Universidad de Alcalá
COMISIÓN DE ESTUDIOS OFICIALES
DE POSGRADO Y DOCTORADO

ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Año académico 2018/19

DOCTORANDO: **MASANA DIEGO, DANIEL**
D.N.I./PASAPORTE: ******3538K**

PROGRAMA DE DOCTORADO: **D410-BIOLOGÍA FUNCIONAL Y BIOTECNOLOGÍA**
DPTO. COORDINADOR DEL PROGRAMA: **CIENCIAS DE LA VIDA**
TITULACIÓN DE DOCTOR EN: **DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**

En el día de hoy 01/04/19, reunido el tribunal de evaluación nombrado por la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado de la Universidad y constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral, elaborada bajo la dirección de **FERNANDO VIDAL VANACLOCHA // .**

Sobre el siguiente tema: *ESTUDIO DE LA FASE PERIVASCULAR DE LA ENFERMEDAD METASTÁSICA CEREBRAL: EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN TUMORAL DE HER2 EN LA REGULACIÓN DEL ENDOTELIO CEREBROVASCULAR POR ASTROCITOS*

Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL[1] de (**no apto, aprobado, notable y sobresaliente**): SOBRESALIENTE

Alcalá de Henares, 1 de abril de 2019

EL PRESIDENTE

Fdo.: ALFREDO CARRATO MENA

EL SECRETARIO

Fdo.:JAVIER CORTES CASTAN

EL VOCAL

Fdo.: CRISTINA PEÑA MAROTO

Con fecha 24 de abril de 2019 la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- [x] Conceder la Mención de "Cum Laude"
- [ ] No conceder la Mención de "Cum Laude"

La Secretaria de la Comisión Delegada

FIRMA DEL ALUMNO,

Fdo.: MASANA DIEGO, DANIEL

[1] La calificación podrá ser "**no apto**" "**aprobado**" "**notable**" y "**sobresaliente**". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad.

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ, PATRIMONIO DE LA HUMANIDAD

INCIDENCIAS / OBSERVACIONES:

Universidad de Alcalá

COMISIÓN DE ESTUDIOS OFICIALES
DE POSGRADO Y DOCTORADO

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 24 de abril, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por *MASANA DIEGO, DANIEL*, el día 1 de abril de 2019, titulada *ESTUDIO DE LA FASE PERIVASCULAR DE LA ENFERMEDAD METASTÁSICA CEREBRAL: EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN TUMORAL DE HER2 EN LA REGULACIÓN DEL ENDOTELIO CEREBROVASCULAR POR ASTROCITOS*, para determinar, si a la misma, se le concede la mención "cum laude", arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado **resuelve otorgar** a dicha tesis la

MENCIÓN "CUM LAUDE"

Alcalá de Henares, 24 de abril de 2019
EL VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y TRANSFERENCIA

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ · VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y TRANSFERENCIA

F. Javier de la Mata de la Mata

Copia por e-mail a:
Doctorando: MASANA DIEGO, DANIEL
Secretario del Tribunal: JAVIER CORTES CASTAN
Director de Tesis: FERNANDO VIDAL VANACLOCHA

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ, PATRIMONIO DE LA HUMANIDAD

Universidad de Alcalá

ESCUELA DE DOCTORADO
Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado

DILIGENCIA DE DEPÓSITO DE TESIS.

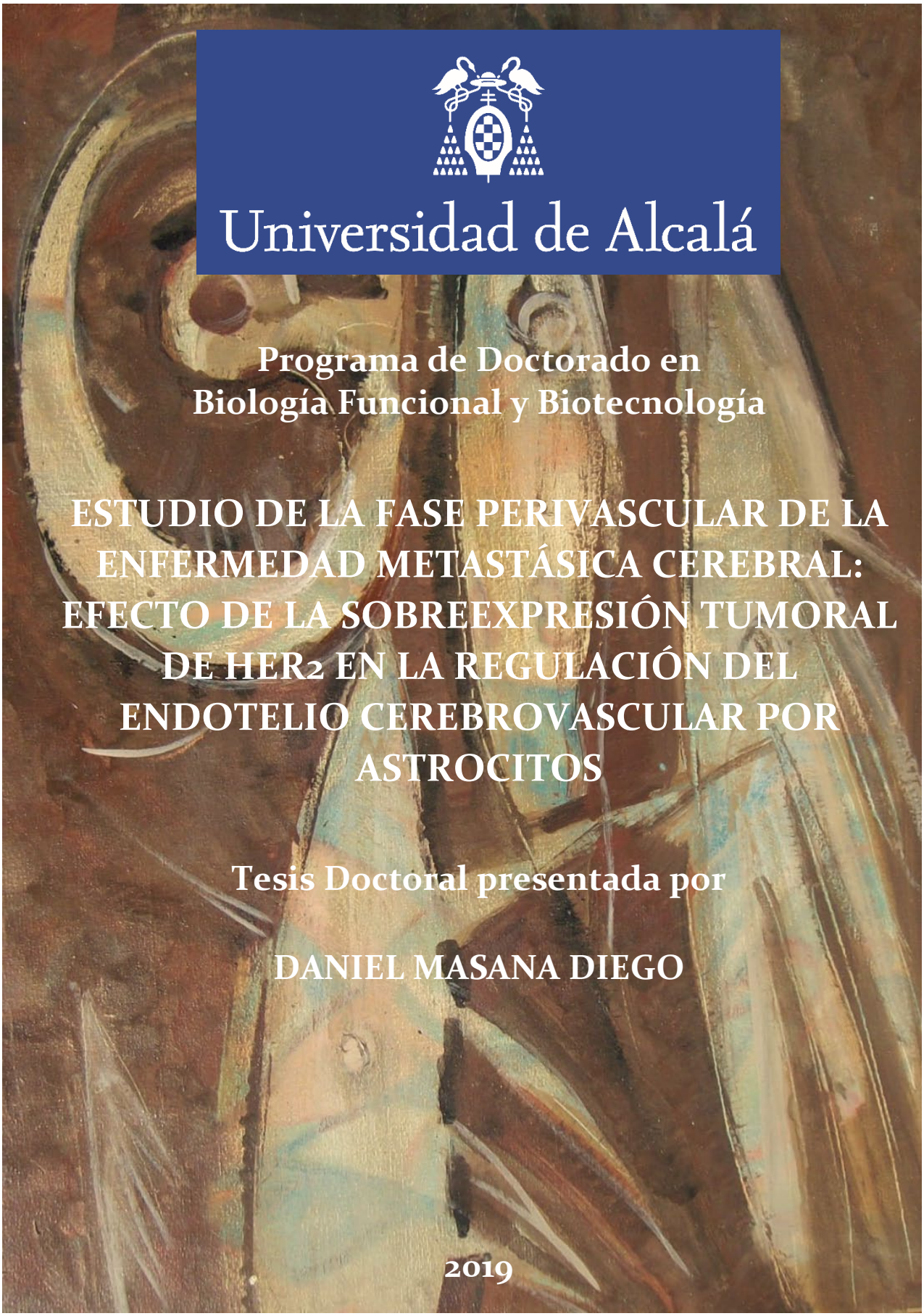
Comprobado que el expediente académico de D./Dª DANIEL MASANA DIEGO reúne los requisitos exigidos para la presentación de la Tesis, de acuerdo a la normativa vigente, y habiendo presentado la misma en formato: ☐ soporte electrónico ☒ impreso en papel, para el depósito de la misma, en el Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado, con el nº de páginas: 221 se procede, con fecha de hoy a registrar el depósito de la tesis.

Alcalá de Henares a 11 de febrero de 2019

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ SERVICIO DE ESTUDIOS OFICIALES DE POSGRADO

Aurora Juárez Abril

Fdo. El Funcionario



Universidad de Alcalá

Programa de Doctorado en
Biología Funcional y Biotecnología

ESTUDIO DE LA FASE PERIVASCULAR DE LA ENFERMEDAD METASTÁSICA CEREBRAL: EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN TUMORAL DE HER2 EN LA REGULACIÓN DEL ENDOTELIO CEREBROVASCULAR POR ASTROCITOS

Tesis Doctoral presentada por

DANIEL MASANA DIEGO

2019

ESTUDIO DE LA FASE PERIVASCULAR DE LA ENFERMEDAD METASTÁSICA CEREBRAL:
EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN TUMORAL DE HER2
EN LA REGULACIÓN DEL ENDOTELIO CEREBROVASCULAR POR ASTROCITOS
Daniel Masana Diego
2019

Universidad de Alcalá

Programa de Doctorado en
Biología Funcional y Biotecnología

ESTUDIO DE LA FASE PERIVASCULAR DE LA ENFERMEDAD METASTÁSICA CEREBRAL: EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN TUMORAL DE HER2 EN LA REGULACIÓN DEL ENDOTELIO CEREBROVASCULAR POR ASTROCITOS

Tesis Doctoral presentada por

DANIEL MASANA DIEGO

Director: Dr. Fernando Vidal Vanaclocha
Tutor: Dr. Guillermo Bodega

Alcalá de Henares, 2019

Universidad de Alcalá

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
Edificio de Ciencias. Campus Universitario
Ctra. A-2, Km 33,6
28805 Alcalá de Henares (Madrid)
Tel.: 91 885 4927/4965
dpto.ccvida@uah.es

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ, PATRIMONIO DE LA HUMANIDAD

LEONARDO CASANO MAZZA, Catedrático de Fisiología Vegetal y Coordinador del Programa de Doctorado en Biología Funcional y Biotecnología de la Universidad de Alcalá

INFORMA que la Tesis Doctoral titulada: **"Estudio de la fase perivascular de la enfermedad metastásica cerebral: Efecto de la sobreexpresión tumoral de Her2 en la regulación del endotelio cerebrovascular por astrocitos"**, presentada por **D. Daniel Masana Diego**, bajo la dirección del Dr. Fernando Vidal Vanaclocha del Dpto. de Medicina Molecular y Bioquímica de la George Washington University School of Medicine, reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, se firma el presente informe en Alcalá de Henares, a 7 de noviembre de 2018

Fdo.: Leonardo Casano Mazza

D. FERNANDO VIDAL VANACLOCHA, Profesor de Medicina Molecular en George Washington University School of Medicine, dpt. Biochemistry and Molecular Medicine, Washington, DC

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada: **"Estudio de la fase perivascular de la enfermedad metastásica cerebral: Efecto de la sobreexpresión tumoral de Her2 en la regulación del endotelio cerebrovascular por astrocitos"**, realizada bajo su dirección por **D. Daniel Masana Diego** en el Departamento de Medicina Molecular y Bioquímica de la George Washington University School of Medicine, se considera ya finalizada y puede ser presentada para su exposición y defensa.

Madrid, a 29 de Octubre de 2018.

Fdo.: Fernando Vidal Vanaclocha

A mi Familia

“El significado de la vida es encontrar tu regalo. El propósito de la vida es regalarlo.”

Pablo Picasso

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Fernando Vidal Vanaclocha y a Dr. Guillermo Bodega su dirección y tutela durante estos años. También, muchas gracias a la Universidad de Alcalá por permitirme formar parte de esta institución. Tampoco podría haber desarrollado mi actividad investigadora sin la colaboración de la Universidad CEU San Pablo y HM-Hospitales Madrid, así como el servicio de proteómica del CBM.

Mis agradecimientos el Dr. Domingo Barber, por facilitarme la labor investigadora en el IMMA. Gracias al servicio de Neurocirugía de HM-Hospital Montepríncipe por la labor que hacen día a día y al importantísimo trabajo cediendo las muestras para la investigación.

Gracias a todo el equipo del IMMA, Cruz, Bea, Álvaro, Luis, Pía, María, Javi, Ricardo, Pepa, Susana, las Irenes, a los que ya no están allí a los que vinieron nuevos. Ha sido un placer trabajar y compartir una etapa de mi vida con vosotros. Gracias Paloma por confiar en mí de manera incondicional. Quería agradecer a Ángel, tus conversaciones sinceras, esas que te hacen reaccionar y plantearte las cosas seriamente. Gracias a Sonia, por ser tan empática conmigo, ayudarme en todo y permitirme acoplarme a tus vacaciones, echo de menos nuestros desayunos con las Irenes.

Dar las gracias a mis compañeras/os del H. U. Ramón y Cajal, por haberme acogido con los brazos abiertos, aprendo todos los días de vosotros. Un abrazo muy fuerte a mis mamas, sin vosotras no sería lo mismo ir a trabajar todos los días, siempre tenéis una sonrisa en la cara y la mano tendida para ayudarme en cualquier cosa que necesite. Además, me habéis tenido que aguantar la chapa de la tesis más tiempo del que me habría gustado.

También agradecer a Jesús por todos estos años, desde el instituto nunca hemos perdido el contacto y aunque la geografía no ha ayudado, nuestra amistad ha permanecido intacta.

