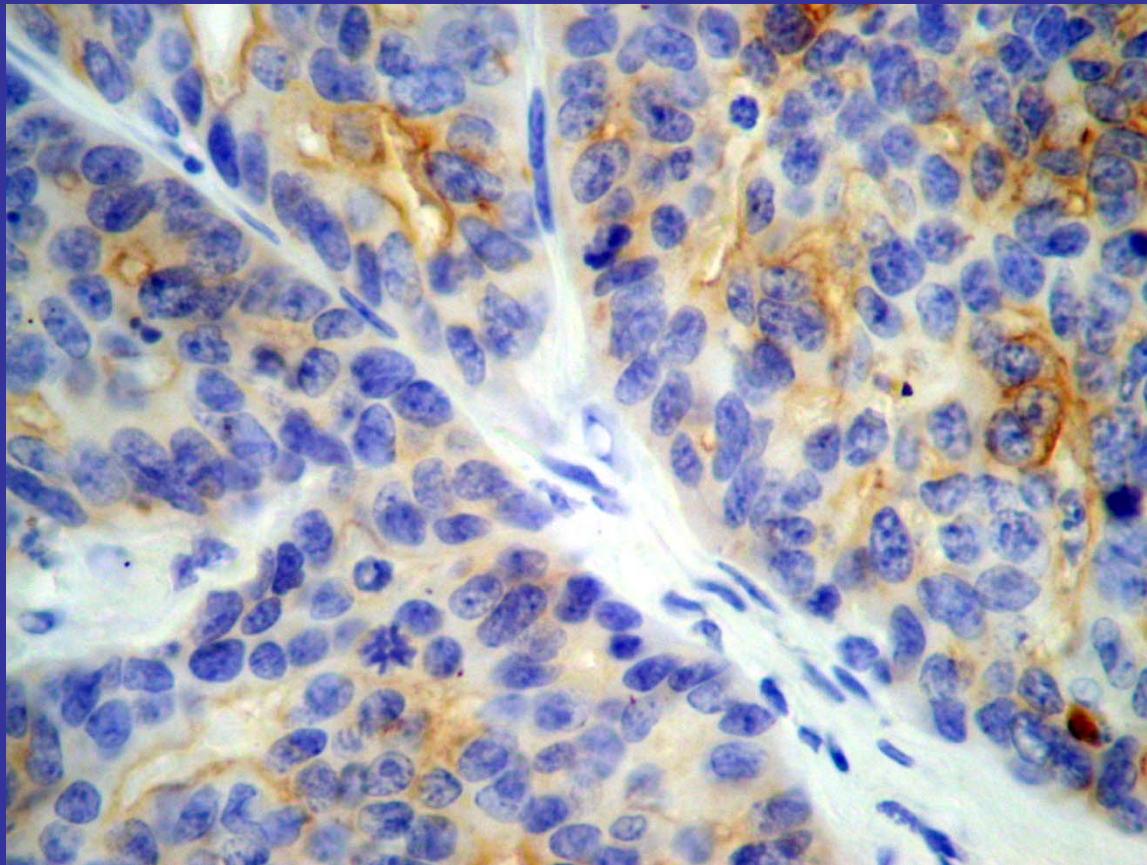
## Adenocarcinomas mamarios murinos



	M3	MM3	LM3	LMM3	F3II
<b>In vivo</b>					
Invasividad	Baja	Baja	Alta	Alta	Muy Alta
Metástasis	40 %	90%	80-90%	90-100%	100%
Diferenciación Histológica	+++	+ / ++	+ / -	+ / -	-
In vitro	epitelioide	epitelioide	epitelioide	epitelioide	spindle

# **MODELOS DE CÁNCER DE MAMA BI-CELLULARES**

# TUMOR MAMARIO MURINO M38



- Aparecido de forma espontánea en una hembra BALB/c preñada
- Mantenido por trasplante subcutáneo
- Adenocarcinoma mamario papilífero bien diferenciado
- Formado por células luminales y mioepiteliales transformadas
- ER<sup>-</sup> y PR<sup>-</sup>
- Metastásico en pulmón y ganglio drenante

Research article

Open Access

**Malignant myoepithelial cells are associated with the differentiated papillary structure and metastatic ability of a syngeneic murine mammary adenocarcinoma model**

Viviana Bumaschny, Alejandro Urtreger, Miriam Diament, Martin Krasnapolski, Gabriel Fiszman, Slobodanka Klein and Elisa Bal de Kier Joffé *Breast Cancer Res 2004, Vol. 6:R116-R129*

# Comportamiento *in vivo*

	LM38-LP	LM38-HP	LM38-D2	HP+D2 (36h)
Tumorigénesis	100%	~30%	100%	100%
Latencia [Días]	5 (5-19)	19 (19-61)	24,5 (18-69)	15 (7-25)
Tasa de Crecimiento [mm/día]	0,22 ± 0,04	0,05 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,14 ± 0,04
Metástasis pulmonares	100%	50%	12,5%	81,8%
Metástasis ganglionares	55,5%	12,5 %	0%	0%
Metástasis experimentales	40,5 (9-80)	0 (0-3)	0 (0-1)	N/D

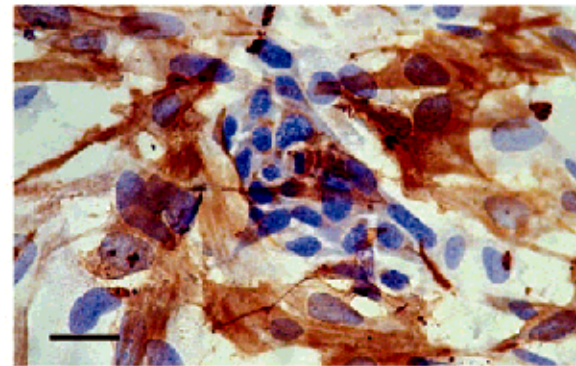
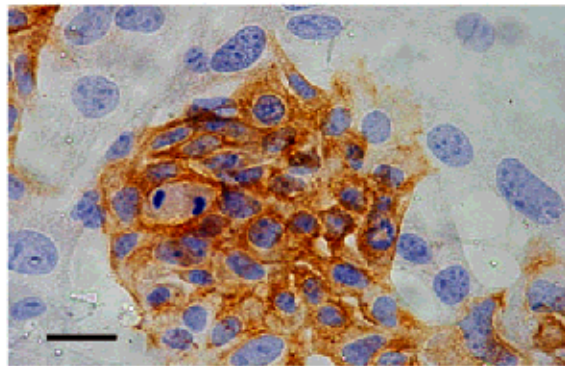
La interacción entre las luminales y las mioepiteliales es necesaria para el comportamiento maligno de M38

# La línea LM38-LP esta constituida por dos subpoblaciones: luminal (LEP) y mioepitelial (MEP)

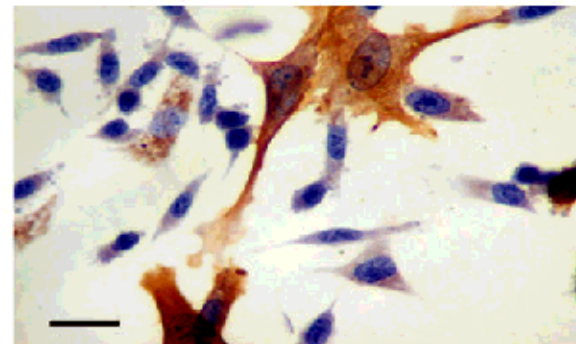
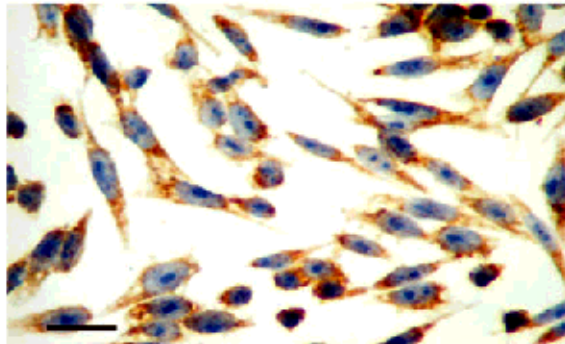
**Pan-CK**

**$\alpha$ SMA**

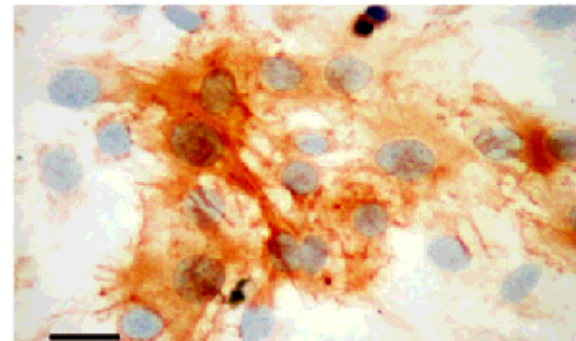
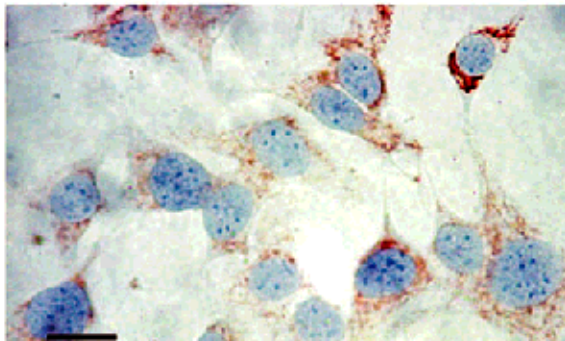
**LM38-LP**



**LM38-HP**



**LM38-D2**

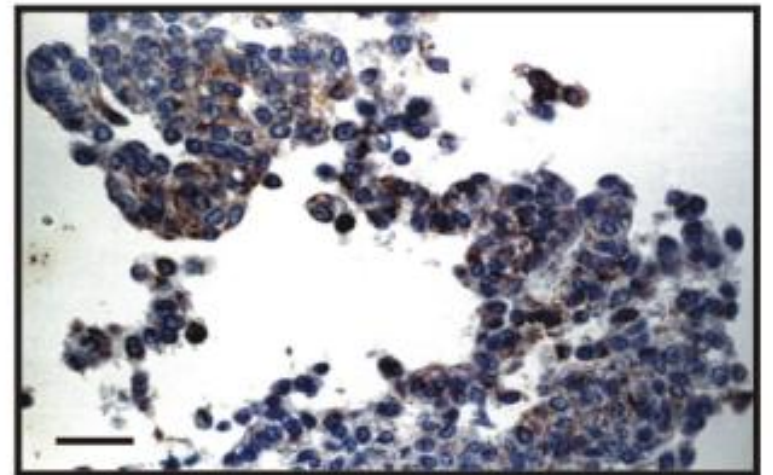
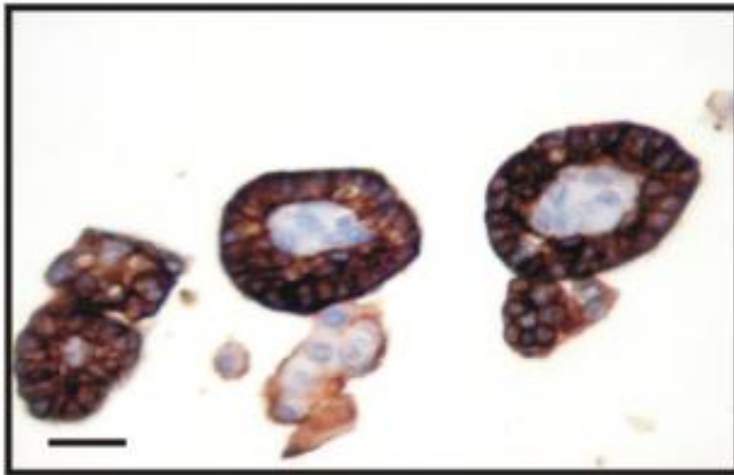


# 3-D Growth in suspension. Spheroids

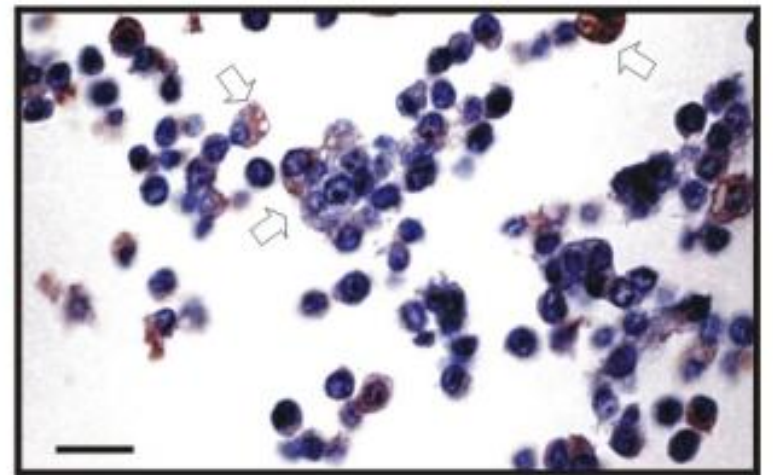
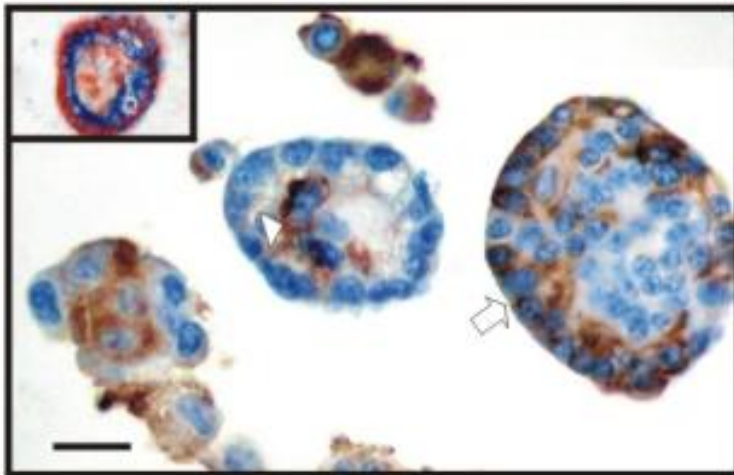
LM38  
LP

LM38  
HP

Pan-CK



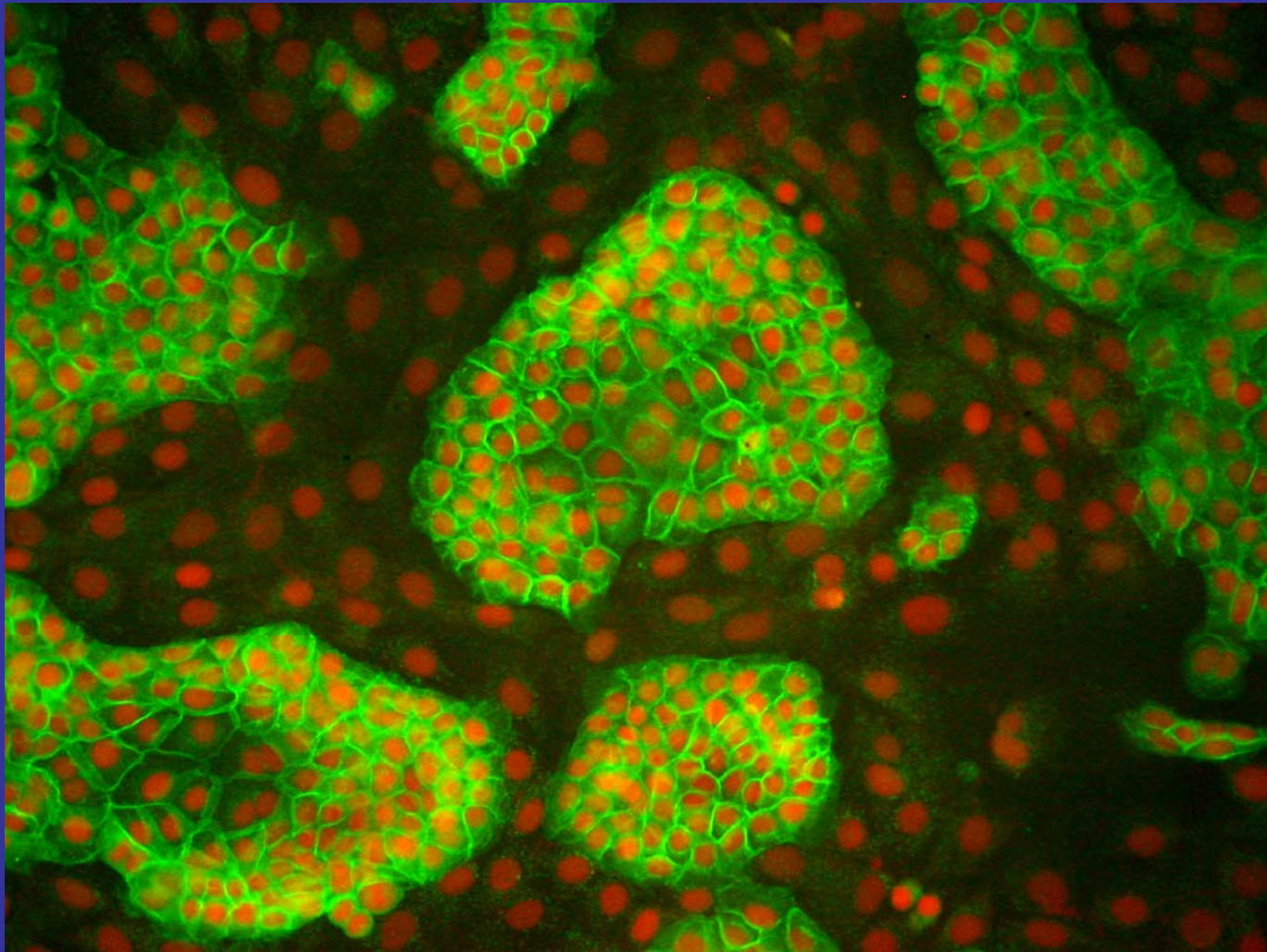
CK14





# Caracterización de la línea bicelular LM05-mix

(Pontiggia et al. Breast cancer Res. 2009)

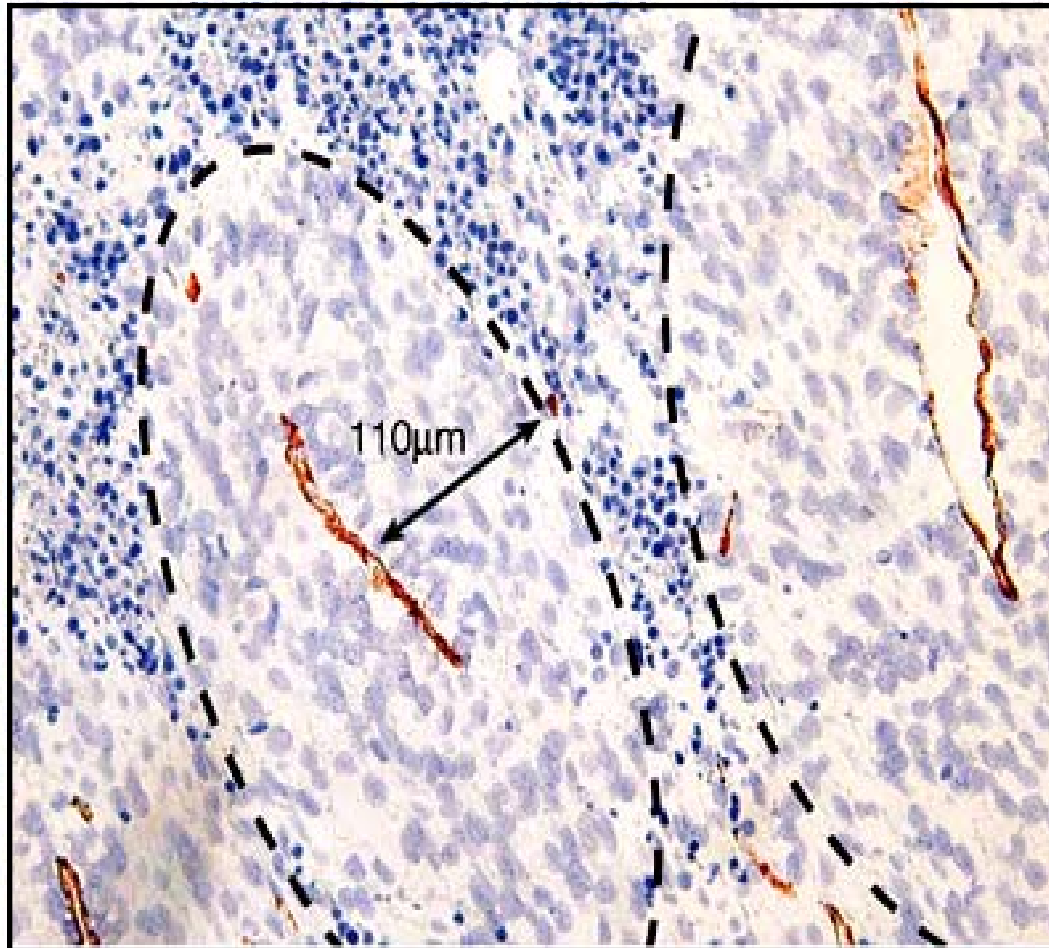


**Rojo:** núcleos con IP.  
**Verde:** E-cadherina (FITC).

**Células epiteliales E-cadherina (+)**  
**Células estromales (-)**

# HIPOXIA, ANGIOGENESIS y VASCULOGÉNESIS

**Los tumores deben vascularizarse para crecer.  
Importancia de la HIPOXIA en el fenotipo metastásico.**



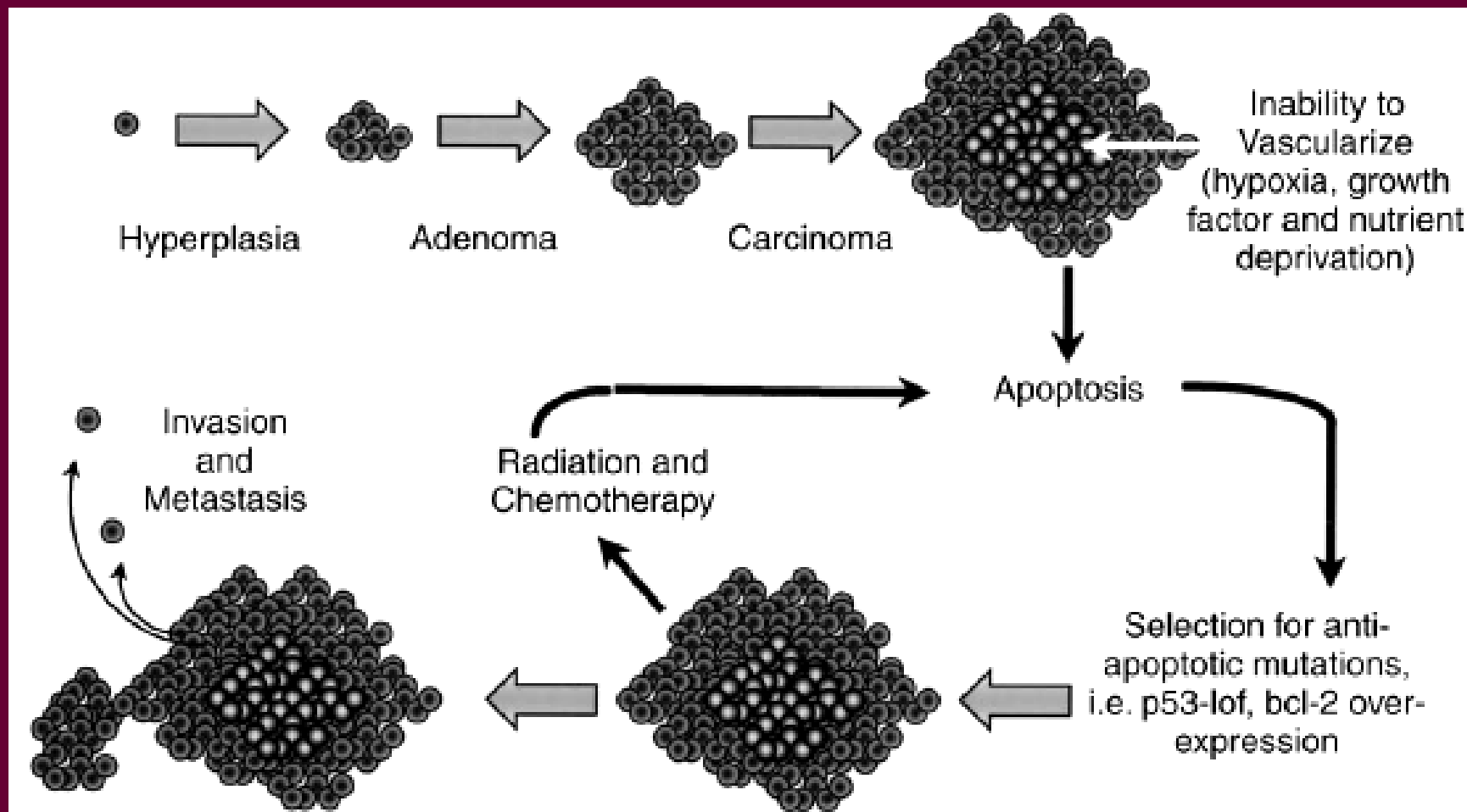
**Diagnóstico de hipoxia**

Microelectrodos para O<sub>2</sub>, biomarcadores específicos

# CONSECUENCIAS DE LA HIPOXIA

- Mala distribución de agentes terapéuticos.
- Menos sensibilidad a radio-y quimioterapia.
- Emergencia de subpoblaciones más metastásicas
- Desregulación de la expresión génica: en general se produce severa represión, pero el 1 % del genoma es inducido por el stress hipóxico.
- La mayor parte de esos genes es regulada por el factor de transcripción HIF-1 ( $\alpha$  y  $\beta$ ).
- Genes regulables asociados a metástasis: uPA, PAI, uPAR, osteopontina (OPN), la *chemoquina* CXCL12 y su receptor CXCR4, VEGF, p53)

# Posibles mecanismos por los cuales la hipoxia selecciona células resistentes a la apoptosis y más metastásicas



# TRATAMIENTOS ESPECÍFICOS DEPENDIENTES DE LA HIPOXIA

## ◆ Citotoxinas selectivas.

Quinonas (myto-C)

Nitroimidazoles (metronidazole)

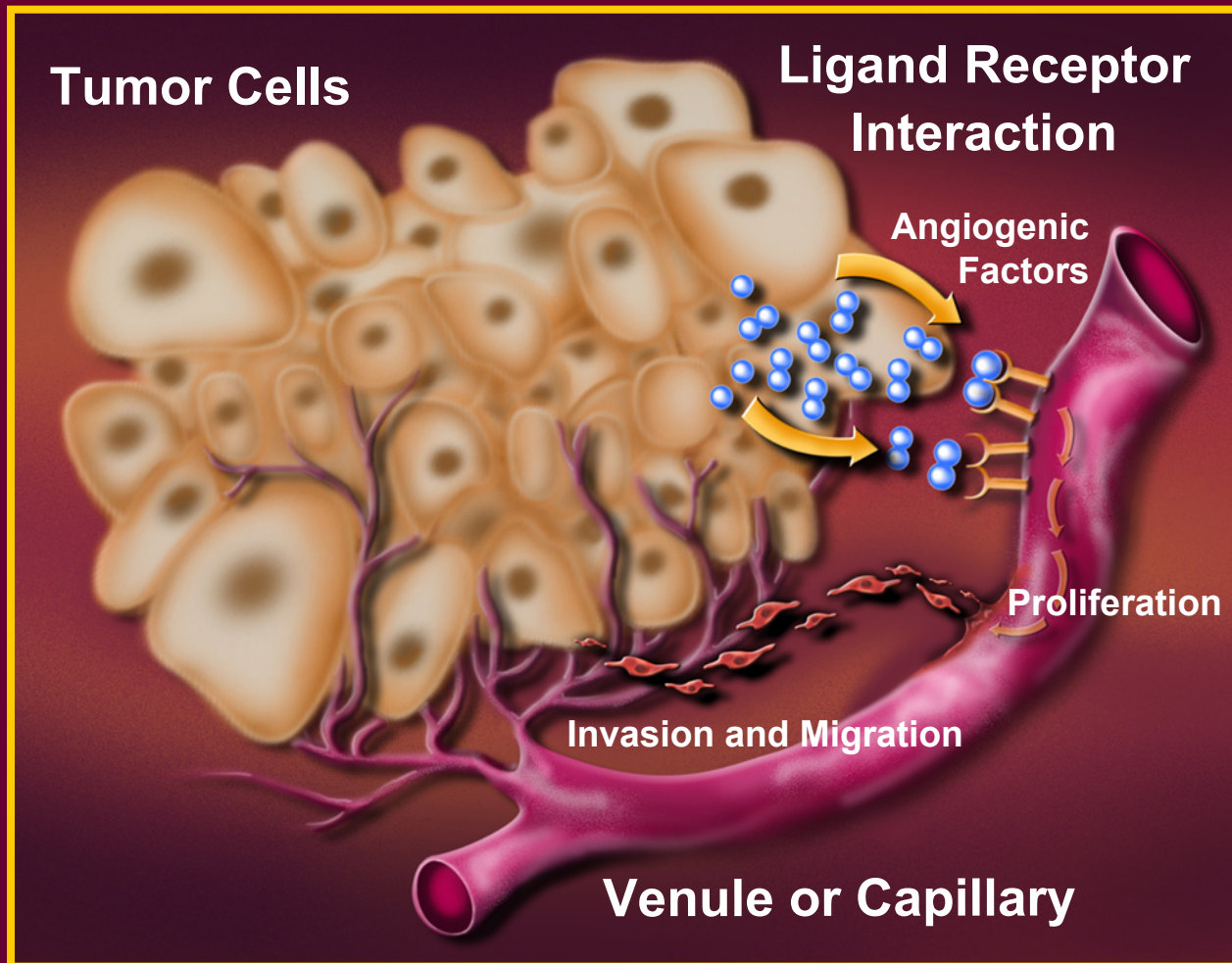
Benzotriazine di-N-oxides (TPZ)

(primer droga activada por hipoxia)

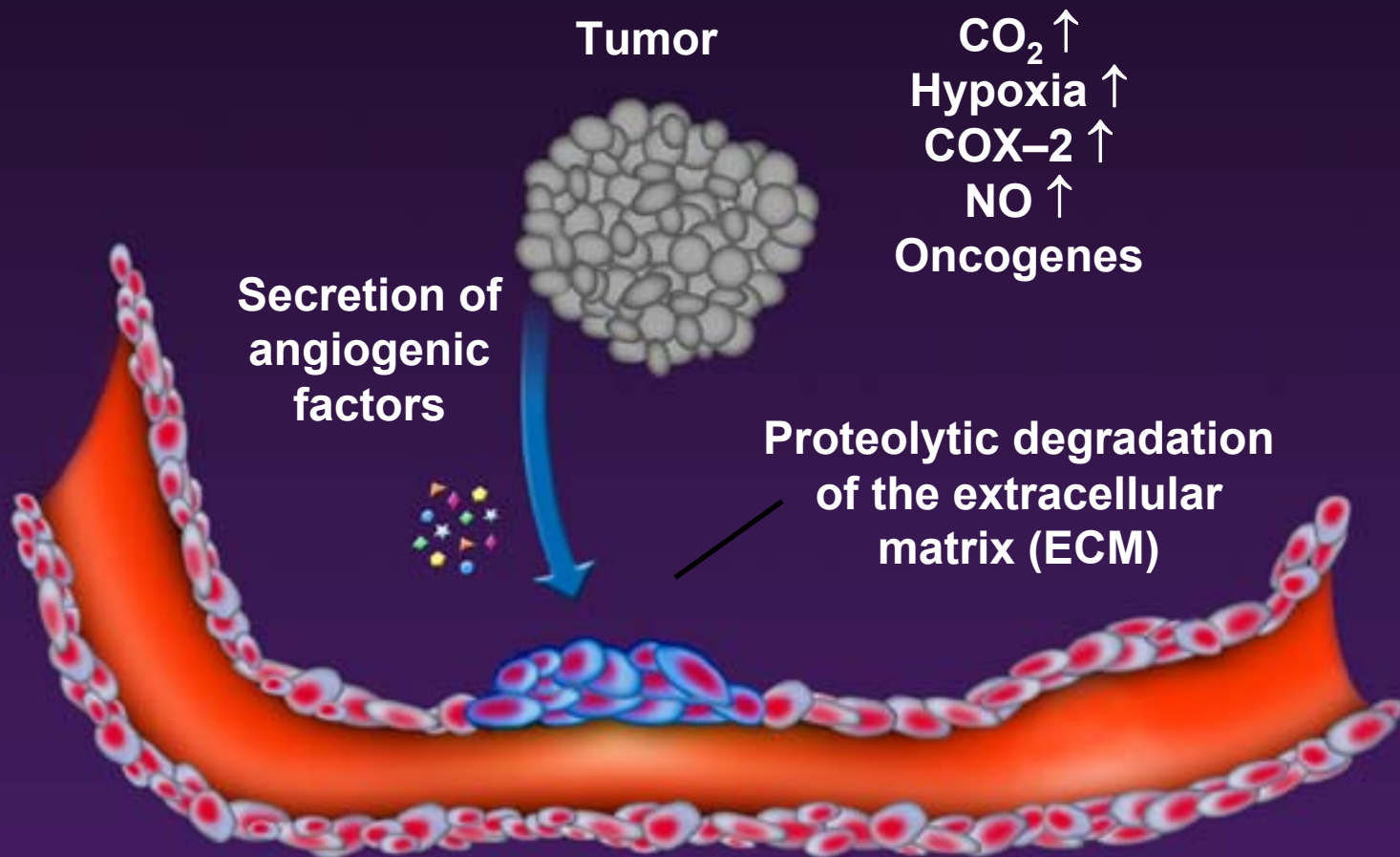
## ◆ Terapia génica vs. hipoxia

(prodrogas activables por hipoxia)

# Angiogenesis is Required for Sustained Tumor Growth

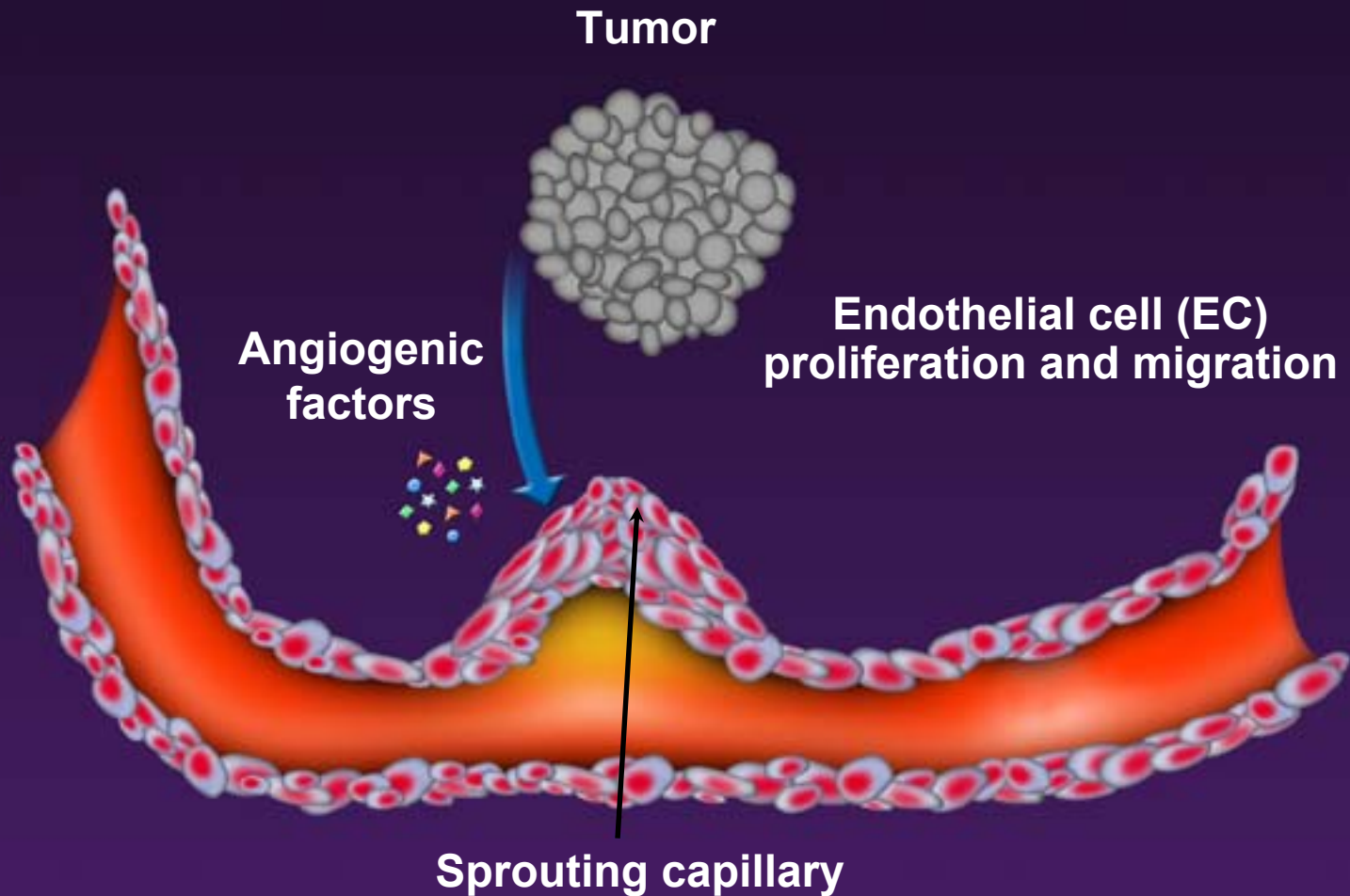


# Tumor Angiogenesis

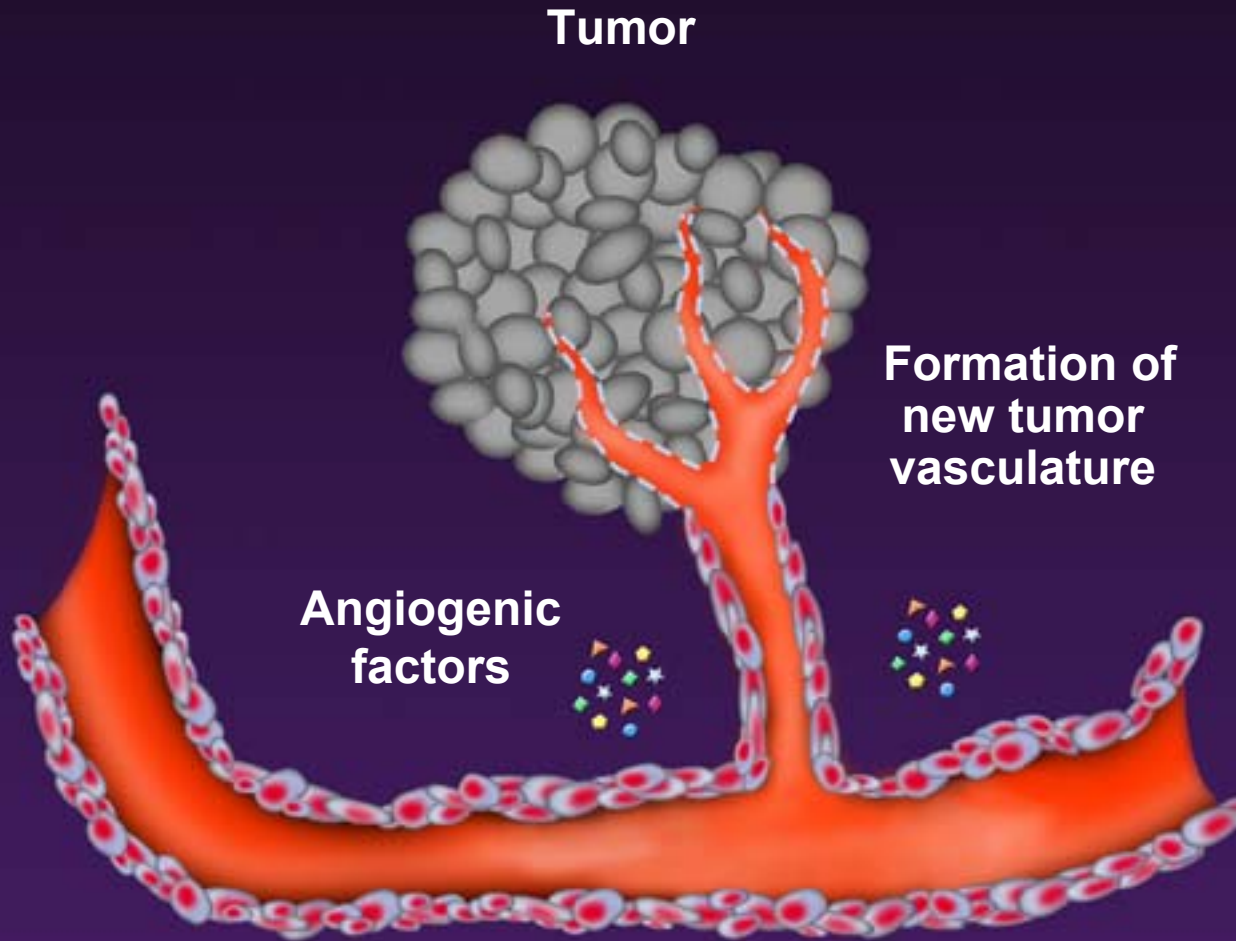




# Tumor Angiogenesis



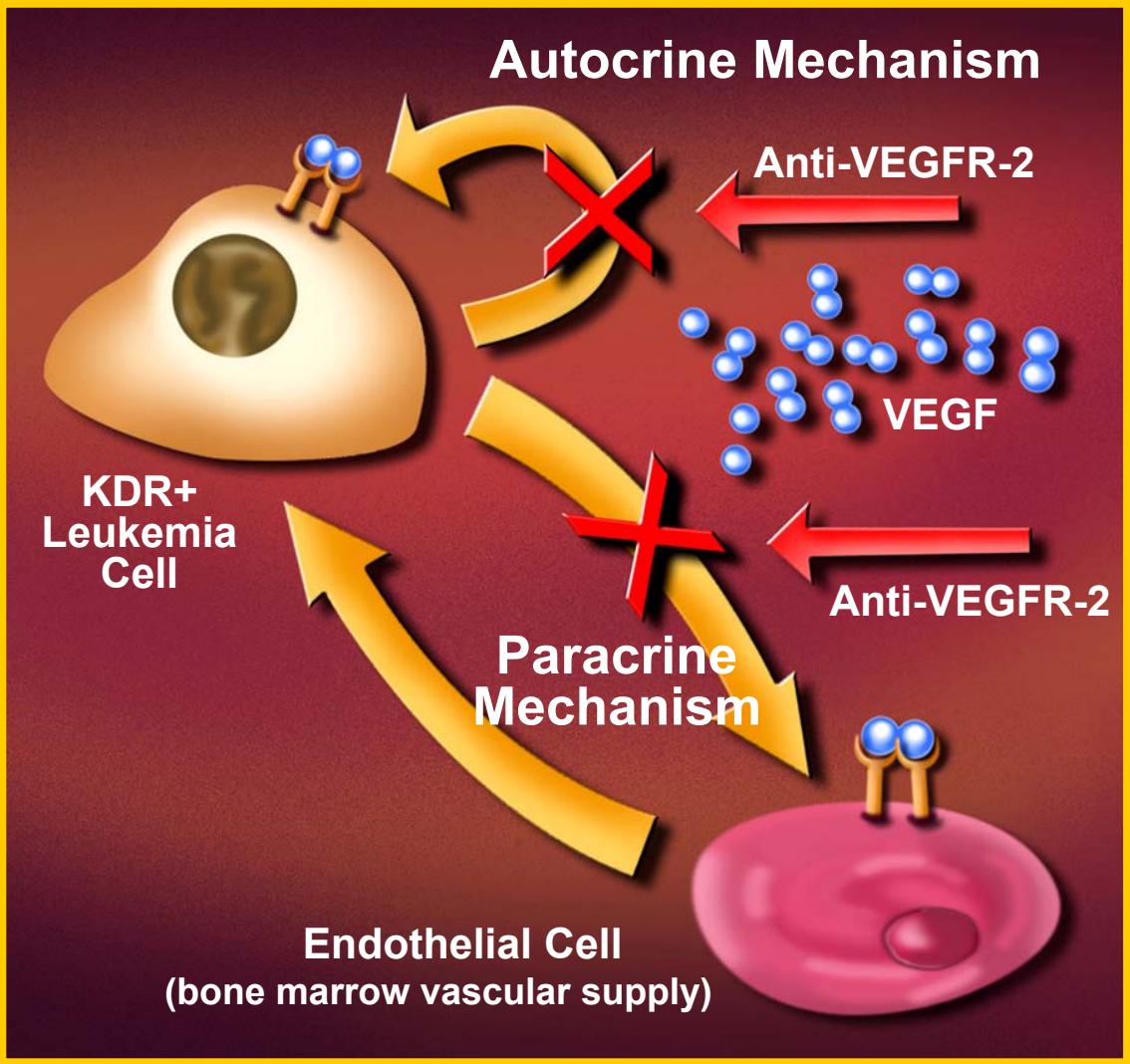
# Tumor Angiogenesis



# Potential Targets for Inhibiting Angiogenesis

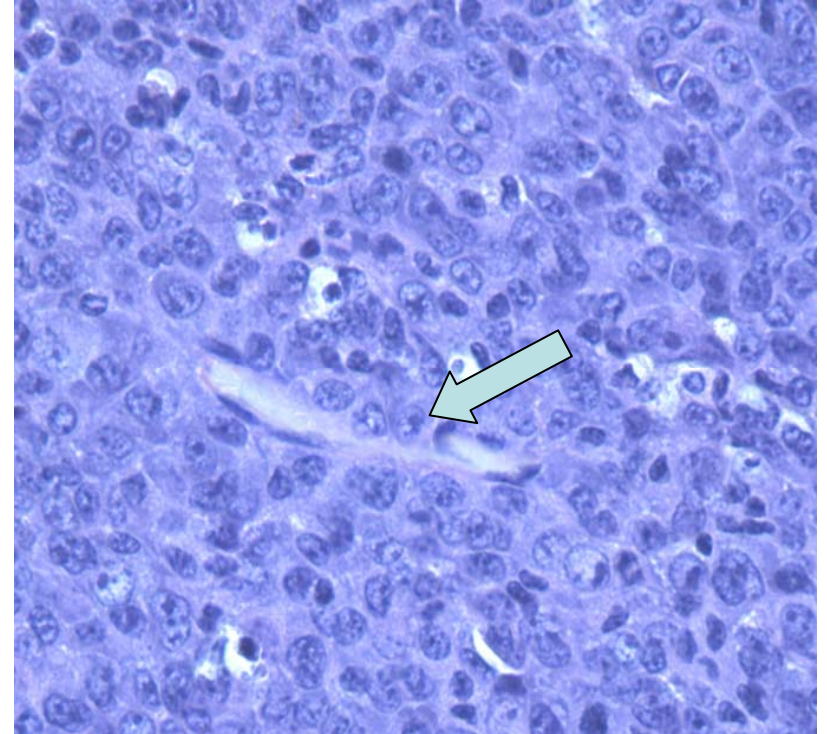
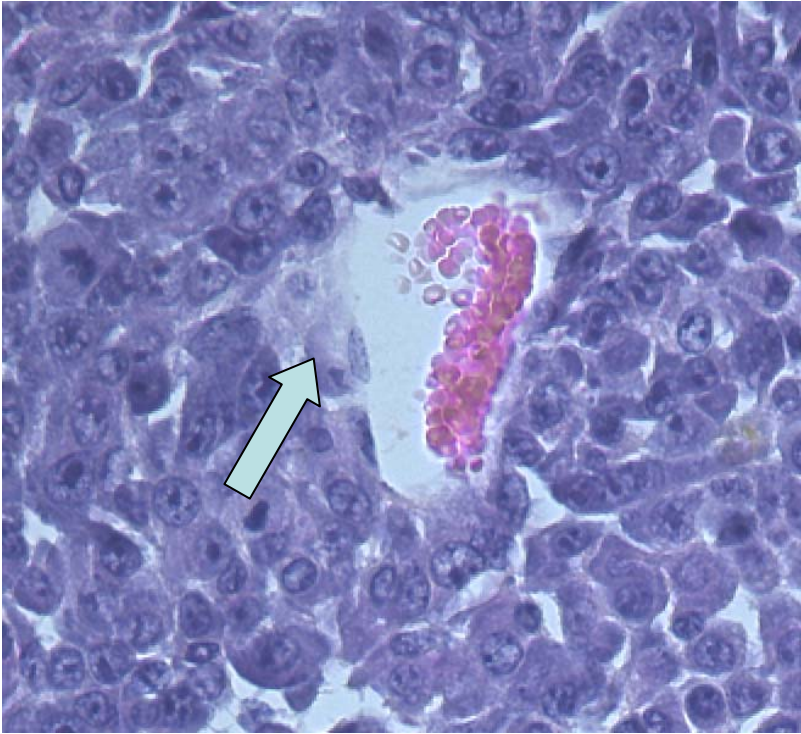
Angiogenic Function	Molecular Target
Proliferation	KDR / VEGFR2      HGF VEGF                      HGFR FGFR-1                  VEGI Angiogenin
Invasion	Heparanase
Adhesion	$\alpha$ V $\beta$ 3 Integrin $\alpha$ V $\beta$ 5 Integrin
Tube Formation	VE-Cadherin
Anastomosis	EphrinB2 EphrinR
Maturation	Flt1 Tie2 Angiopoietin

# Los inhibidores de VEGFR-2 bloquean el crecimiento de las células leucémicas por un mecanismo dual: antitumoral y antiangiogénico



# Otros mecanismos para la formación de vasos por el tumor

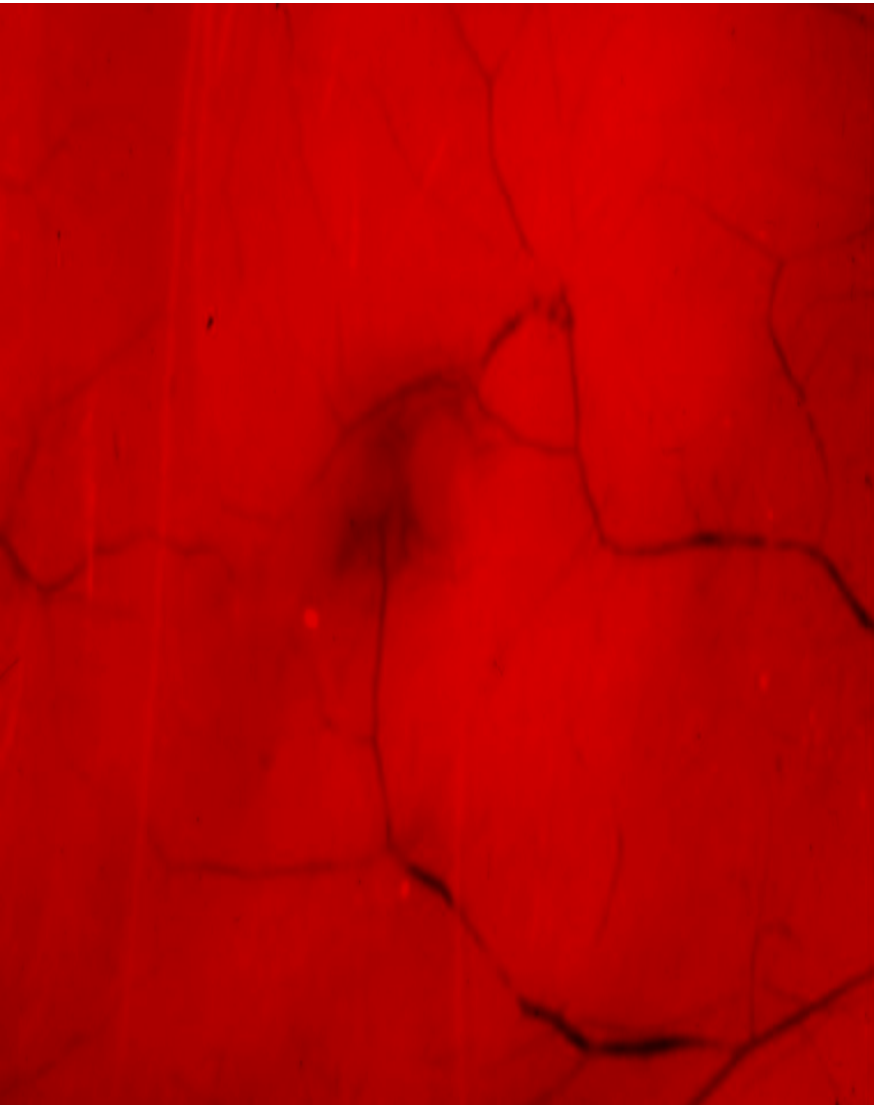
- La vasculogénesis se genera a partir de la migración de células progenitoras de la médula ósea VEGFR-2 hacia el tumor. Se requiere de la actividad de MMP-9.
- La “imitación” vasculogénica ocurre en tumores muy malignos. En este caso las propias células tumorales sufren una modificación fenotípica y adquieren la capacidad de formar paredes a nuevos vasos (VE-Cadh). Puede constituir un blanco terapéutico.



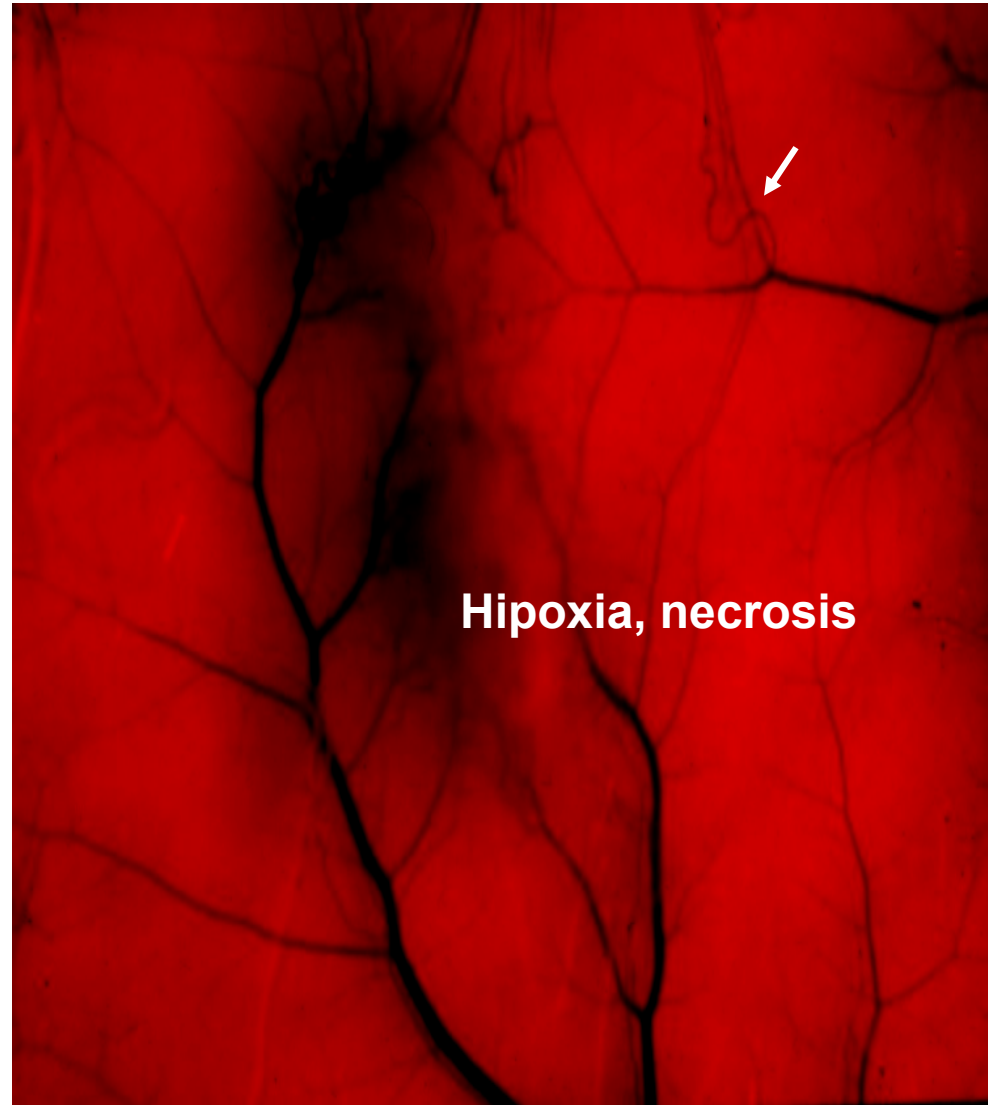
**Adenocarcinoma mamario LM38-HP**  
**Vasculogenic mimicry**

# Ensayo de angiogénesis inducido por tumor en la piel de ratones singeneicos

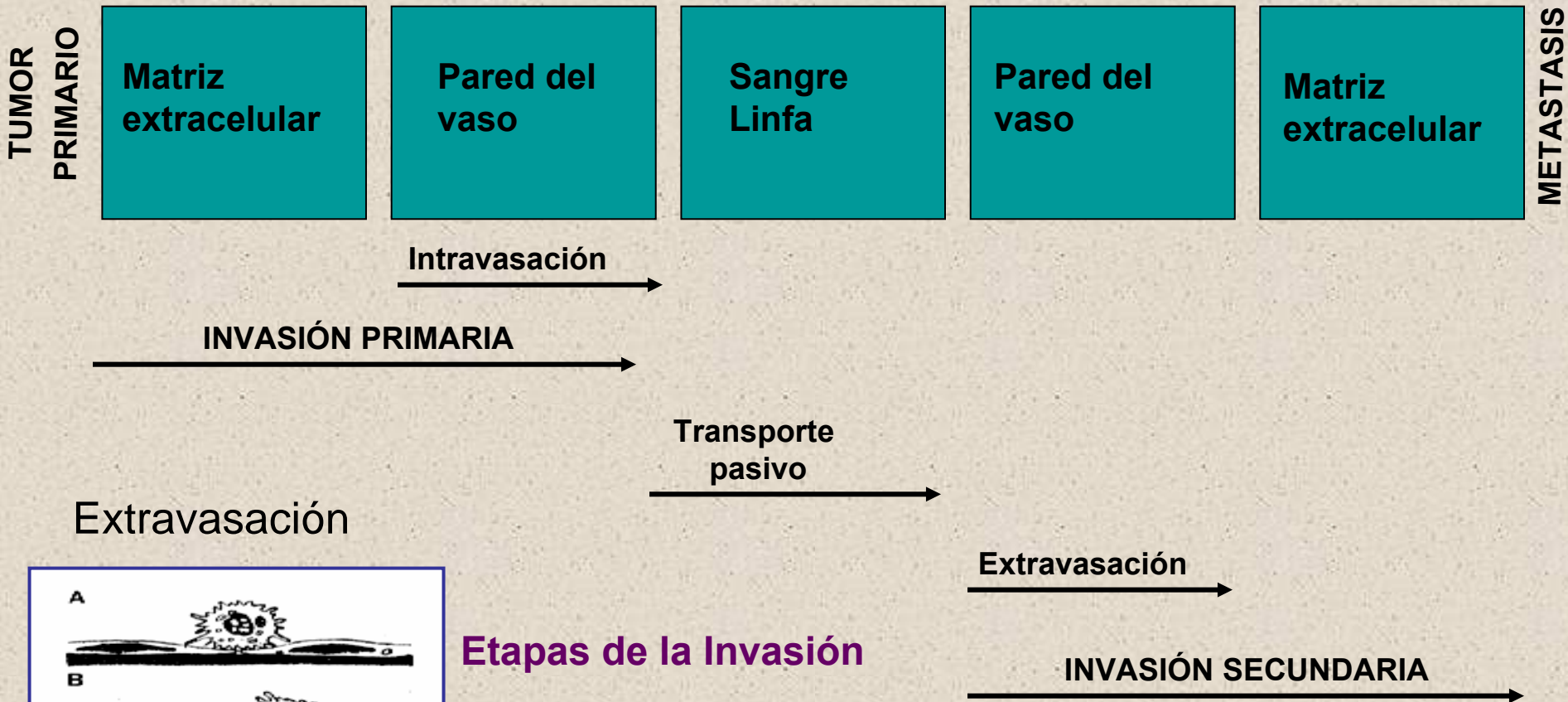
Control sin células



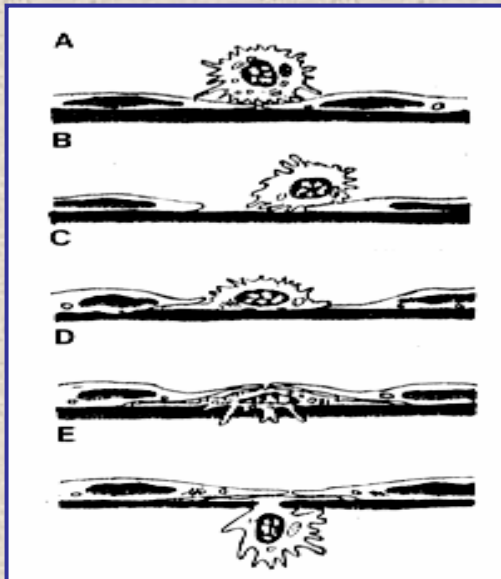
Células tumorales mamarias MM3



# Fases invasivas de la cascada metastásica



Extravasación



## Etapas de la Invasión

- 1) Adhesión
- 2) Degradación de la ECM
- 3) Migración

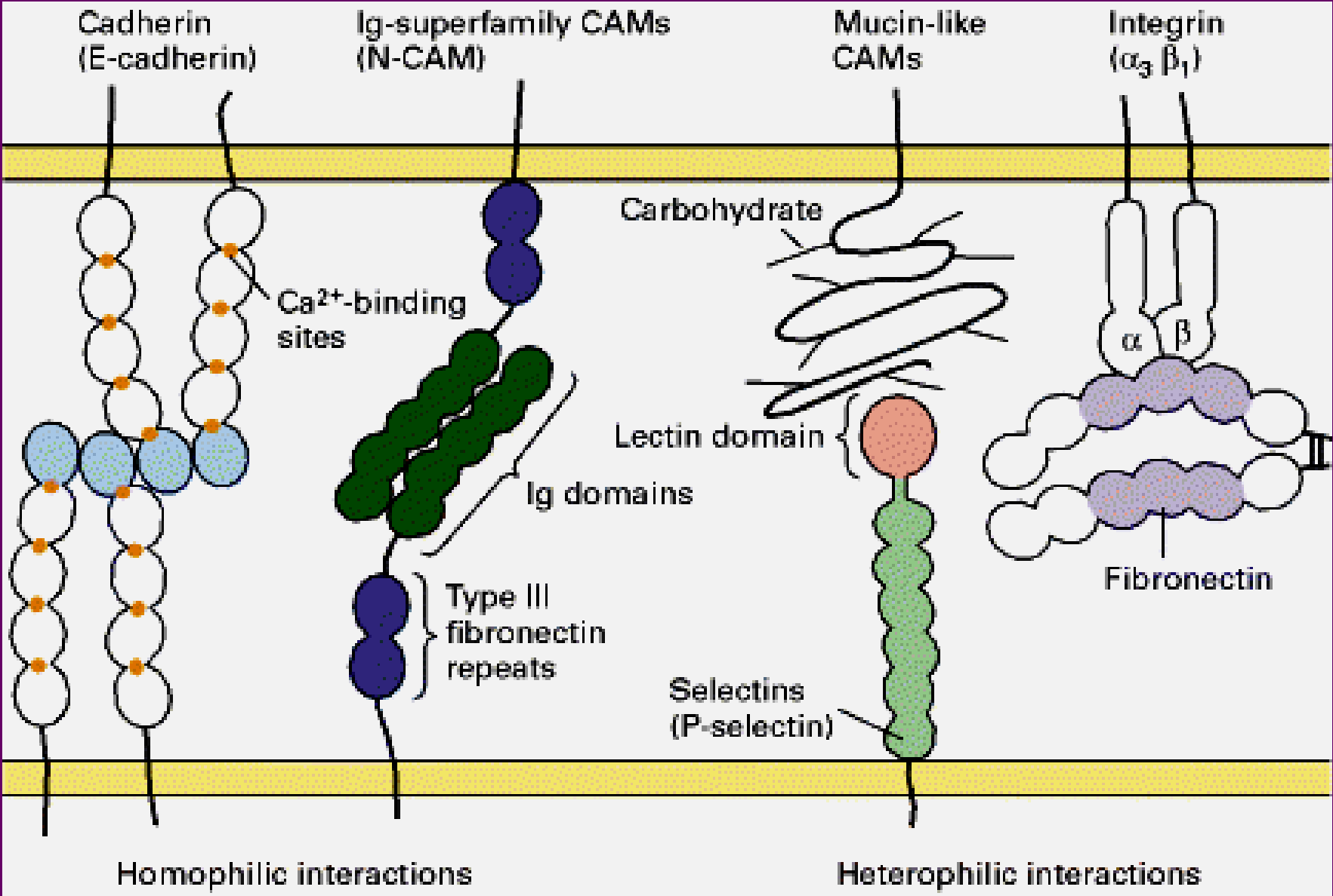
(AMF=molécula multifuncional. Citoquina reguladora de la motilidad y proliferación y es además una gluco-fosfohexosa isomerasa)

Extravasación

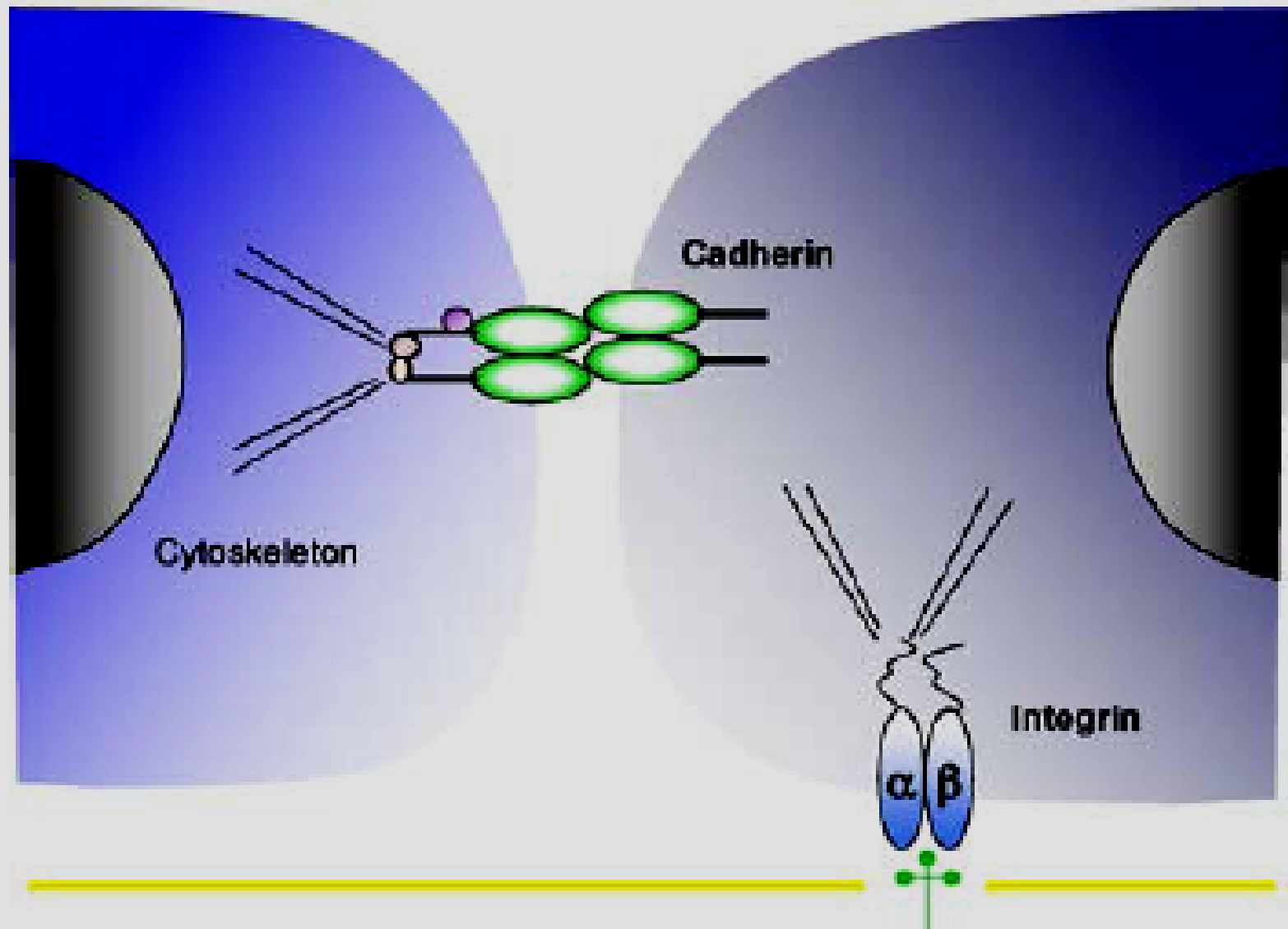
INVASIÓN SECUNDARIA



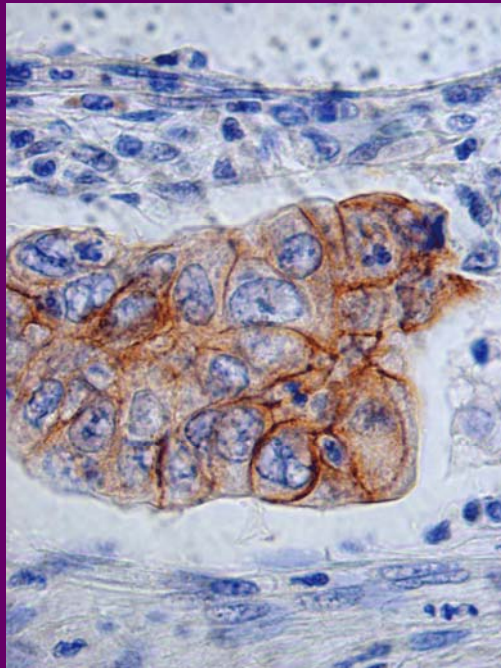
# MOLECULAS DE ADHESION



# ADHESION RECEPTORS

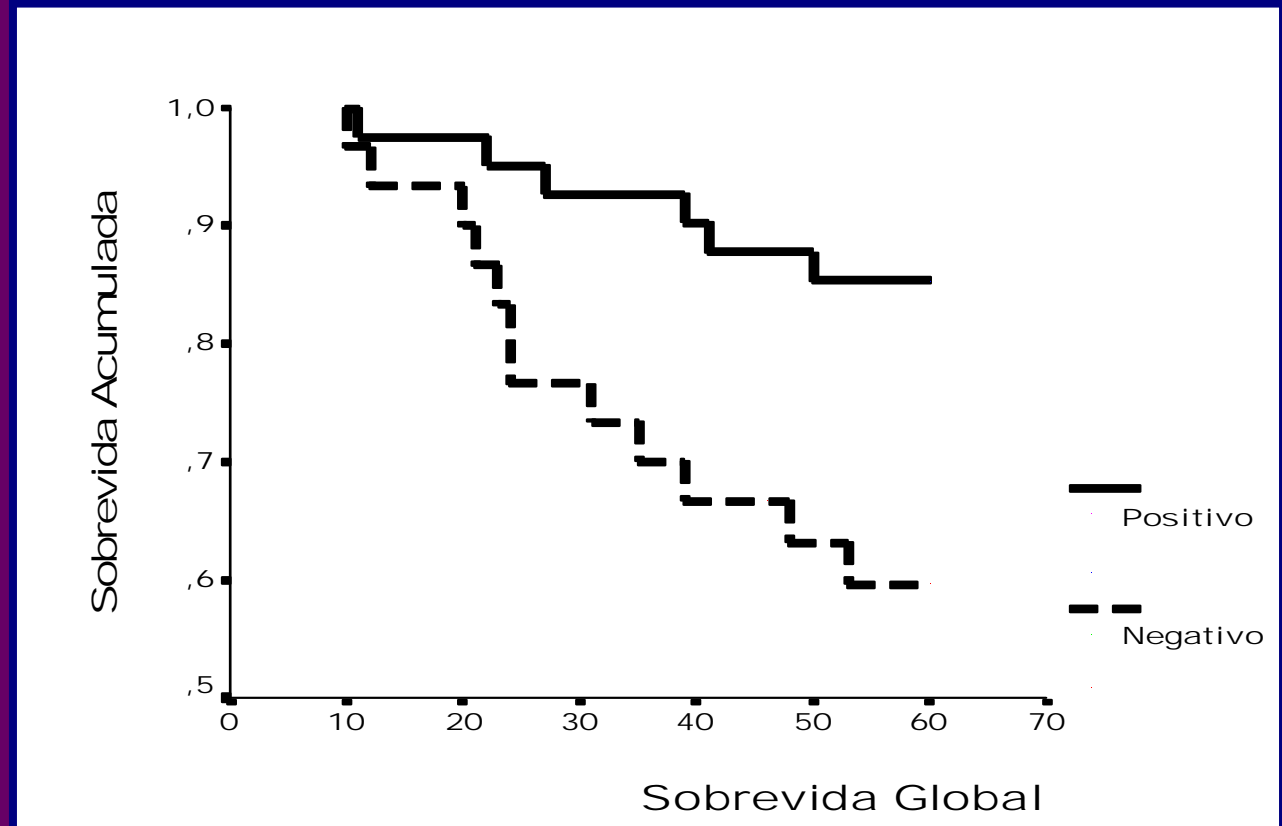


"Prognostic value of **E-Cadherin**, Beta-Catenin, MMPs (7 and 9) and TIMPs (1 and 2) in patients with colorectal carcinoma"  
(Roca et al. *J SURGICAL ONCOLOGY* 93:151, 2006)