Nico, gracias por dejarte caer por el laboratorio, me encanta como eres y tu perspectiva ante la vida. Me encanta que formes parte de ella. Noe y Cira, mis directoras desde la barrera y amigas sois una pasada. Sin vosotras no creo que estuviese aquí hoy. Para querer a una persona tienes que admirarla y yo a vosotras os admiro mucho. Me habéis ayudado a nivel laboral y personal sin pedir nada a cambio: tu fuerza, humor, pragmatismo, inteligencia y amistad me han ayudado a no rendirme. Me encanta quedar con vosotras, es genial encontrar a alguien con un sentido del humor tan similar al mío. Vuestra amistad es muy importante para mí.

A mis amigos Zamoranos Lean, Alberto, Laura, Tere, Samuel y Miguel. Gracias por vuestra comprensión y apoyo incondicional, siempre me he sentido acompañado, me inspiráis y me hacéis crecer como persona. Thank you, Pete, without your support I wouldn't have done so many important steps to accomplish all this. Your words were always kind to me, and you never let me give up. I am glad to have met you. Finally, this clown made it! Las asturianas apátridas Lore y Raque, gracias por estar ahí siempre. Raque, me encanta que siempre hayamos mantenido el contacto, me alegro de haberte conocido. Víctor y Paula, muchas gracias, por ser mi amigo desde el instituto, haberme apoyado y sostenido tantas veces, eres como mi sexto hermano. A la familia Mozo García Patos, sois un importantes en mi vida y os agradezco, también a las niñas, vuestro cariño, siempre me habéis abierto las puertas de vuestra casa cuando lo he necesitado.

Sin mi familia habría sido imposible lograrlo, sin su amor incondicional todo habría sido más difícil. Siempre habéis creído en mí, incluso cuando ni yo me sentía capaz. Todos vuestros consejos los he intentado aplicar con mayor o menor éxito, siempre los hice míos y nunca quedaron en el olvido. Aunque sé que a veces no es fácil lidiar conmigo, gracias por ser pacientes, os quiero. Por supuesto también os quiero y admiro: papá y mamá. El cariño, la implicación y el sacrificio que habéis hecho por mí es incalculable.

Seguramente me estaré dejando a alguien al que agradecer su apoyo, a todos, gracias.

RESUMEN

La metástasis cerebral es una importante causa de muerte en pacientes con cáncer avanzado, y su desarrollo se inicia en un microambiente funcional condicionado por el endotelio cerebrovascular (ECV) y los astrocitos de la barrera hematoencefálica (BHE), desconociéndose en gran medida su patogenia molecular, y no existiendo por el momento biomarcadores que pronostiquen el riesgo de padecerlas, o que representen dianas moleculares para su tratamiento.

El presente proyecto se planteó con el objetivo de estudiar el microambiente neurovascular y el patrón de crecimiento de la metástasis cerebral y, más en concreto, la actividad transcripcional y el secretoma del ECV en respuesta a factores solubles del astrocito activado por células del cáncer de mama con o sin sobreexpresión de Her2, tras su exposición o no a factores característicos del microambiente tumoral.

Los resultados obtenidos demostraron que el crecimiento inicial de las metástasis cerebrales tanto experimentales como clínicas se produjo en el espacio perivascular, quedando la barrera hematoencefálica (BHE) original desdoblada en dos nuevas barreras, una interna hematotumoral (entre sangre y tejido metastásico), y otra externa neurotumoral (entre tejido metastásico y tejido nervioso).

Al profundizar mediante modelos in vitro en las interrelaciones funcionales que acontecen en el microambiente de la metástasis cerebral entre células tumorales, astrocitos perivasculares y células del ECV, el presente trabajo demostró por vez primera una alteración en la expresión génica y la composición del secretoma del ECV inducido por astrocitos activados por factores tumorales. Más en concreto, demostró que el microambiente tumoral (MAT) en condiciones de deprivación de oxígeno (hipoxia), estrés oxidativo, estímulo mecánico e inflamación, activaron en tumores con sobreexpresión de Her2, la producción de factores estimulantes de astrocitos, cuyo efecto sobre el ECV propició su paso a un estado neuroespecífico proinflamatorio, caracterizado por su aumento en la expresión génica de *Clau-1*, *Vcam-1* y *Pecam-1* (implicados en la regulación de las relaciones

intercelulares), de *Vegfr-2*, *Rage* y *Col-IV* (implicados en la regulación de la diferenciación endotelial) y de *Pgp* (implicado en la regulación de los intercambios moleculares transcelulares); también la producción de un secretoma enriquecido en proteínas implicadas en los procesos de desarrollo neural, regulación neurovascular y de la BHE, neuroinflamación, neuroprotección, neurotrofismo, neurodegeneración y desarrollo tumoral.

De esta forma se pudo verificar la hipótesis planteada en el proyecto, y concluir que el crecimiento metastásico precoz en el microambiente perivascular del cerebro alteró la función de los astrocitos que regulan el endotelio de la BHE, contribuyendo la sobreexpresión de Her2 a la clase de respuesta funcional del tumor en el microambiente perivascular, con respecto a su efecto regulador del ECV por intermediación de los astrocitos perivasculares.

SUMMARY

Brain metastasis is an important cause of death in patients with advanced cancer, and its development begins in a functional microenvironment regulated by cerebrovascular endothelium (CVD) and astrocytes of the blood-brain barrier (BBB). However, its molecular pathogenesis is largely unknown, and there are no molecular biomarkers alerting us on the risk of suffering brain metastasis, or that might represent good targets for therapy.

The aim of the project was to study the neurovascular microenvironment and the growth pattern of brain metastasis and, more specifically, the transcriptional activity and the secretome of the ECV in response to soluble factors from - astrocytes activated by breast cancer cell with or without HER2 overexpression, exposed or not to tumor microenvironment factors.

Results showed that initial growth of both experimental and clinical brain metastases occurred in the perivascular space, with the original blood-brain barrier (BHE) being split into two new barriers, an internal hematotumoral (between blood and metastatic tissue), and another external neurotumoral (between metastatic tissue and unaffected brain tissue).

Next, in vitro models recapitulating the functional interrelationship operating in the brain metastasis microenvironment among cancer cells, perivascular astrocytes and ECV cells, demonstrated for first time an alteration in gene expression and composition of the ECV secretome induced by tumor-activated astrocytes. More specifically, we showed that the tumor microenvironment (MAT) in conditions of oxygen deprivation (hypoxia), oxidative stress, mechanical stimulation and inflammation, activated the production of astrocyte stimulating factors from Her2-overexpressing tumors, inducing CVE cell passage to a proinflammatory neuro-specific state, defined by increased gene expression of *Clau-1*, *Vcam-1* and *Pecam-1* (involved in the regulation of intercellular relationships), *Vegfr-2*, *Rage* and *Col-IV* (involved in the regulation of endothelial differentiation) and *Pgp* (involved in the regulation of transcellular molecular exchanges); and production of a secretome enriched in proteins involved in the processes of neural

development, neurovascular and BHE regulation, neuroinflammation, neuroprotection and neurotrophism, neurodegeneration and tumor development.

Therefore, we verified the hypothesis raised in the project, and conclude that early metastatic growth in the perivascular microenvironment of the brain altered the function of the astrocytes that regulate the BBB endothelium, contributing the overexpression of Her2 to the functional response of the tumor to the perivascular microenvironment, with respect to regulating CVE via perivascular astrocytes.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN 1

A. PATOGENIA CELULAR Y MOLECULAR DE LA METÁSTASIS 1

1. Encéfalo-tropismo de los tumores malignos 3

2. Patogenia de la metástasis cerebral 4

B. ESTRUCTURAS Y FUNCIONES DEL SNC ASOCIADAS AL PROCESO DE METÁSTASIS 5

1. La barrera hematoencefálica (BHE) 7

2. La estructura celular de la BHE 9

3. Inmunidad antitumoral del encéfalo 13

C. MODELOS EXPERIMENTALES DE METÁSTASIS CEREBRAL 15

D. CÁNCER DE MAMA 19

E. BIOMARCADORES VASCULARES DURANTE LA METÁSTASIS CEREBRAL 23

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 31

A. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA 31

B. PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS 36

C. OBJETIVOS DEL PROYECTO 36

D. DISEÑO EXPERIMENTAL. 37

III. MATERIALES Y METODOS 41

A. LÍNEAS CELULARES 41

B. CRIOPRESERVACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE LOS CULTIVOS 42

C. OBTENCIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS 43

1. Líneas celulares en condiciones basales 43

2. Líneas celulares tumorales de cáncer de mama con o sin sobreexpresión de Her2 y exposición o no a factores del microambiente tumoral 44

3. Astrocitos activados por factores solubles tumorales y cocktail del microambiente tumoral 46

D. VIABILIDAD CELULAR 48

E. ESTUDIO TRANSCRIPCIONAL 49

1. Extracción de ARN de líneas celulares 49

2. Métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa 49

3. qRT-PCR semicuantitativa 50

F. DETERMINACIÓN POR WESTERN-BLOT DEL RECEPTOR HER2 EN LÍNEA CELULAR MDA 231 BR HER2 53
G. ESTUDIO PROTEÓMICO 54
1. Determinación de la concentración de proteínas en los medios condicionados de THBEC 54
2. Estudio del perfil de expresión proteico 54
3. Procesamiento de datos obtenidos por LC/MSMS 56
H. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE PACIENTES 56
I. PROCESADO DE MUESTRAS HISTOLOGICAS 58
1. Estudio inmhohistoquímico 58
2. Inmunoflurorescencia de las biopsias de ratón 61
3. Microscopía y escaneado de imágenes y análisis estadístico 62
IV. RESULTADOS 65
A. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y MICROAMBIENTALES DEL PROCESO DE COLONIZACIÓN CEREBRAL EXPERIMENTAL DE LA LÍNEA CELULAR HUMANA 231-BR-HER2 DE CÁNCER DE MAMA 65
B. ESTUDIO DEL PROCESO METASTÁSICO CEREBRAL DE PACIENTES CON CÁNCER 70
C. RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL DEL ENDOTELIO CEREBROVASCULAR A FACTORES SOLUBLES DEL ASTROCITO, TRAS SU ACTIVACIÓN POR FACTORES SOLUBLES DEL CÁNCER DE MAMA CON O SIN SOBREEXPRESIÓN DE *Her2* Y EXPOSICIÓN O NO A ESTÍMULOS DEL MICROAMBIENTE TUMORAL 81
D. COMPOSICIÓN MOLECULAR DEL SECRETOMA DE ENDOTELIO CEREBROVASCULAR INDUCIDO POR ASTROCITOS ACTIVADOS POR CÁNCER DE MAMA, INFLUENCIA DE LA EXPRESIÓN DE *Her2* Y EXPOSICIÓN A FACTORES DEL MICROAMBIENTE TUMORAL 91
V. DISCUSIÓN 103
A. CONTRIBUCIÓN DE LA ESTRUCTURA NEUROVASCULAR AL DESARROLLO DEL MICROAMBIENTE FUNCIONAL DE LA METÁSTASIS CEREBRAL 104
B. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL ENDOTELIO CEREBROVASCULAR POR ASTROCITOS ACTIVADOS POR FACTORES TUMORALES 108
C. COMPOSICIÓN MOLECULAR DEL SECRETOMA ENDOTELIAL CEREBROVASCULAR Y SU REGULACIÓN POR ASTROCITOS ACTIVADOS POR FACTORES TUMORALES 111
D. IMPLICACIONES TRASLACIONALES Y FUTUROS ESTUDIOS 129
VI. CONCLUSIONES 133
VII. BIBLIOGRAFÍA 137
VIII. ANEXO 187

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Formación de metástasis.....3
Figura 2: Etapas en la formación de la metástasis cerebral. 5
Figura 3: Interacción de las células del SNC con células de tumor..... 6
Figura 4: Esquema de la interacción en el cerebro entre células tumorales invasoras y células nerviosas..... 19
Figura 5: Esquema de la obtención de medios condicionados.....45
Figura 6: Detección por WB de HER2.....53
Figura 7: Caracterización del microambiente metastásico originado por células de cáncer de mama humanas 231-BR-HER2 en el cerebelo de ratón.....65
Figura 8: Caracterización del microambiente metastásico originado por células de cáncer de mama humanas 231-BR-HER2 en el cerebelo de ratón..... 66
Figura 9: Marcaje con Col-IV y CD31.....67
Figura 10: Marcaje con Ki67 y CD31..... 68
Figura 11: Marcaje CD11b/CD45 y CD31.. 69
Figura 12: Técnica de Inmunohistoquímica realizada en muestras humanas de resecciones de metástasis cerebral utilizando anticuerpo frente a multicitoqueratina AE1/AR3. 71
Figura 13: Técnica de Inmunohistoquímica realizada en muestras humanas de resecciones de metástasis cerebral utilizando anticuerpo frente a multicitoqueratina AE1/AR3. 72
Figura 14: Técnica de Inmunohistoquímica realizada en muestras humanas de resecciones de metástasis cerebral utilizando anticuerpo frente a CD31. 73
Figura 15: Técnica de Inmunohistoquímica realizada en muestras humanas de resecciones de metástasis cerebral utilizando anticuerpo frente a Claudina-5. 74
Figura 16: Técnica de Inmunohistoquímica realizada en muestras humanas de resecciones de metástasis cerebral utilizando anticuerpo frente a CSPG4.....75
Figura 17: Técnica de Inmunohistoquímica realizada en muestras humanas de resecciones de metástasis cerebral utilizando anticuerpo frente a Colágeno tipo IV.....
....92**Figura18:** Colágeno tipo IV. 77
Figura 19: Técnica de Inmunohistoquímica realizada en muestras humanas de resecciones de metástasis cerebral utilizando anticuerpo frente a Colágeno tipo IV. 78
Figura 20: Técnica de Inmunohistoquímica realizada en muestras humanas de resecciones de metástasis cerebral utilizando anticuerpo frente a GFAP..... 79
Figura 21: Técnica de Inmunohistoquímica realizada en muestras humanas de resecciones de metástasis cerebral utilizando anticuerpo frente a GFAP..... 80
Figura 22: Técnica de Inmunohistoquímica realizada en muestras humanas de resecciones de metástasis cerebral utilizando anticuerpo frente a PDGFRβ fosforilado..... 81
Figura 23: Ensayo de viabilidad y proliferación de astrocitos humanos durante 24 horas.....82
Figura 24: Ensayo de MTT sobre viabilidad y proliferación del ECV en cultivo tras su exposición a los medios condicionados de Astrocitos humanos activados durante