Cadherina-E

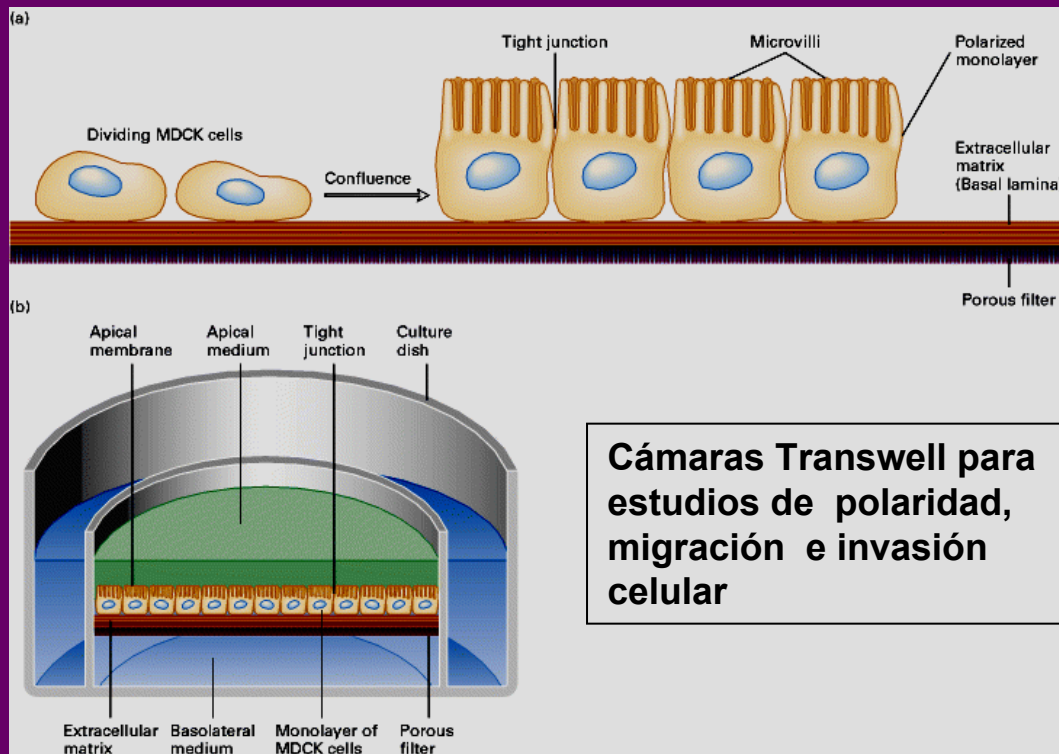
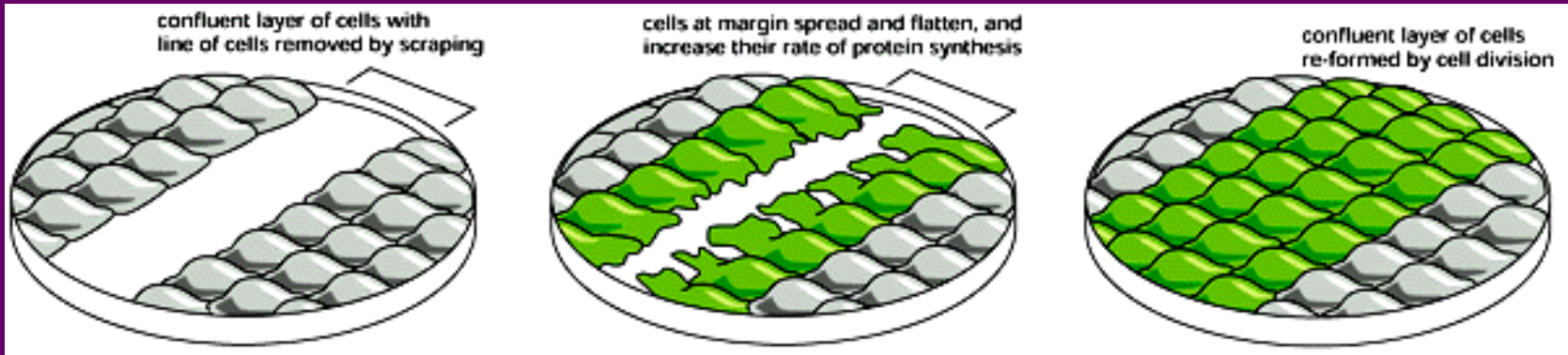
### Curva de Kaplan-Meier



La pérdida de Cadherina E se asocia a peor  
sobrevida. (Log Rank test: 6,31;  $p=0,012$ )

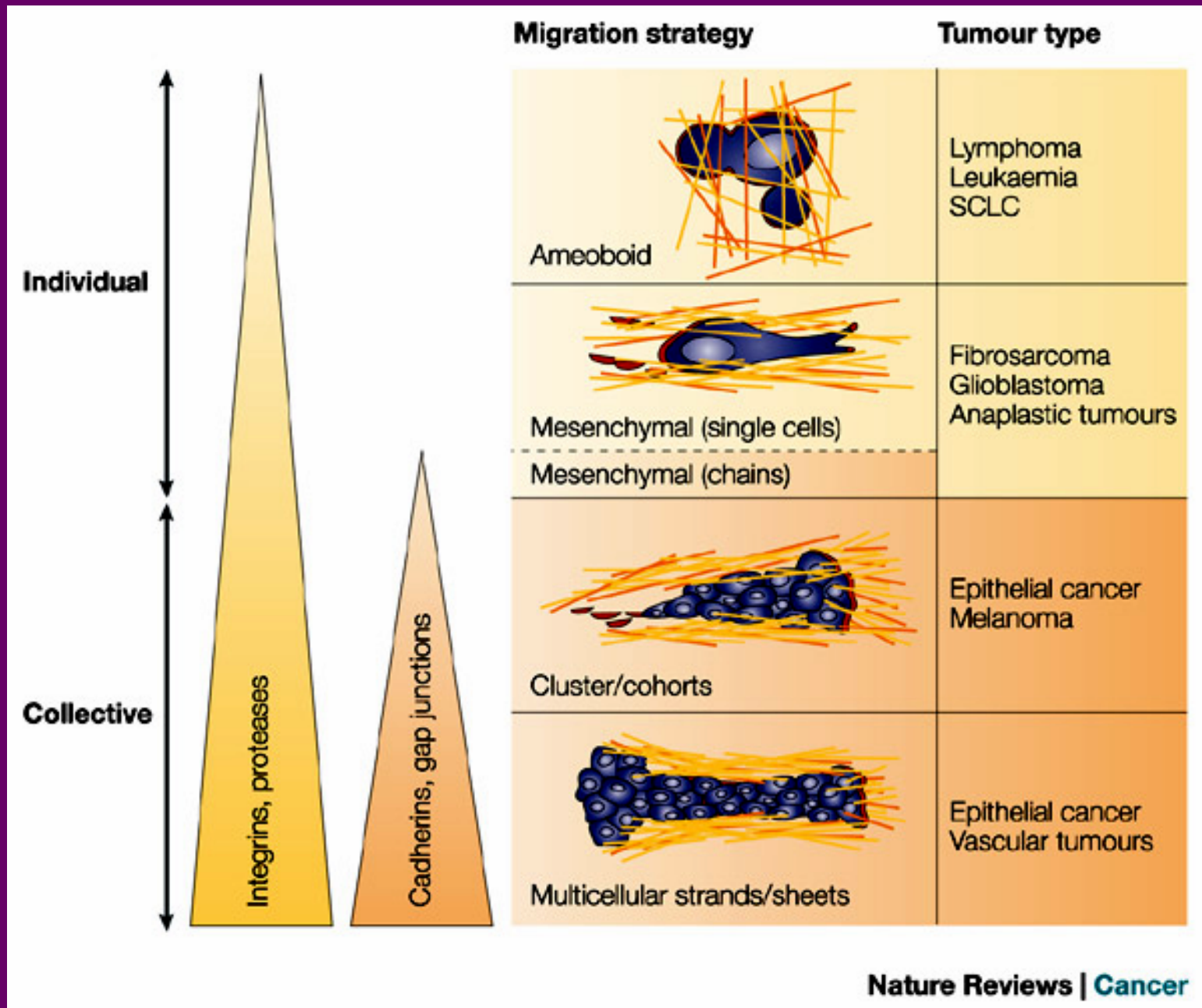
# Técnicas para evaluar la migración y la invasión celular

## *Wound healing assay*

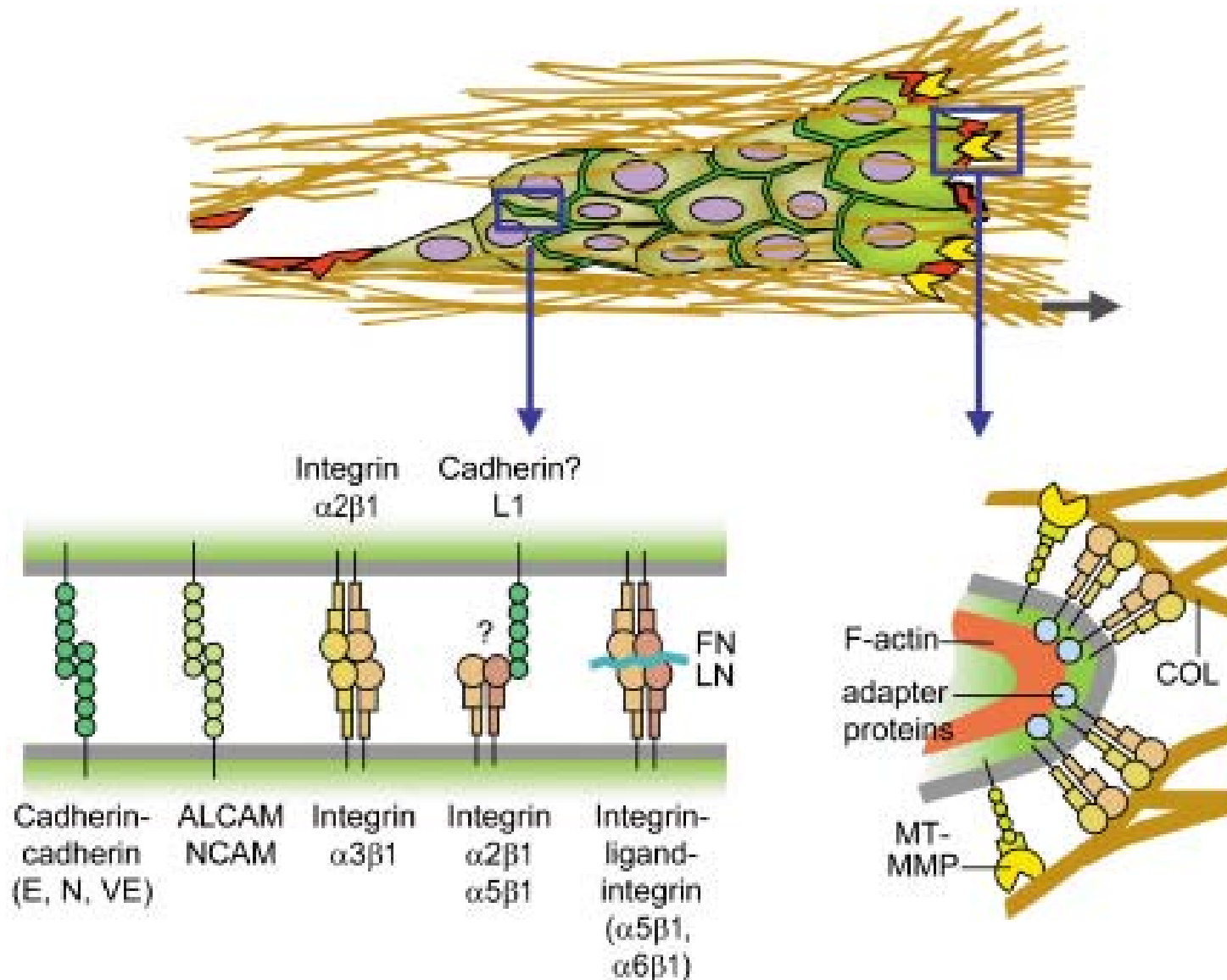


**Cámaras Transwell para estudios de polaridad, migración e invasión celular**

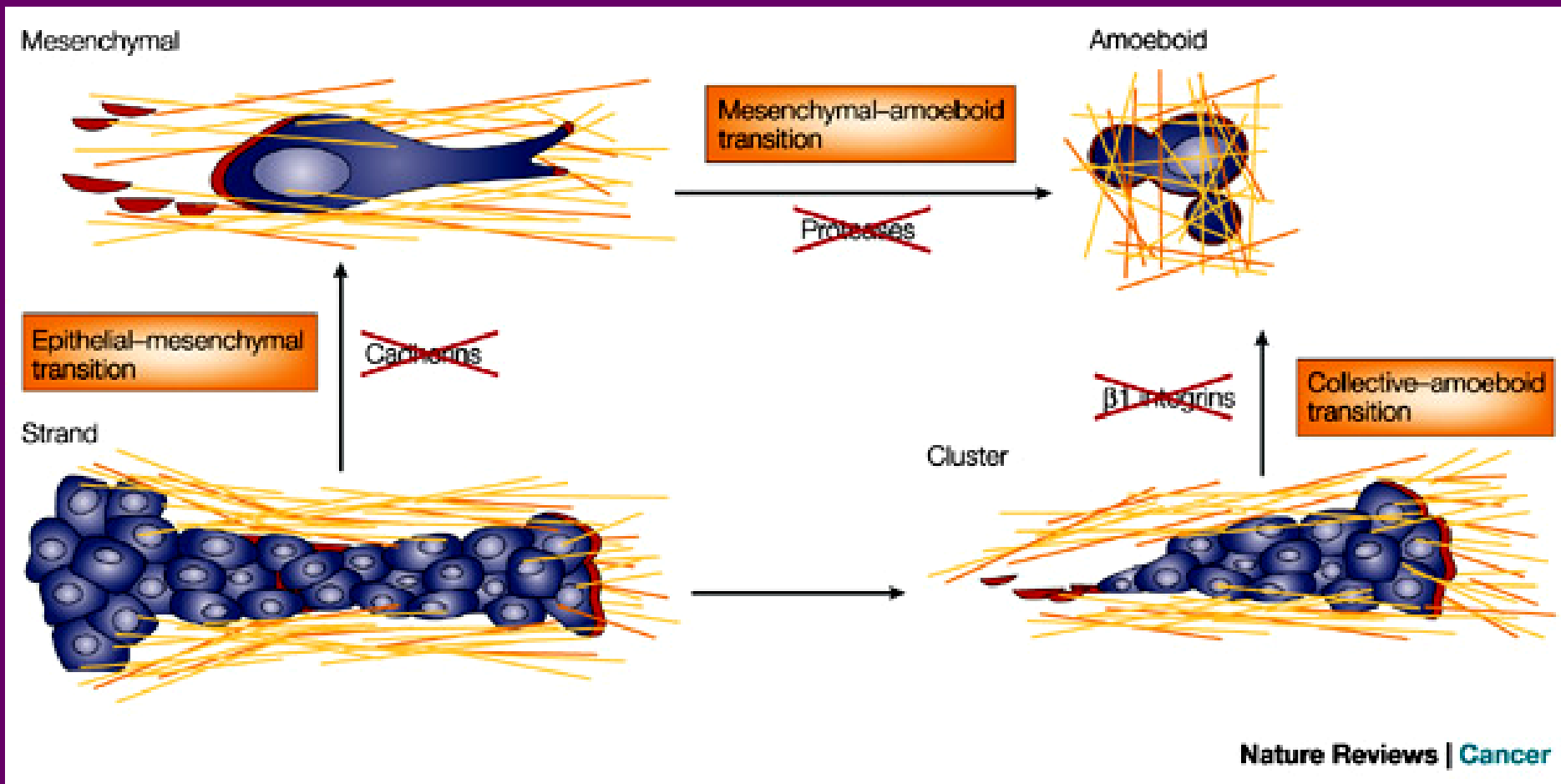
# Estrategias de las células tumorales para migrar



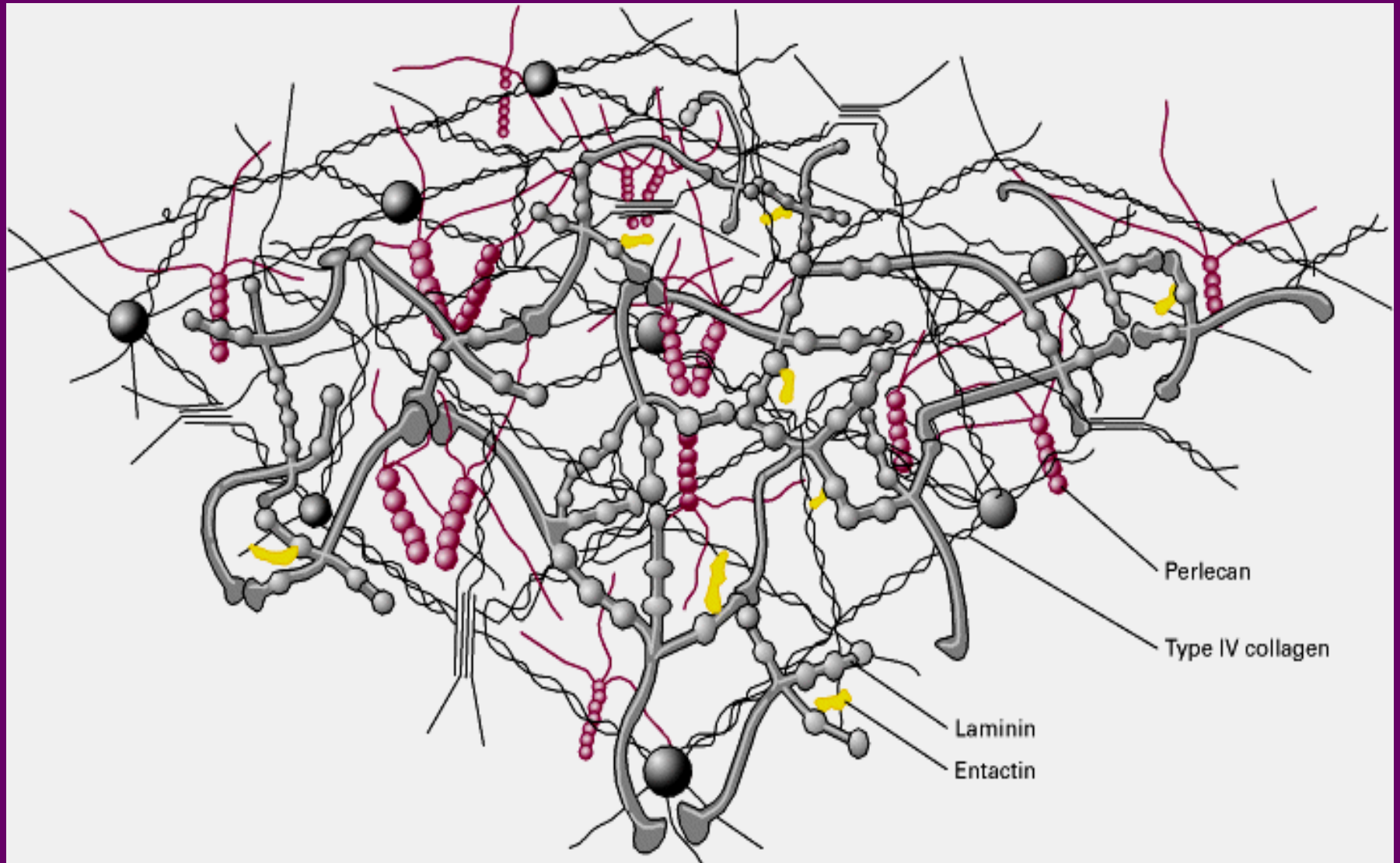
# Migración celular colectiva en carcinomas



# Estrategias de las células tumorales para migrar II

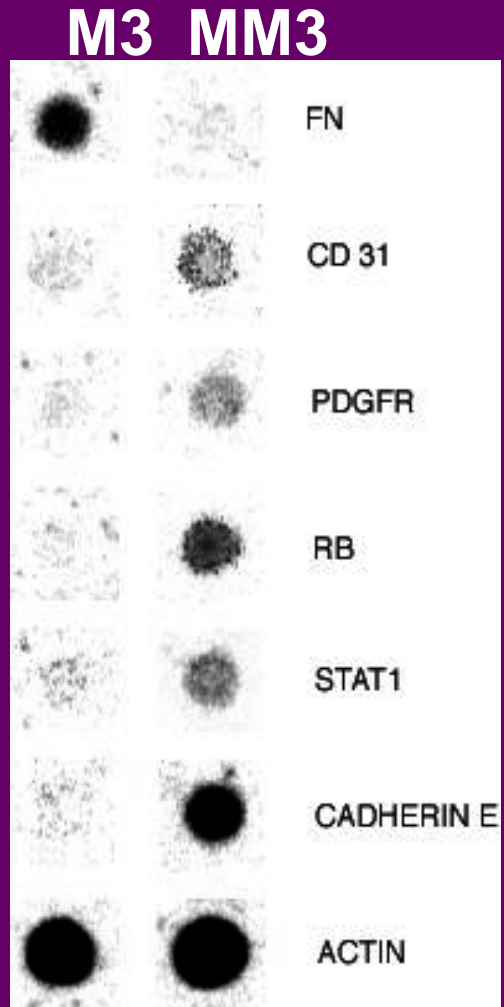


# MATRICES EXTRACELULARES

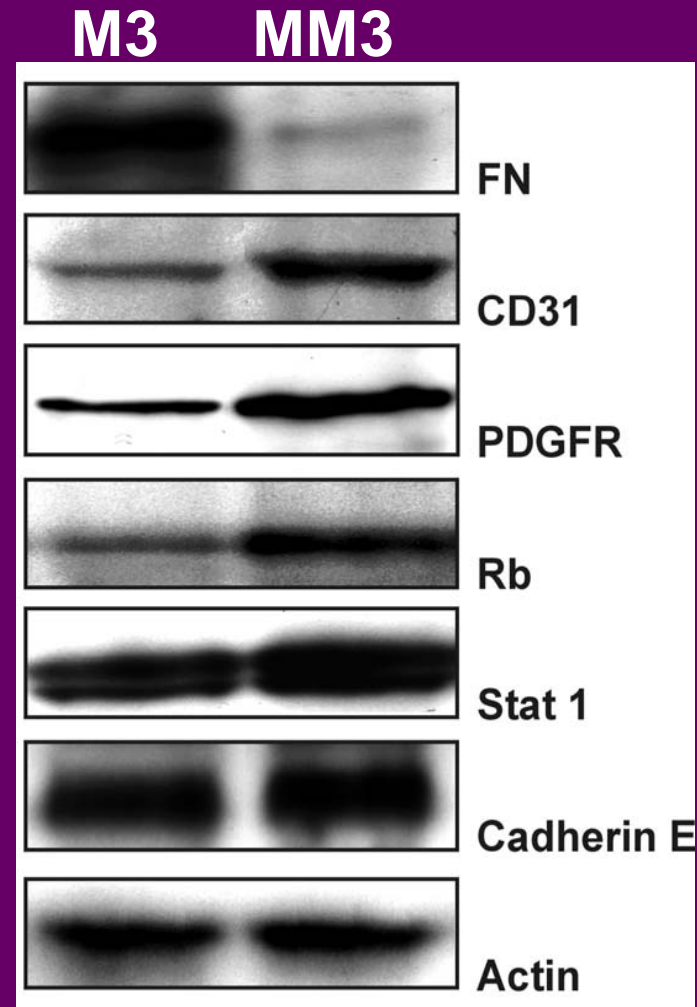




**FIBRONECTIN IS THE MAIN DOWN-REGULATED GENE ASSOCIATED WITH THE HIGHER METASTATIC ABILITY OF A MURINE MAMMARY TUMOR (86 genes were upregulated vs only 2 downregulated).  
(Urtreger et al. Oncology Rep 16:1403, 2006)**



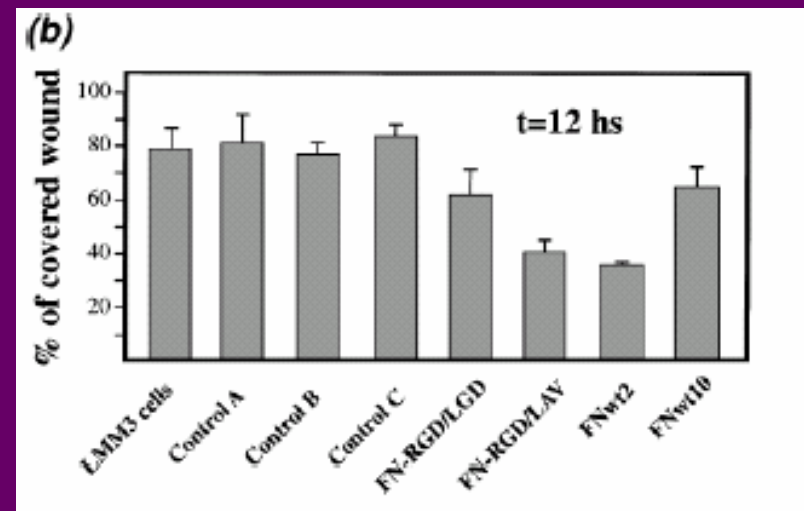
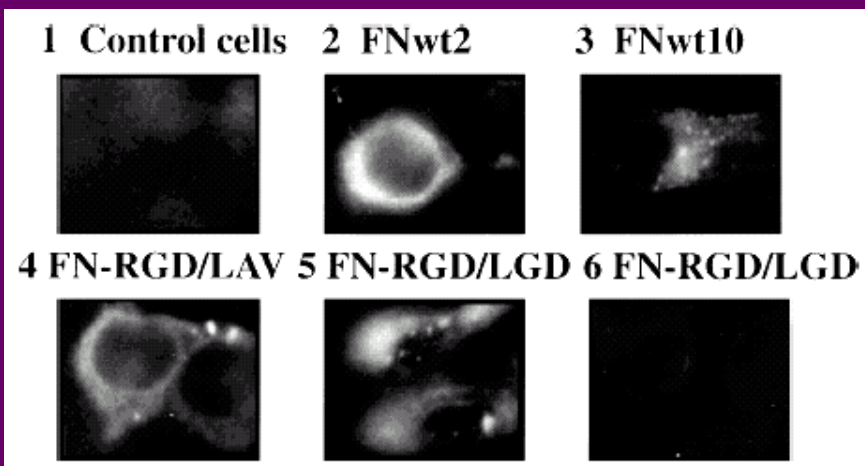
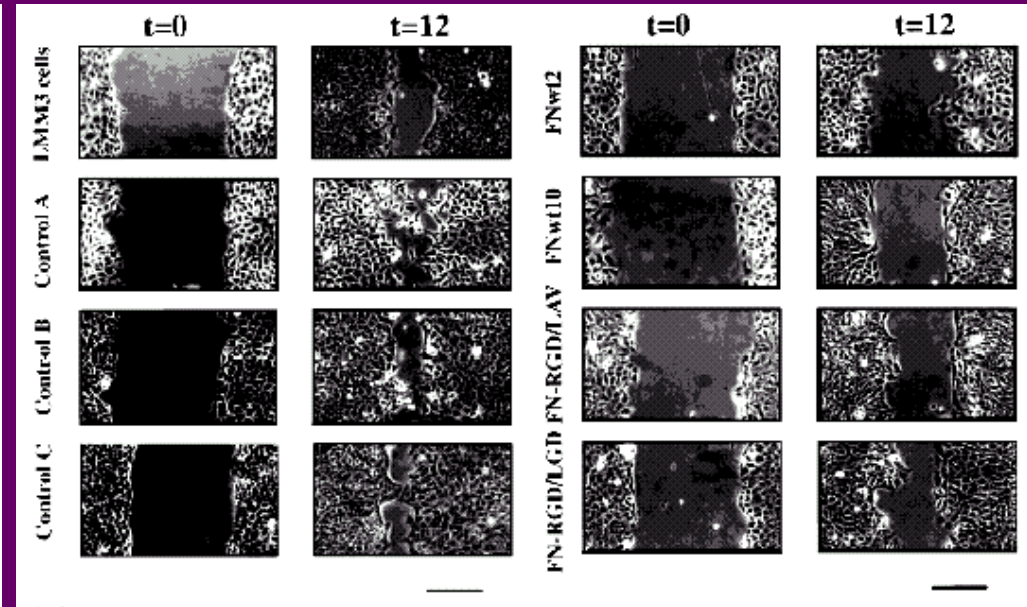
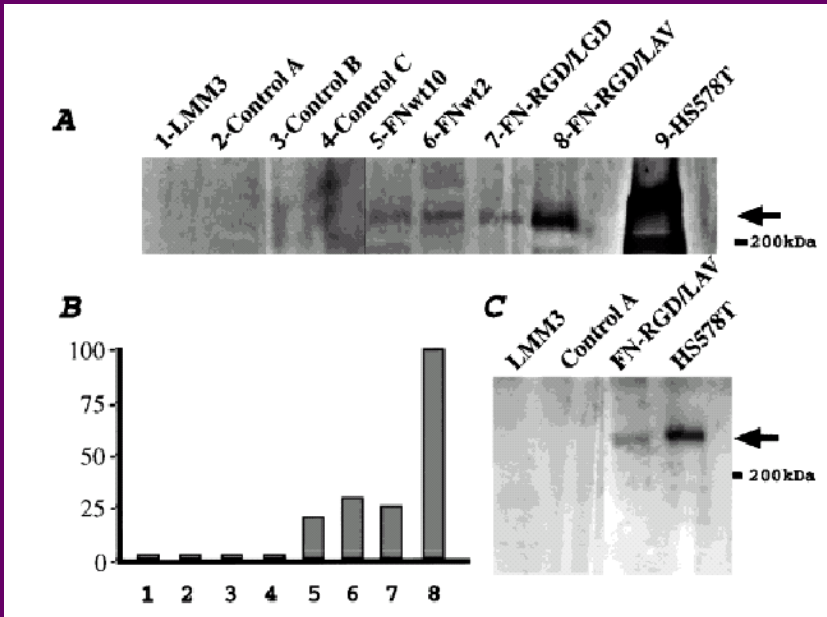
**cDNA array**

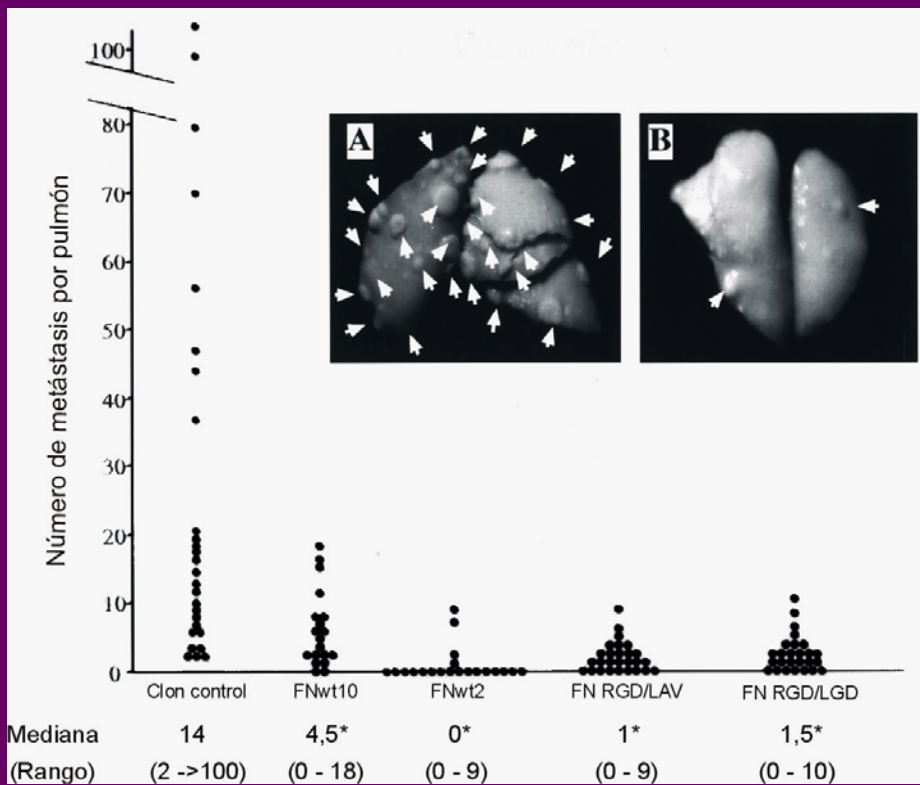


**Western blot**

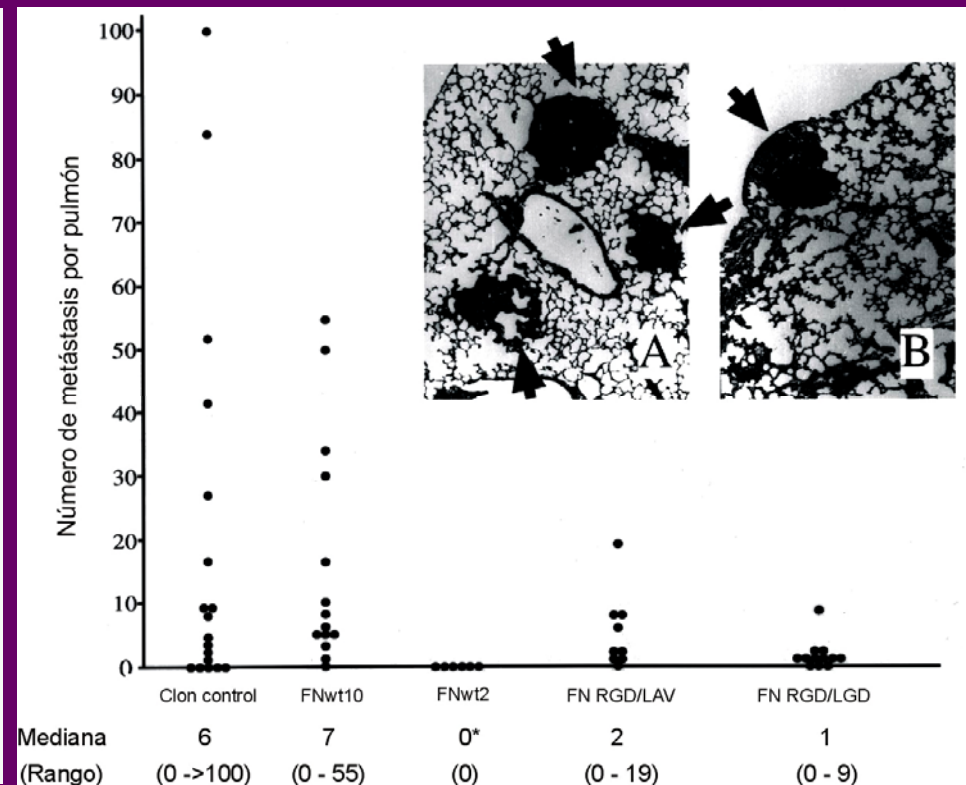
# EXPRESSION OF RGD MINUS FIBRONECTIN THAT DOES NOT FORM EXTRACELLULAR MATRIX FIBRILS IS SUFFICIENT TO DECREASE TUMOR METASTASIS.

Alejandro Urtreger et al., *Int. J. Cancer*: 78, 233–241 (1998)





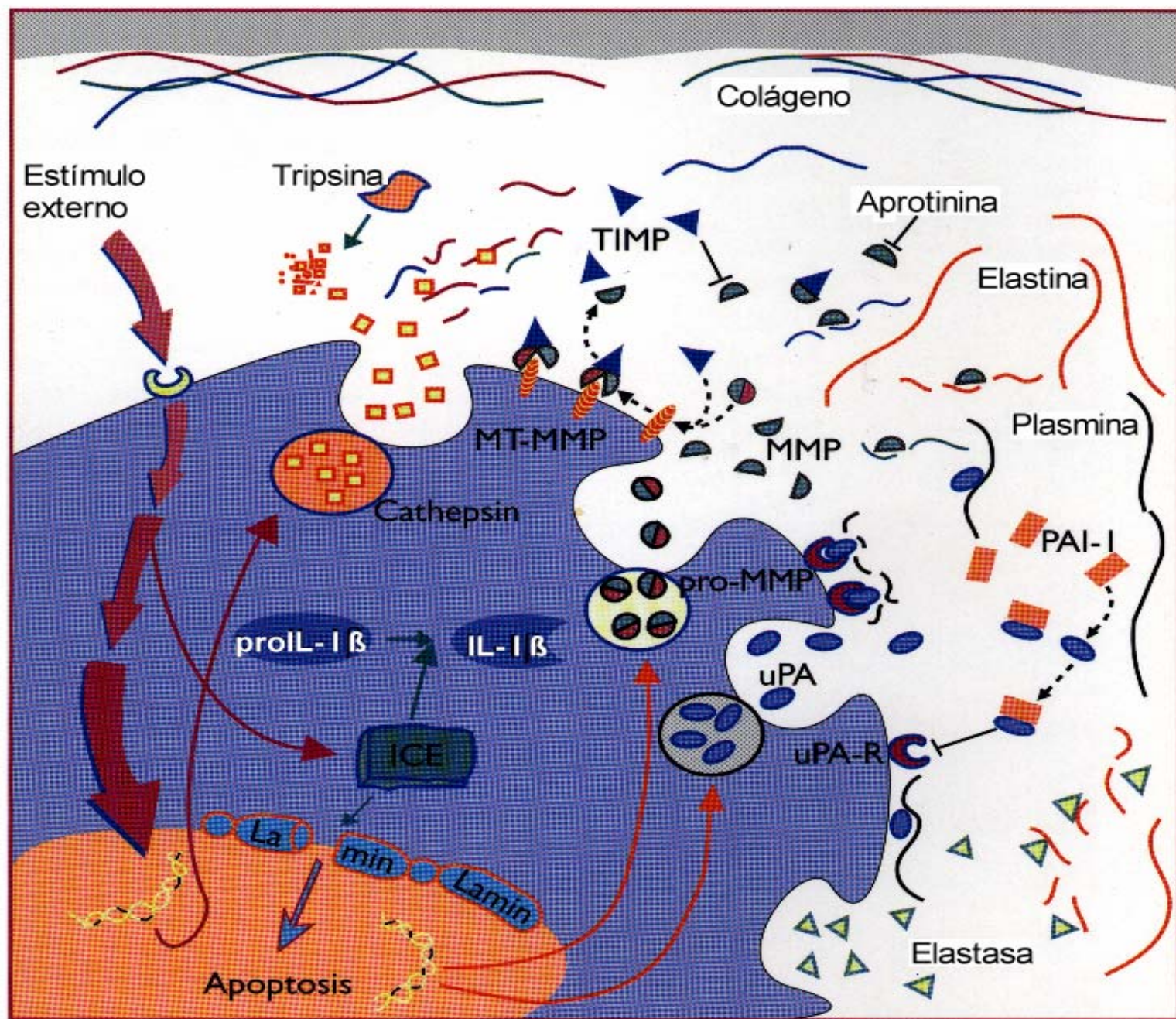
**Metástasis experimentales**



**Metástasis espontáneas**

# ENZIMAS PROTEOLITICAS

# Cascada proteolítica pericelular

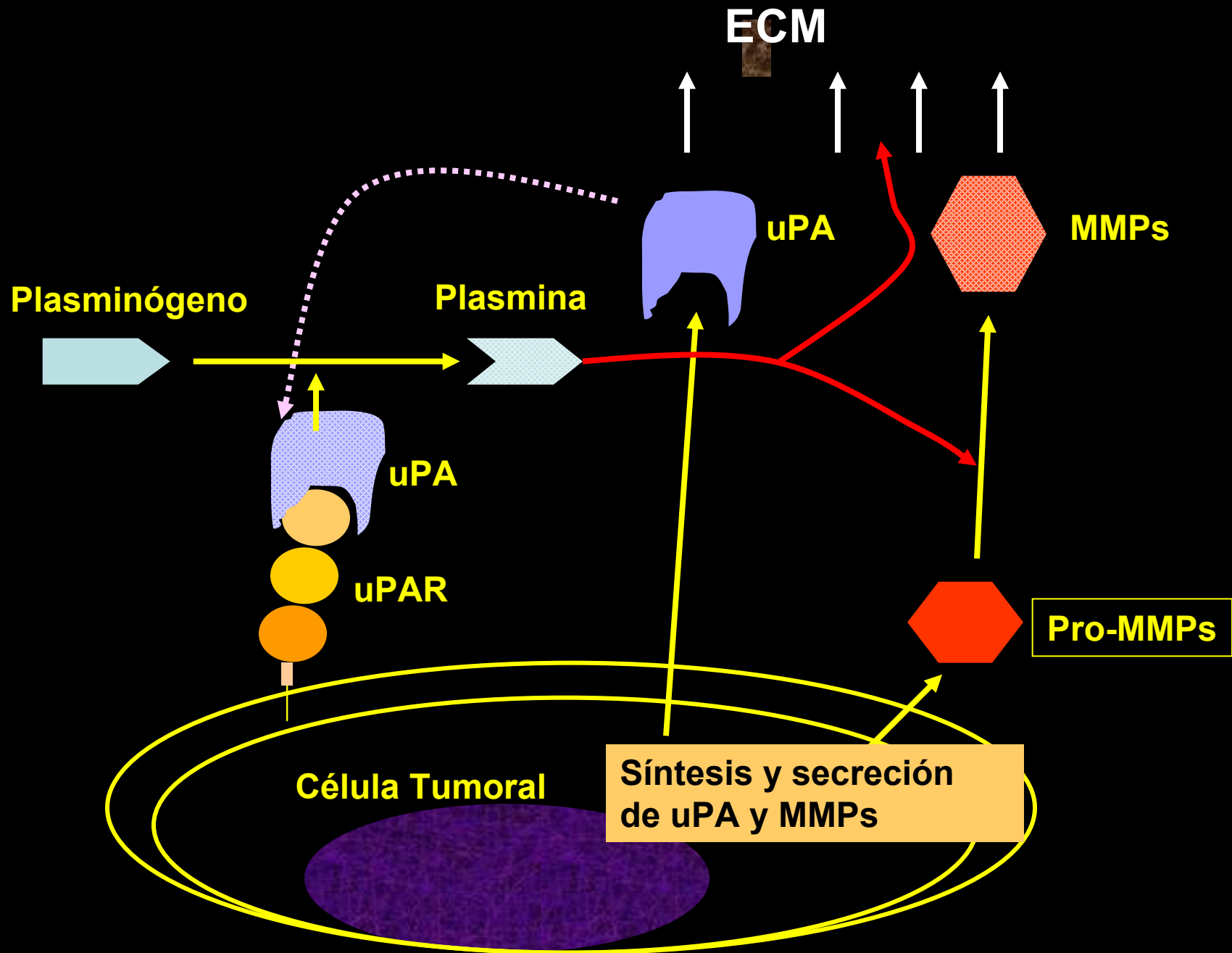


## Proteasas involucradas en la invasión tumoral.

<i>Clasificación</i>	<i>Miembros más relevantes</i>	<i>Actividad biológica</i>
1. Serino-proteasas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• uPA</li> <li>• tPA</li> <li>• Plasmina</li> </ul>	<p>Activan el plasminógeno a plasmina. Degradan algunas proteínas de la matriz, como la FN.</p> <p>Degrada laminina, FN y colágeno IV. Activa las metaloproteasas latentes</p>
2. Metallo-proteasas (dependientes de $\text{Ca}^{2+}$ y $\text{Zn}^{2+}$ )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MMP-1</li> <li>• MMP-2 y MMP-9</li> <li>• Estromelisinias</li> <li>• Matrilisinias</li> <li>• MT-MMP</li> </ul>	<p>El espectro de acción degradativa es bastante variado. Degradan todo tipo de colágeno incluyendo colágeno intersticial y de las membranas basales y colágeno desnaturalizado, también pueden degradar proteoglicanos y glicoproteínas. Las MT-MMP se insertan en la membrana plasmática.</p>
3. Cisteíno-proteasas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Catepsina B</li> </ul>	<p>Amplio espectro. Activa al uPA y a las metaloproteasas.</p>
4. Aspartil-proteasas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Catepsina D</li> </ul>	<p>Degrada amplia variedad de proteínas endocitadas (degradación lisosomal). También puede secretarse.</p>

## SISTEMA DEL ACTIVADOR DEL PLASMINOGENO:

- Dos moléculas activadoras: activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) y el activador de plasminógeno tisular (tPA).
- Receptores de superficie celular específicos (uPAR).
- El sustrato de ambos activadores: plasminógeno.
- El producto de su acción catalítica: plasmina.
- Sus inhibidores endógenos específicos: PAI-1 y PAI-2 (inhibidores del activador del plasminógeno).



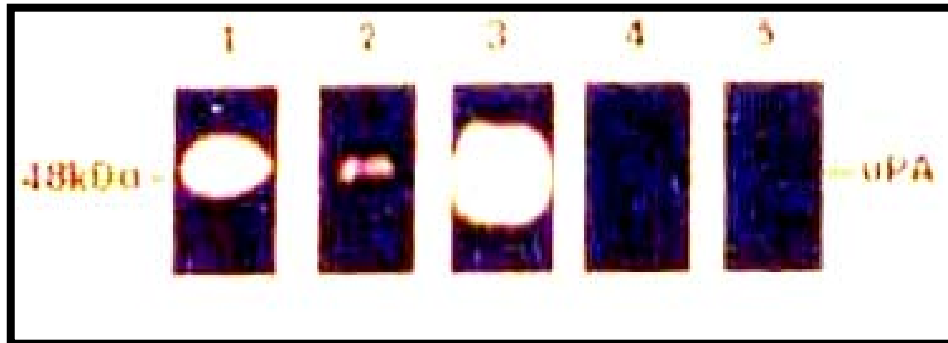


# uPA Y METASTASIS

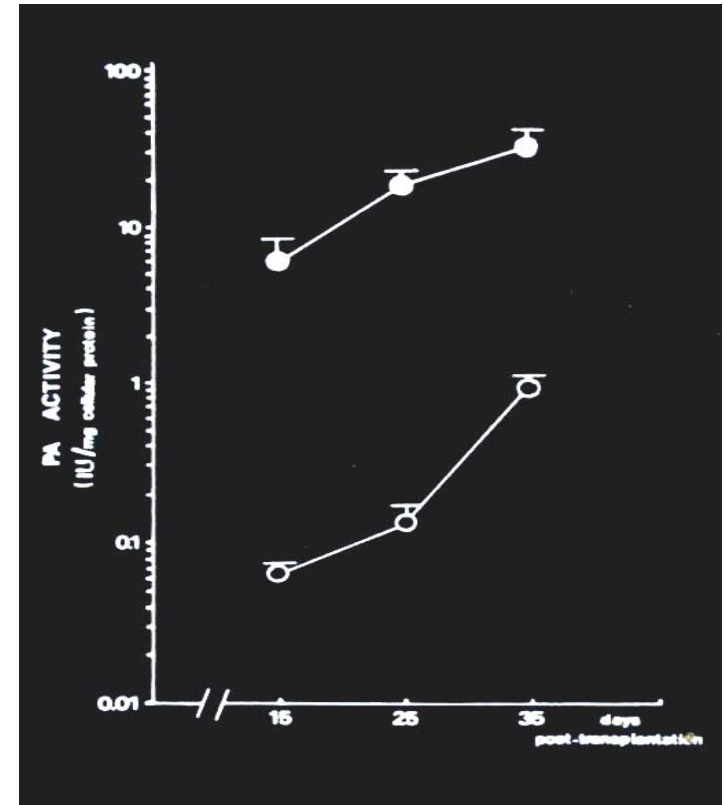
En el modelo experimental de adenocarcinomas mamarios murinos (M3 y MM3), que difieren en su capacidad metastásica, demostramos que:

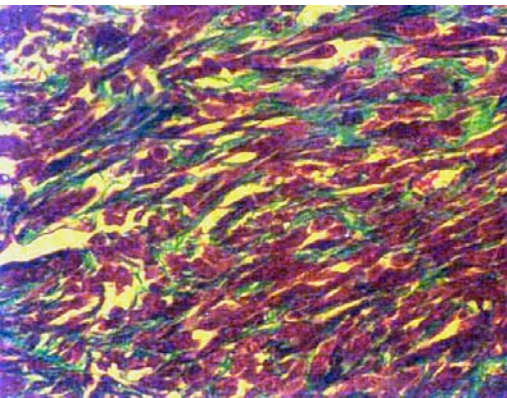
- El tumor MM3, más metastásico, secreta 3-4 veces más uPA (*Int. J. Cancer* 42:59-63, 1988).
- La producción de uPA aumenta a lo largo del crecimiento tumoral en ambos (*Int. J. Cancer* 43:356-357, 1989; *Clin. Exp. Metastasis* 10:395-401, 1992)

## Zimografía



C M3 MM3 (anti-uPA)



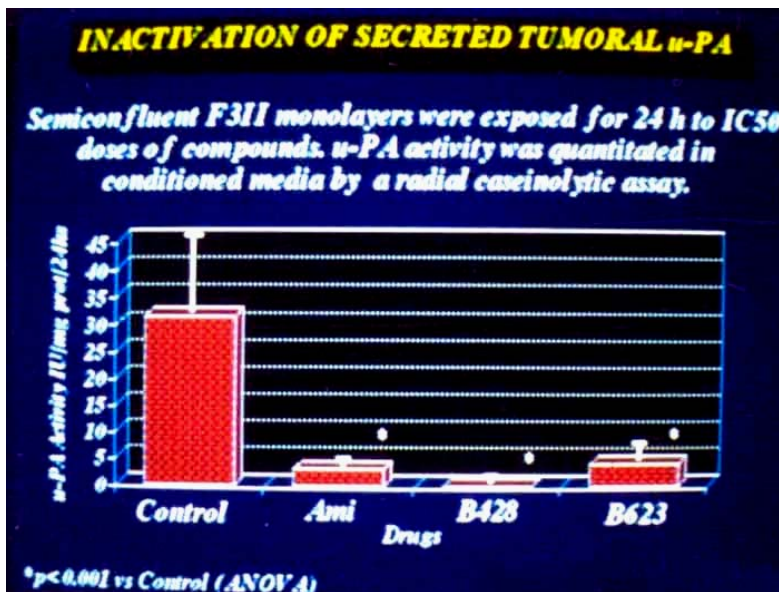


## uPA Y PROGRESION TUMORAL

Se emplearon dos inhibidores altamente específicos de la actividad catalítica de uPA: B428 y B623 (4-substituted benzo(b)thiophene 2-carboxamidines) (Eisai Res. Inst., USA)

Línea F3II

Ensayos in vitro

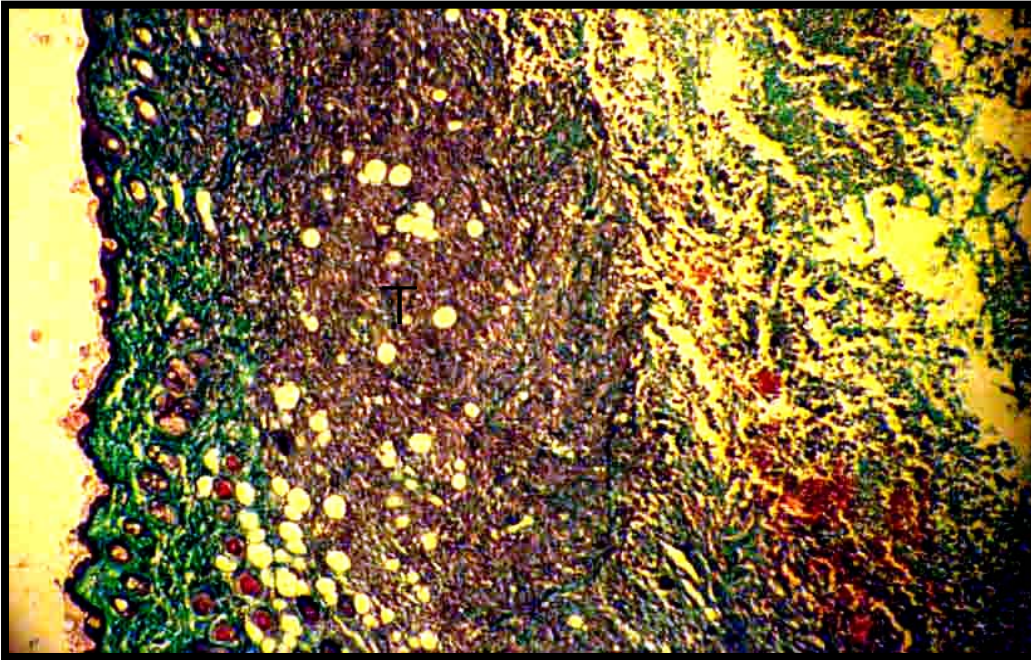


	Inhibición de migración (%)	Inhibición de invasión (%)
B428 10 uM	29.8 ± 15.5	39.1 ± 8.3*
B428 20 uM	49.4 ± 6.8*	58.9 ± 9.0*

P<0.05 (ANOVA) vs control

El uPA tiene un rol crítico en los procesos de migración e invasión, en el modelo en estudio, tanto in vitro como in vivo

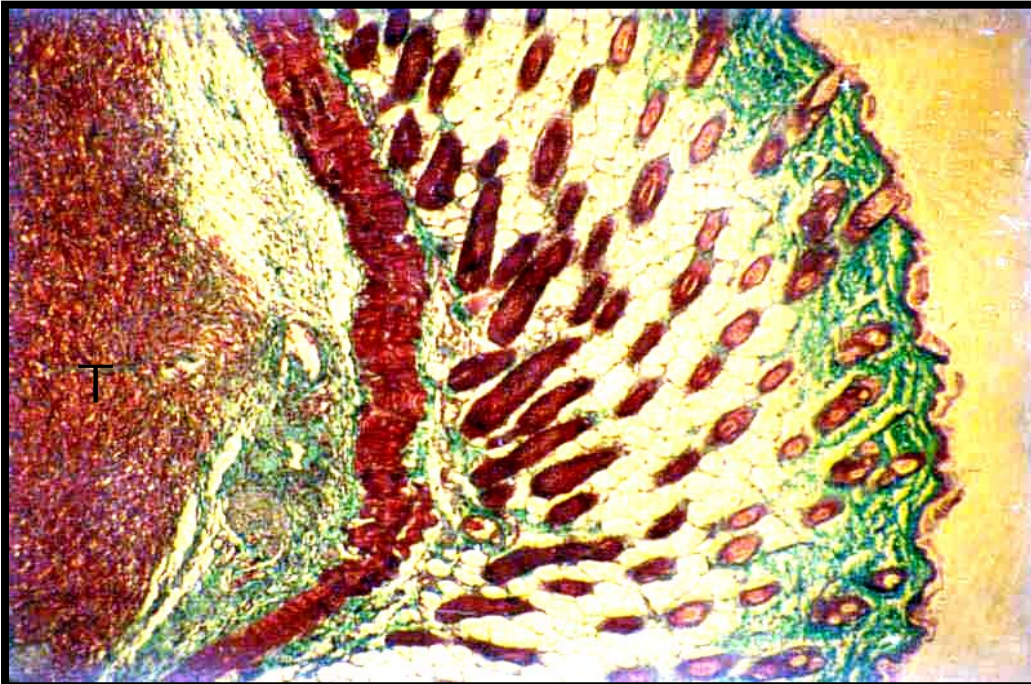
(Breast Cancer Res. & Treatment 40:209-223, 1996, Anticancer Res. 18: 4499 4504, 1998).



***Cuando los tumores son palpables se inicia tratamiento ip con los inhibidores de uPA B428 o B623 (20 ó 7.5 mg/kg ratón, 3 veces por semana), o su vehículo.***

## **CONTROL**

**El tumor invade dermis y músculo subcutáneo**



## **TRATADO CON B428:**

**Se observa inhibición de la invasión local. Sin embargo no modula (o, B623 aumenta) la diseminación metastásica**

### Minimal-domain MMPs



### Simple hemopexin-domain-containing MMPs



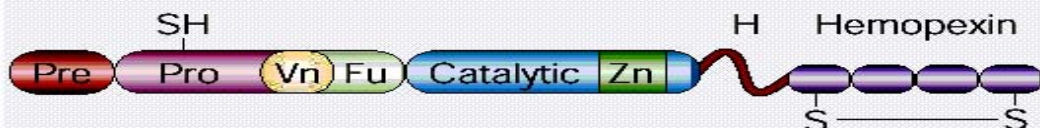
### Gelatin-binding MMPs



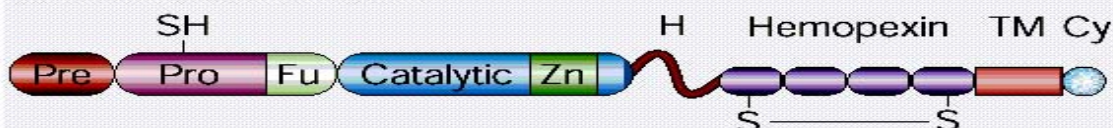
### Furin-activated secreted MMPs



### Vitronectin-like insert MMPs



### Transmembrane MMPs



### GPI-anchored MMPs



### Type II transmembrane MMPs



# La estructura química de las MMPs

(24 EN EL GENOMA HUMANO + OTRAS RELACIONADAS)

Constituyen 8 grupos estructurales diferentes

**Metaloproteasas  
(MMPs)  
Matrixinas**

**Matrilisinas**

**Colagenasas  
Intersticiales**

**Colagenasas Tipo IV  
Gelatinasas**

**Estromelisin**

**Metaloproteasas de  
Membrana**

**Proteoglicanos**

**Colágenos  
Fibrilares**

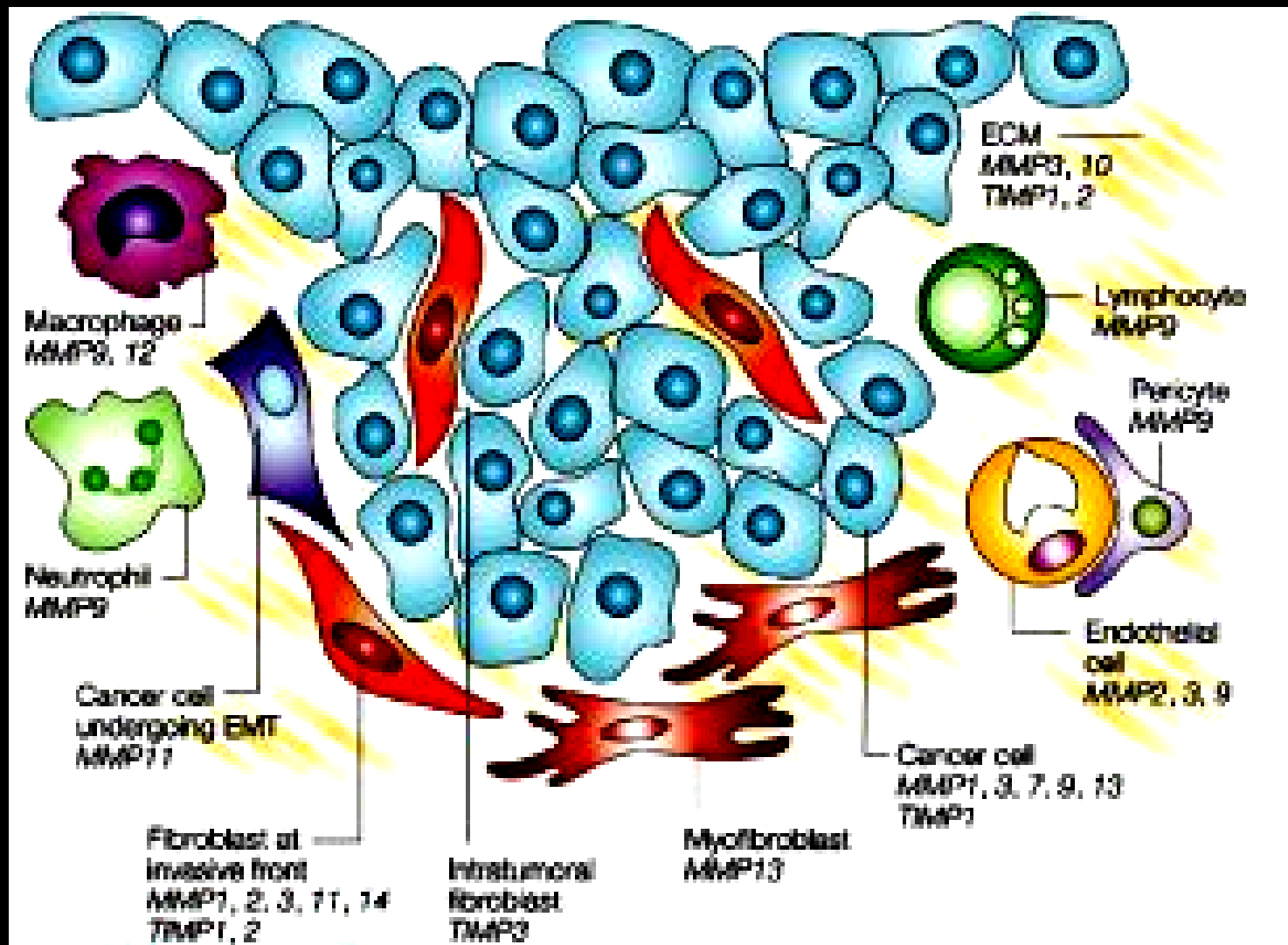
**Colágeno  
Tipo IV**

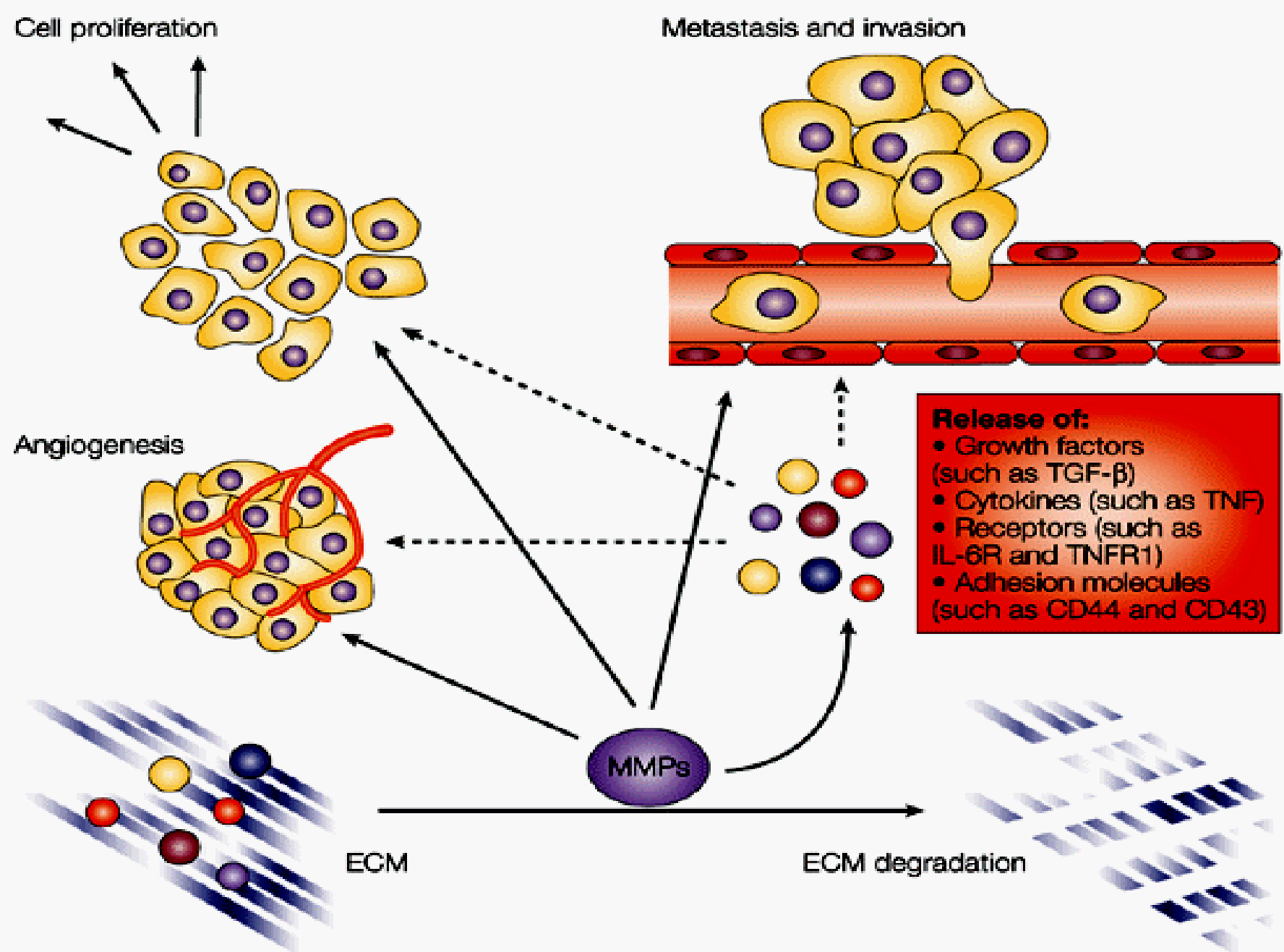
**GAGs**

**Pro-MMP2**

**MMP-2  
MMP-9**

# The tumor organ consists of a network of host and malignant cells and extracellular matrix: Which cells make MMPs?





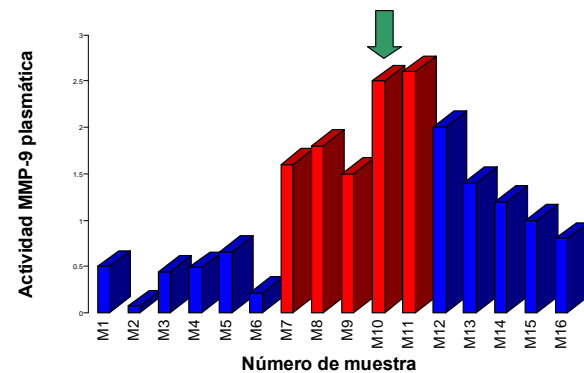
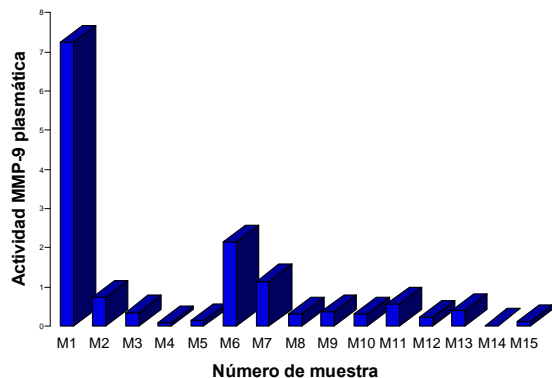
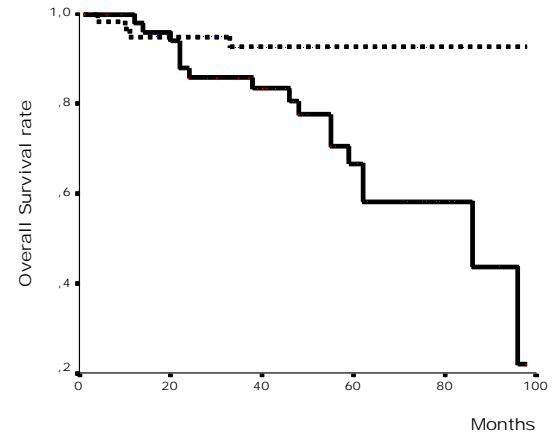
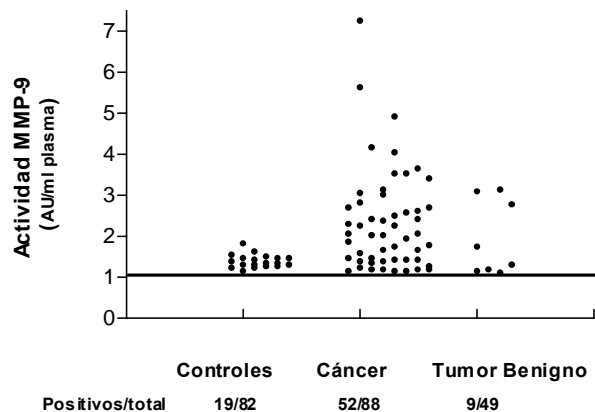
**FUNCIONES DE LAS MMPs EN EL CANCER**

**LA MMP-9 PLASMÁTICA COMO  
MARCADORA DE PRONÓSTICO  
Y SEGUIMIENTO EN CÁNCER DE  
MAMA**

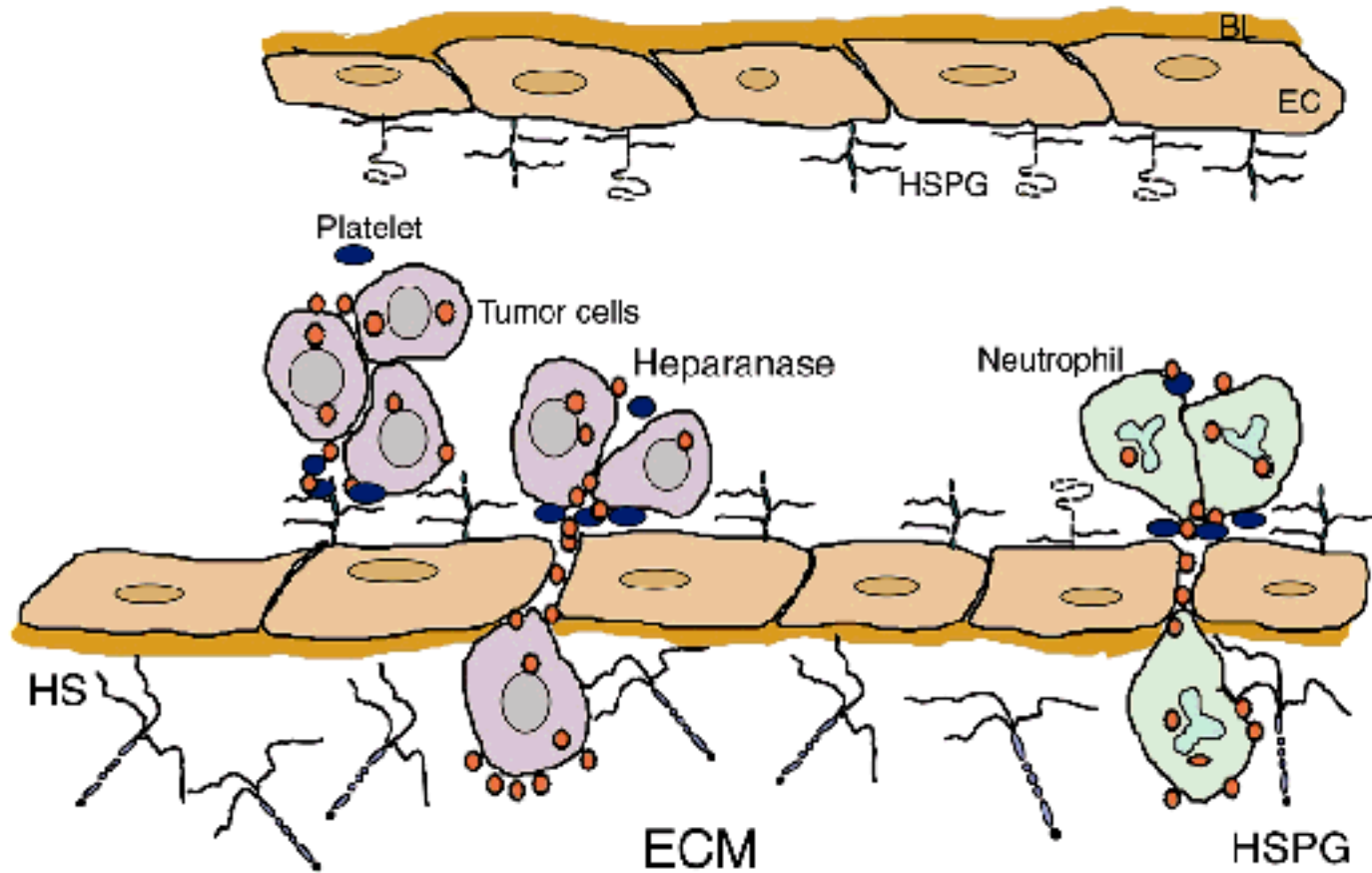
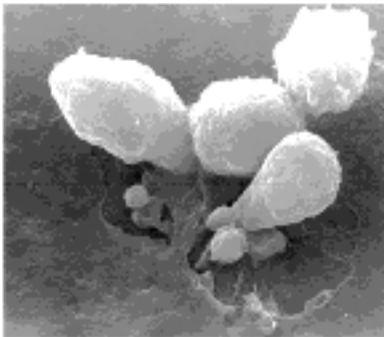
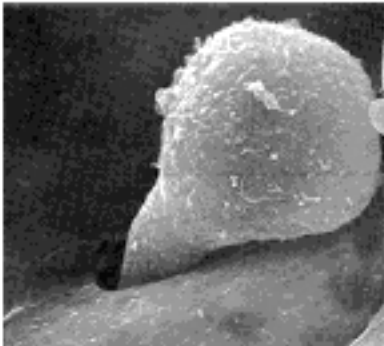


# Actividad de MMP-9 plasmática en cáncer de mama humano

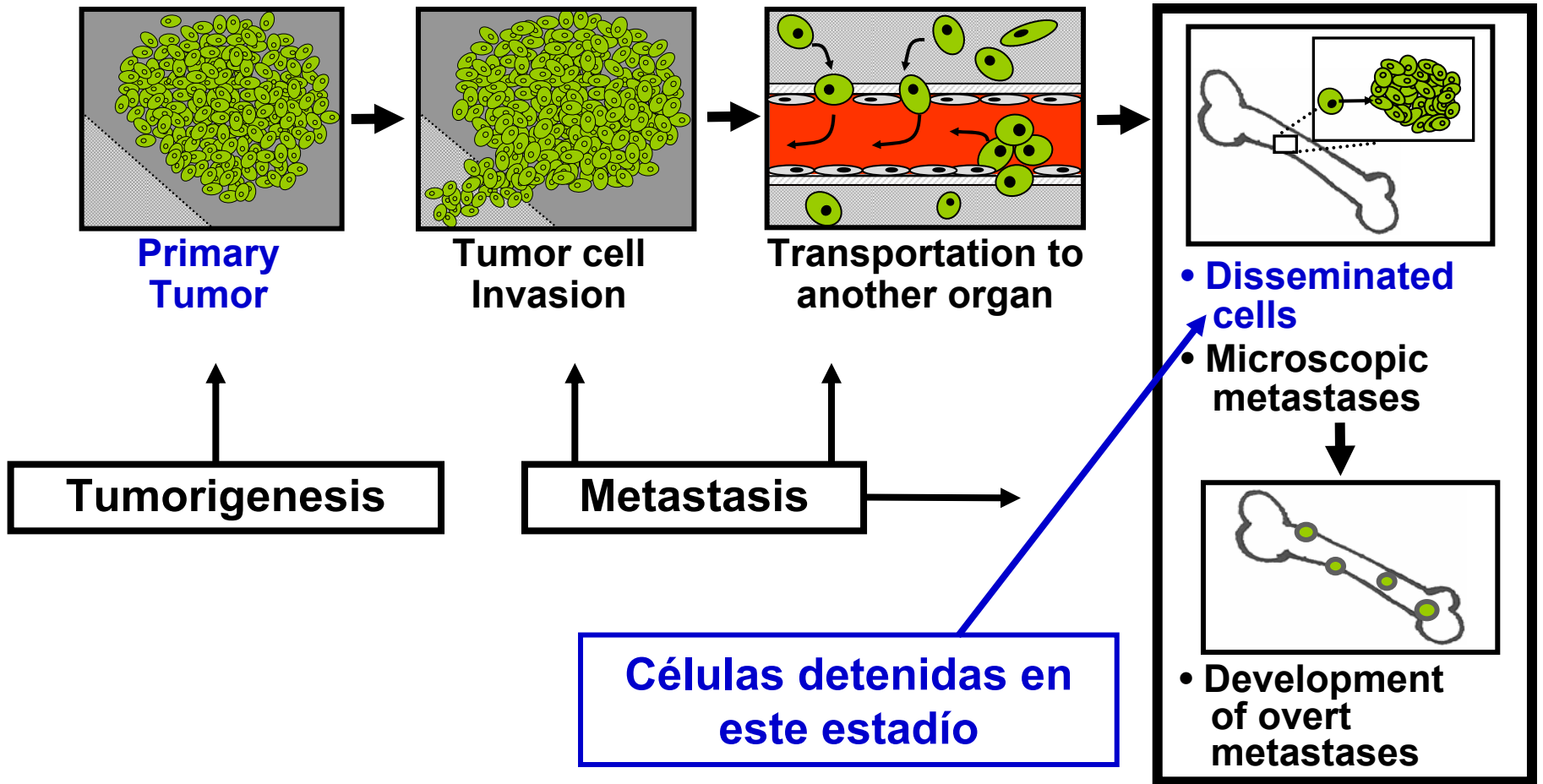
- 63 % de las pacientes con cáncer de mama presentan niveles elevados de MMP-9 circulante, asociado a mal pronóstico (menor sobrevida global).
- Los valores de MMP-9 son de utilidad para el seguimiento de la enfermedad durante y después del tratamiento adyuvante.
- Predicen la recurrencia (recidiva o metástasis) entre 1 y 8 meses previo a la detección clínica. (*INT. J. CANCER.(Predictive Oncology), 89/4: 389-394, 2001. INT. J. CANCER, 2003, 106 (5):745-751*)