24 y 48 horas por medios condicionados de cáncer de mama con y sin HER2 y exposición a factores del MAT.. 84
Figura 25: Análisis mediante qRT-PCR de la respuesta transcripcional in vitro del ECV al medio condicionado de astrocitos humanos en condiciones basales de cultivo. 85
Figura 26: Resultados sobre la expresión del grupo de genes asociados a las relaciones intercelulares del ECV. 87
Figura 27: resultados sobre la expresión del grupo de genes asociados a los intercambios moleculares transcelulares del ECV. 88
Figura 28. Resultados sobre la expresión del grupo de genes asociados a la diferenciación endotelial del ECV. 89
Figura 29: Heat map de dos experimentos independientes sobre la expresión génica del ECV 91
Figura 30: Representación mediante matriz de HeatMap del análisis de conglomerados jerárquicos sobre el nivel de similitud entre patrones moleculares de los secretomas del ECV obtenidos tras su exposición durante 24 y 48 horas al medio condicionado tumoral, ... 94
Figura 31: Matrices en forma de HeatMap para representar el grado de similitud y agrupamiento jerárquico de los perfiles de expresión de proteínas en los secretomas obtenidos tras la respuesta celular del ECV al medio condicionado por astrocitos 95
Figura 32: Distribución de las 451 proteínas identificadas en los secretomas obtenidos tras la respuesta del ECV al medio condicionado por astrocitos 96
Figura 33: Distribución mediante diagramas de Venn de las proteínas específicas, observadas únicamente en secretomas de ECV tratados con astrocitos activados 98
Figura 34: Modelo sobre la regulación del microambiente tumoral en la estructura de la metástasis cerebral en desarrollo. 105
Figura 35: Modelo sobre la composición de la metástasis cerebral en su fase de crecimiento perivascular. 107

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación molecular de los subtipos de cáncer de mama y su comportamiento metastásico. 20
Tabla 2: Líneas celulares. 42
Tabla 3: Siglas asignadas a los medios condicionados por células tumorales.....46
Tabla 4: Siglas asignadas a medios condicionados por astrocitos activados por medios condicionados tumorales durante 24 y 48 horas. 47
Tabla 5: Secuencias de los cebadores específicos empleados en las reacciones de qRT-PCR con ADNc.....51
Tabla 6: Secuencias de los cebadores específicos empleados en las reacciones de qRT-PCR con ADNc.....51
Tabla 7: Condiciones empleadas en las qRT-PCRs sobre ADNc y las qPCRs sobre ADNc. 52
Tabla 8: Listado de muestras de cerebro obtenidas por craneotomía. 57
Tabla 9: Pasos para el procesado de fijación e inclusión de biopsias humanas.....58
Tabla 10: Protocolo F Bond Max IHC. 60

Tabla 11: Panel de anticuerpos utilizados para describir: BHE, activación de astrocitos, marcaje tumoral y respuesta inmune. 61
Tabla 12: Anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia en muestras de ratón ... 62
Tabla 13: Proteínas específicas observadas en secretomas de ECV tratados con astrocitos activados 24 y 48 horas por sobrenadante de tumor con o sin sobreexpresión de Her2 y exposición a factores del MAT. 99
Tabla 14: Distribución funcional de las moléculas del secretoma de ECV inducidas por factores solubles del astrocito activado por células del cáncer de mama con o sin sobreexpresión de Her2 y exposición o no a MAT. 128
Tabla 15: Perfil neurofuncional de las moléculas del secretoma de ECV inducidas por factores solubles del astrocito activado por células del cáncer de mama con o sin sobreexpresión de Her2 y exposición o no a MAT. 130

ABREVIATURAS

ABM™	***Astrocyte Basal Medium*. Medio de cultivo de Astrocitos**
AE1/AE3	Citoqueratina AE1/AR3
AGM™	*Astrocyte Growth Medium*
ANHs	*Astrocyte Normal Human*. Astrocitos humanos.
Anti-CSPG4	*Anti-chondroitin sulfate proteoglycan 4*
AT	Medio Ccondicionado ondicionado de Astrocito tumoral
AT-MAT	Medio Condicionado de Astrocito por Microambiente tumoral
BHE	Barrera Hematoencefálica
BMP-2	Proteína morfogénica-2
BSO	DL-butionina-(S, R)-sulfoximina
CAF	Fibroblastos Asociados a Tumor
CAV-1	Caveolina-1
CD31	Hipoxantina fosforribosil-transferasa
CLAU-5	Claudina-5
COL IV A1	Colágeno tipo IV
Ct	Ciclo umbral
DDR-1	Discoidina
DMEM	Medio Esencial Dulbeeco modificado
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA / ADN	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxi-nucleotidos trifosfato
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
ECV	Endotelio Cerebrovascular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factores de Crecimiento Endotelial
EMT	Transdiferenciación Epitelio-Mesénquima
Eph	Efrina
FBS	Suero Fetal Bovino
FGF	Factor de Crecimiento de Fibroblastos
FST	Medio condicionado tumoral basal

GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GFAP	Proteína Glial Fibrilar Acídica
GFP	Proteína verde fluorescente
GLUT-1	Transportador de Glucosa-1
GPP	Glucoproteína P
H_2O_2	Peróxido de Hidrógeno
H2Omq	Agua ultra pura
hBMEC	Human Brain Microvasculature Endothelial Cells
HER2	Receptor 2 de Factores de Crecimiento Epidérmico Humano
HER2/neu	Receptor HER-2
HIF	Factor inducible hipoxia
HPRT-1	Hipozantina-guanina fosforribosiltransferasa l
ICAM-1	Molécula de adhesión Intercelular
IG	Inmunoglobulina
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleucina
JAMs	Moléculas de adhesión
LDLr	Receptor de lipoproteína de baja densidad
LRP-1	Receptor α-2 de Macroglobulina A2MP
MAT	Medico Condicionado de Microambiente Tumoral
MEM	Medio Esencial Modificado
MET	Forma de nombrar las resecciones cerebrales de pacientes
Met-SCs	Células madre metastásicas
MMP	Metaloproteasas de la Matriz
MTT	Bromuro de 3,4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolio
NG-2	Proteoglicano Condroitín Sulfato-4
NGFr	Receptor de factor de crecimiento nervioso
NHA	Normal Human Astrocyte. Astrocito Normal Humano
NSE	Enolasa Específica de Neuronas
PBS	Buffer fosfato salino
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PECAM-1	Molécula 1 de adhesión de Plaquetas
PGP	Glicoproteína P
pPDGFRβ	Receptor de crecimiento derivado de plaquetas fosforilado
RAGE	Receptor de Productos finales de Glicosilación Avanzados
rhEGF	Factor de crecimiento Epidérmico humano recombinante
RNA / ARN	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa
S100β	Proteína β de Unión a Calcio S100
TEER	Alta Resistencia eléctrica transendotelial
TGFβ	Factores de Crecimiento Transformante β
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular-1
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR2	Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular 2
ZO-1	Zónula-1
XRCC6	*x-ray repair cross-complementing protein 6*
AHCY	Adenosilhomocisteinasa

EEF1G	Factor gamma de Elongación 1
ATIC	Proteína Bifuncional de la Biosíntesis de la Purina
DGS1	Oligosacaril transferasa Subunidad 48kDa
MFGE8	Antígeno Epitelial de mama BA46
CCL-2	Proteína quimioatrayente de Monocitos
IL-6	Interleucina 6
S1P3	Receptor 3 de esfingosina 1 fosfato
GSTA5	Glutation S-Transferasa α-5
BCL2L1	Regulador de Apoptosis Bcl-X
TWIST1	Proteina Twist-1
AHSG	*Alpha-2-HS-glycoprotein*
GSN	Gelsolina
DKK3	*Dickkopf-related protein 3*
LDHA	Lactato deshidrogenasa
SRPX	*Isoform 4 of Sushi repeat-containing protein SRPX*
MSN	Moesina
SDC4	*Isoform 2 of Syndecan-4*
DDX39A	*ATP-dependent RNA helicase DDX39A*
FLNB	*Isoform 5 of Filamin-B*
AIFM1	*Isoform 3 of Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial*
GSR	*Isoform 4 of Glutathione reductase,*
CAT	Catalasa

I. INTRODUCCIÓN

A. PATOGENIA CELULAR Y MOLECULAR DE LA METÁSTASIS

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, siendo la metástasis la principal responsable de las muertes por esta patología. La metástasis es el proceso de extensión del cáncer desde su localización inicial hasta otros órganos a distancia.

Hace más de un siglo, Stephen Paget (1898) introdujo la hipótesis sobre *"seed and soil"* para sugerir que el desarrollo de la metástasis no es un proceso azaroso que pueda culminarse en cualquier lugar del cuerpo humano, sino algo órgano-específico, exclusivo de aquellas células tumorales -"the seed"- (la semilla) capaces de crecer en órganos a distancia -"the soil"- (la tierra) al poderse adaptar a su nuevo medio ambiente (Paget et al., 1989). La hipótesis planteaba tres principios: 1) Las neoplasias están compuestas por subpoblaciones celulares heterogéneas con respecto a su potencial metastásico; 2) Solo algunas subpoblaciones celulares se adaptan y crecen en otros órganos; y 3) La colonización requiere la interacción funcional entre las células metastásicas y del nuevo órgano colonizado (Fidler et al., 2002).

Sobre estas bases, se ha propuesto que el proceso de metástasis comprende dos etapas: 1) La migración intravascular y diseminación sanguínea o linfática de células tumorales desde su tumor primario hasta otros órganos del cuerpo y su aposentamiento en tejidos diferentes; y 2) la reproducción del mismo tejido tumoral en nuevos órganos —metástasis— (Chaffer et al., 2011). El proceso comporta una compleja secuencia de etapas denominada la "cascada metastásica" ; (Rahmathulla et al., 2012).

A pesar de su relevancia clínica y prevalencia global, la metástasis es un proceso extremadamente improbable e ineficiente. La evidencia en modelos de ratón sugiere que solo una pequeña fracción de células tumorales tienen la capacidad de crecer y formar tumores secundarios (Cameron et al., 2000; Luzzi et al., 1998; Fomby et al., 2014; Kienast et al., 2010). Como parte de su heterogeneidad

genética y epigenética, las células tumorales presentan una gran variabilidad en su potencial metastásico (Fomby et al., 2014). De hecho, la mayoría de las células tumorales mueren en el torrente circulatorio o en los capilares de los órganos a distancia donde quedan atrapadas (Cameron et al., 2000; Luzzi et al., 1998). Sin embargo, algunas células son capaces de reiniciar el crecimiento en éstos, pudiendo ser consideradas las células madre metastásicas (Met-SCs) (Massagué et al. 2014).

La formación de la metástasis se divide en seis etapas (Robert S. Kerbel et al., 2008): **1)** Crecimiento, neoangiogénesis e invasión tumoral de tejidos locales circundantes del tumor primario; **2)** Invasión tumoral de paredes vasculares y de las células del endotelio vascular (intravasación); **3)** Supervivencia de células tumorales circulantes y formación de embolias tumorales en asociación con las plaquetas; **4)** Extravasación de células tumorales e interacción con el nuevo microambiente del órgano invadido, pudiendo dar lugar a distintas formas (patrones) de crecimiento en función de la respuesta estromagénica, inflamatoria y angiogénica local; **5)** Colonización metastásica, con proliferación y tiempos variables de quiescencia en los órganos colonizados (Figura 1), lo que conlleva la existencia de metástasis sintomáticas (detectables) y asintomáticas (indetectables) habitualmente quiescentes (Nathoo et al., 2005).