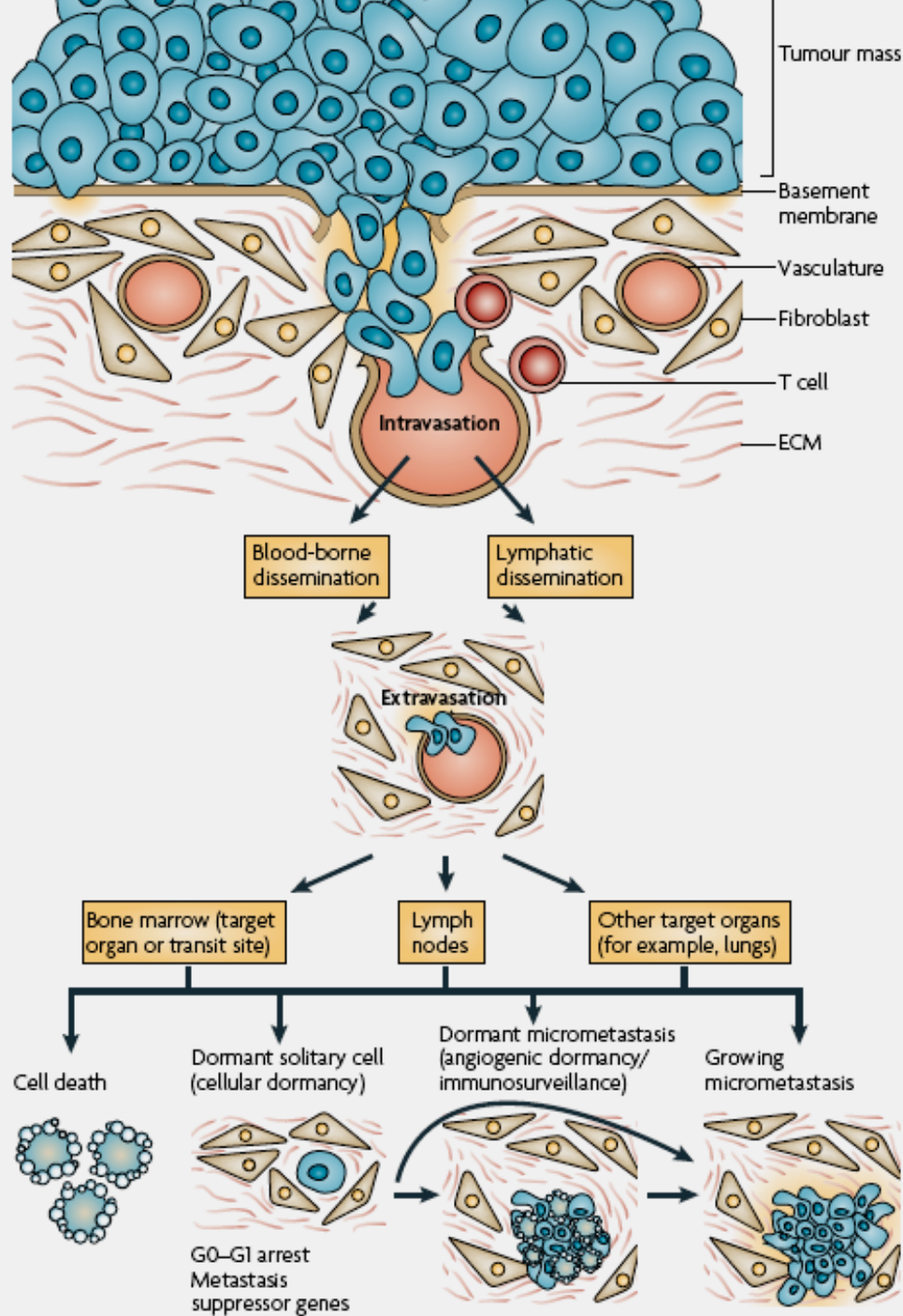


**Heparanase expressed by tumor cells and neutrophils promotes cell invasion between adjacent vascular ECs and through their underlying basal lamina (BL) into the ECM.**



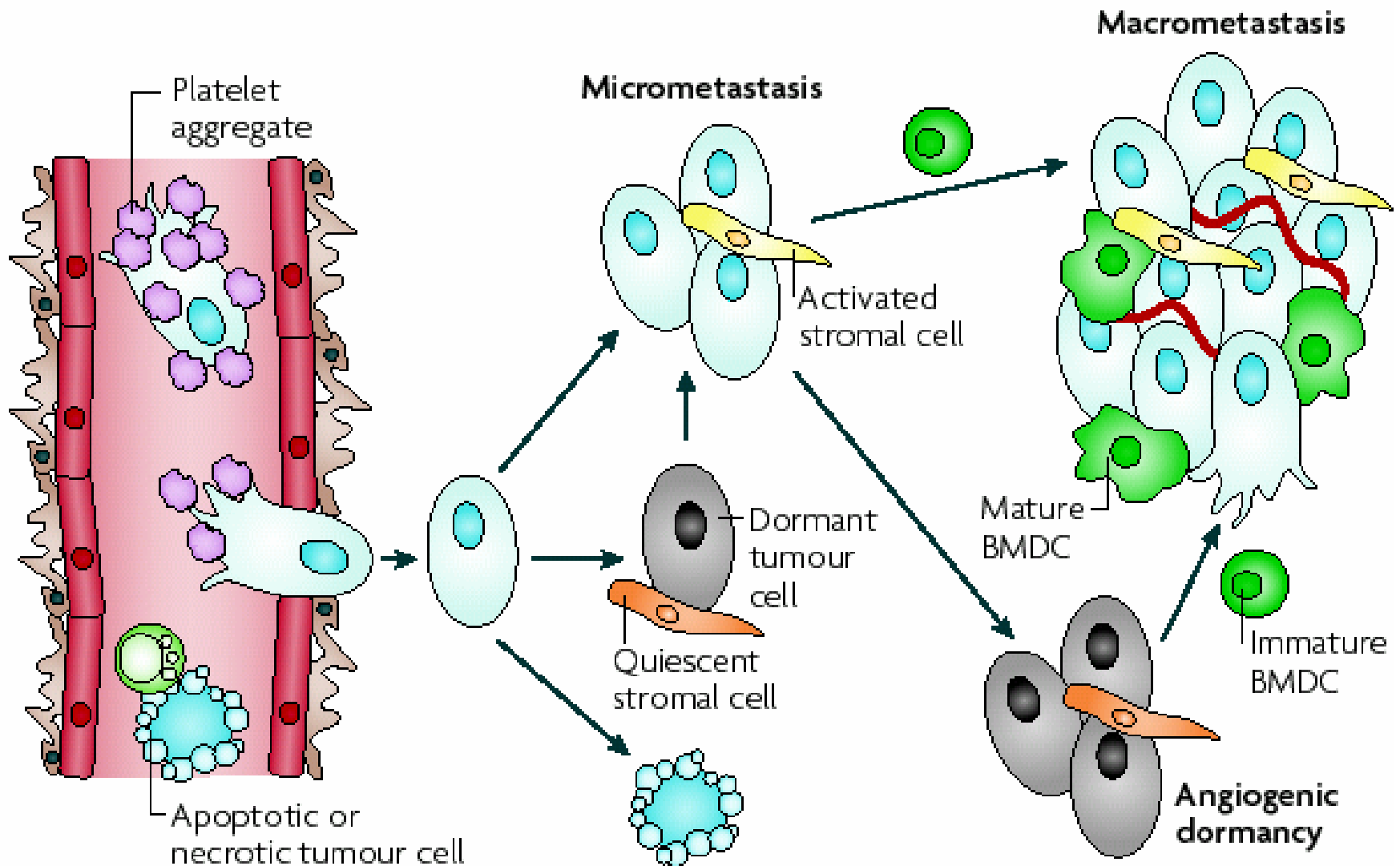
# Diseminación ≠ Metástasis





“TUMOR DORMANCY” es un estadio de la progresión maligna, en la cual hay enfermedad residual, pero es asintomática.

# EL DESTINO DE LAS CÉLULAS DISEMINADAS (DTC) ROL DEL MICROAMBIENTE DEL ÓRGANO BLANCO



**BMDC: bone marrow derived cells**

Joyce & Pollard, Nature Rev Cancer, April 2009

# Células tumorales diseminadas (DTC)

- ❑ Es posible detectar DTC en sangre, nódulos linfáticos y médula ósea, en total ausencia de evidencias clínicas de metástasis.
- ❑ La presencia de DTC en médula ósea tiene un fuerte impacto en el pronóstico y eventual tratamiento en cáncer de mama (4700 casos).
- ❑ La médula ósea sería un sitio de privilegio (reservorio) para el estado de “dormancy” de DTC.
- ❑ El hallazgo de DTC (ADN, mutaciones) en sangre periférica y otros fluidos es aún motivo de estudio y controversia.
- ❑ La detección de DTC tiene importantes implicancias en la biología de la progresión tumoral. DTC podrían ser nuevos marcadores y/o nuevos blancos terapéuticos

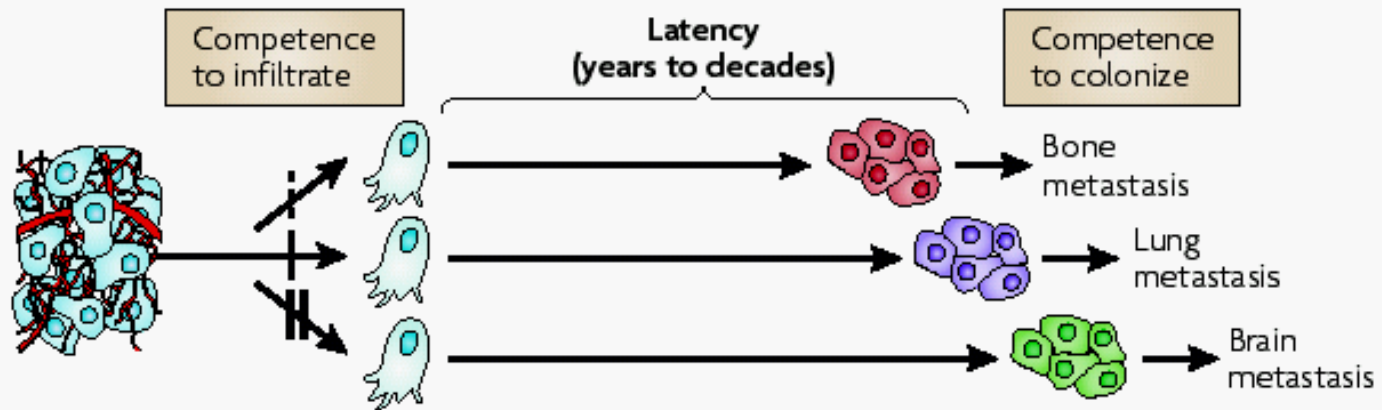
# **Un concepto provocativo...**

**Las células potencialmente metastásicas se separarían muy temprano del tumor primario y quedarían alojadas en médula ósea, u otros sitios, donde tendrían una evolución independiente del tumor primario en sus características genotípicas y fenotípicas.**

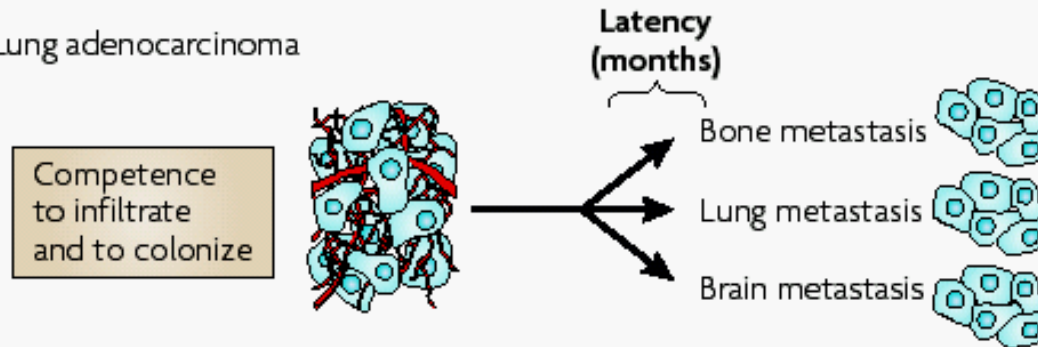
**La formación exitosa de metástasis dependería de interacciones entre la célula tumoral y el medio ambiente del nicho u órgano blanco, siendo la metástasis una enfermedad con regulación ectópica del crecimiento celular.**

# El curso temporal de la metástasis puede variar de acuerdo al tipo tumoral (Nguyen et al, Nature Rev. Cancer, 2009)

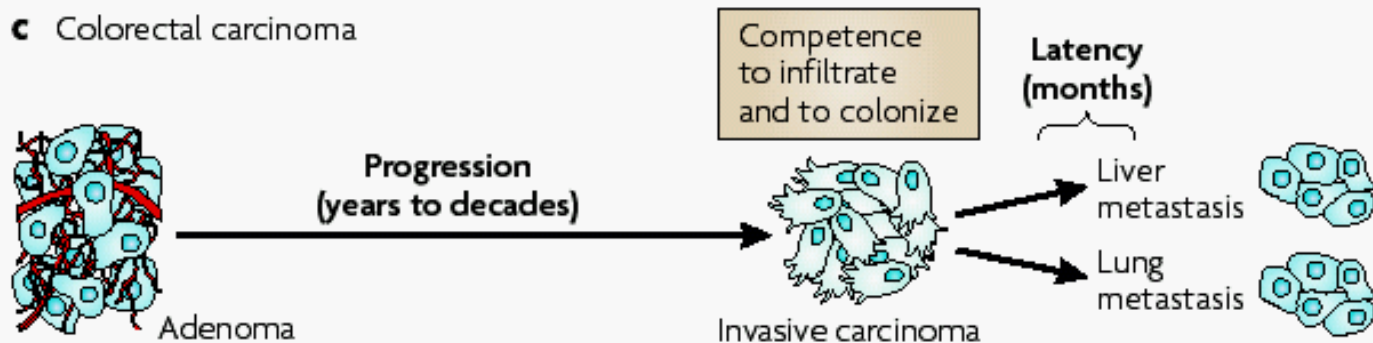
## a Breast carcinoma



## b Lung adenocarcinoma

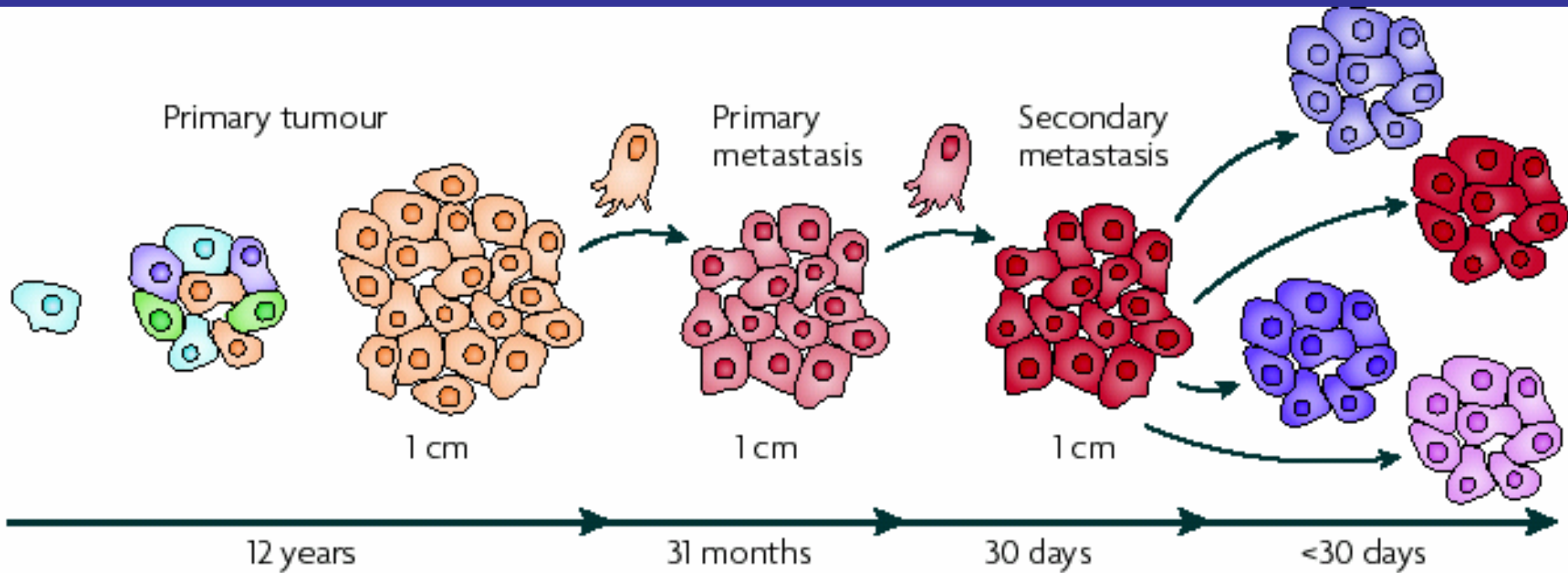


## c Colorectal carcinoma





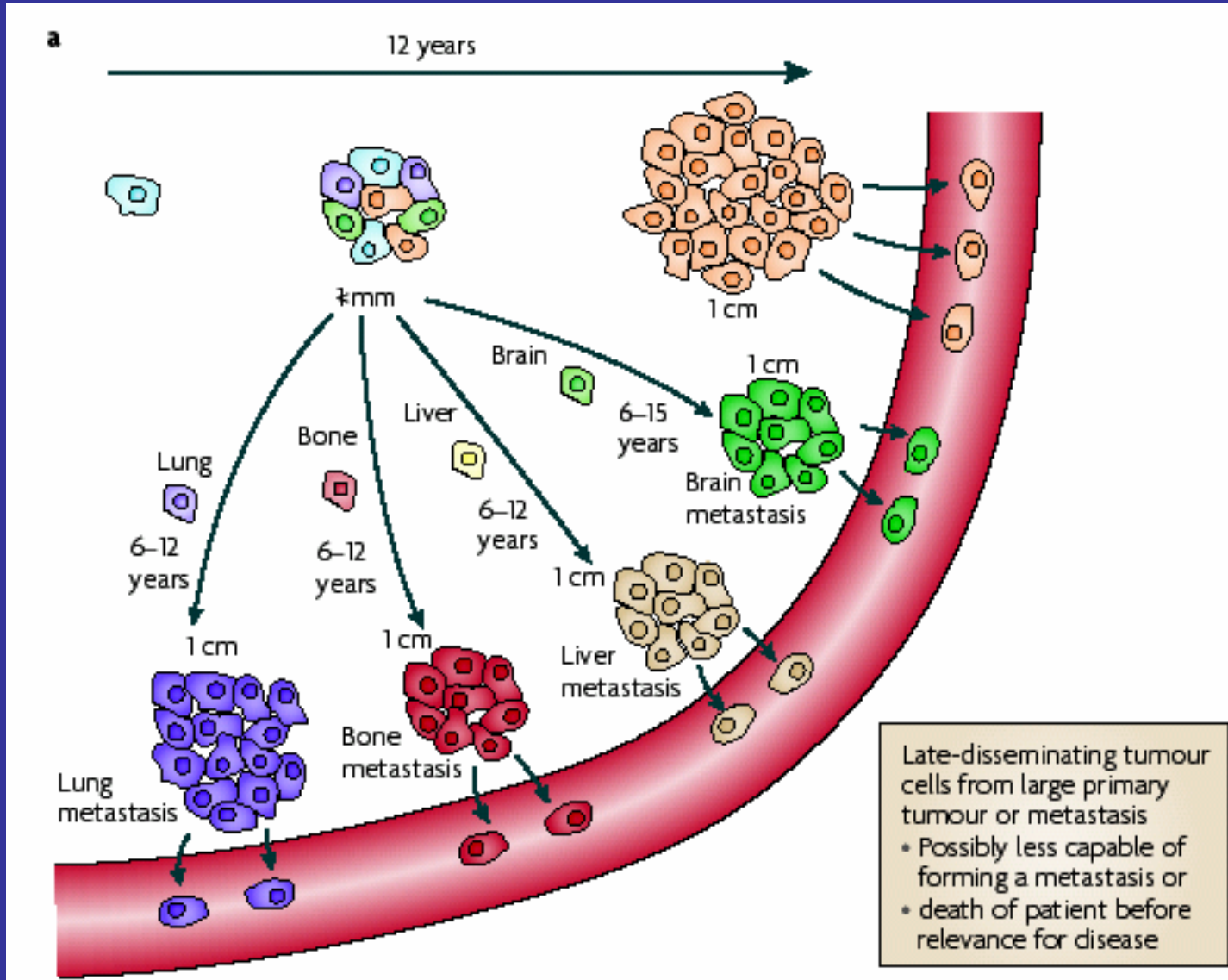
# MODELO DE PROGRESION LINEAR DE TUMORES Y METASTASIS



Las células van incrementando su malignidad localmente en el tumor primario con el tiempo. Incluye el concepto de metástasis de metástasis, cada vez mas malignas, hasta la muerte del paciente

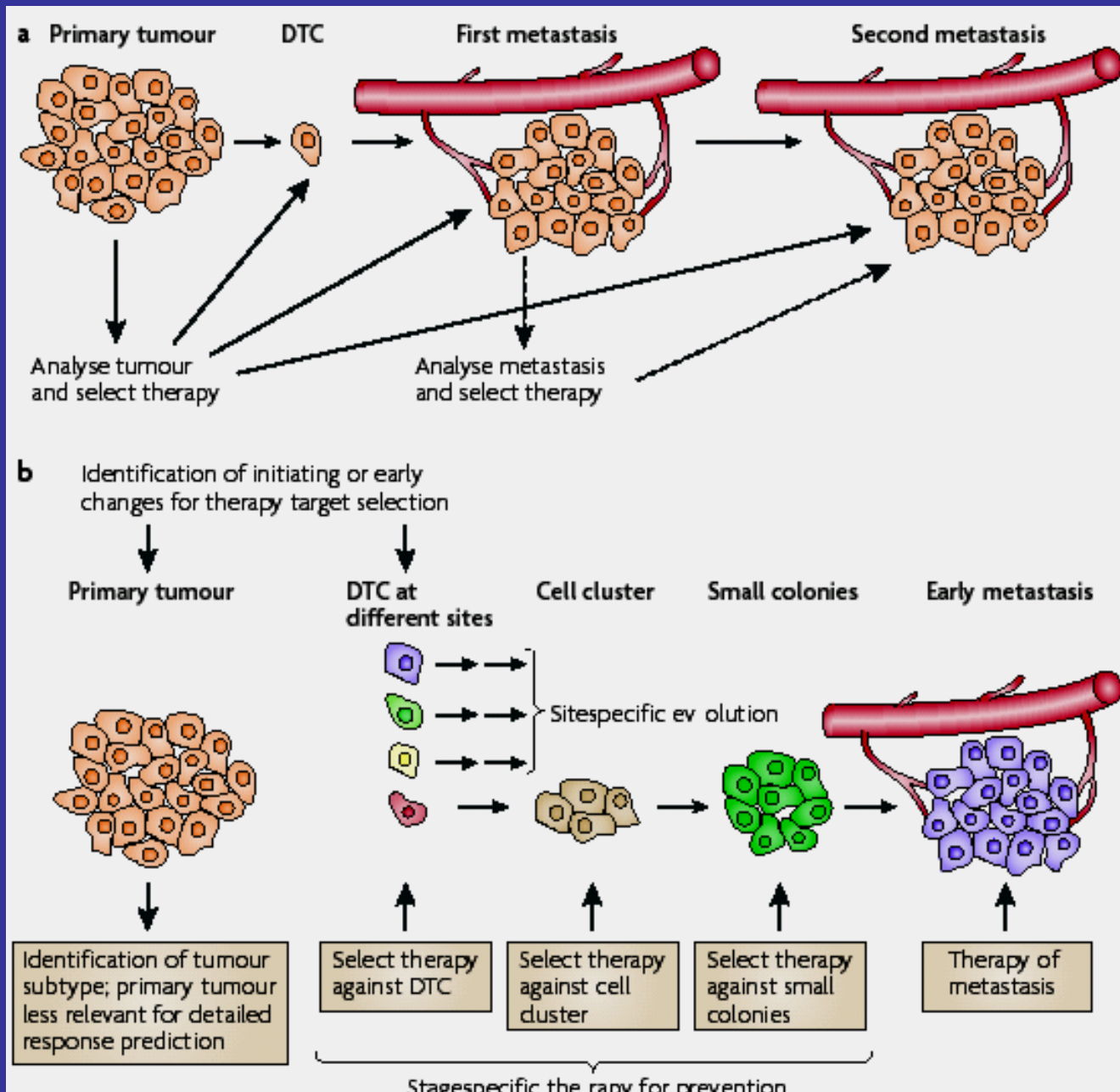
# MODELO DE PROGRESION PARALELA DE TUMORES Y METASTASIS

*Klein C, Nature Rev Cancer, April 20*



Según este modelo pueden ocurrir varios ciclos de diseminación antes del diagnóstico clínico, y cada DTC tener una evolución diferente en forma paralela

# Consecuencias de la evolución lineal (a) o paralela (b) de la diseminación metastásica para las decisiones terapéuticas *Klein C, Nature Rev Cancer, April 2009*



# NUEVOS CONCEPTOS PROVOCADORES

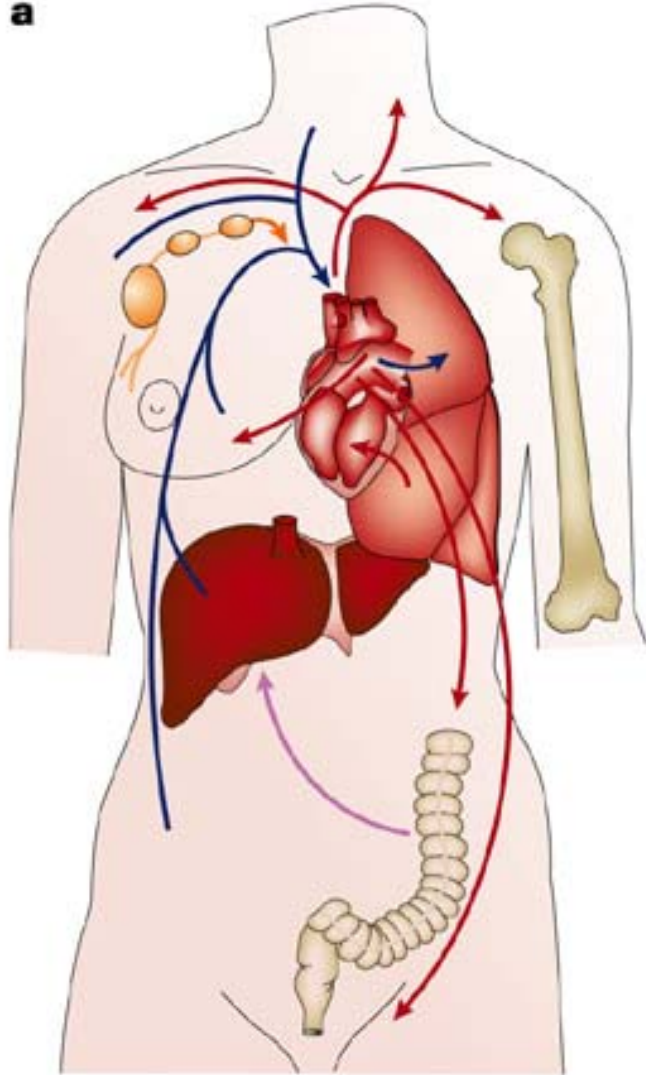
Las metástasis se podrían desarrollar a partir de células normales que migraron y sobrevivieron en diferentes órganos distantes

## Seeding and Propagation of Untransformed Mouse Mammary Cells in the Lung

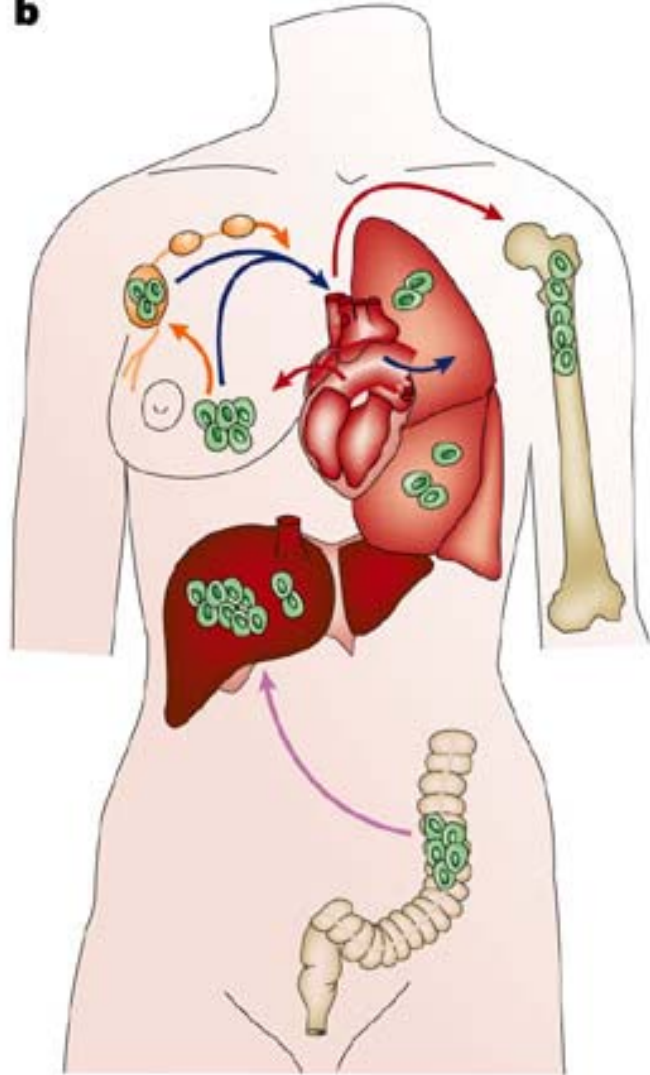
Katrina Podsypanina,\* Yi-Chieh Nancy Du, Martin Jechlinger, Levi J. Beverly, Dolores Hambardzumyan, Harold Varnus

The acquisition of metastatic ability by tumor cells is considered a late event in the evolution of malignant tumors. We report that untransformed mouse mammary cells that have been engineered to express the inducible oncogenic transgenes *MYC* and *Kras*<sup>D12</sup>, or polyoma middle T, and introduced into the systemic circulation of a mouse can bypass transformation at the primary site and develop into metastatic pulmonary lesions upon immediate or delayed oncogene induction. Therefore, previously untransformed mammary cells may establish residence in the lung once they have entered the bloodstream and may assume malignant growth upon oncogene activation. Mammary cells lacking oncogenic transgenes displayed a similar capacity for long-term residence in the lungs but did not form ectopic tumors.

**a**



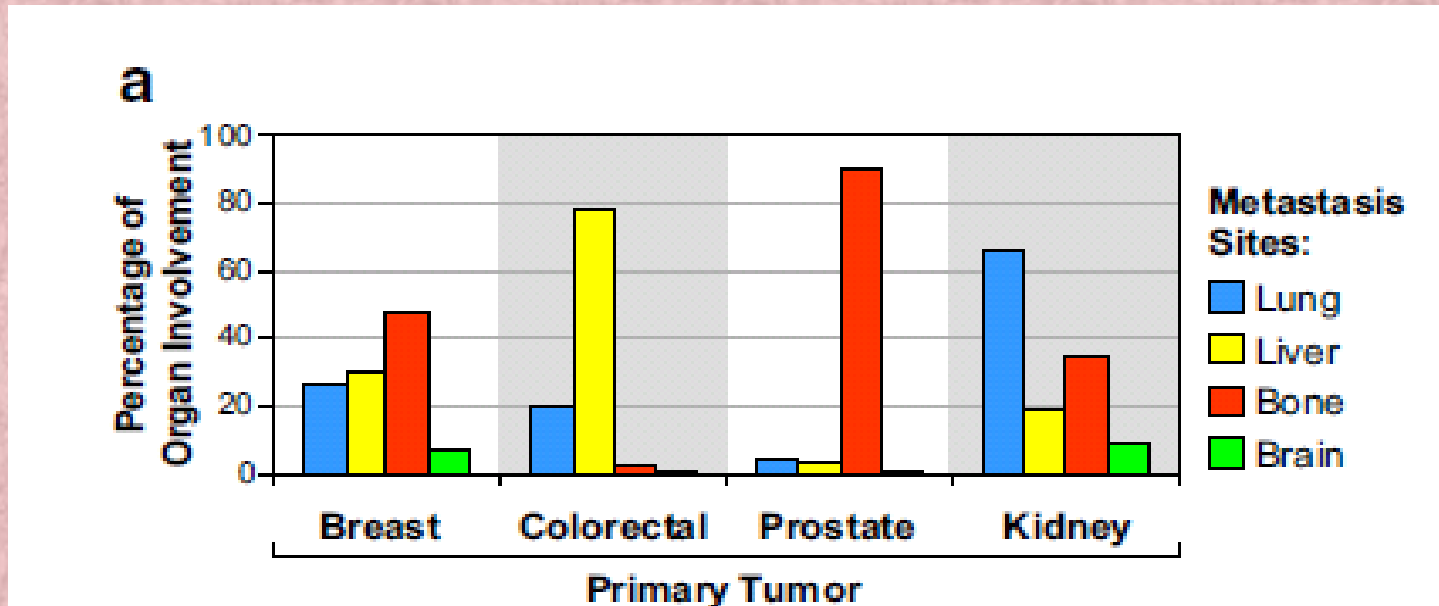
**b**



**Vías de la diseminación metastásica**

# La metástasis es específica de órgano

- Hace mucho tiempo se ha observado que determinados tumores “prefieren” diseminarse hacia algunos órganos específicos
- Algunos tejidos nunca son metastatizados.



# TEORIAS

- **Diseminación mecánica: papel de los sistemas circulatorio y linfático.**
- **Teoría de Paget: suelo y semilla.**
- **Integración de ambas teorías**

# James Ewing - 1920

## Teoría Anátomo-Mecánica (*Neoplastic diseases. A treatise on Tumours*)

Los patrones de diseminación metastática pueden simplemente ser explicados por los lechos vasculares con los que las células tumorales se encuentran en la circulación.

### EVIDENCIAS A FAVOR DE EWING

- El carcinoma de colon metastatiza en hígado, explicado por el sistema Porta
- El carcinoma de mama metastatiza en pulmón, primer lecho vascular



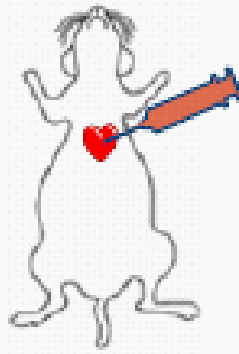
**a**

**Method of Inoculation**

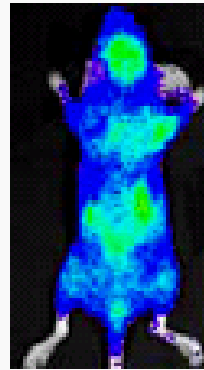
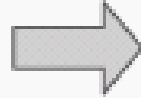
**Early Distribution**

**Metastasis**

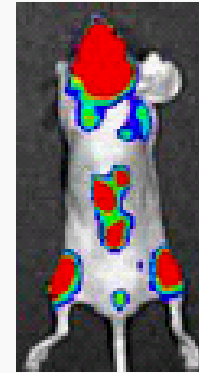
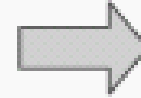
**Intracardiac**



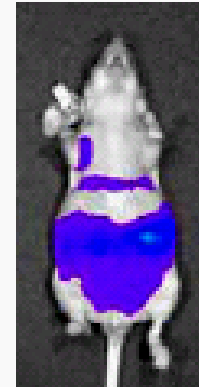
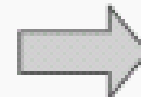
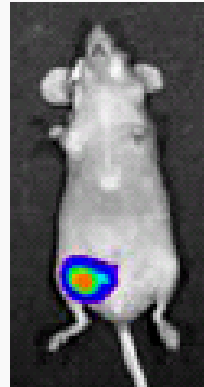
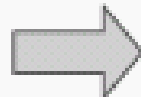
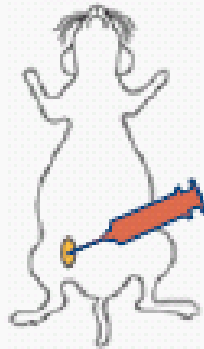
**1 min**



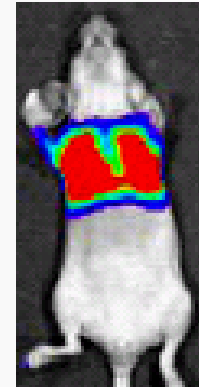
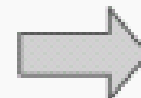
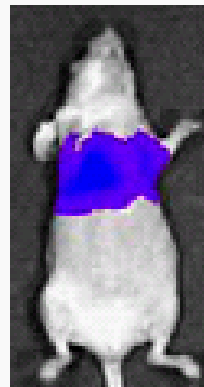
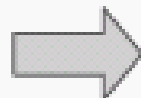
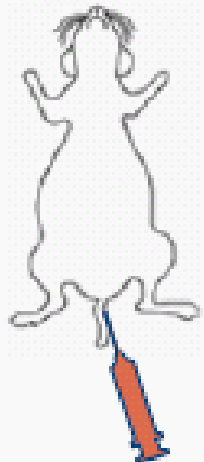
**1-3 months**



**Mammary Gland**



**Tail Vein**



**Distribución metastásica y vía de inoculación**

**Células MDA-MB-231**

# Stephen Paget - 1889

Estudió las autopsias de más de 1000 mujeres que habían muerto de cáncer de mama. *The distribution of secondary growths in cancer of the breast. (Lancet 1889; 1: 571–73)*

## Evidencias a favor de Paget

- A pesar de no existir ningún circuito “corto”, los tumores de pulmón dan metástasis en cerebro.
- A pesar de que toda la sangre pasa a través del corazón y el riñón, muy pocas veces se ven metástasis en esos órganos.