Un aspecto relevante del proceso de circulación intravascular sanguíneo de las células tumorales es su adhesión a plaquetas a través de sus integrinas de superficie, lo que las oculta frente a células del sistema inmune (Nieswandt et al., 1999), facilitando su supervivencia. Otro aspecto crítico en el desarrollo de la metástasis es su acceso a nutrientes. El proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes provee al tejido tumoral de oxígeno, factores de crecimiento, nutrientes y metabolitos, este proceso es conocido como angiogénesis y se pone en marcha a través de factores pro angiogénicos (S. H. Lee et al., 2015; Rak et al., 2004), aunque en modelos preclínicos se ha visto que las metástasis experimentales (mucho más pequeñas) pueden crecer hasta cierto tamaño (1-3 mm) aprovechando vasos pre-existentes. La neoangiogénesis tumoral la promueven factores de crecimiento como VEGF, angiopoyetina, epfrina (Eph),

factor de crecimiento derivado de plaquetas (PEDGF), TGF-beta o el factor de crecimiento fibroblástico. A su vez, VEGF también estimula pericitos (Friedl et al., 2003) y contribuye a regular la supervivencia, proliferación e invasión de las propias células tumorales a través de la ruta de señalización Erk1 / 2 y PI3K (Graells et al., 2004; Price et al., 2001). Más aún, el tratamiento con anticuerpos contra ligando VEGF (bevacizumab) junto con quimioterapia (paclitaxel) produce experimentalmente efectos antimetastásicos.

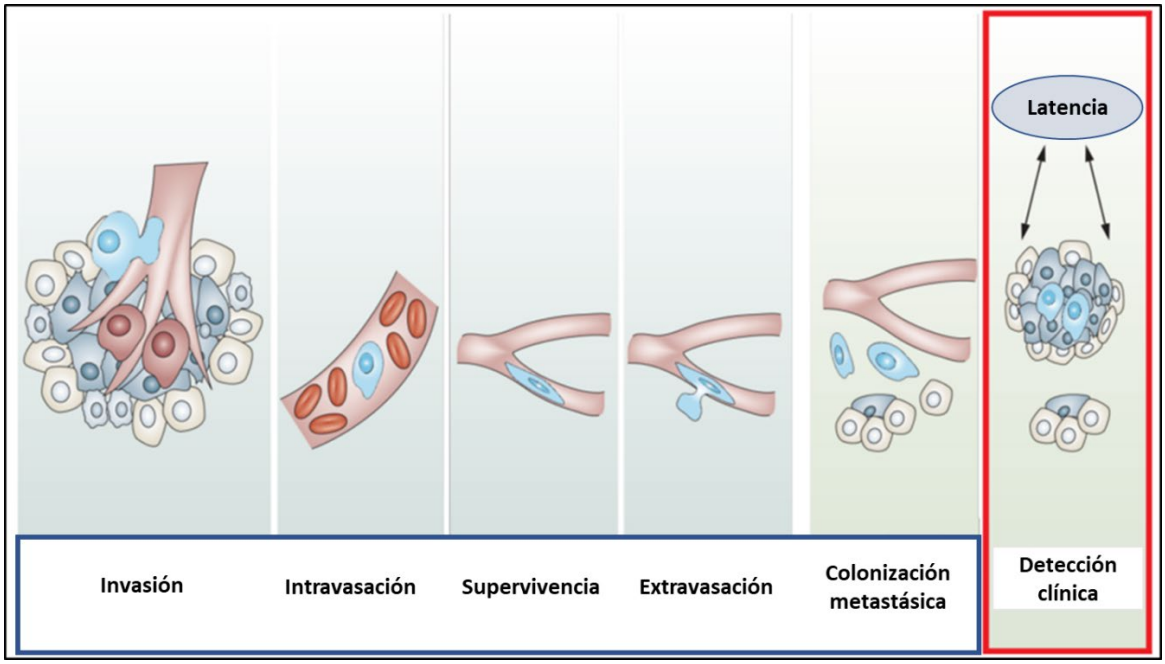


Figura 1: Formación de metástasis. Después de que el proceso de angiogénesis se ha dado con éxito, los tumores primarios invaden el torrente sanguíneo formando embolias y quedándose atrapadas en los capilares de órganos distantes. Las células tumorales se unen a la pared vascular y se extravasan. En microambientes favorables, las células comienzan a proliferar y finalmente desarrollan metástasis (Robert S. Kerbel et al., 2008).

1. *Encéfalo-tropismo de los tumores malignos*

La metástasis cerebral aparece aproximadamente en el 35% de los pacientes que sufren cáncer. Sin embargo, no todos ellos son detectados hasta el momento de la autopsia (Berghoff et al., 2013; N. U. Lin et al., 2013; Termini et al., 2014). Este tipo de metástasis es un criterio de exclusión en ensayos clínicos, ya que provocan sintomatología neurológica que afecta a la calidad de vida de los pacientes. Por este motivo, las terapias disponibles se limitan a la radioterapia paliativa y la cirugía, siendo el acceso de los quimioterapéuticos muy limitado a través de la BHE (Kondziolka et al., 2014; Termini et al., 2014). Los tumores malignos muestran una

gran variabilidad en su patrón de metástasis. Algunos producen metástasis en órganos muy específicos (por ejemplo, los tumores de próstata lo hacen en hueso, los melanomas oculares en hígado y los sarcomas en los pulmones). Otros tumores, como, el cáncer de mama triple negativo, los melanomas cutáneos, el cáncer de pulmón y renal, sufren recidivas en múltiples órganos. La anatomía vascular puede distribuir las células tumorales hacia un órgano en particular, como ocurre en la circulación mesentérica que dirige las células de cáncer colorrectal al hígado. Sin embargo, cuando las células tumorales llegan a la vía arterial, entonces alcanzan numerosos órganos, incluido el Sistema Nervioso Central (SNC).

2. *Patogenia de la metástasis cerebral*

Las células tumorales metastásicas únicamente llegan al SNC a través de vasos sanguíneos, ya que este no tiene circulación linfática. La aparición de metástasis encefálicas se correlaciona con el flujo sanguíneo y el volumen de tejido en cada parte del SNC. De este modo, el 80% de los tumores se detectan en los hemisferios cerebrales, el 15% en cerebelo y el 5% en tronco del encéfalo (Delattre et al., 1988).

Cuando entran en la circulación sanguínea del cerebro, las células tumorales quedan atrapadas en áreas de bajo flujo sanguíneo, como los puntos de ramificación vascular (Eichler et al., 2012; Kienast et al., 2010). A continuación, las células tumorales retenidas interaccionan con la superficie luminal del endotelio, sin que esté completamente esclarecido cuando y en virtud de qué circunstancias se produce la extravasación tumoral en el SNC (Kienast et al., 2010) (Carbonell et al., 2009). Más aún, experimentalmente se ha visto que las células tumorales aposentadas en el cerebro siguen interactuando con las paredes de los capilares sanguíneos después de la extravasación, uniéndose al lado abluminal de los vasos existentes y creciendo a lo largo de ellos. Este proceso es conocido como "cooptación" vascular porque implica el que las células tumorales no requieran de un proceso neoangiogénico durante su crecimiento metastásico (Figura 2).

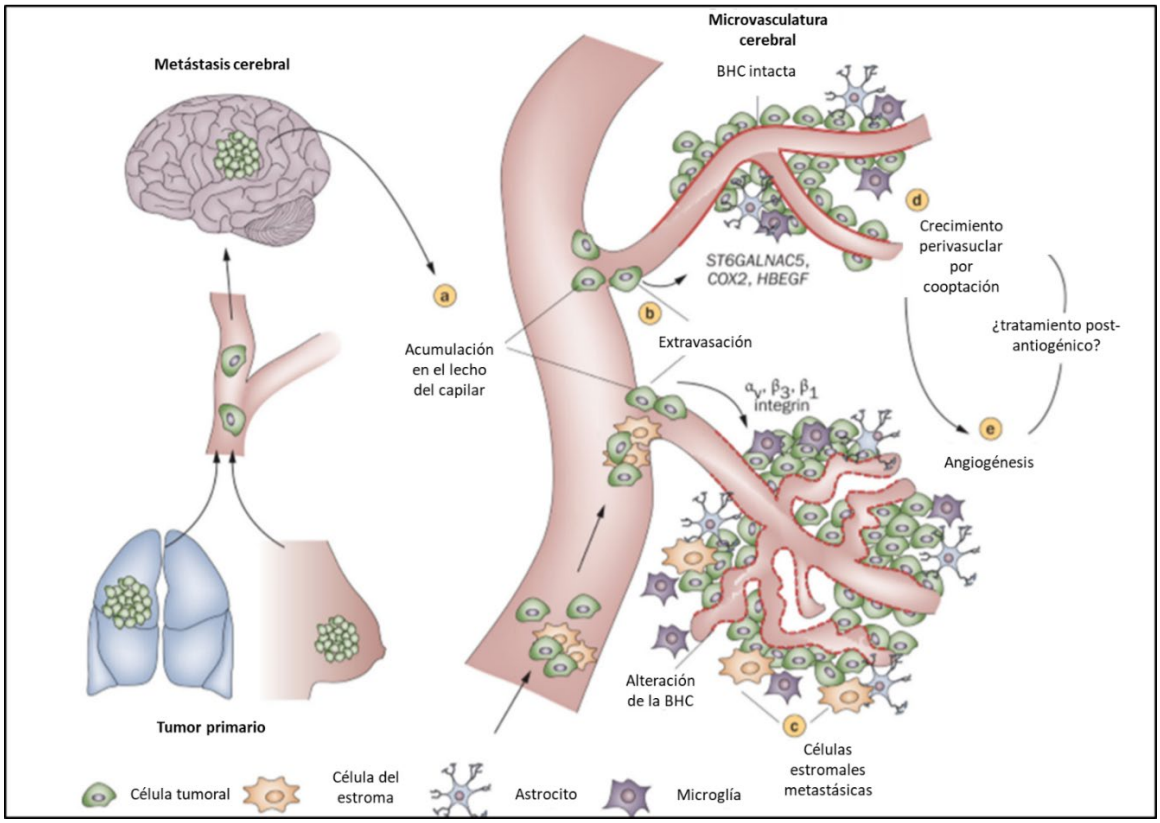


Figura 2: Etapas en la formación de la metástasis cerebral. Las células del tumor primario entran en el torrente sanguíneo, **a)** quedan atrapadas en los capilares cerebrales, debido, primero a las restricciones de tamaño, y **b)** se extravasan a través de la BHE accediendo al parénquima cerebral. Genes implicados en la extravasación: ST6GALNAC5, HBEGF y COX2. También, activación de la integrina regula el arresto de las células tumorales y su adhesión al endotelio. **c)** Las células tumorales metastásicas (the seed) pueden traer consigo sus propias células hospedadoras (the soil). Después de la extravasación, las células tumorales pueden **d)** crecer a lo largo de vasos preexistentes (co-option) o **e)** iniciar angiogénesis para obtener suficiente cantidad de nutrientes. Adaptado de (Eichler et al., 2012).

B. ESTRUCTURAS Y FUNCIONES DEL SNC ASOCIADAS AL PROCESO DE METÁSTASIS

Las células nerviosas y gliales del encéfalo, junto con las estructuras neurovasculares y las moleculares que ocupan su espacio intersticial se modifican funcionalmente durante el proceso de metástasis, aunque las consecuencias pro- y anti-metastásicas se desconocen en gran parte. Por ejemplo, las células madre neurales pueden diferenciarse en neuronas o células gliales en virtud de señales moleculares que surgen durante el desarrollo o tras la lesión cerebral, pero su papel en la metástasis es todavía materia de investigación. Se han identificado células madre neurales en muestras histológicas de pacientes con metástasis cerebral de cáncer de mama y parénquima cerebral adyacente. Así mismo, los astrocitos reactivos también se observan con frecuencia, siendo comparables a los de cicatrices

gliales de pacientes con lesiones cerebrales traumáticas. Por otra parte, las células metastásicas sobreexpresan la proteína morfogénica ósea 2 (*BMP-2)*, una señal molecular en la diferenciación de astrocitos a partir de células neurales indiferenciadas, y en co-cultivos de células metastásicas y células madre neurales se ha observado que estas últimas inhiben el crecimiento de células tumorales (Figura 3). Otro componente celular del SNC con efectos sobre células tumorales es la misma neurona a través de sus neurotrofinas (NGF, BDNF, NT-3, NT-4), que fisiológicamente regulan las células madre neurales de la zona subgranular del giro dentado y subventricular de los lóbulos frontales en el cerebro (Termini et al., 2014).

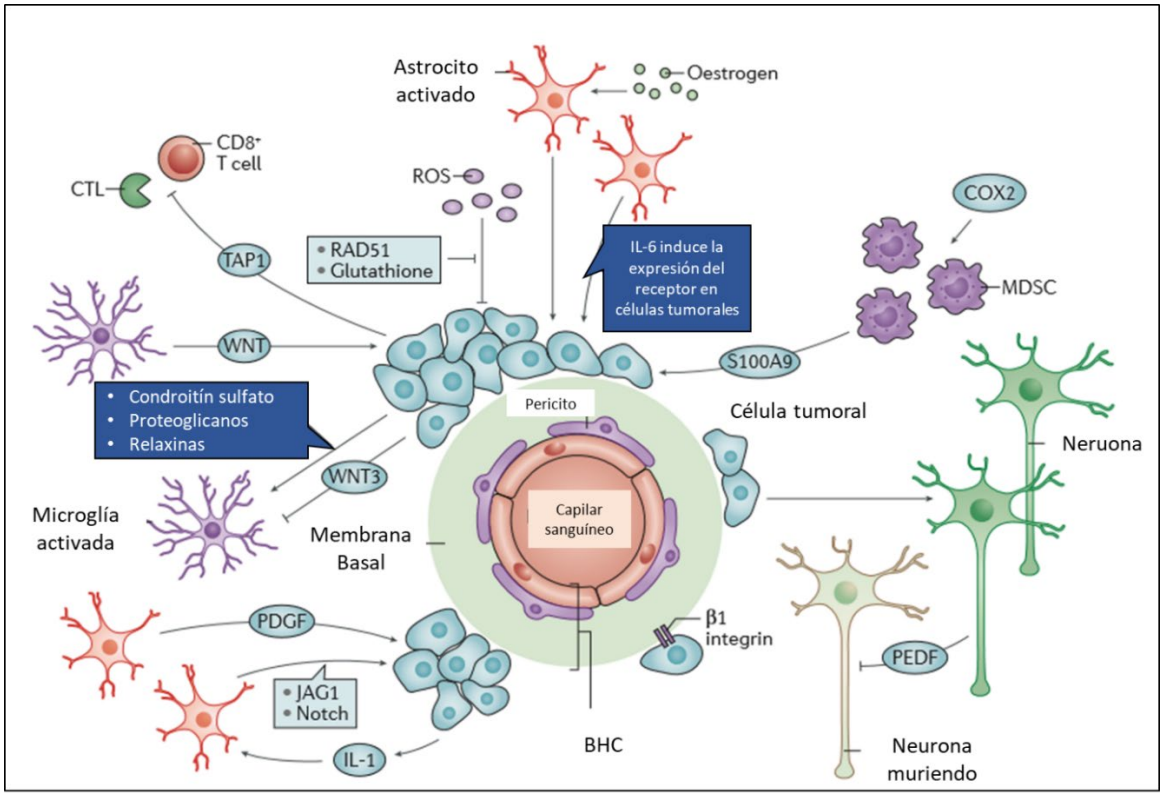


Figura 3: Interacción de las células del SNC con células de tumor. Los astrocitos activados se congregan alrededor de la metástasis en desarrollo y son estimulados por citoquinas derivadas del tumor (Xing et al., 2013). Los astrocitos producen factores de crecimiento que estimulan a las células tumorales del microambiente (Gril et al., 2013) incrementando la expresión de receptores para las citokinas (Noda et al., 2013). Hormonas como el estrógeno pueden activar los astrocitos y estimular la colonización (Sartorius et al., 2015). La microglía activada, semejante a los macrófagos residentes, rodean la metástasis en desarrollo. Su activación está determinada por un equilibrio entre factores de activación o inhibición secretados por las células tumorales (Binder et al., 2014; Louie et al., 2013; Pukrop et al., 2010; Silver et al., 2013). A su vez activan las células tumorales a través de la vía Wnt. En una fase pre-metastásica en el cerebro se encuentran infiltradas células supresoras de derivados mieloides (MDSCs) (Liu et al., 2013), favorecido por ciloxigenasa 2 (COX2) y células T. Las células tumorales bloquean la respuesta de las células T el transportador 1 ATP (TAP1, también conocido como ABCB2) (Liu et al., 2012). El microambiente cerebral establece un mecanismo de protección mediante la secreción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (E. I. Chen et al., 2007). La sobreexpresión de genes de reparación de ruptura de ADN de doble hélice por las células tumorales

atenúa el daño sobre el ADN inducido por ROS (Liu et al., 2012) además el aumento en la expresión de serpinas inactivan las señales de muerte celular originadas desde el microambiente (Fomby et al., 2014).

1. *La barrera hematoencefálica (BHE)*

La BHE es una estructura neurovascular situada entre la sangre y el parénquima cerebral, que proporciona protección anatómica y fisiológica al SNC, a la vez que le suministra nutrientes y devuelve a la sangre sus sustancias de desecho protegiéndolo de su toxicidad. La BHE consta de cuatro elementos principales: las células endoteliales, su membrana basal, los pies de astrocitos (que forman la membrana glial perivascular) y los pericitos (Correale et al., 2009) que regulan la diferenciación del endotelio y sirven como conectores funcionales entre endotelio y astrocitos. Así mismo, a su alrededor se encuentran las células de la microglía.

Las células endoteliales de la BHE crean entre ellas uniones estrechas que diferencian su compartimento luminal y abluminal. Además, para mayor eficiencia en su función de barrera selectiva, carecen de poros (fenestraciones), para mayor eficiencia en su acción como barrera selectiva y tienen una baja permeabilidad a iones y moléculas pequeñas, así como son muy poco permeables a macromoléculas y péptidos, careciendo de pinocitosis para así evitar la transcitosis. Cuando las células tumorales invaden la BHE y se establece la metástasis, las células endoteliales también forman una barrera hematotumoral ineficiente se acompaña con frecuencia de edema intersticial alrededor de la lesión metastásicas debido al aumento en la permeabilidad de las células endoteliales asociadas al tumor, que permiten la entrada de proteínas y agua al parénquima cerebral que rodea al tumor (Lesniak et al., 2004). Las células gliales proporcionan soporte estructural a las neuronas y confieren integridad a la BHE.

Estudios sobre la ultraestructura de las células endoteliales han verificado la importancia fisiopatológica de sus uniones estrechas, localizadas en sus márgenes para limitar el paso de sustancias por mecanismos intercelulares, y su elevado número de mitocondrias, evidencia de su alta actividad metabólica para el soporte

energético de los intercambios a través de la barrera (Correale et al., 2009; Bearer et al., 1985; Brightman et al., 1969; Lane et al., 1992; Villegas et al., 1993; Dorovini-Zis et al., 1991). Sin embargo, el endotelio cerebral también comparte con otros endotelios algunas características, como la presencia del factor VIII, su elevada concentración de fosfatasa alcalina y su actividad gamma-glutamil-transpeptidasa, su absorción de lipoproteína acetilada de baja densidad, su alta resistencia eléctrica transendotelial (TEER) (Gaspar et al., 2010; Jia et al., 2014).

La identificación de moléculas específicas de las células endoteliales del SNC ha conducido al descubrimiento de componentes estructurales y de transporte importantes para la BHE, y más en particular de sus uniones estrechas, donde se ha identificado moléculas transmembrana de interacción homotípicas y heterotípicas y al citoesqueleto. Entre estas moléculas transmembrana se incluyen claudinas, ocludinas, y moléculas de adhesión (JAMS) (Furuse et al., 2010). Las **claudinas** son tetraspaninas que forman más de 25 familias diferentescaracterizadas por un domino w-glw-c-c en el primer *loop* extracelular (Gupta et al., 2010). Los ensayos *in vitro* sugieren que las claudinas son esenciales para la formación de la barrera paracelular. La Claudina-5 se expresa mucho en células endoteliales del SNC, y los ratones que carecen de esta Claudina poseen una filtración alterada a través de la BHE (Nitta et al., 2003). Otras claudinas, como la cldn12 y cldn3 se han identificado también en la BHE (Daneman et al., 2010). La **ocludina** es una tetraspanina que expresan células epiteliales y endoteliales del SNC. Es importante para la resistencia de la barrera y su deficiencia comporta la aparición de calcificaciones en el SNC lo que sugiere que pueda regular el flujo de calcio a través de la BHE (Saitou et al., 2000). Las **JAMS** son de la superfamilia de las inmunoglobulinas y forman interacciones que contribuyen a regular la extravasación de los leucocitos y la permeabilidad paracelular (Ludwig et al., 2005). Curiosamente muchas de las proteínas identificadas en las uniones estrechas de células endoteliales del SNC (cldn5, cldn12, ZO-1 y ZO-2), se expresan también en células endoteliales de otros tejidos. Estudios de análisis transcripcional comparando células endoteliales del SNC y células endoteliales de órganos extracorticales, sugieren que varios adaptadores citoplasmáticos, como jacop y MPP7, así como LSR y marveld2, están

más expresados en la BHE, sugiriendo que estas moléculas puedan ser la clave para la formación de la barrera (Daneman et al., 2010).

2. *La estructura celular de la BHE*

Los pericitos son células que se encuentran en la superficie abluminal de la pared endotelial, embebidos en la propia membrana basal vascular (Sims et al., 1986). La dificultad a la hora de estudiar los pericitos es la falta de un marcador específico que se exprese únicamente en este tipo celular, por lo que estas células a menudo se confunden con otras que también se disponen en el espacio perivascular. Actualmente, el marcador molecular ampliamente aceptado para pericitos del SNC es de reactividad positiva para PDGFR-beta y NG2; pero existen otros marcadores como CD31, desmina, Rgs5, Abcc9, Kcnj8, Dlk y Zic1 (Armulik et al., 2011).

Los pericitos se encuentran en contacto con las células endoteliales a través de uniones de comunicación directa establecidas entre los dos tipos celulares (Armulik et al., 2005). Las interacciones pericito – célula endotelial contribuyen a regular la angiogénesis, la formación y mantenimiento de la BHE, la estabilidad y angioarquitectura vascular, la regulación del flujo sanguíneo celular y la eliminación de productos tóxicos del metabolismo celular necesarios para mantener la homeostasia del SNC y su buen funcionamiento neural (Fomby et al., 2011). La ausencia o mal funcionamiento de los pericitos se asocia a las enfermedades neurodegenerativas del SNC (Dalkara et al., 2015; Jia et al., 2014).

El pericito extiende largos procesos celulares a lo largo de la superficie abluminal del endotelio que a menudo pueden abarcar varios cuerpos de células endoteliales. Estas proteínas poseen proteínas contráctiles por lo que tienen capacidad de contracción permitiendo controlar el diámetro del capilar (Hall et al., 2014). Aunque estas células revisten el tubo endotelial, la mayor parte de su cuerpo celular y sus procesos no están en contacto directo con el endotelio, del que están separadas por la membrana basal. Los procesos del pericito forman adhesiones celulares con el endotelio en puntos concretos, que se conocen como uniones "*peg-and-socket junctions*" y están mediadas por la molécula de adhesión N-cadherina

(Gerhardt et al., 2000). Se pueden dar otro tipo de adhesiones celulares por ejemplo: placas de adhesión, uniones de comunicación directa y uniones estrechas (Diaz-Flores et al., 2009).

Los pericitos del SNC tienen su origen en la cresta neural, mientras que los que encontramos en el resto de tejidos provienen del mesodermo (Majesky et al., 2007). Además, la microcirculación del SNC tiene mayor número de pericitos cubriendo los microcapilares que cualquier otro órgano, con un ratio Endotelio:Pericito entre 1:1 y 3:1; mientras que en el músculo tiene una relación de 100:1 (Shepro et al. 1993). Se ha sugerido que los pericitos son células madre del SNC y contribuyen a la formación de la BHE durante el desarrollo, y a su mantenimiento funcional en la edad adulta (Armulik et al., 2011).

El capilar del SNC está rodeado por dos membranas basales, la más interna es la **membrana basal vascular** y la más externa la **membrana basal parenquimal** (Sorokin et al., 2010). La membrana basal vascular es una matriz secretada por la célula endotelial y el pericito, mientras que la membrana basal parenquimal es secretada por procesos astrocíticos que se extienden a lo largo del capilar. Estas membranas están compuestas por diferentes concentraciones moleculares de colágeno tipo IV, laminina, nidogen, proteoglicanos heparin sulfato y otras glucoproteínas. Por ejemplo, la membrana basal vascular posee laminina A4 y A5, mientras que la parenquimal contiene del tipo A1 y A2 (Sorokin et al., 2010). Estas membranas basales hacen de puntos de fijación y señalización y contribuyen a la barrera frente a moléculas y células que cruzan hacia el tejido neural. La ruptura de estas membranas por metaloproteasas de matriz producidas por la respuesta inflamatoria de diversas causas puede alterar el efecto de barrera a la difusión de moléculas y la infiltración de leucocitos, hecho que se puede observar en algunos trastornos neurológicos (Daneman et al., 2015).

Otro componente crucial de la BHE es la estructura glial constituida por los **astrocitos.** Éstos fueron considerados inicialmente los encargados del apoyo estructural y metabólico de las neuronas y más recientemente de la comunicación con neuronas a través de vías de señalización de Ca^{2+} (Abbott et al., 2006). Las

prolongaciones o pies de astrocitos que recubren casi en su totalidad la pared de los capilares del SNC, engloban a células endoteliales y pericitos (Kacem et al., 1998). Sin embargo, el recubrimiento no es total, lo que permite un contacto directo entre terminaciones nerviosas y membrana basal capilar (Paspalas et al., 1996; Cohen et al., 1997).