## Hipótesis Seed & Soil

La “**semilla**” (células tumoral) sólo crecerá si es arrastrada por el “**viento**” (circulación) hacia un “**suelo hospitalario**” (factores presentes en el microambiente del órgano).

# Isaiah J. Fidler – 1980

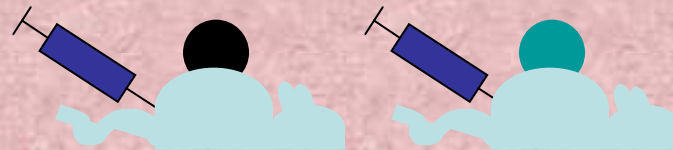
## Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma

*Cancer Research 40: 2281-2287*

Implante s.c.

Pulmón

Riñón



Inoculación i.v. de células de melanoma B16-F10 radioactivas

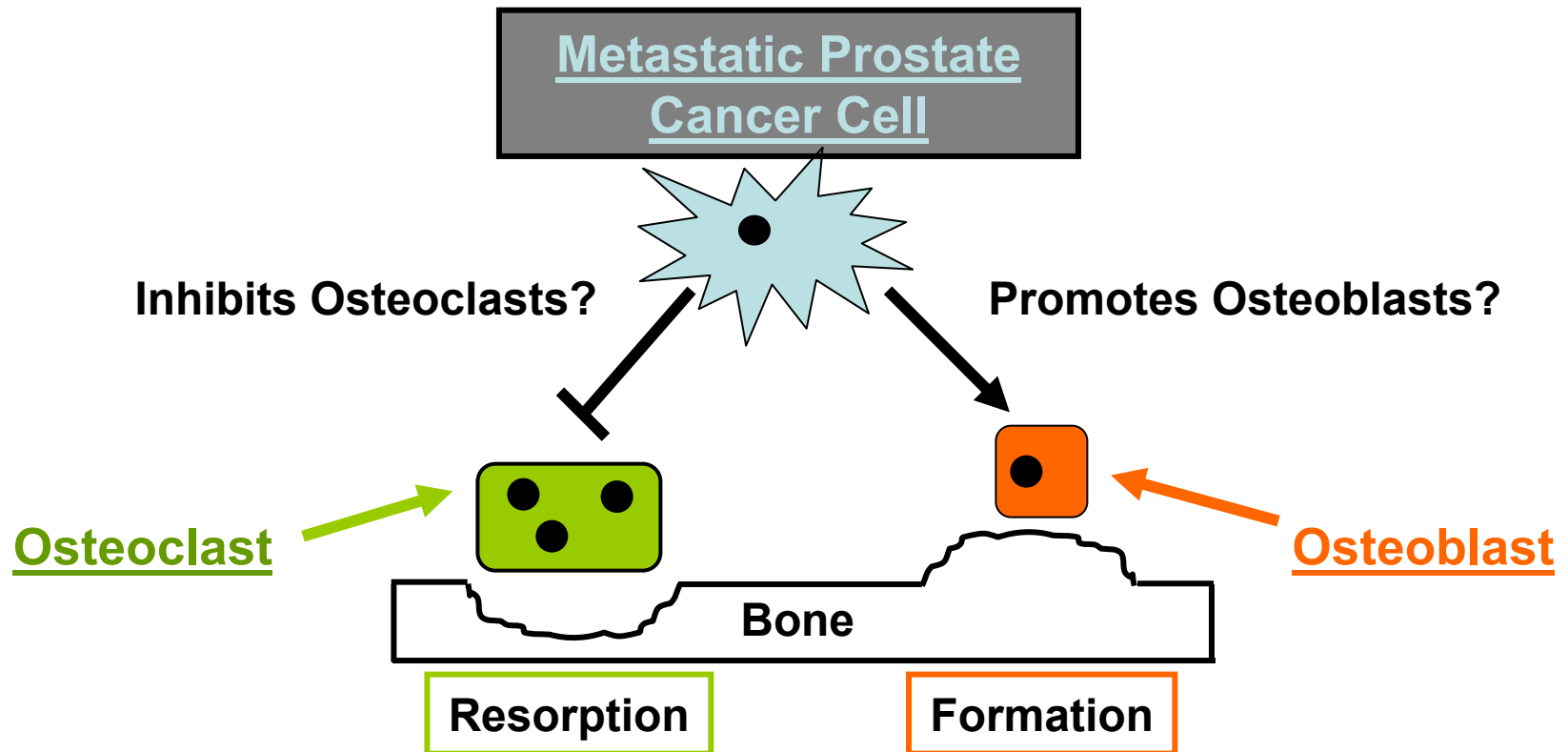
Radioactividad en Pulmón	Si	Si
Mts en Pulmón	Si	Si
Radioactividad en Implante	Si	Si
Mts en Implante	Si	No

# Metastasis Óseas de Cancer de Próstata

- ~ 65% de las metástasis prostáticas inducen la formación anormal de hueso (**osteoblásticas**).
- ~ 12% de las metástasis prostáticas destruyen el hueso (**osteolíticas**).
- ~ 23% presentan una apariencia mixta osteoblástica/osteolítica, sin cambios significativos en la masa ósea.

# Metastasis Oseas Osteoblásticas

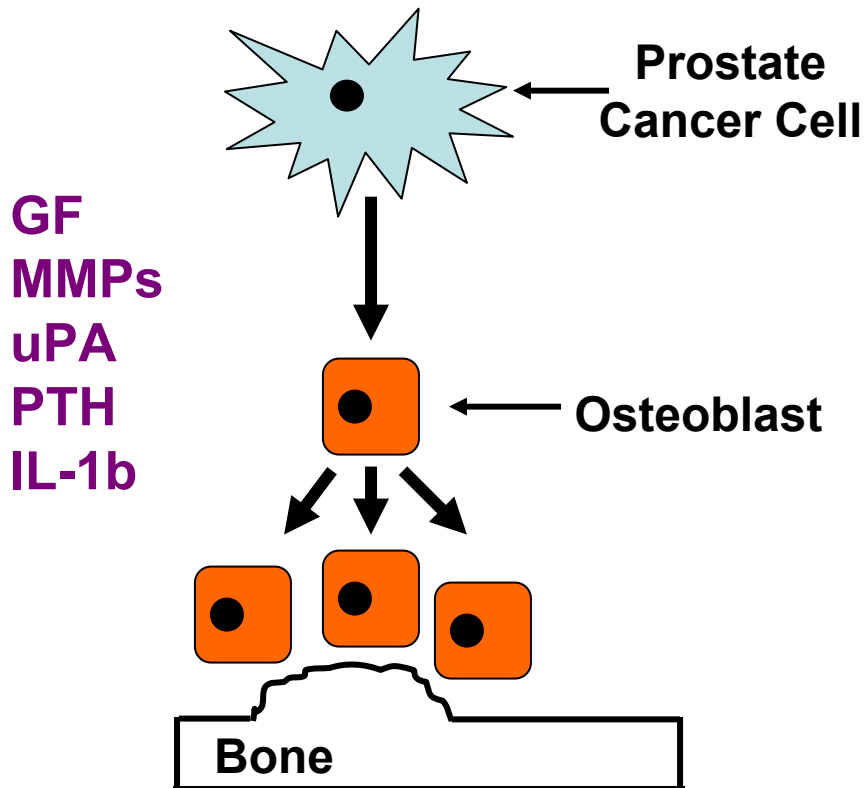
Las célula metastásicas de cáncer de próstata interactúan con el microambiente óseo y lo modifican



# Prostate Cancer Cell and Osteoblast Interaction

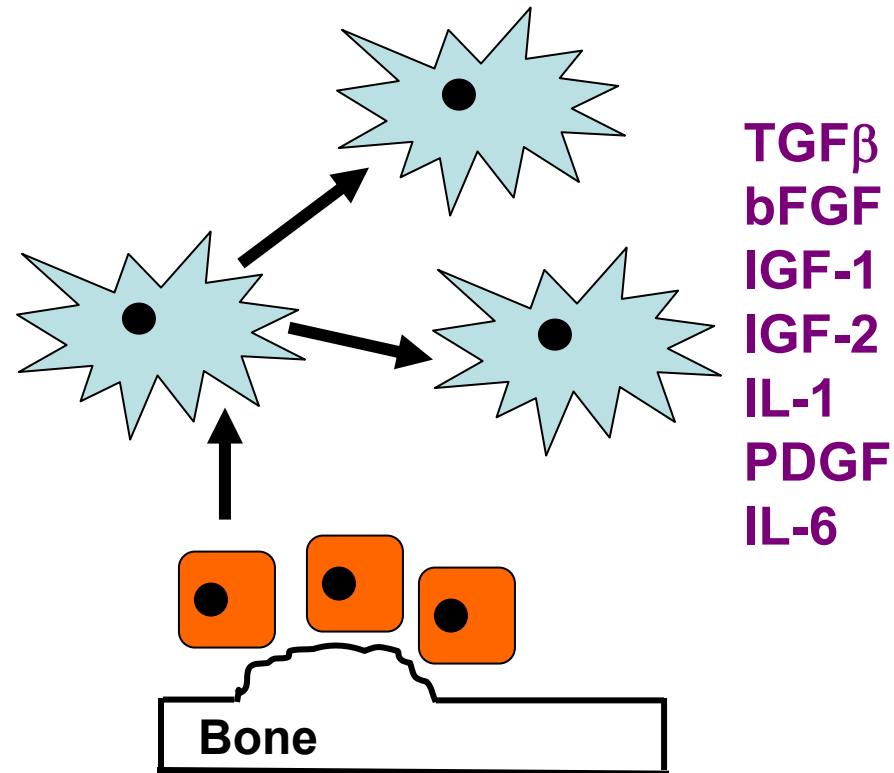
## Step 1

Prostate Cancer Cell Secretes Factors that Promote Osteoblast Formation

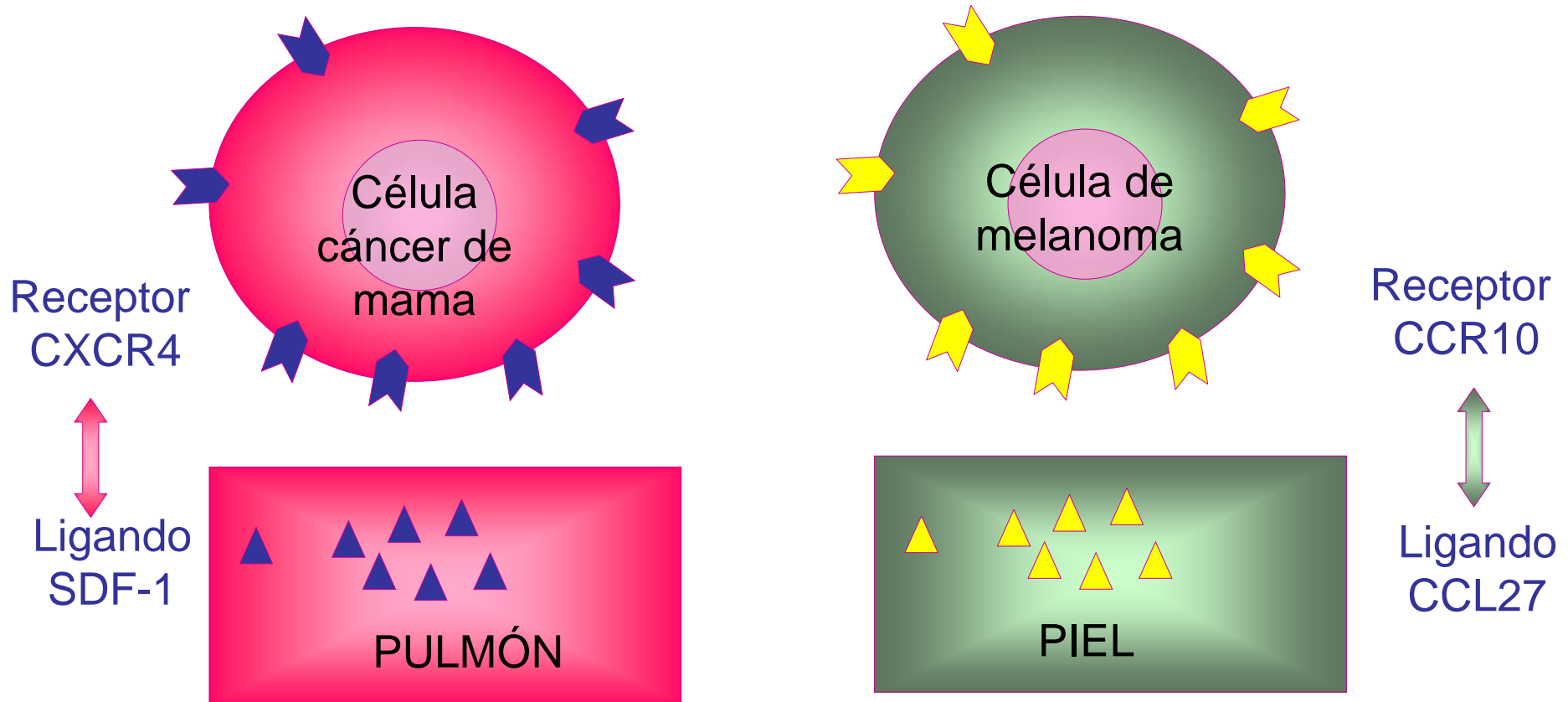


## Step 2

Osteoblasts Secrete Growth Factors that Stimulate Prostate Cancer Cell Proliferation



# Las quimoquinas y sus receptores contribuyen a determinar el patrón metastásico

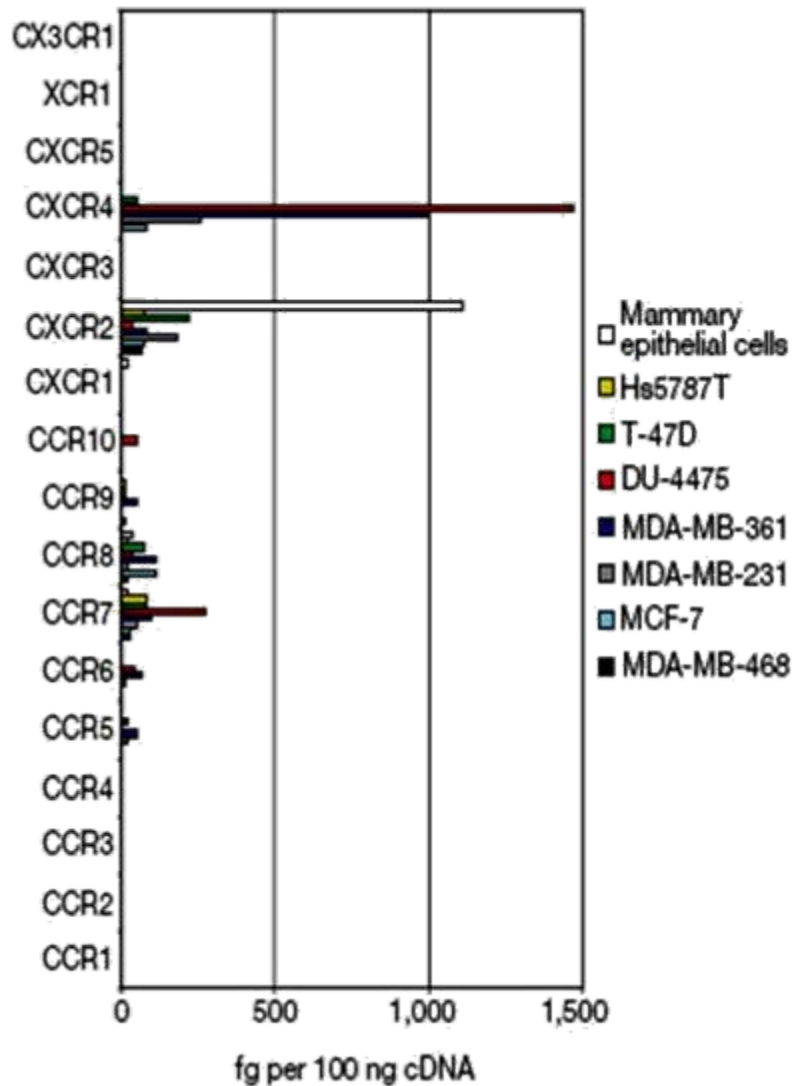


La metástasis específica, en parte, podría explicarse porque las células tumorales expresan receptores que reconocen ligandos que se encuentran con mayor frecuencia en el órgano blanco de la metástasis.

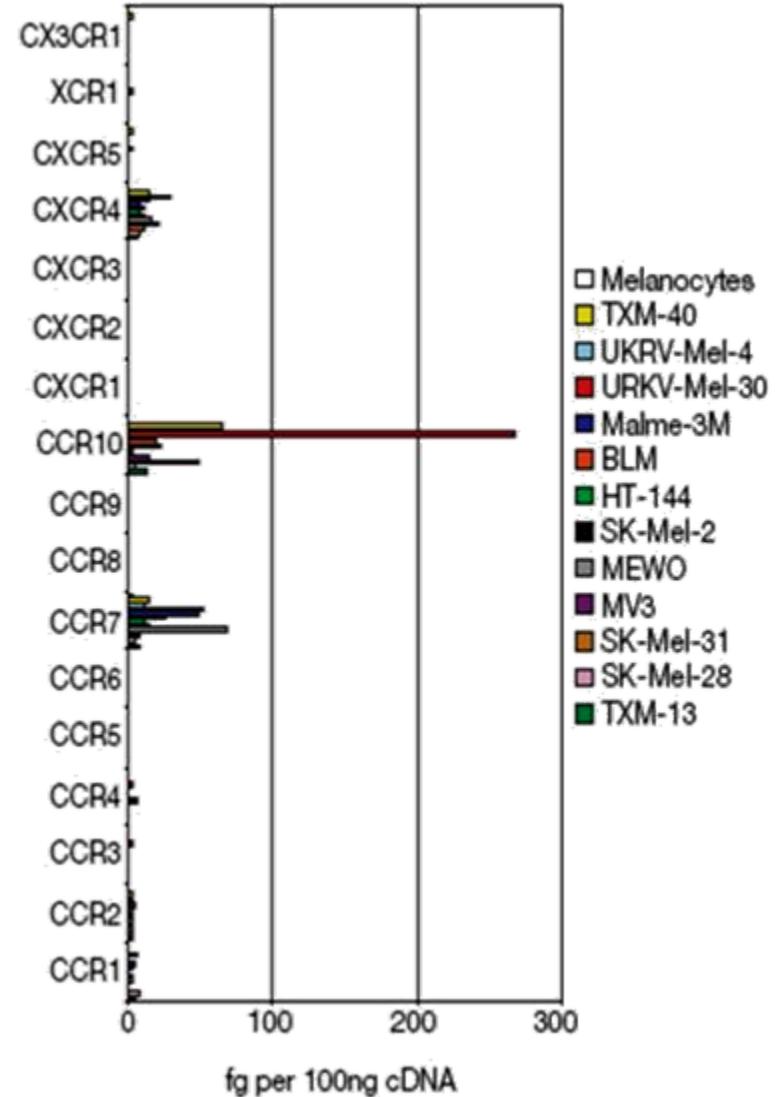
Los sistemas quimoquina-receptor modulan adhesión, migración, proliferación y supervivencia, activando diferentes vías como MAPK, PI3K, etc.

# Receptores de quimoquinas en tumores

## Mama

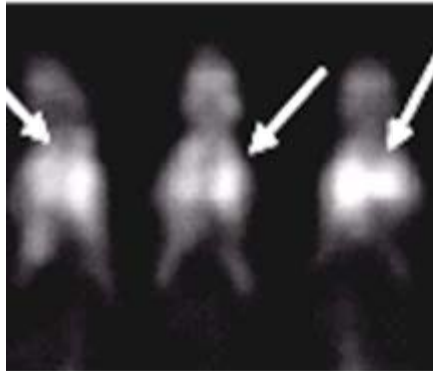


## Melanoma

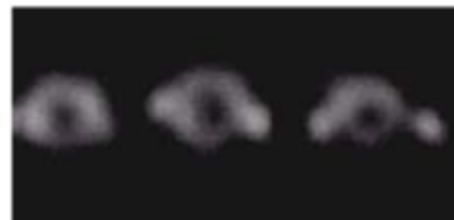
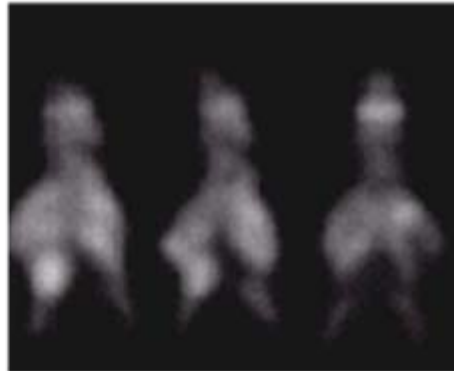




**Control**



**siRNA**



**La inhibición de la expresión de CXCR4 mediante siRNA disminuye las metástasis pulmonares (ver figura).**

**Otros ensayos preclínicos emplean anticuerpos, o pequeñas moléculas, o péptidos inhibitorios vs los receptores de quimoquinas.**

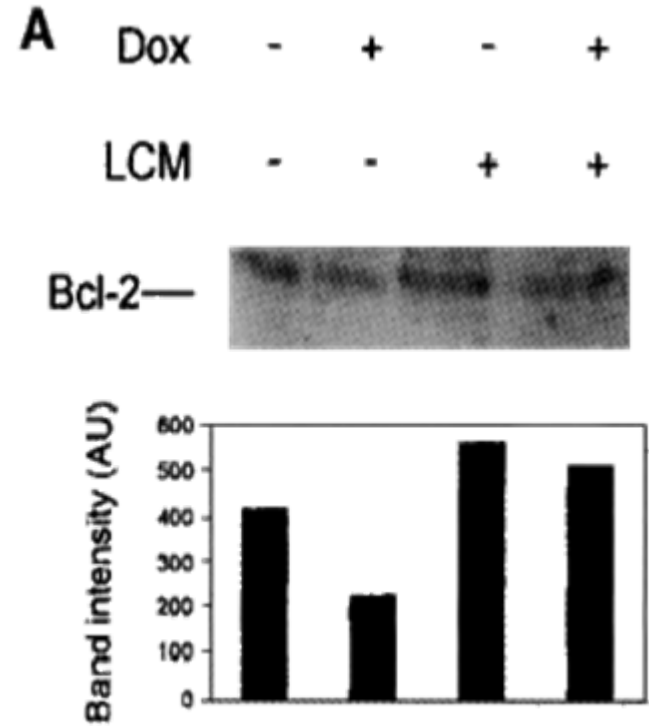
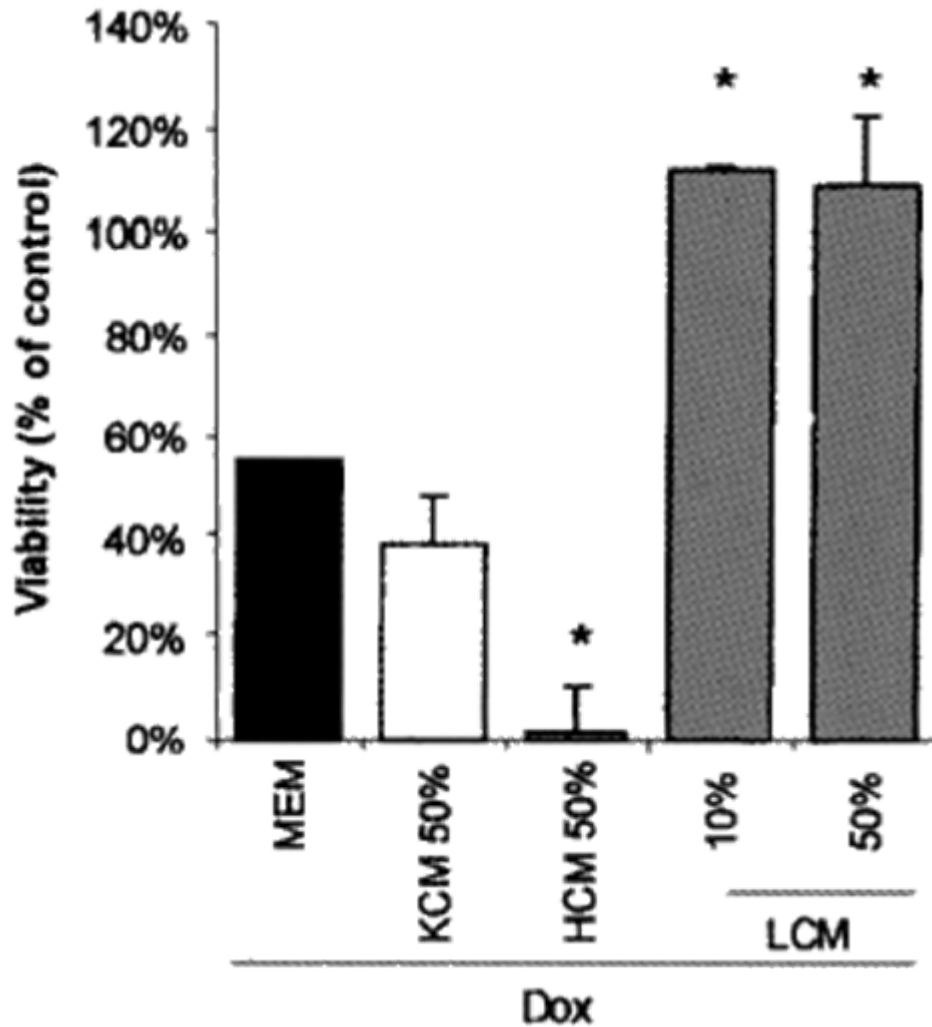
**Estos compuestos generalmente no presentan toxicidad alguna**

# **NUESTROS RESULTADOS**

**Factores solubles de pulmón (PN/LCM) aumentan la angiogénesis, el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica de células tumorales mamarias murinas M3 in vivo, así como también la secreción de enzimas proteolíticas, la proliferación y la migración de las mismas células in vitro**

***(CLINICAL AND EXPERIMENTAL METASTASIS 1991, 9/1:51-56.;  
TUMOR BIOLOGY 199415/5: 284-293, ONCOLOGY REPORTS,  
1999 6(4): 907-911)***

# Mayor sobrevivida



# **LOS NICHOS PRE-METASTÁSICOS**

**UN NUEVO PARADIGMA PARA EXPLICAR LOS  
MECANISMOS CELULARES Y  
MOLECULARES QUE DETERMINAN LA  
LOCALIZACIÓN METASTÁSICA ESPECÍFICA  
DE LOS TUMORES**

*Cancer Cell 2: 289, 2002.*

*Nature 8:1369, 2006*

*Cancer Cell 15:35, 2009*

*Nature Rev Cancer, April 2009.*

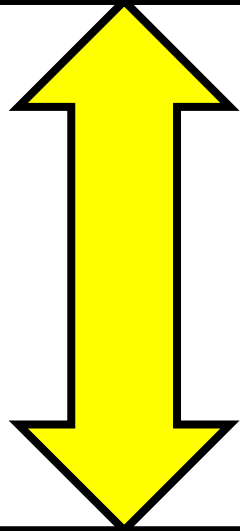
## ARTICLES

---

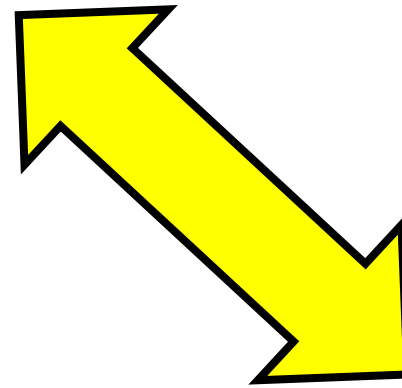
# VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche

Rosandra N. Kaplan<sup>1,2,6\*</sup>, Rebecca D. Riba<sup>1,2\*</sup>, Stergios Zacharoulis<sup>1,2,6\*</sup>, Anna H. Bramley<sup>1,2</sup>, Loïc Vincent<sup>4</sup>, Carla Costa<sup>1,2</sup>, Daniel D. MacDonald<sup>1,2</sup>, David K. Jin<sup>4</sup>, Koji Shido<sup>4</sup>, Scott A. Kerns<sup>1,2</sup>, Zhenping Zhu<sup>8</sup>, Daniel Hicklin<sup>8</sup>, Yan Wu<sup>8</sup>, Jeffrey L. Port<sup>5</sup>, Nasser Altorki<sup>5</sup>, Elisa R. Port<sup>7</sup>, Davide Ruggero<sup>9</sup>, Sergey V. Shmelkov<sup>1,2,4</sup>, Kristian K. Jensen<sup>1,2</sup>, Shahin Rafii<sup>3,4</sup> & David Lyden<sup>1,2,6</sup>

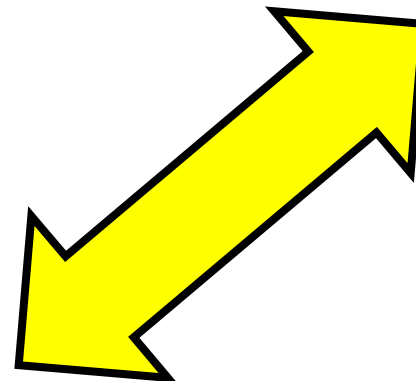
CÉLULA  
TUMORAL



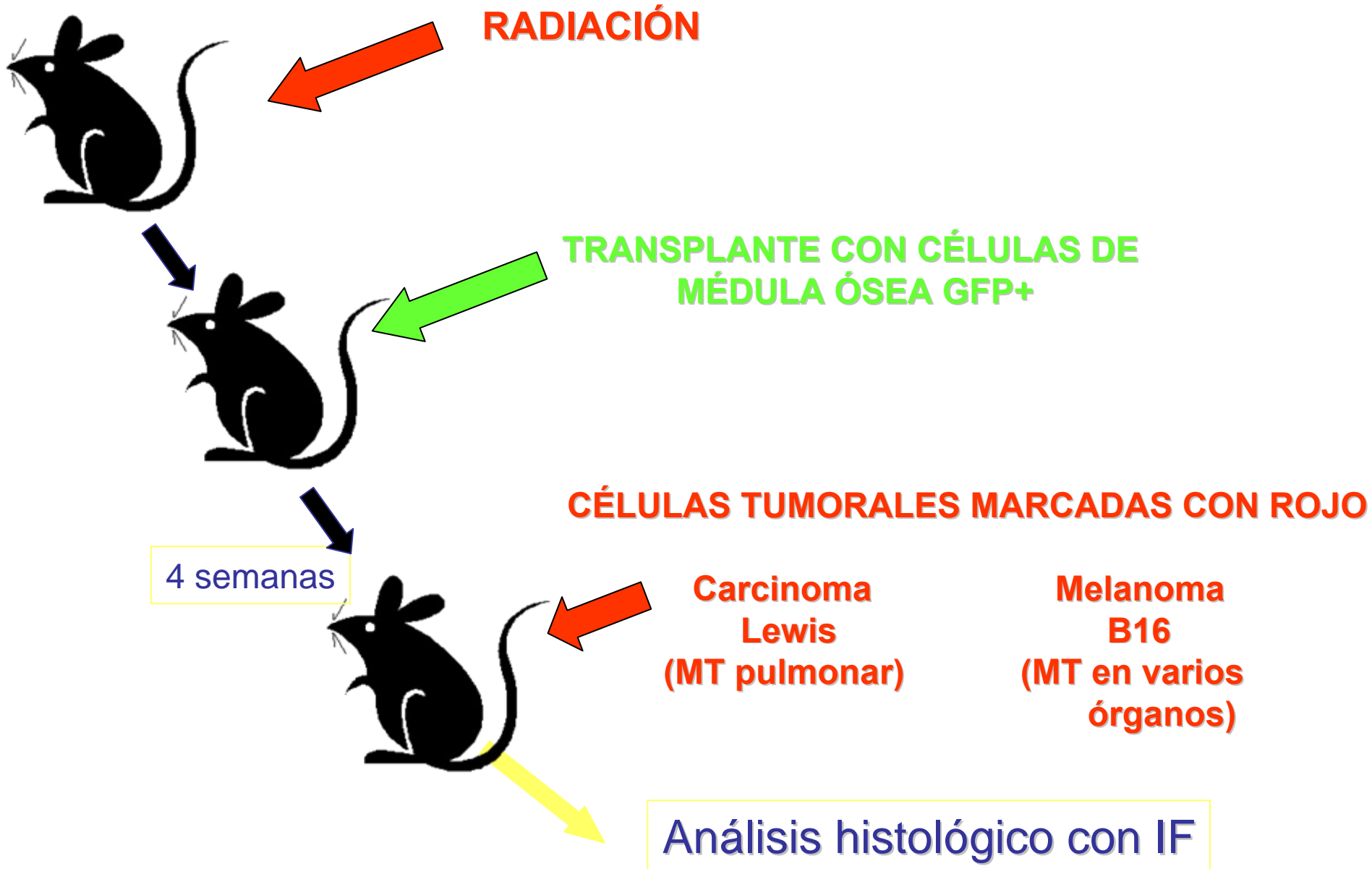
MÉDULA ÓSEA



MICROAMBIENTE  
DEL ÓRGANO BLANCO



# Modelo experimental



días post inóculo cél tumorales

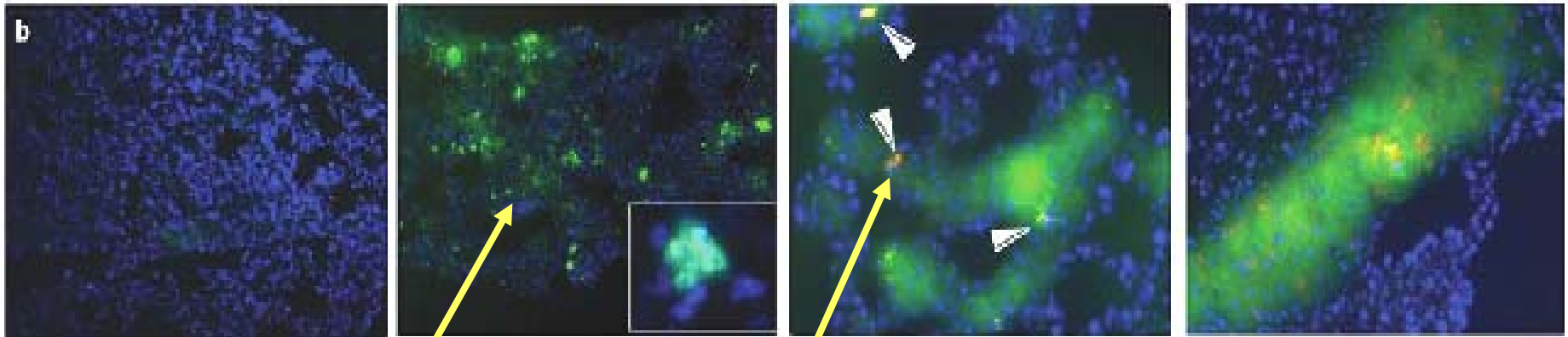
# CORTES HISTOLÓGICOS DE PULMÓN

3d

14 d

18 d

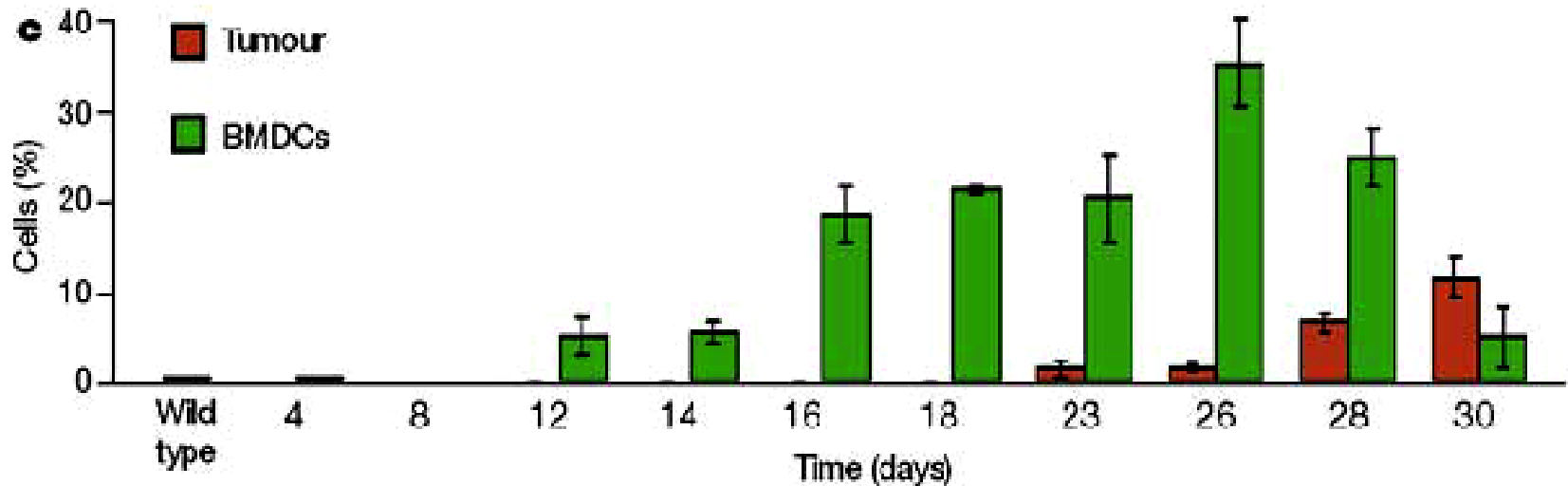
21 d



Cél de MO Verdes

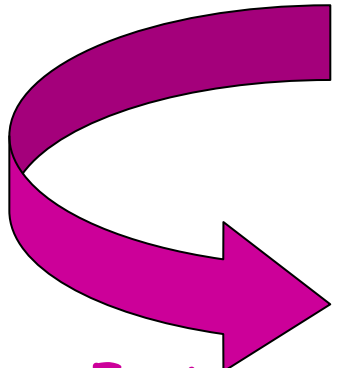
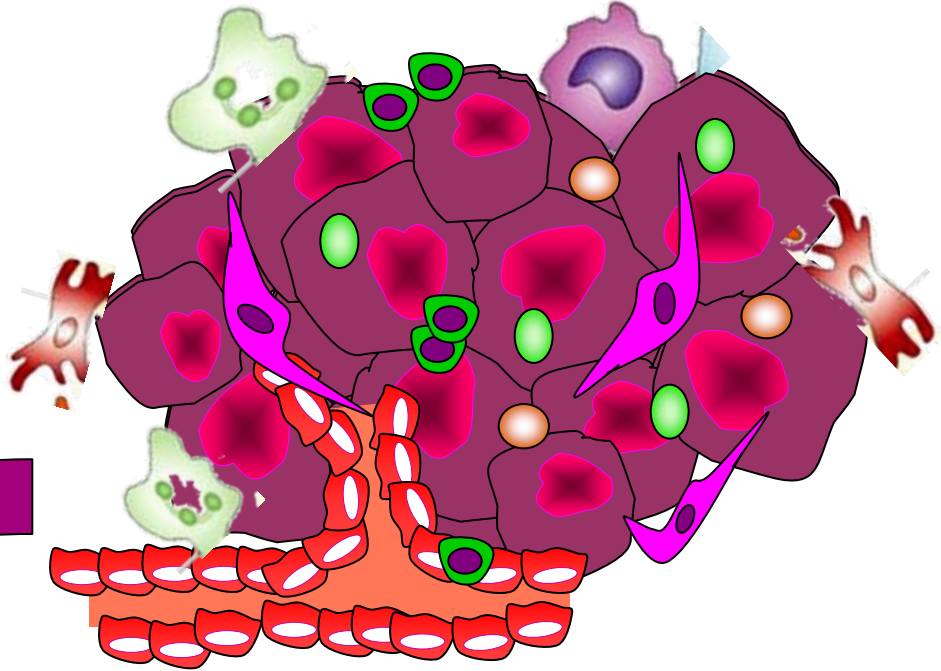
Cél Tumorales Rojas

## Citometría de flujo de células provenientes del pulmón

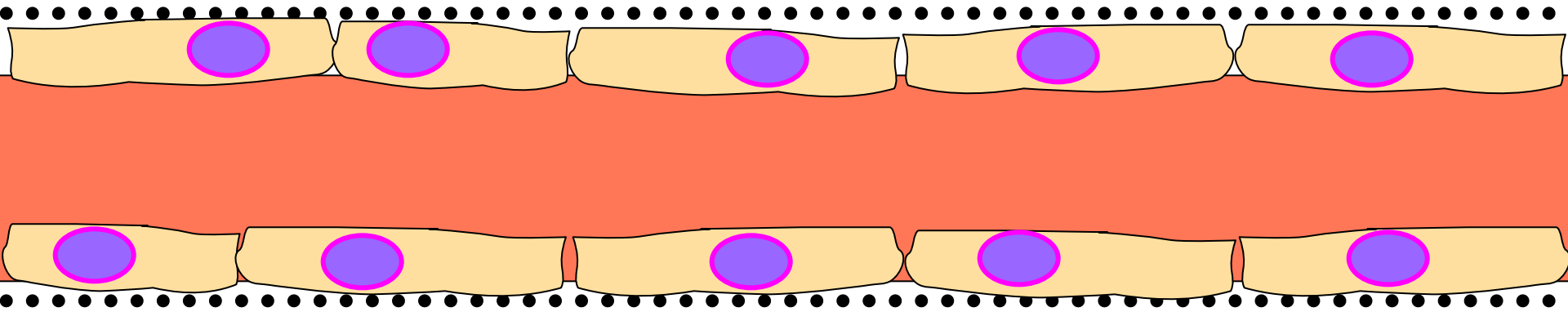


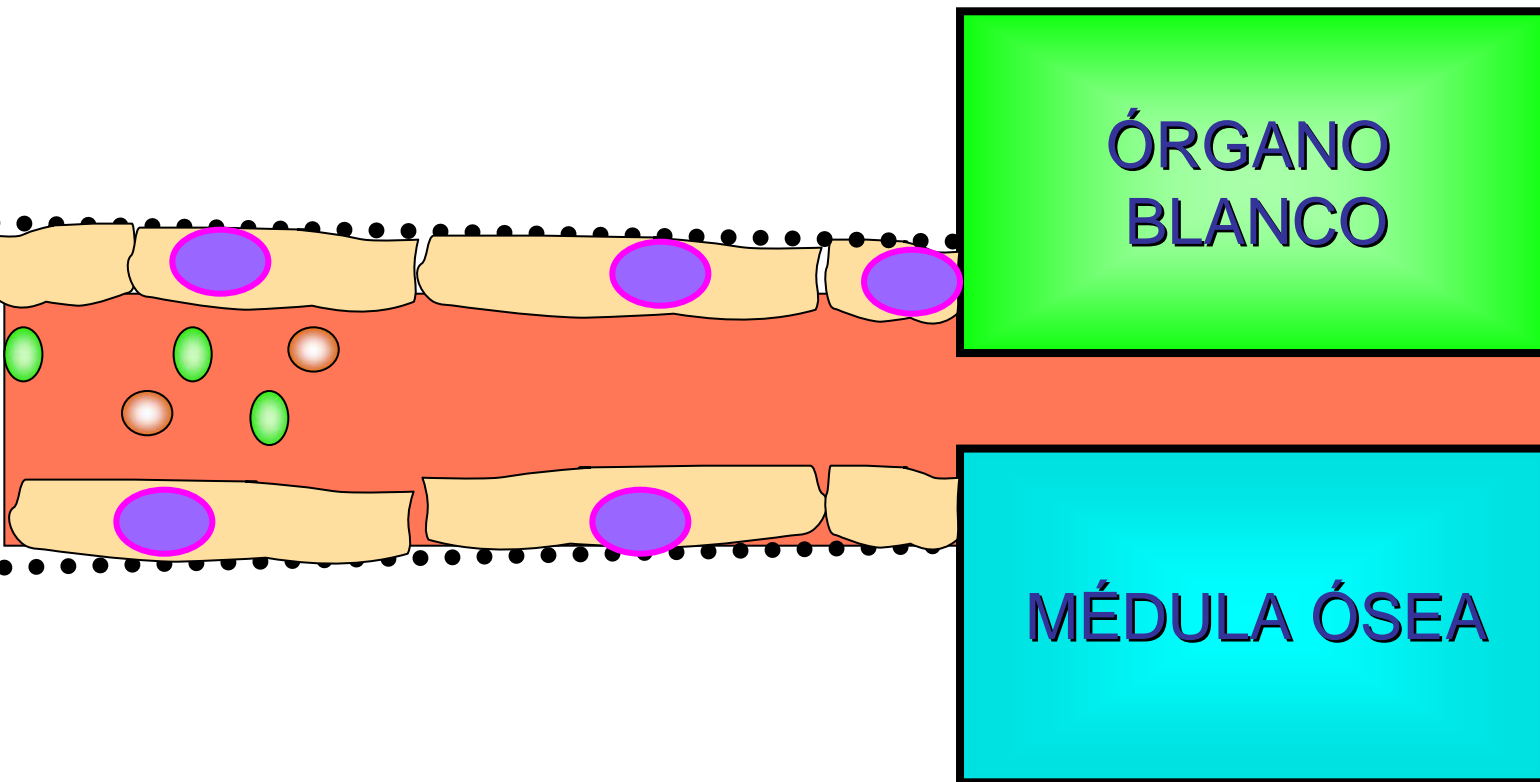


TUMOR PRIMARIO



Factores liberados  
por el tumor





**FACTORES SOLUBLES** específicos de tipo tumoral:

- VEGF
- PIGF (ligando de VEGFR1)
- TNFalfa
- TGFbeta

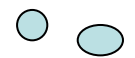
# ÓRGANO BLANCO



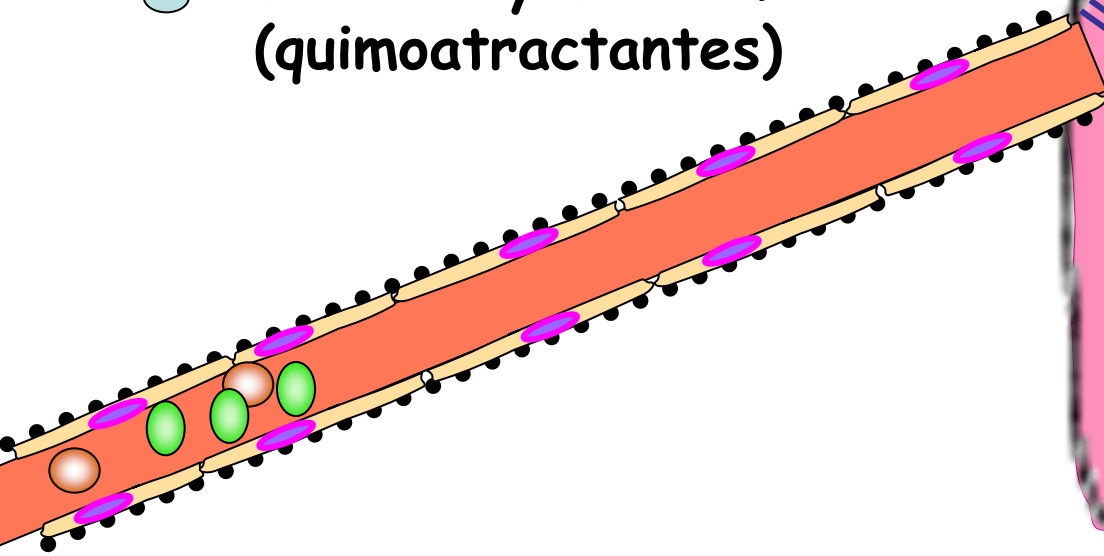
"Fibroblastos" del órgano blanco



Matriz rica en FN



S100A8 y S100A9  
(quimoattractantes)

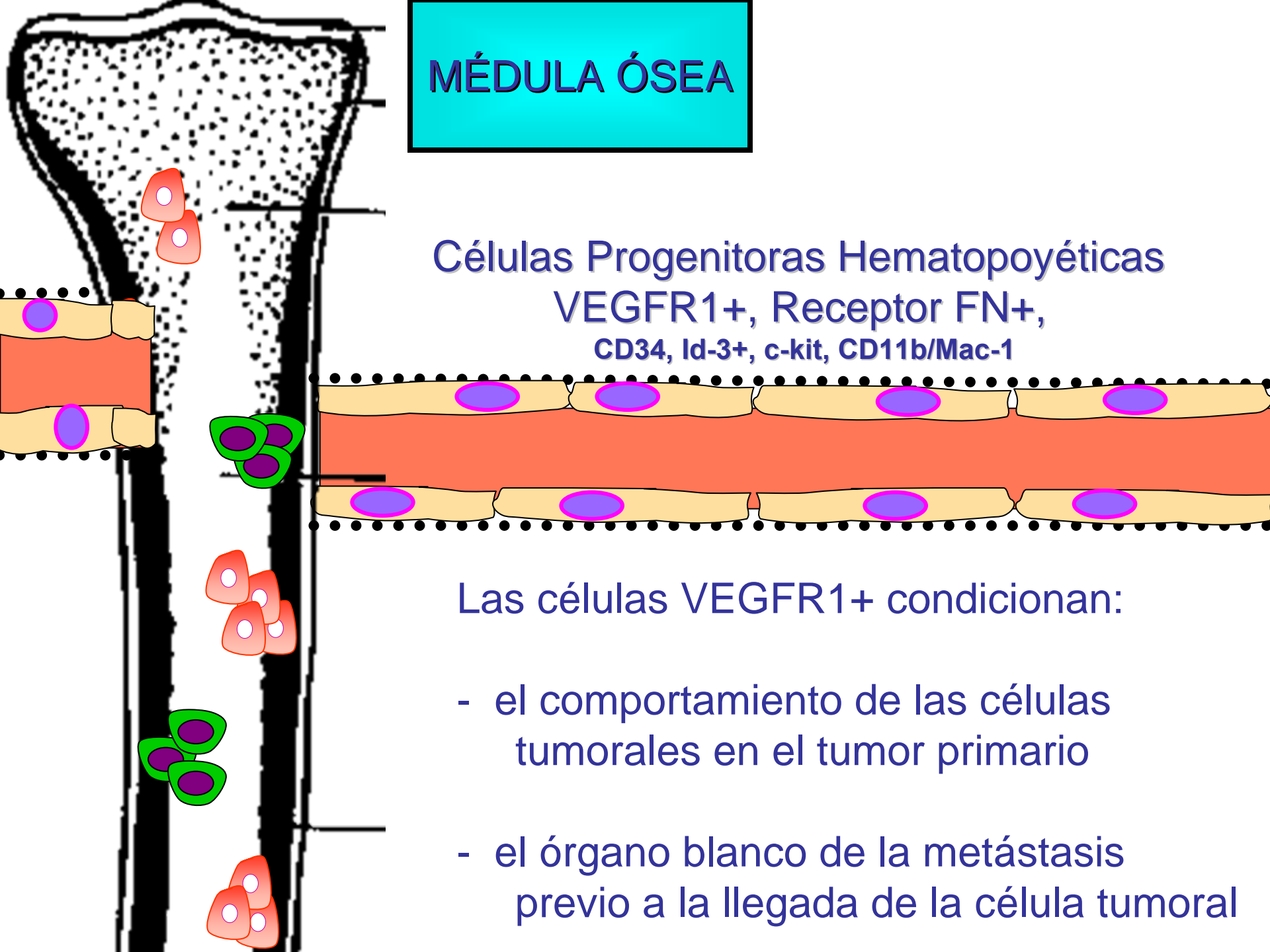


# MÉDULA ÓSEA

Células Progenitoras Hematopoyéticas  
VEGFR1+, Receptor FN+,  
CD34, Id-3+, c-kit, CD11b/Mac-1

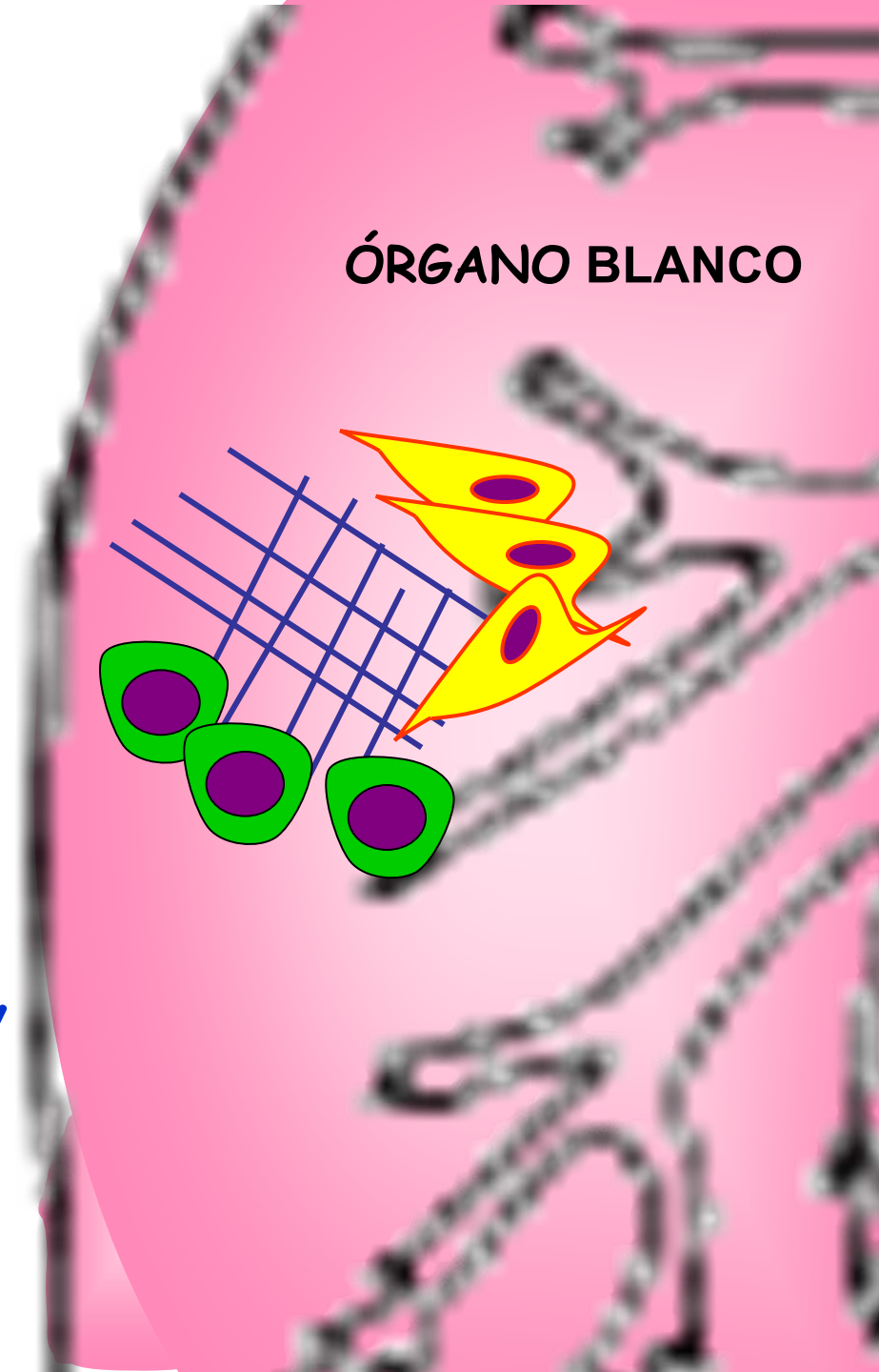
Las células VEGFR1+ condicionan:

- el comportamiento de las células tumorales en el tumor primario
- el órgano blanco de la metástasis previo a la llegada de la célula tumoral

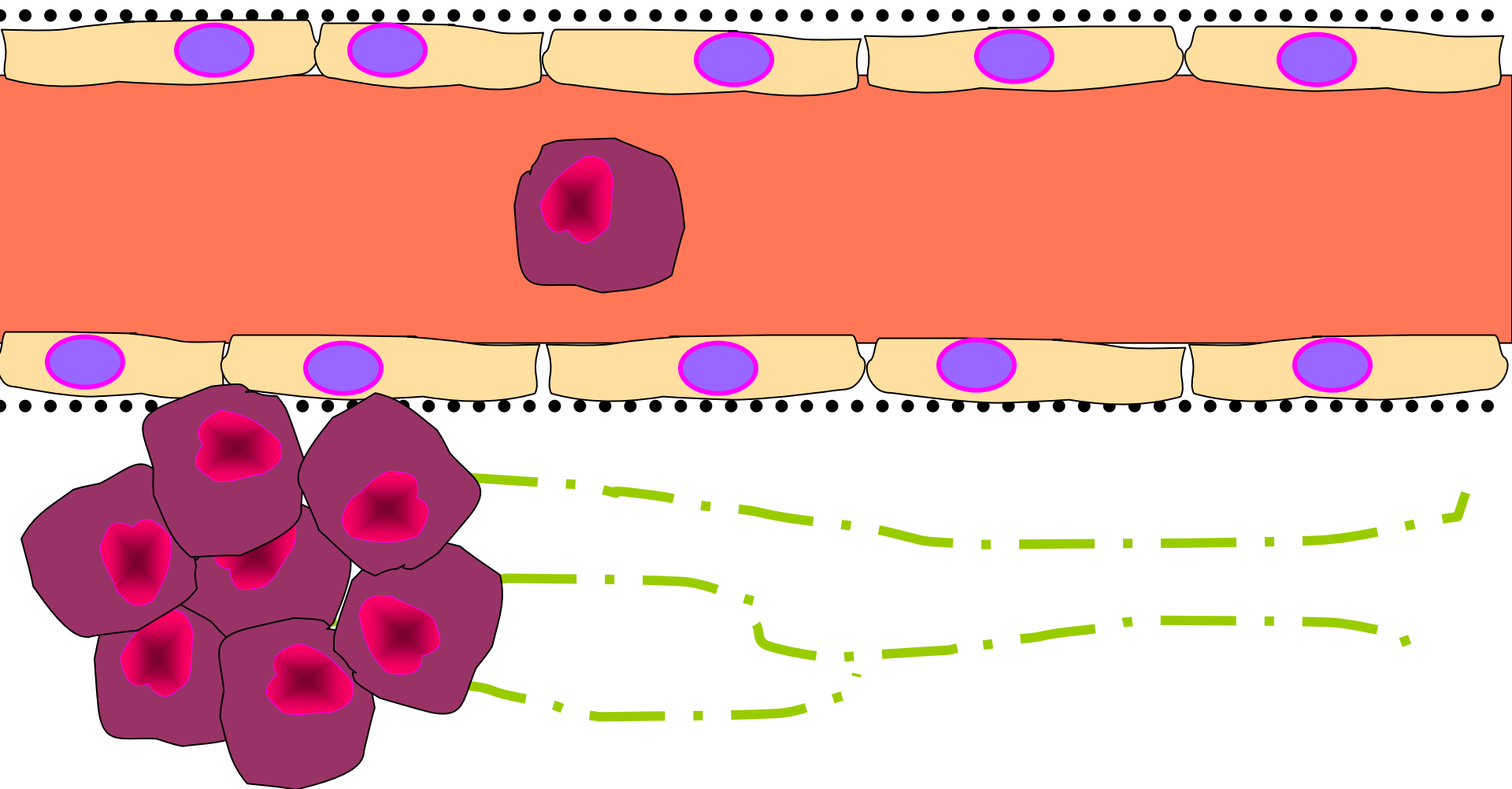


## FORMACIÓN DE LOS SITIOS PREMETASTÁSICOS

- Secreción de enzimas proteolíticas (MMP-9)
- Remodelación de la matriz extracelular
- Producción de factores quimioattractantes (pe SDF-1) y otras quimoquinas (TGFbeta)



Tumor Primario:  
Células CXCR4+  
(receptor de quimoquina SDF-1)



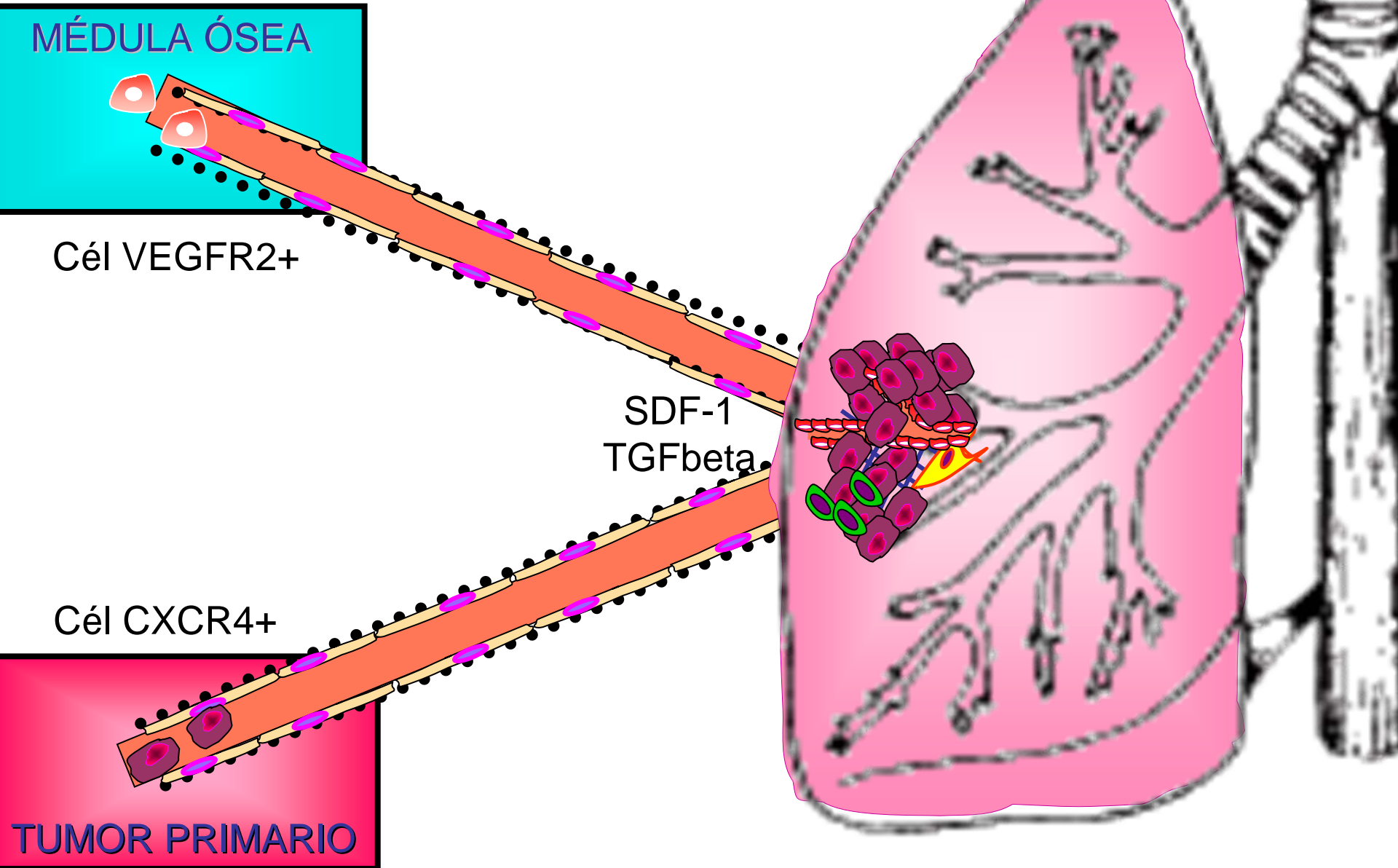


MÉDULA ÓSEA

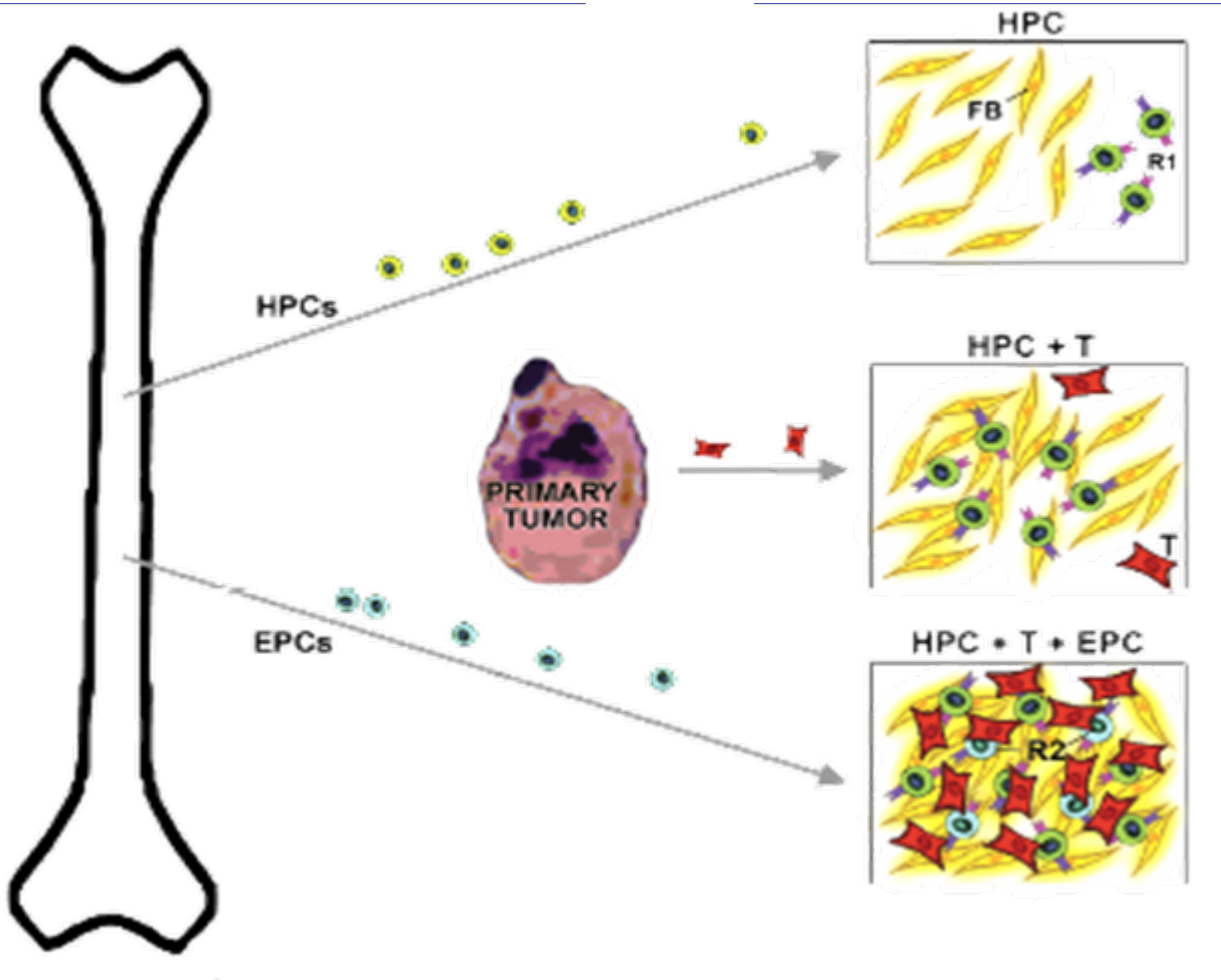
Células Progenitoras Endoteliales

VEGFR2 +

# FORMACIÓN DE LA METÁSTASIS





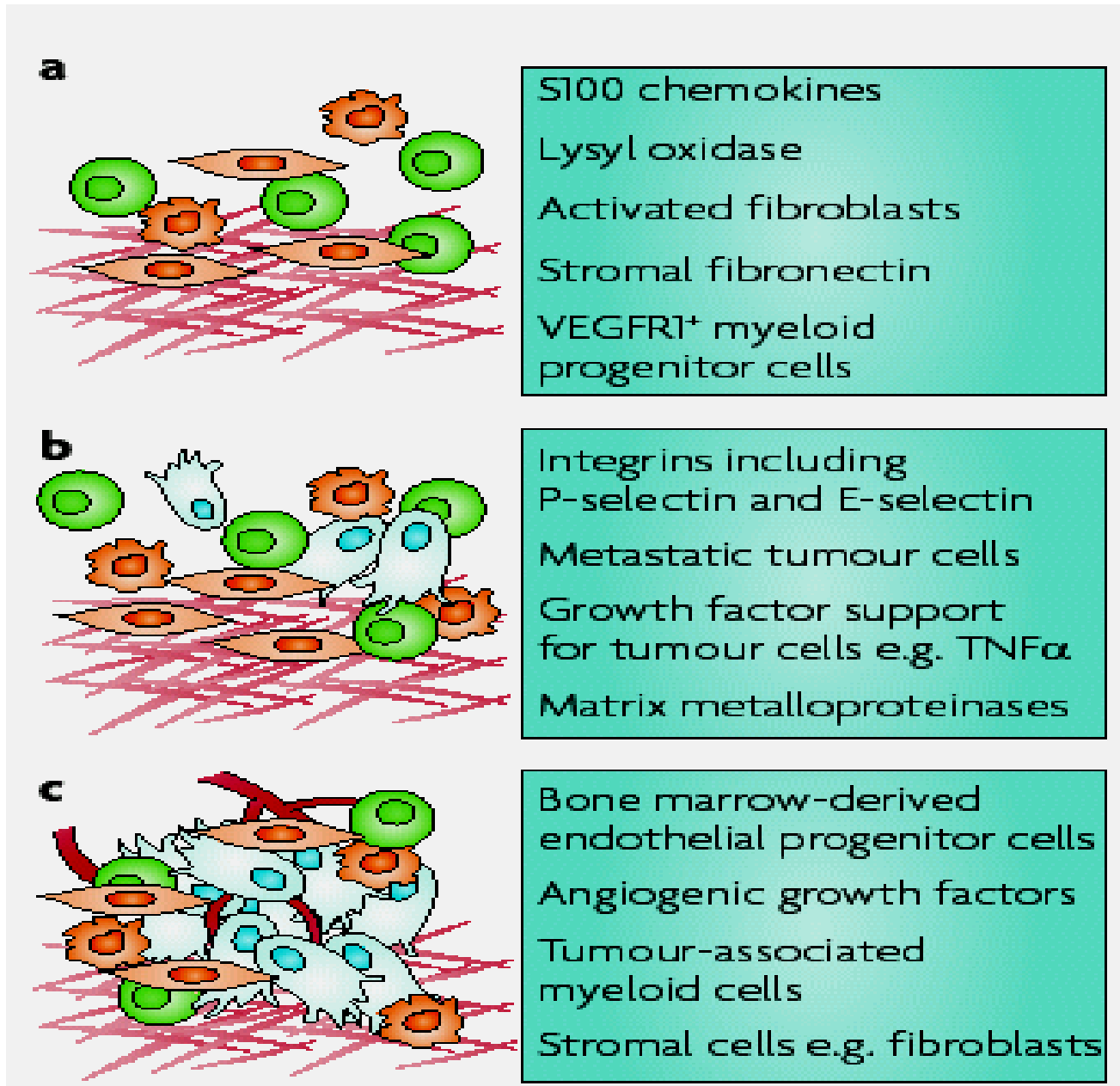


**En tejido humano también se encontró grupos de células derivadas de médula ósea VEGFR1 + en el órgano blanco**

**Es el tumor primario el que, con la producción y liberación de un perfil único de factores solubles, orquesta la formación de los sitios premetastásicos y dirige el patrón metastásico**

**Las células VEGFR1 favorecen la progresión metastásica. Si se remueven del sitio premetastásico la célula tumoral entra en dormancy.**

# Tratamientos dirigidos contra las moléculas implicadas en las fases premetastásica, micrometastásica y macrometastásica



---

**Review**

# Premetastatic Lung “Niche”: Is Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 Activation Required?

Dan G. Duda and Rakesh K. Jain

---

## Abstract

Inflammatory pathways may mediate preparation of the “metastatic soil” in the lungs. Some of these pathways—activation and/or the recruitment of certain inflammatory cells—might depend on vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1) activity. Thus, blocking the activity of VEGFR1 (or the interaction with its ligands) has emerged as a potential antimetastasis strategy to target not only angiogenesis and cancer cell survival and migration, but also the recruitment of tumor growth–promoting bone marrow–derived cells (BMDC). However, inhibition of VEGFR1 activity by blocking antibodies or by genetic deletion of the tyrosine kinase domain neither prevented nor changed the rate of spontaneous metastasis formation after surgical removal of primary tumors. Thus, development of VEGFR1-targeted agents should be pursued in selected tumors (e.g., by identifying cancers that depend on VEGFR1 signaling for survival) or in specific combination therapies. Preventing metastasis will likely require identification and blockade of additional or alternative proinflammatory pathways that mediate the priming of the metastatic soil and the growth of micrometastases. *Cancer Res*; 70(14); 5670–3. ©2010 AACR.