Los astrocitos regulan la permeabilidad de la BHE a iones y agua (W. Jia et al., 2014). A tal efecto, los astrocitos expresan un conjunto de proteínas —entre las que se incluyen distroglicano, distrofina y aquaporina 4— que son importantes para la unión del citoesqueleto del pie de astrocito a la membrana basal (Wolburg et al., 2011). Este acoplamiento neurovascular sitúa al astrocito como bisagra neurovascular en la regulación de las señales de flujo sanguíneo en respuesta a la actividad neuronal (Gordon et al., 2011). Esto incluye la regulación de la contracción/dilatación de las células de musculo liso vasculares, así como de los pericitos de los capilares y arteriolas cercanos.

Los astrocitos se han identificado como importantes mediadores en la formación y función de la BHE, ya que los astrocitos, en ensayos de trasplantes, inducen propiedades de barrera en vasos sanguíneos que no pertenecen al SNC, o en cultivo *in vitro* de células endoteliales (Janzer et al., 1987; Abbott et al., 2006). Un problema con estos estudios es que los astrocitos que se utilizan se obtienen a menudo de cerebros de ratones neonatales y pasan a través de una serie de ciclos de división celular, lo que sugiere que estos estudios están analizando células progenitoras en vez de astrocitos maduros. De hecho, datos recientes que analizan la BHE en embriones de roedores sugieren que la BHE se forma antes de que lleguen los astrocitos para formar el recubrimiento vascular, y por tanto, estas células no juegan un papel en la inducción inicial de la BHE (Daneman et al., 2010). La identificación de factores secretados por astrocitos que regulan la función de la BHE sugiere que los astrocitos maduros modulan y mantienen la BHE una vez formada (Daneman et al., 2015). En estudios previos también se ha observado que la inflamación e hipoxia intervienen en la ruptura de la BHE (Yang et al., 2013). En modelos *in vitro* de BHE se ha observado que las neuronas y astrocitos, sometidos a

condiciones de estrés metabólico durante la isquemia cerebral , también intervienen en la regulación de la BHE (Chaitanya et al., 2014). Sin embargo, aún no está claro si la falta de disponibilidad de glucosa u oxígeno, o una combinación de ambas condiciones, están implicadas en el proceso.

Por otro lado, los astrocitos reactivos localizan las células tumorales de cáncer de mama incluso antes de la extravasación y se asocian a ellas durante el proceso de transmigración y del crecimiento de la lesión e inducen la protección (Lorger et al., 2010). Los astrocitos reactivos favorecen la protección de las células tumorales frente a la quimioterapia, secuestrando el calcio del citoplasma de las células tumorales y activando la regulación de genes de supervivencia en células tumorales (S.-J. Kim et al., 2011a; Q. Lin et al., 2010). Por otra parte, los astrocitos secretan factores solubles que estimulan la proliferación de células tumorales en el microambiente cerebral. Las neurotrofinas tienen una importancia especial en el crecimiento de las células de melanoma en la metástasis (Menter et al., 1995). Además, los astrocitos inducen la proliferación de células tumorales de pulmón y cáncer de mama mediante la liberación de IL-1b, TNF-a y IL-6 (Seike et al., 2011; Sierra et al., 1997).

Desde que se descubrió que la inflamación fomenta la proliferación, supervivencia y migración de células tumorales (Vidal-Vanaclocha et al., 1994), y que las células metastásicas también son capaces de utilizar mecanismos similares a la migración que realizan los leucocitos, es posible que estas citocinas proinflamatorias secretadas por astrocitos no induzcan la proliferación tumoral, sino que también apoyen la migración transendotelial y la formación de metástasis en el SNC. Los astrocitos también producen heparanasa, que contribuye a la especificidad de la metástasis cerebral del melanoma, y MMP-9, que puede favorecer la invasión tumoral y la liberación de factores de crecimiento tras la degradación de la matriz extracelular (Marchetti et al., 2000; Lorger et al., 2010; Wilhelm et al., 2013).

Cuando hay una lesión cerebral se puede limitar su propagación mediante la formación de una cicatriz glial que sella las zonas dañadas. En el cerebro adulto, los astrocitos no son proliferativos y están quiescentes a no ser que sean activados

debido a alguna enfermedad (Anderson et al., 2014). Estos astrocitos reactivos se hipertrofian y aumentan sus niveles de expresión de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en un proceso llamado gliosis. La ablación experimental de la proliferación de astrocitos reactivos causa un aumento de pérdida neuronal y desmielinización (Sofroniew et al., 2010). Los astrocitos tienen un papel importante en la formación de cicatrices gliales, protección y reparación neural. La respuesta de los astrocitos a la lesión involucra a otras células del SNC como células progenitoras de oligodendrocitos residentes, que participan en la gliosis y la regeneración. Los progenitores de oligodendrocitos secretan localmente Proteoglicano Condroitín Sulfato 4 (NG2), que disminuye el crecimiento axonal *de novo* (Busch et al., 2010).

El papel de los astrocitos en la metástasis cerebral ha sido abordado por varios grupos de investigación. Los primeros trabajos demostraron que su papel en la señalización paracrina a través de la liberación de citocinas por astrocitos favorecía la formación de metástasis cerebral. Además de la liberación de diversas interleucinas, los astrocitos reactivos activan la sobreexpresión de genes relacionados con la supervivencia (*GSTA5, BCL2L1, TWIST1*) en las células de cáncer de mama, lo que se traduce en mayor resistencia a la quimioterapia (S.-J. Kim et al., 2011b). Por otra parte, en relación directa con los mecanismos frente a la eficiencia al tratamiento, la inhibición con pazopanib del receptor β+ de PDGF en astrocitos, previene el crecimiento de metástasis cerebrales HER2+ en modelos animales (Gril et al., 2013). La contribución indispensable de los astrocitos en la colonización metastásica está bien establecida y continúa siendo investigada.

3. *Inmunidad antitumoral del encéfalo.*

Los vasos sanguíneos del SNC también interactúan con diferentes tipos de **células del sistema inmune**, tanto de origen hematopoyético como neuroectodérmico. Las principales poblaciones celulares son:

- Macrófagos perivasculares. Se trata de células de linaje monocítico que asientan en el lado abluminal de los vasos sanguíneos cerebrales, en el espacio de Virchow-Robin que contiene el líquido intersticial que rodea venas y arterias a lo largo de su

recorrido desde el espacio subaracnoideo al parénquima cerebral (Polfliet et al., 2001; Hickey et al., 1988). Estando rodeado por piamadre, pero sin comunicación directa con el espacio subaracnoideo. Estas células del sistema inmune proporcionan al SNC una primera acción defensiva innata, fagocitando los productos celulares de deshecho.

- La microglía. Son otro tipo de células que también tienen una relación estrecha con los capilares cerebrales. Junto con los macrófagos perivasculares derivados de la medula ósea, la microglía puede actuar como células presentadoras de antígeno durante la inmunidad adaptativa (Ajami et al., 2007; Keaney et al., 2015). Son células del sistema inmune innato residentes en el parénquima del SNC, que derivan de células progenitoras del saco vitelino y entran en el cerebro durante el desarrollo embrionario. Están implicadas en la regulación del desarrollo neuronal, la respuesta inmune innata y la cicatrización. Actúan como la principal línea de defensa en el cerebro una vez superada la BHE, y sus células pueden existir en uno o dos estados de activación: en la vía de activación clásica M1, la microglía libera citocinas proinflamatorias principalmente IL1-β y TNF-α, mientras que la vía de activación alternativa M2 está implicada en reparación de tejidos, fagocitosis de neuronas dañadas y material extraño, liberando quimiocinas y VEGF que activan vías neurotróficas (Ginhoux et al., 2010). Las células endoteliales del cerebro también pueden secretar moléculas que promuevan la activación microglial. En los capilares de pacientes con Alzheimer liberan elevadas niveles de proteasas neurotóxicas similares a la trombina, y como esta trombina, puede incrementar los niveles de óxido nítrico, activar la microglía y contribuir a la pérdida de neuronas dopaminérgicas (Yin et al., 2010; Huang et al., 2008).

El rol específico de la microglía en la metástasis cerebral es menos conocido a pesar de que la inflamación sea una de las características principales del cáncer, y el papel de la activación de los macrófagos en cáncer haya sido ampliamente estudiado. Se ha visto que la microglía favorece la invasión y colonización del tejido cerebral por las células tumorales de cáncer de mama. Dicha invasión parece ser dependiente de la ruta de señalización Wnt. La microglía y los macrófagos secretan

numerosas citocinas, factores de crecimiento, enzimas y especies reactivas de oxígeno, que directa o indirectamente pueden favorecer el proceso de angiogénesis (VEGF), la proliferación tumoral (EGF), o la invasión de células tumorales metastásicas al cerebro (MMPs) (Lorger et al., 2012). En particular, los estudios sobre células tumorales de cáncer de mama metastásico muestran un perfil de expresión de proteínas que indican una activación mitocondrial que mejora la producción de energía y los mecanismos de defensa frente a la oxidación, y que estimula el metabolismo energético a través del aumento de la glucolisis, la beta oxidación de ácidos grasos y la vía de la pentosa monofosfato (E. I. Chen et al., 2007). De esta forma, la respuesta neuroinflamatoria y el metabolismo de las células metastásicas están interrelacionados funcionalmente en el área perivascular del encéfalo, donde se podría regular la adaptación metabólica de las células tumorales al microambiente cerebral, siendo los determinantes del metabolismo de las células metastásicas posibles dianas terapéuticas (Rao et al. 2006; Svokos et al., 2014; Hu et al., 2009).

Además, las diferentes poblaciones de células inmunes, incluidos neutrófilos, linfocitos T y macrófagos, también interactúan con los vasos sanguíneos del SNC cuando están activados y se cree que regulan propiedades de la BHE en respuesta a infección, lesión y enfermedad mediante la liberación de especies reactivas de oxígeno y otros mediadores que aumentan la permeabilidad vascular (Hudson et al., 2005).

C. MODELOS EXPERIMENTALES DE METÁSTASIS CEREBRAL

Los modelos animales son ampliamente utilizados para estudiar la metástasis cerebral. Algunos se focalizan en las poblaciones celulares iniciadoras de metástasis identificando los factores patogénicos prometastásicos que fomentan la progresión de la enfermedad en el SNC (Langley et al., 2013). En algunos modelos, las células tumorales se inyectan en la circulación arterial del ratón para provocar un elevado número metástasis en el SNC mientras el número de metástasis viscerales es bajo (Schackert et al., 1988). Otra ventaja del modelo experimental es que permite estudiar la retención y extravasación en intervalos de tiempo. Sin embargo, el método tiene sus limitaciones, ya que las células tumorales en cultivo puede que no

utilicen el mismo mecanismo de metástasis que aquellas que se derivan de tumores primarios en los pacientes.

Del mismo modo, debido a que en este modelo las células tumorales no pasan por las primeras etapas del proceso de metástasis, puede ser que favorezca un crecimiento tumoral artificial en el SNC que de otra forma no se produciría. Para superar las limitaciones asociadas a este modelo, otros grupos han optado por el uso de modelos de tumor espontáneos. Este sistema se aproxima más a la diseminación de las células tumorales que se produce en los pacientes, ya que las células tumorales se implantan en su ambiente de forma natural y pasan por todas las etapas de la cascada metastásica. Sin embargo, un inconveniente de los modelos *in vivo* es que consumen mucho tiempo ya que requieren de muchas rondas de implantación tumoral y selección previa de las variantes con mayor potencial metastásico. Además, el reciclado de células tumorales en animales de experimentación no es necesariamente el enfoque más práctico para el examen de muestras de tumor obtenidas de pacientes. Por lo tanto, el desarrollo de un enfoque *in vitro* mejorado, que facilita el aislamiento rápido y caracterización de células tumorales con potencial metastásico podría ser más ventajoso (Langley et al., 2013). A este respecto, la línea celular tumoral de cáncer de mama MDA-MB-231 coloniza preferentemente los pulmones y el cerebro es un modelo ampliamente empleado (Eichler et al., 2012; Müller et al., 2001). Sin embargo, dónde, cómo y con qué rapidez las células MDA-MB-231 migran a través de estas barreras endoteliales de estos órganos específicos siguen sin estar claro. Utilizando la sub-línea MDA-MB-231 "brain seeking" (231-Br) y comparado con las células parentales las 231-Br, se observó que la 231-Br compartía ciertas características con las metástasis cerebrales de pacientes con cáncer de mama tales como las tasas de proliferación, apoptosis, y presencia de microambiente pro-inflamatorio. A este respecto, Lee et al. descubrieron que las células tumorales secretan factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), altamente proinflamatorio, favoreciendo la adhesión y transmigración de las células MDA-MB-231 a través de la monocapa de células endoteliales al alterar su permeabilidad (T.-H. Lee et al., 2003). Así mismo, Fan et al. señaló que VEGF interrumpe las uniones célula - célula del endotelio, lo que permite la exposición de la membrana basal

subyacente y el aumento de la adherencia de las células tumorales a los sitios de unión inter-endotelial (H. Wang et al, 2011). Sin embargo, Chan et al. no observaron ninguna disrupción de las uniones entre células endoteliales tras la transmigración de células MDA-MB-231 (Michelle B. Chen et al., 2013). Más recientemente, Jeon et al desarrolló un modelo microfluídico órgano-especifico en 3D para dilucidar los efectos de los microambientes en extravasación de las células MDA-MB-231 y reportó que en los microambientes de mayor filtración se daban las tasas más bajas de extravasación (Jeon et al., 2014). En su conjunto, todos estos estudios han pretendido encontrar nuevas dianas moleculares de interés en la innovación terapéutica. Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han desarrollado en modelos experimentales que no representan la realidad de esta enfermedad en el ser humano, siendo por esto difícil la aplicación clínica de sus resultados.

Otro de los principales problemas clínicos que se ha abordado en modelos experimentales es la identificación de los pacientes que van a sufrir metástasis cerebrales. A este respecto, se han estudiado los perfiles de expresión génica en los tumores primarios de pacientes que tuvieron o no metástasis cerebrales. Sin embargo, por el momento todavía no existen marcadores moleculares o genéticos que puedan asegurar este riesgo en la biopsia de los tumores primarios con más tendencia a producir metástasis cerebral (Fan et al., 2015). Más aún, estando el fenotipo metastásico regulado en parte por señales paracrinas de las células de tejidos con los que interactúan las tumorales durante su crecimiento y migración corporal posiblemente sea muy difícil desde el tumor primario predecir si éste producirá o no metástasis (Pietras et al., 2010). Una de las estirpes celulares del microambiente tumoral más destacadas a este respecto es la célula mesenquimal —incluidos fibroblastos asociados a tumor (CAF) y pericitos— que se acumula alrededor de los vasos sanguíneos. Los CAFs expresan altos niveles de factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), Factor de crecimiento del hepatocito (HGF), factores de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) e IL-6 (Bhowminck et al., 2011). Los modelos experimentales sugieren que las células tumorales liberan factores tales como CSF-1, que a su vez estimulan la aparición de macrófagos en el microambiente tumoral, cuya secreción

de EGF promueve la proliferación tumoral (Chanmee et al., 2014). Sin embargo, en el SNC las células más abundantes son neuronas y células de la glía, pero no fibroblastos, y algunos estudios ya han demostrado el importante papel de la glía en el desarrollo de metástasis. Las células de la glía asociadas a la metástasis cerebral son principalmente la microglía y los astrocitos. Los astrocitos de cerebro adulto tienen un fenotipo no proliferativo, aunque pueden activarse tras la lesión cerebral, generando un proceso reactivo denominado gliosis.

La metástasis cerebral provoca también una activación local y gliosis en los astrocitos. En pacientes con cáncer de mama los astrocitos activados se acumulan tanto alrededor y dentro de los focos metastásicos, estando en contacto directo con las células tumorales. Los astrocitos reactivos secretan citocinas, quimiocinas e interleucinas. Muchas de estas moléculas, como Il-6 y TGF-β, pueden actuar como señales oncogénicas para las células tumorales. En cocultivos de células tumorales y astrocitos se ha visto que los factores secretados por los astrocitos inducen migración e invasión de las células tumorales del cáncer de mama. Wang y colaboradores identificaron dos metaloproteasas de la matriz (MMP-2 y MMP-9) que pueden ser mediadores de la invasión tumoral inducida por los astrocitos. Así mismo, cuando las células del cáncer de mama se cocultivan con astrocitos, éstas se vuelven más resistentes al cisplatino. En este caso, la función protectora del astrocito dependió directamente del contacto directo con la célula tumoral, ya que los cocultivos indirectos (con membrana interpuesta) no proporcionaron este tipo de protección frente a la toxicidad del cisplatino (Figura 4).

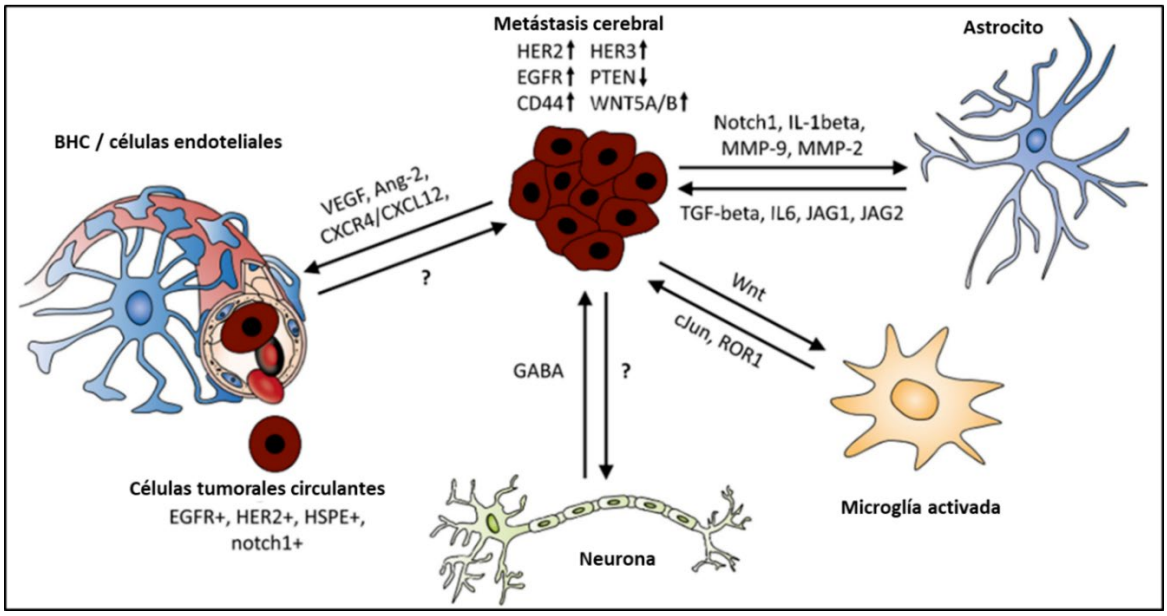


Figura 4: Esquema de la interacción en el cerebro entre células tumorales invasoras y células nerviosas. Para que las células tumorales circulantes pasen a través de la barrera hematoencefálica tiene que darse una comunicación directa e indirecta entre células nerviosas y las células tumorales. Estas interacciones, además de la predisposición genética de la célula tumoral, dan como resultado una gran cantidad de activaciones de rutas de señalización entre tumor y células hospedadoras. BHC, receptor EGF, GABA, HER, IL, JAG, MMP, TGF, VEGF.

D. CÁNCER DE MAMA

Es el cáncer más diagnosticado en mujeres y la segunda causa de muerte relacionada con un tumor maligno (Mego et al., 2010). De hecho, la gran mayoría de las muertes por cáncer de mama están asociadas con la metástasis pese a su detección precoz y avances en la terapéutica (Jones et al., 2008).

Los tumores de mama se pueden dividir en varias categorías con diferentes pronósticos y respuesta a la quimioterapia basándonos en la morfología del tumor, su grado (nivel de diferenciación) y su expresión de receptores hormonales —receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR) y HER2— (Harrell et al., 2012). De esta forma, los tumores pueden ser HER2-positivo (HER+, amplificado y/o estimulada la expresión de este receptor) y HER2-triple negativo (negativos para ER, PR y HER2), que tienen un mayor riesgo de generar metástasis en SNC (Harrell et al., 2012). En estos dos subtipos de cáncer de mama se desconoce el mecanismo celular y molecular que les confiere una tendencia prometastásica

Además de esta subdivisión del cáncer de mama, su clasificación por los perfiles de expresión génica está ganando terreno. Los análisis de agrupamiento no supervisado de los perfiles de expresión génica de grandes cohortes tumorales han demostrado diferencias fenotípicas entre subtipos que se correlacionan con la respuesta al tratamiento y la aparición o no de metástasis. El análisis de diferentes cohortes tumorales los ha clasificado ligeramente en subgrupos, aunque hay ciertos subtipos moleculares que están suficientemente identificados (Tabla 1).

Tabla 1: Clasificación molecular de los subtipos de cáncer de mama y su comportamiento metastásico.

Subtipo molecular	*Características*	*Comportamiento metastásico*	*Referencias*
Semejante al basal	Perfil de expresión semejante al basal de las células de cáncer de mama normal. Superposición significativa entre este grupo y el subtipo histológico triple negativo	Alto riesgo de metástasis cerebral	(Harrell et al., 2012)
HER2+	Her2-positivo	Alto riesgo de metástasis cerebral	(Harrell et al., 2012)
Expresión baja de Claudina	Por lo general, triple negativo, baja expresión de proteínas de unión célula – célula; elevada expresión de marcadores de diferenciación mesenquimal	Alto riesgo de metástasis cerebral	(Harrell et al., 2012)
Luminal A	ER+, PR+, resultados más favorables que el resto de los subtipos moleculares	Bajo riesgo de metástasis cerebral. Altos ratios de metástasis ósea	(Harrell et al., 2012)
Luminal B	ER+, PR+, más proliferativo y Ki67+	Bajo riesgo de metástasis cerebral	(Harrell et al., 2012)
Semejante al normal	Perfil de expresión génica semejante al del tejido adiposo (algunos creen que estas muestras tumorales están contaminadas de tejido mamario normal)	ND	(Harrell et al., 2012)

En la última década, ha aumentado la incidencia de la metástasis cerebral, convirtiéndose en una complicación clínica en las pacientes con cáncer de mama. Se ha estimado que el 15-20% de los pacientes con cáncer de mama metastásico acaban desarrollando con el tiempo metástasis cerebral (Berghoff et al., 2013). Dentro de los subtipos el HER2+ y los tumores de mama con baja expresión de la proteína de unión Claudina representan un alto riesgo de desarrollar metástasis cerebral mediante mecanismos moleculares todavía sin aclarar (Harrell et al., 2012). Los pacientes con metástasis cerebral sufren convulsiones, dolor de cabeza, alteración cognitiva y algunos otros trastornos neurológicos que varían según la localización anatómica de

las lesiones metastásicas (Gavrilovic et al., 2005). Algunos de los factores que más afectan el pronósticos son la edad, el número de lesiones metastásicas, la presencia de metástasis fuera del SNC (metástasis en el hígado o hueso), el periodo de tiempo entre el diagnóstico del tumor primario, el desarrollo de recidivas y el subtipo histopatológico (Melisko et al., 2009).

Hay muchos factores que aumentan el riesgo de metástasis cerebral en cáncer de mama. Entre esto se incluyen, ser pacientes jóvenes, tener tumores poco diferenciados (de alto grado), sin expresión de receptores hormonales y cuatro o más metástasis en ganglios linfáticos. La incidencia de la metástasis cerebral también está aumentando debido a su mayor detección por imagen. Así mismo, los tumores con expresión del receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2) y los que son triple negativo (TNBC) también tienen un alto riesgo de producir metástasis cerebral si lo comparamos con los pacientes con cáncer luminal. En ambos casos la incidencia de metástasis cerebral es mayor del 30-40%. Una característica común de ambos tumores (triple negativo y HER2 positivo) es su mayor supervivencia en el microambiente cerebral comparado con tumores con receptores hormonales positivos (Yu et al., 2017).

El gen *Her2* (también conocido como *Her2*/neu) codifica una proteína transmembrana que pertenece a la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) humano. HER2 es un receptor tirosín-cinasa que juega un papel muy importante en muchas patologías humanas. El gen *Her2* está amplificado o sobreexpresado en aproximadamente el 30% de cánceres de mama y en muchos otros tipos de cáncer, incluido ovario, estomago, vejiga, glándulas salivales y carcinoma de pulmón. Esta proteína es un importante biomarcador y diana terapéutica. Muchos estudios han demostrado que la sobrexpresión de *Her2* interfiere con los mecanismos de control de las células normales y da lugar a células tumorales más agresivas y sobre todo metastásicas, y las pacientes tienen una esperanza de vida más corta que aquellas con tumores en los que no se detecta sobrexpresión de *Her2*.