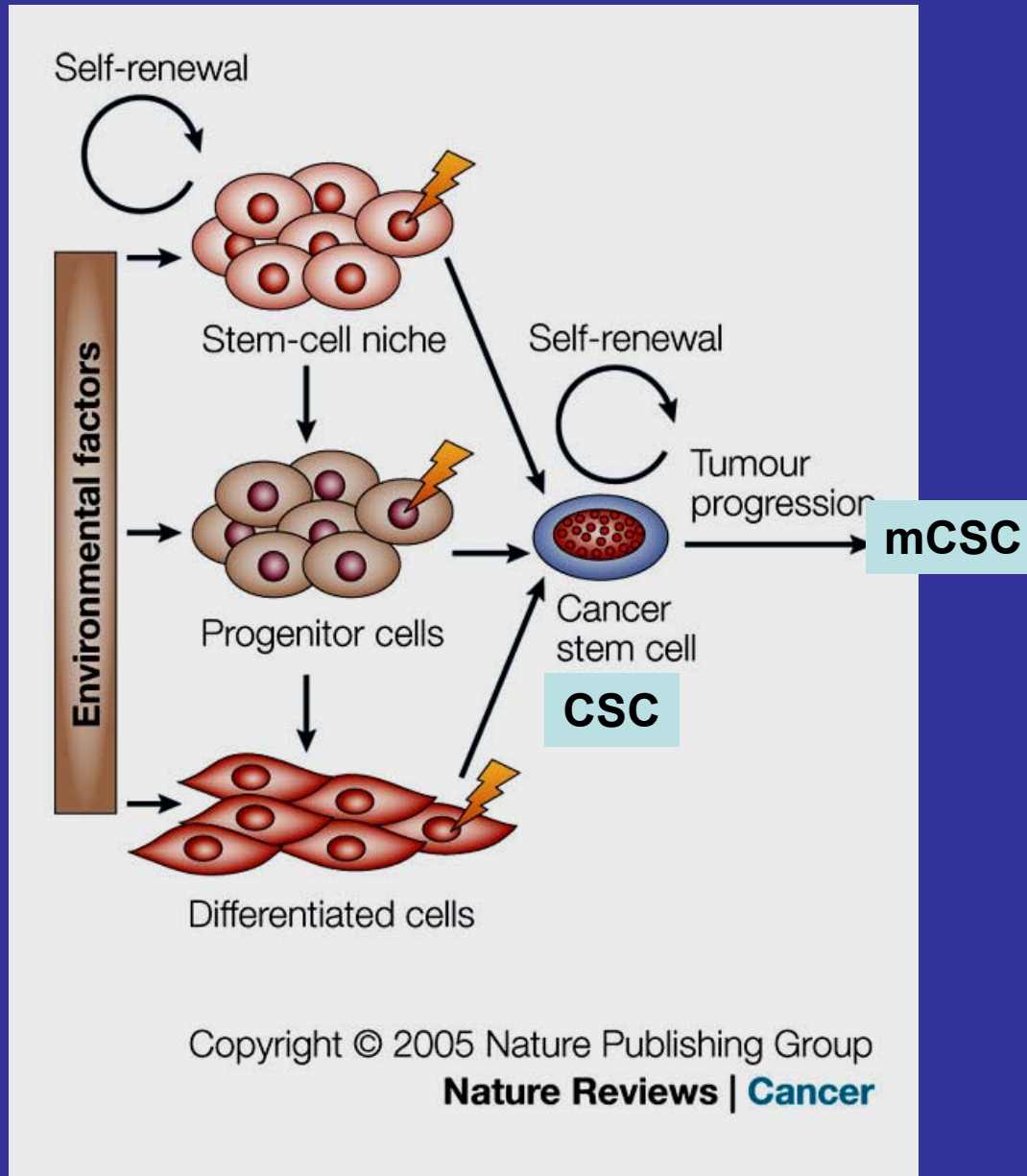
---

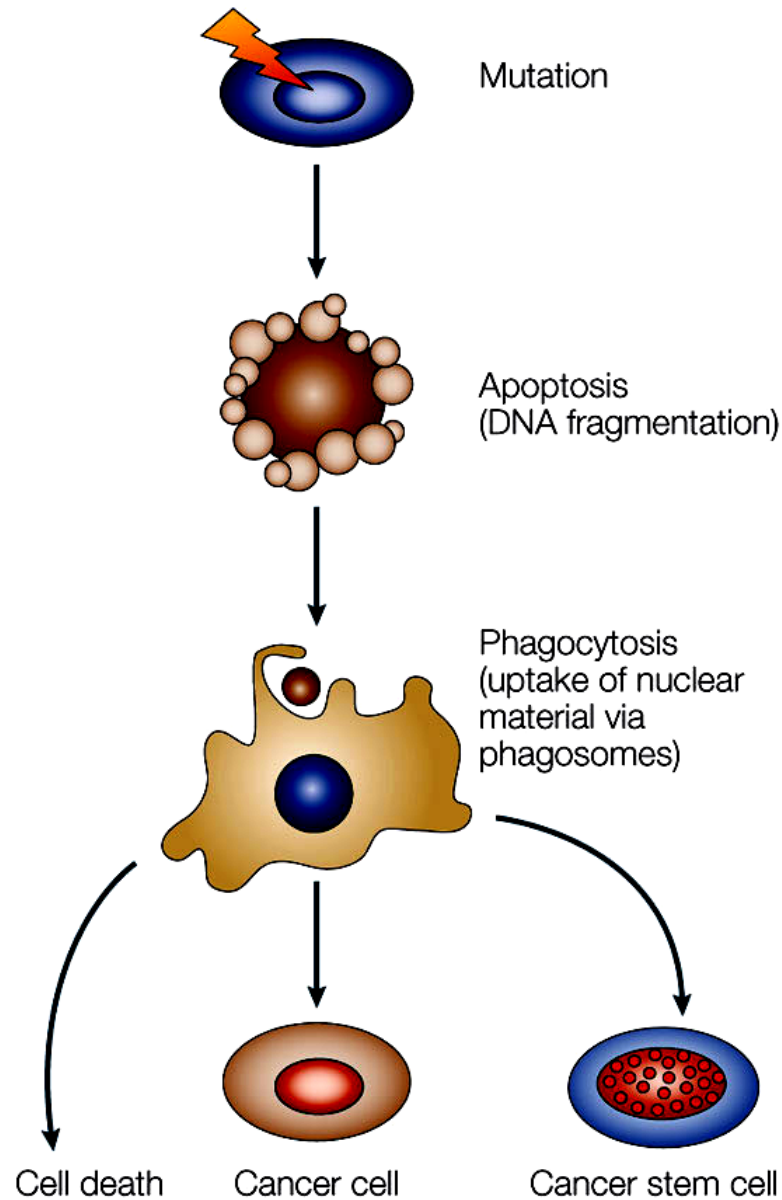
**CÉLULAS STEM Y CÁNCER.**

**CÉLULAS STEM Y METÁSTASIS**

# CÉLULAS STEM Y CÁNCER. CÉLULAS STEM Y METÁSTASIS

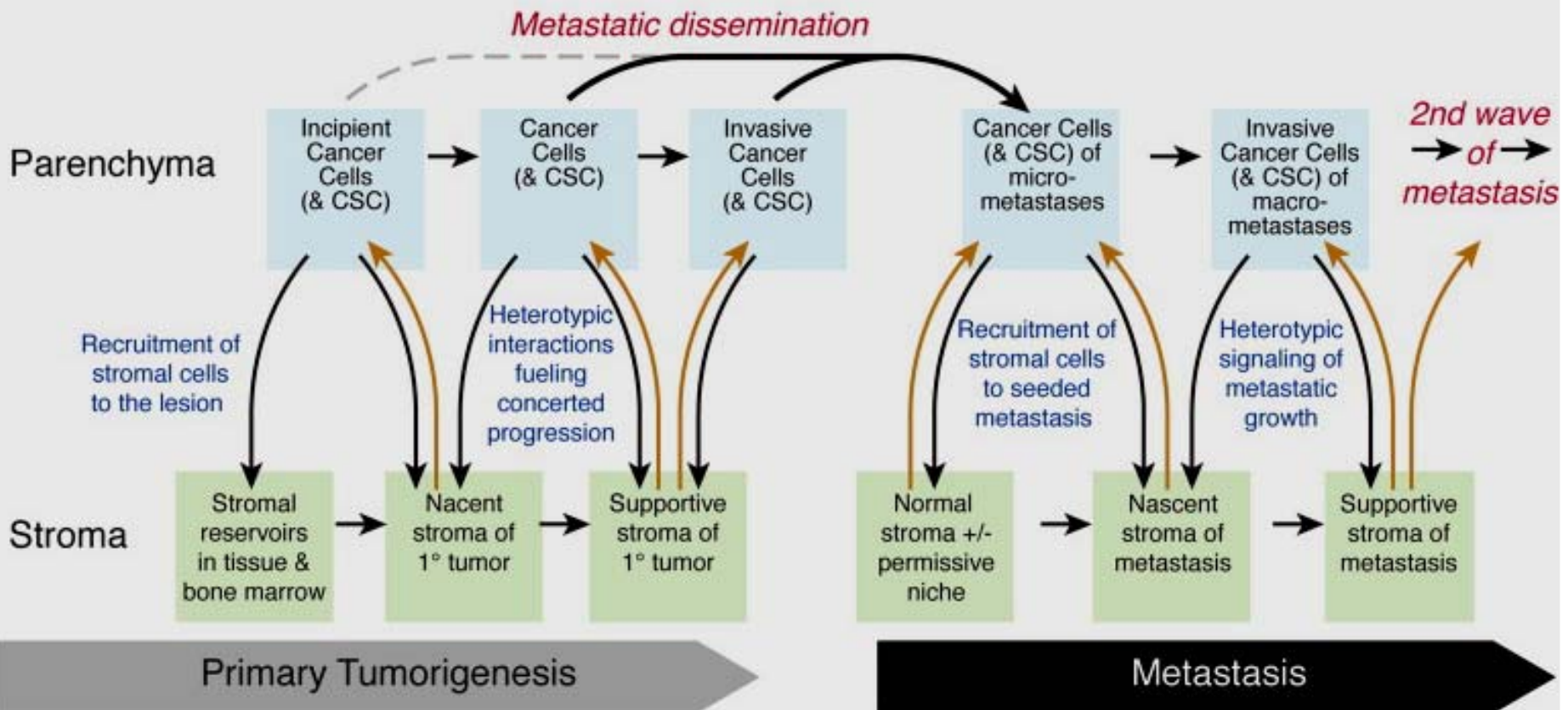
Faltan aun evidencias definitivas experimentales y clínicas

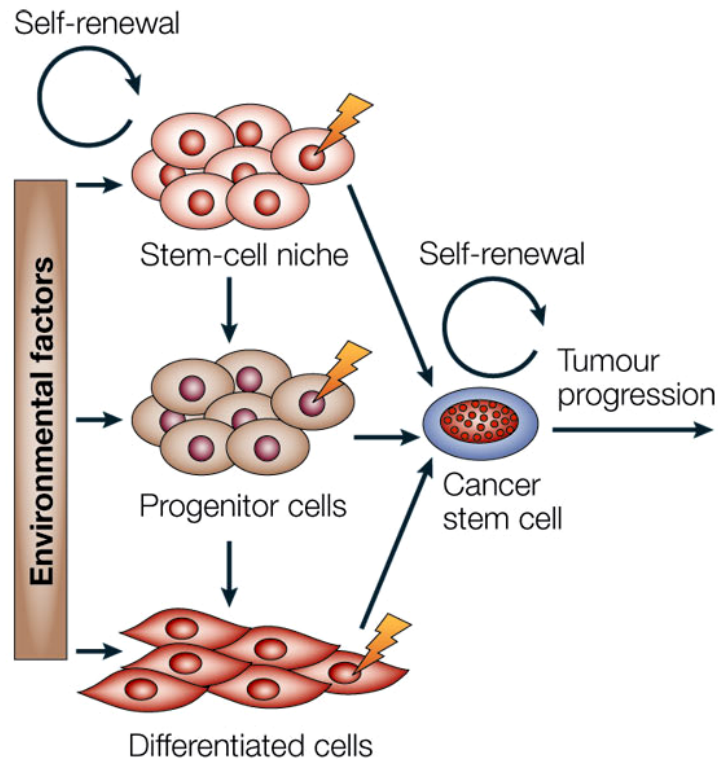




La fagocitosis de cuerpos apoptóticos y la entrada (transfection-like) de ADN libre circulante en células normales o tumorales podrían explicar la tumorigénesis y progresión maligna

Figure 5

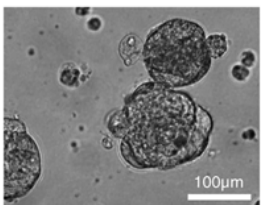




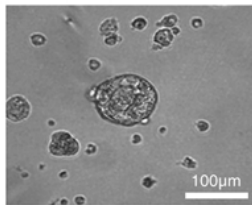
## ALGUNOS MARCADORES DE CÉLULAS STEM

- CD44+ (resp. A TGFb)
- CD24 LOW (indif. a TGFb)
- CD133+
- **CD133+ / CXCR4 (MTS en Ca de Páncreas. Hermann et al, 2007)**
- ALDH1+ (ALDEFLUOR)
- LOH para BRCA
- Vías WNT/ $\beta$  cat activadas
- > ABC transporters
- Formación de esferas en medio sin suero

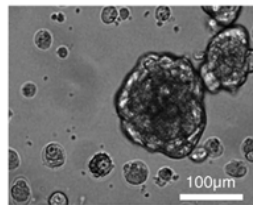
PE14



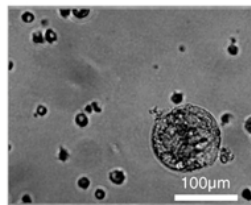
PE6



PE21



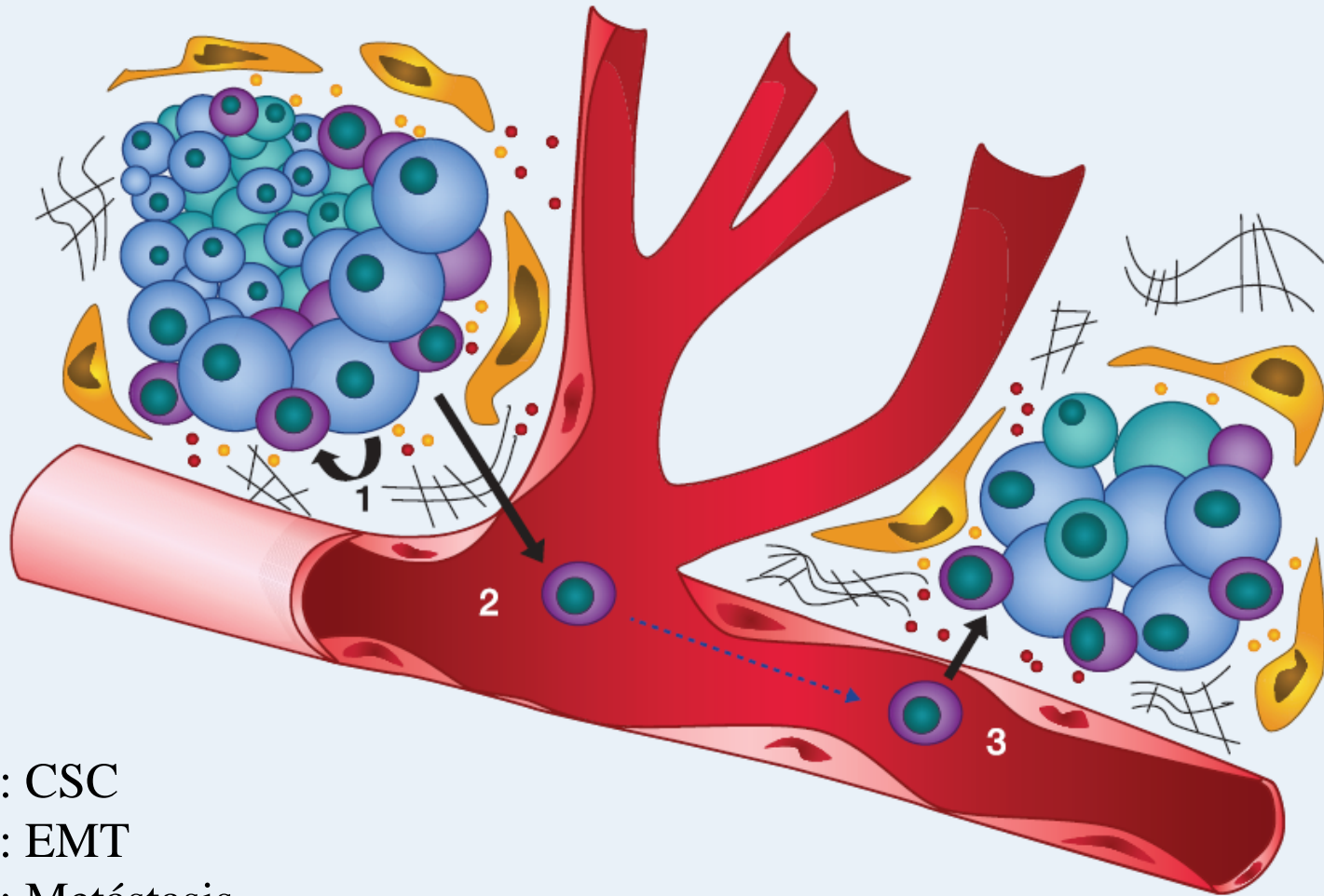
PE8



**Heterogeneidad de la subpoblación de células stem**



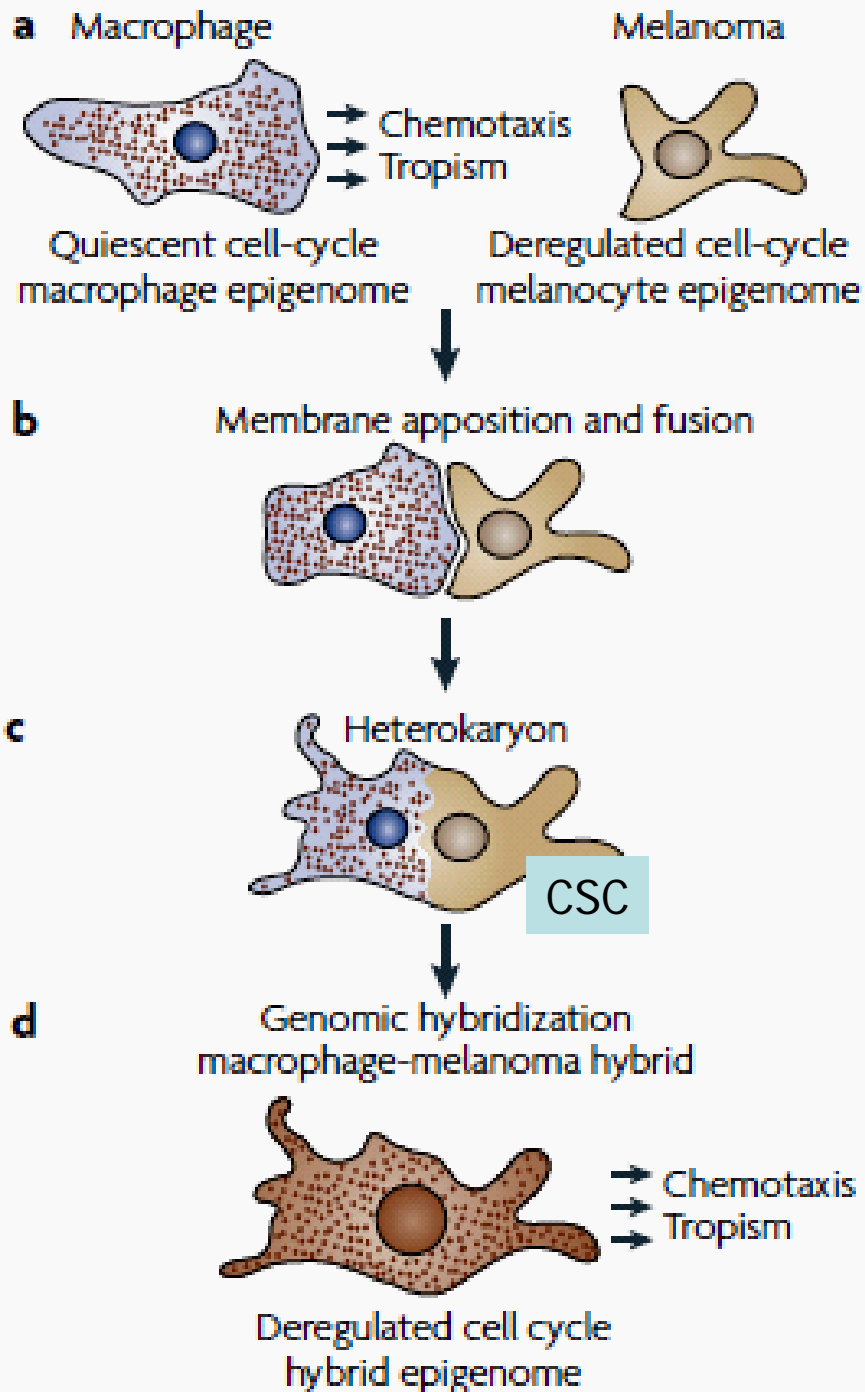
# El nicho de la Cancer Stem Cell (CSC)



- 1: CSC
- 2: EMT
- 3: Metástasis

# Fusión celular. Otro factor etiológico? Un nuevo blanco terapéutico?

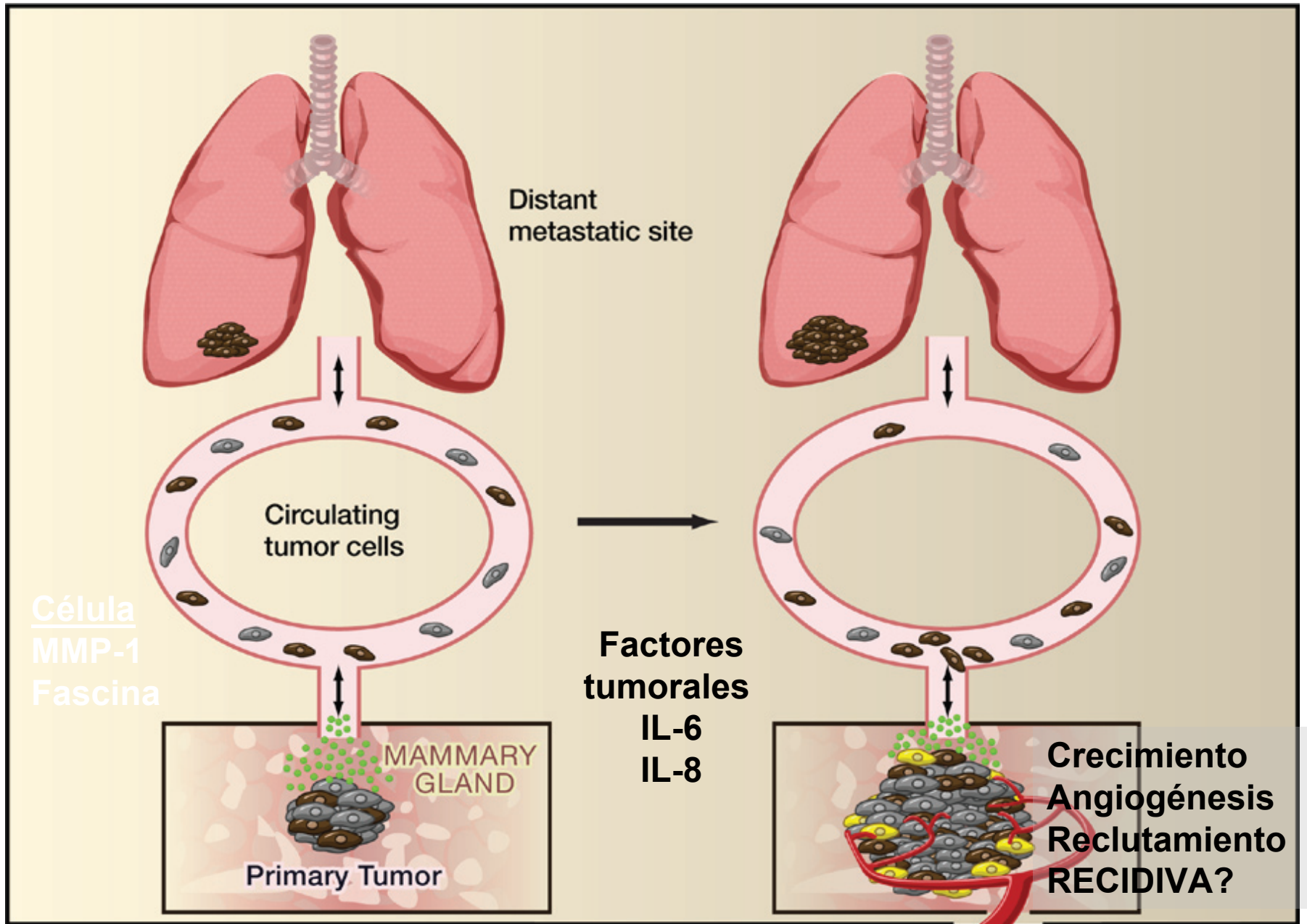
- Numerosas evidencias clínicas y experimentales sugieren que la fusión entre células tumorales y normales, o entre células tumorales, puede contribuir a la iniciación tumoral así como a la progresión tumoral y la metástasis.
- Se han encontrado híbridos entre células tumorales y macrófagos u otras células migratorias derivadas de la médula ósea (BMDC) cuya expresión génica refleja un fenotipo metastásico.
- Andersen et al (J Pathol. 2007) hallaron un 30% de núcleos malignos en osteoclastos de pacientes de mieloma (1er. confirmación en humanos de fusión BMDC-tumor)
- Recientemente se ha demostrado que la fusión de dos sublíneas de diferente organotropismo de la línea MDA-MB-231 genera una nueva línea con capacidad metastásica dual (*Lu & Wang, PNAS 2009*)



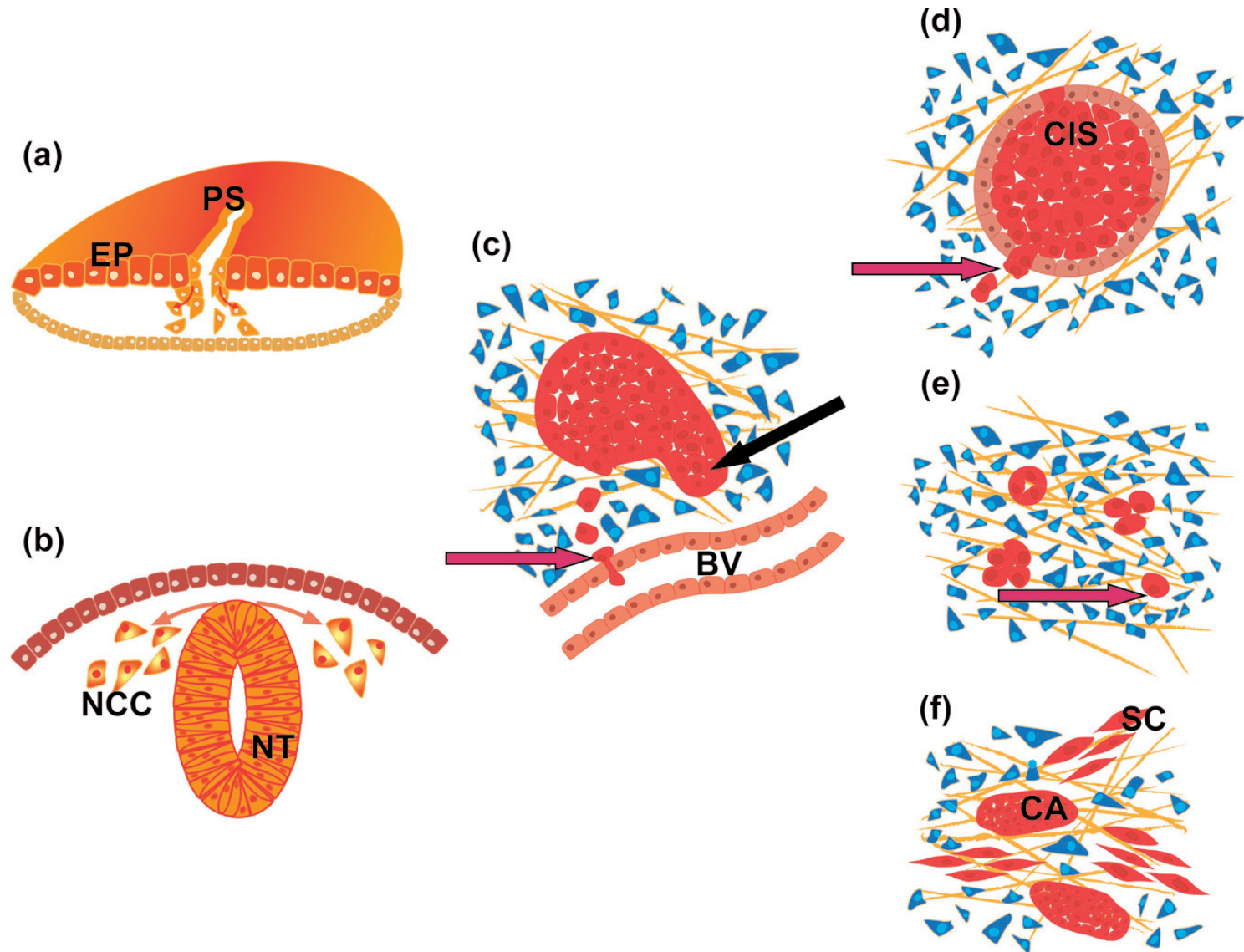
Un modelo para la generación de una célula metastásica por fusión de una célula de melanoma con un macrófago. (*Powelek et al. Nature Rev Cancer, 2008*)

Una nueva vuelta de tuerca  
en la progresión tumoral...

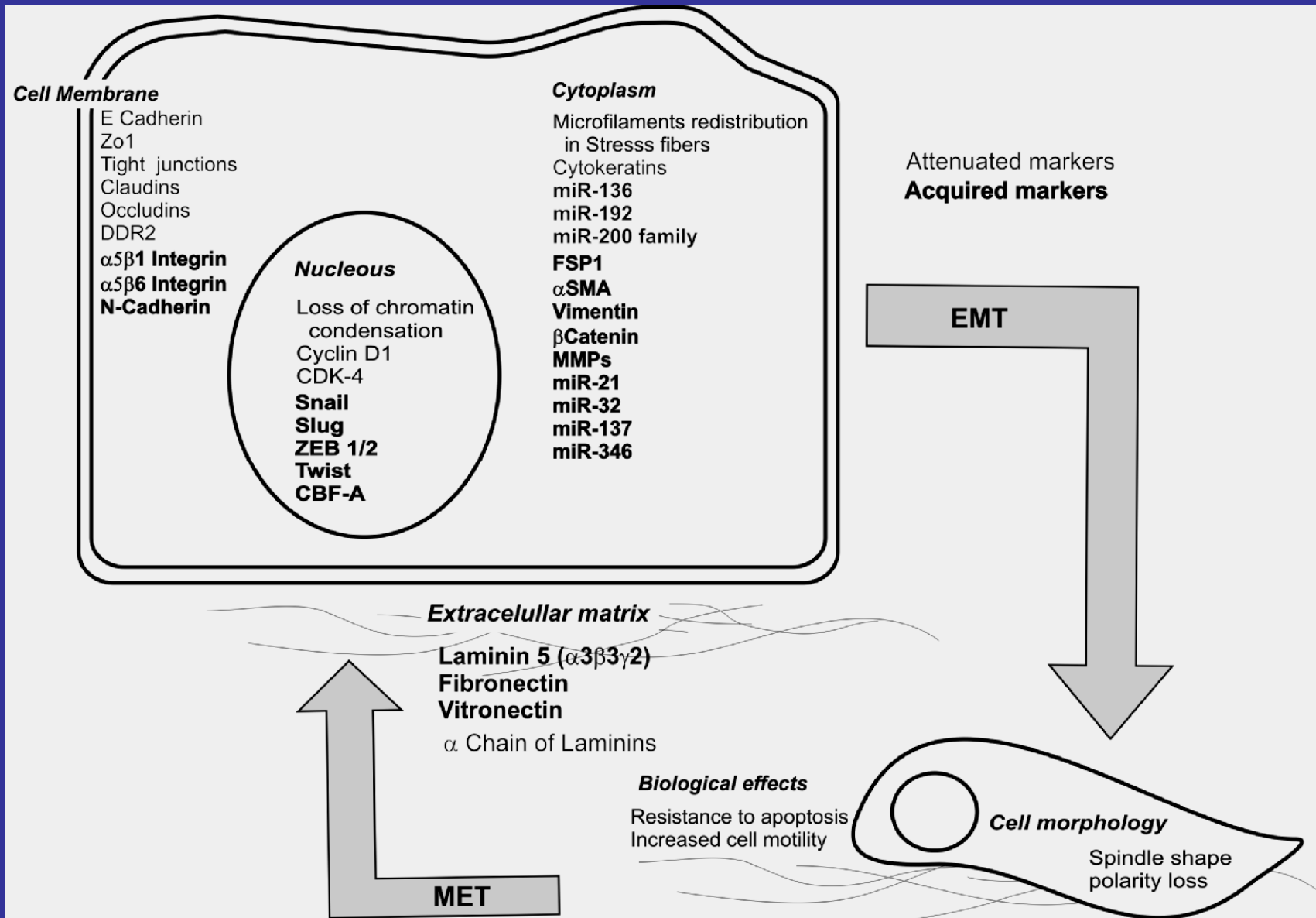
**AUTOSIEMBRA DEL TUMOR  
PRIMARIO**

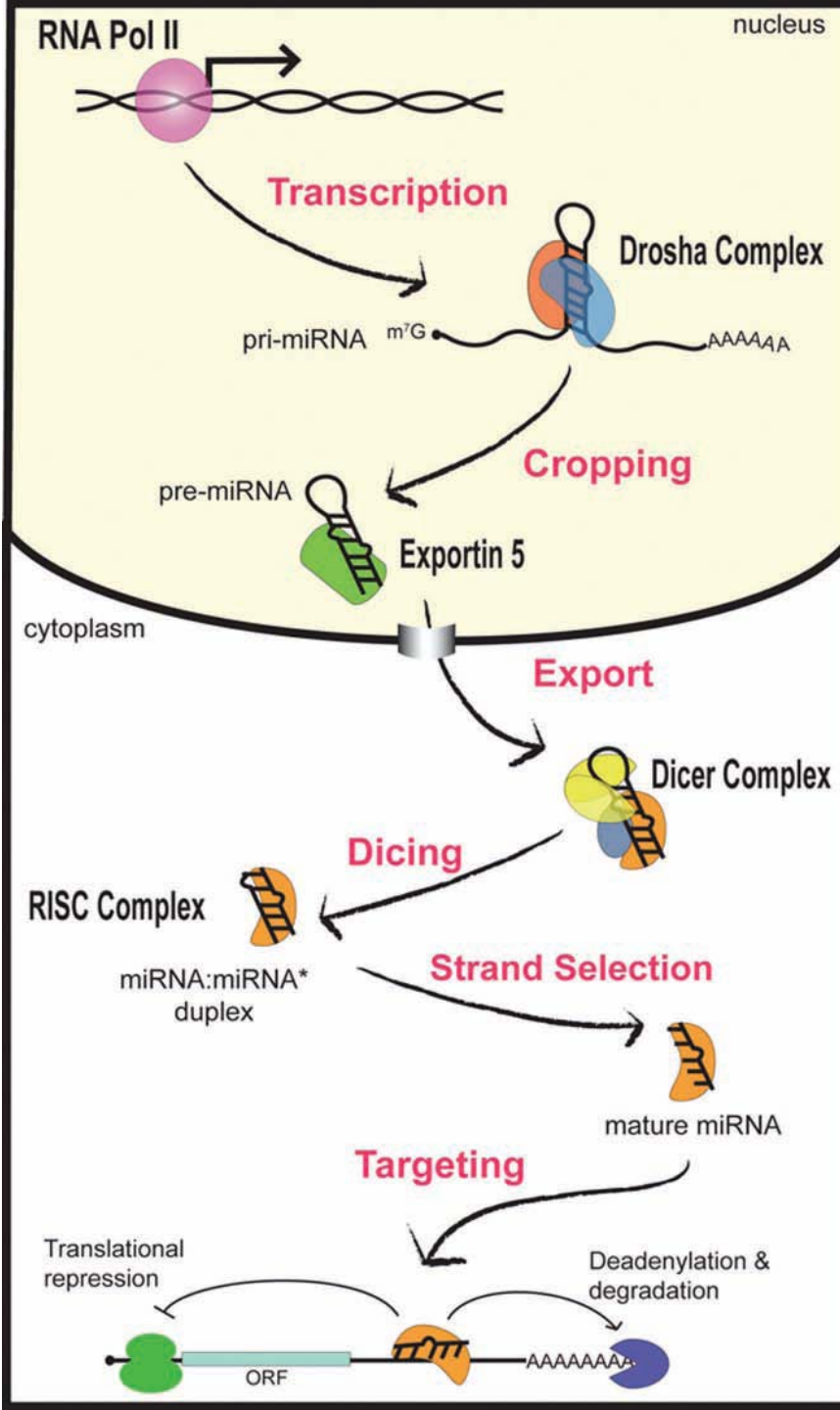


# EMT (Transición epitelio-mesenquimática) durante la embriogénesis y en cáncer



# Cambios morfológicos y moleculares en la EMT (Transición epitelio-mesenquimática)





# Mecanismo general de biogénesis de los miARN



# Modificaciones de los miARN en diferentes tumores

miRNA	Expression intumors
Let-7	↓
miR-7	↓ (glioma)
miR-16	↓
miR-18a	↑
miR-21	↑
miR-31	↑
miR-143 & miR-145	↓
miR-155	↑
miR-191	↑ (leukemia)

Los miARN pueden promover, suprimir o predecir el riesgo para padecer metástasis

**Knockdown of miR-21 in human breast cancer cell lines inhibits proliferation, in vitro migration and in vivo tumor growth**

*Breast Cancer Research* 2011, 13:R2 doi:10.1186/bcr2803

**Conclusion:** Knockdown of *miR-21* in MCF-7 and MDA-MB-231 cells inhibits *in vitro* and *in vivo* growth as well as *in vitro* migration. *ANKRD46* is newly identified as a direct target of *miR-21* in BC. These results suggest that inhibitory strategies against *miR-21* using peptide nucleic acids (PNAs)-antimiR-21 may provide potential therapeutic applications in breast cancer treatment.

*Ankyrin repeat domain: ANKRD46*

OBSERVACION  
CLINICA



ESTUDIOS BASICOS  
DE BIOLOGIA TUMORAL  
EN MODELOS  
EXPERIMENTALES.  
DETERMINANTES  
MOLECULARES

*¿NUEVOS  
"BLANCOS"  
TERAPEUTICOS?*

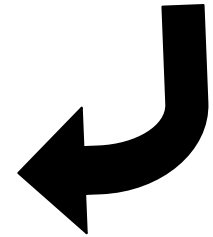
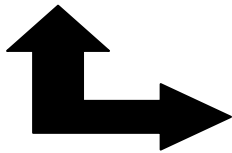
*¿NUEVOS  
MARCADORES?*

- **Prevención de metástasis**
- **Tratamiento de metástasis resistentes**

- **Diag. precoz de metástasis**
- **Pronóstico**



ESTUDIOS CLINICOS





PABELLON  
EMILIO J. COSTA

**INSTITUTO DE ONCOLOGÍA "ÁNGEL H. ROFFO"**  
**ÁREA INVESTIGACIÓN**  
**Universidad de Buenos Aires**