Debido al papel fundamental de HER2 en el control de los tumores de mama HER2+, hay varios fármacos aprobados por la FDA contra dicho receptor. Trastuzumab (herceptin) es un anticuerpo humano monoclonal se une al dominio extracelular de HER2 e interfiere en su dimerización. El trastuzumab es el tratamiento de primera línea de actuación contra el cáncer de mama HER2+ y aquellos casos en los que se detecta en su etapa más precoz, el tratamiento reduce significativamente el riesgo de recidiva tras la cirugía (Balduzzi et al., 2014; Moja et al., 2006). En el cáncer de mama HER2+ metástasico, el tratamiento con trastuzumab como adyuvante en estadios precoces ha demostrado aumentar la tasa de supervivencia a largo plazo (Bonifazi et al., 2014). El lapatinib es un inhibidor de la tirosina cinasa que bloquea los receptores EGFR y HER2. Se utiliza como tratamiento en pacientes con cáncer de mama metastásico HER2+ que mantuvo su progresión a pesar de los tratamientos iniciales con trastuzumab o quimioterapias (Wood et al., 2004). La terapia que combina lapatinib con capecitibina en pacientes en estados avanzados de cáncer de mama HER2+ reduce el riesgo de progresión de la enfermedad en comparación con capecitibina solo (Cetin et al., 2014). El pertuzumab es otro anticuerpo monoclonal que inhibe la dimerización de HER2 con otros receptores HER, atenuando el crecimiento del tumor en cáncer de mama HER2+ metastásico (Gianni et al., 2012). Curiosamente la combinación de trastuzumab, pertuzumab y docetaxel como primera línea tratamiento en cáncer de mama HER2+ metastásico ha prolongado significativamente la supervivencia de los pacientes (McCormack et al., 2013).

Aunque trastuzumab es efectivo en el tratamiento de cáncer de mama HER2 positivo, no queda del todo claro si es efectivo a nivel del cerebro. Un estudio de Stemmler et al. examinó los niveles de trastuzumab en suero y líquido cefalorraquídeo (LCR). Antes de la radioterapia, la concentración de trastuzumab en suero vs LCR fue de 420:1 y tras ésta la ratio fue de 76:1, habiéndose reportado recientemente que la incidencia de metástasis cerebral puede aumentar en pacientes HER2 positivos tratados con trastuzumab, desconociéndose si en pacientes con metástasis cerebral el tratamiento con trastuzumab es o no beneficioso.

Actualmente, el número de líneas celulares de cáncer de mama sigue siendo muy limitado, no estando claro si son o no representativas de sus tumores de origen y de su heterogeneidad. Algunos estudios sugieren que las líneas celulares de cáncer de mama derivadas de tumores humanos preservan las características genéticas con respecto a su expresión de ER o de HER2, motivo por el cual están siendo usadas como modelo de investigación (Lacroix et al., 2004). Teniendo en cuenta los perfiles de expresión génica, las líneas celulares de tumores de mama pueden estratificarse en 3 grupos: luminal, basal y baja expresión en Claudina (Hollestelle et al., 2010; Neve et al., 2009). El grupo luminal incluye las líneas celulares ER+ y HER2+. El grupo basal se subdivide en A y B. Se ha demostrado que la línea de células basal-A presenta ciertas características similares con los tumores primarios basales; y la línea basal-B son menos parecidas a los tumores de tipo basal y más a los del subtipo de baja expresión de Claudina (Prat et al., 2010). A través de pases seriados en ratones, las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231, CN34, y BT-474 han adquirido características fenotípicas metastásicas (Saxena et al., 2013; Bos et al., 2009; H. Zhao et al., 2012; H. Zhao et al., 2012).

E. BIOMARCADORES VASCULARES DURANTE LA METÁSTASIS CEREBRAL

Las tres principales clases de marcadores de cáncer cerebral primitivo y metastásico son: las propias células tumorales circulantes, el ácido nucleico circulante, ambos ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN) y las proteínas tumorales circulantes (De Mattos-Arruda et al., 2013). El principal problema en la detección de proteínas tumorales circulantes como biomarcador en sangre, es su poca especificidad, si lo comparamos con el ADN del tumor y las células tumorales circulantes. Sin embargo, las proteínas circulantes asociadas a un proceso tumoral maligno se podrían dividir en tres grandes grupos: biomarcadores específicos gliales, proteínas proangiogénicas y citocinas proinflamatorias.

Muchas de las proteínas candidatas para ser biomarcadores de gliomas fueron inicialmente identificadas como marcadores de traumatismo e hipoxia cerebral. Los niveles de GFAP y MMP-9 elevados en suero después de un infarto cerebral y traumatismo cerebral, aparecen también elevados en sangre de pacientes

con gliomas de alto grado debido a la resección quirúrgica, siendo por tanto un marcador de lesión cerebral no específico de tumor (Yikun Li et al., 2017).

La YKL-40 es otra molécula candidata que está aumentada tras cirugía por lo que sus niveles elevados se han asociado también a inflamación y a la alteración de la BHE (Berghuis et al., 2017). Las lesiones cerebrales pueden ser identificadas también mediante otros biomarcadores. Los más frecuentes son: Enolasa Específica de Neurona (NSE) y la proteína β de unión a Calcio S100 (S100β), un dímero que se une al calcio y que está implicado en la diferenciación celular y proliferación neuronal y glial. En este último caso, su bajo peso molecular (21 kDa) le permite cruzar fácilmente la BHE siendo también un biomarcador de lesión e hipoxia cerebral (Stammet et al., 2017). Estudios recientes muestran que NSE y S100β aumentan dos días tras lesiones cerebrales y sus valores se normalizan al cuarto día.

Actualmente, se sigue buscando biomarcadores más específicos del cerebro. Entre los más investigados están: Tau y creatina-fosfokinasa-BB (CPK-BB) cuyo aumento también se correlaciona con la lesión cerebro; MBP, producida por oligodendrocitos y que se une a la mielina; y UCH-L1, proteína implicada en reparación neuronal que se ha encontrado en patologías neurodegenerativas (Sahu et al., 2017; Halford et al., 2017).

Por otro lado, algunos estudios proponen que la producción de IL-1 por microglía induce la producción de VEGF-A desde los astrocitos, que a su vez se une a su receptor VEGFR-2 en la BHE, inhibiendo algunas proteínas de las uniones estrechas (claudina 5 y ocludinas) vía eNOS, lo que desorganiza la BHE. VEGF-A es un factor de permeabilidad vascular que se encuentra aumentado cuando el cerebro sufre algún tipo de lesión e induce alteraciones en la BHE. VEGFR2 está sobreexpresado en astrocitos, células endoteliales y zonas adyacentes a la lesión. Silenciando la expresión de VEGF-A en astrocitos o inhibiendo la ruta de señalización PLC/PKC/eNOS en células endoteliales se inhibe la Claudina 5 y se altera la permeabilidad de la BHE (Luissintet al., 2012). Aunque VEGF es un factor clave en la angiogénesis, su secreción por células tumorales extravasadas puede desencadenar procesos de transmigración, fundamentalmente al favorecer la

permeabilidad. En las células de cáncer de mama, HER2 incrementa la síntesis proteica de VEGF, que a su vez induce la disrupción de las uniones interendoteliales (Huabo Wang et al., 2011). Además VEGF aumenta la adhesión de las células de cáncer de mama, MDA-MB-231 (altamente metastásicas) a las células endoteliales cerebrales e incrementa también la migración in vitro a través de la BHE (T.-H. Lee et al., 2003). También se ha visto que el factor de crecimiento placentario derivado de células pequeñas de cáncer de pulmón, activan la vía de señalización de VEGFR-1/Rho/ERK en células del endotelio cerebral, lo que tiene como resultado el desensamblaje de las uniones estrechas y promueven la migración transendotelial (B. Li et al., 2012; Wilhelm et al., 2013).

El receptor α-2-macroglobulina A2MR o *Low density lipoprotein receptor-related protein-1* o LRP-1 es otro factor interesante. Se trata de un receptor de endocitosis que actúa como supresor tumoral —elimina proteasas como plasmina, activador del plasminógeno tipo uroquinasa y metaloproteinasas—contribuyendo a la prevención de la invasión del cáncer. Así mismo modula también la permeabilidad de la BHE y su deficiencia en el cerebro se asocia a una disminución de la proliferación y apoptosis en el hipocampo de ratones y a la apoptosis de células hepáticas (Y. Zhao et al., 2016). En cambio su expresión aumenta en cáncer de mama triple negativo y en líneas con sobreexpresión de *Her2*, y se correlaciona con el aumento de mecanismos dependientes de colesterol que favorecen el inflamación tumoral y aumentan la recidiva y mortalidad en cáncer de mama de mujeres obesas (Selvais et al., 2011).

El factor de crecimiento transformante β (TGF-β)— inductor de la transdiferenciación epitelio mesénquima(EMT), conocido por sus efectos antiproliferativos— es también otro factor producido por astrocitos cuyos cambios séricos pueden indicar daño en el SNC junto con otros factores. En la enfermedad de Alzheimer se ha visto que la acumulación de β-amiloide es capaz de inducir la infiltración de monocitos a través de la BHE por mecanismos en los que están implicados el receptor de productos finales de glicosilación avanzados (RAGE) y molécula de adhesión de células endoteliales de plaquetas (PECAM-1) (Giri et al.,

2000). Por su parte, RAGE controla la transferencia de beta amilasa en circulación al SNC. RAGE es un receptor que también se ha encontrado en neuronas y microglía y es también el mayor receptor endotelial de amiloide-beta que transporta a este desde la sangre al cerebro. La expresión de este receptor se encuentra aumentado en las células del endotelio cerebral que forman la BHE de pacientes con Alzheimer. Por otra parte, PECAM1 (CD31) —miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig)— está presente en la superficie de células endoteliales y leucocitos para facilitar la adhesión heterotípica durante la inflamación al inducir la migración de los leucocitos entre el endotelio en la angiogénesis. Pero su presencia en la superficie tumoral activa la capacidad invasiva de las células MDA Mb 231 de cáncer de mama. Otra Ig en células endoteliales son: molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) y molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), que son esenciales en la respuesta inmune e inflamatoria, pero algunos que también están implicados en la interacción entre células endoteliales y tumorales durante la formación de metástasis. A este respecto, se ha observado que la formación de metástasis viene precedido de aumentos en la expresión de VCAM-1 en órganos frecuentemente afectados por metástasis, entre ellos el cerebro (Langley et al., 2001).

La función de la Glucoproteína P (GPP) en la BHE también puede estar alterada en muchas situaciones diferentes, tales como estrés oxidativo o activación por glutamato. La función de la BHE tumoral, resultante de una neoangiogénesis, es diferente de la BHE normal, estando influenciada por moléculas que inducen permeabilidad como VEGF, lo que a su vez favorece la difusión y crecimiento de la lesión tumoral (Hartz et al., 2004). La permeabilidad tiende a ser mayor en el núcleo tumoral, mientras que la integridad de la microcirculación se preserva en las zonas periféricas de infiltración tumoral. En concordancia con estas observaciones se ha constatado también que los niveles de expresión de la GPP caen un 40% con respecto a los niveles en cerebro normal (Regina et al., 2001).

Otra molécula de interés es el Colágeno tipo 4, el componente más común de la membrana basal y primer obstáculo a degradar durante el proceso de invasión (Boutaud et al., 2000). Las células tumorales tienen la capacidad de producir MMPs

que degradan la matriz que rodea el tumor y pueden elevar los niveles plasmáticos de Colágeno tipo 4. Cuando se unen al colágeno de la membrana basal, inducen la activación del receptor-1 del dominio discoidina (DDR1), el cual activa a su vez vías de transducción que promueven la secreción de MMPs para la degradación de la membrana basal. Este mecanismo juega un papel importante en el proceso de invasión de las células MDA.MB-231 donde la invasión es en cierto modo dependiente de la cantidad de MMPs (gelatinasa B o MMP-9) que la célula tumoral sintetiza.

También se puede ver alterada la caveolina-1 (CAV-1) durante las lesiones del encéfalo, cuyo aumento de expresión en lesiones cerebrales se asocia a las alteraciones en la BHE (Sukriti Nag et al., 2007). Otros estudios demuestran la fosforilación de Cav-1 en vasos sanguíneos donde la BHE ha sufrido ruptura (S. Nag et al., 2009). De hecho, en los segmentos vasculares dilatados, las células endoteliales están sometidas a un estrés hemodinámico, que aumenta la Cav-1 en la membrana plasmática con la colaboración del aparato de Golgi (Boyd et al., 2003; Rizzo et al., 2003). En estos casos, la tensión por cizallamiento favorece la fosforilación de Cav-1 que precede a la transcitosis, un hecho esencial para la transcitosis anómala de proteínas en el endotelio cerebral como parte de la alteración en la BHE previo al edema cerebral que conduce al daño cerebral (Minshall et al., 2003).

La Claudina-5 —descrita por primera vez por Morita et al en el síndrome hereditario velo-cardio-facial— es otra proteína implicada en el edema cerebral peritumoral del glioblastoma multiforme. En este caso es la inhibición de su expresión o su deficiencia la que conduce a la pérdida de selectividad de la BHE, un factor a su vez determinante en el desarrollo de metástasis (Liebner et al., 2000; Nitta et al., 2003). Sin embargo, durante la inflamación del SNC la claudina-5 aumenta transitoriamente la permeabilidad paracelular del endotelio cerebral e interviene en la regulación de la motilidad transendotelial a través de vías de señalización N-WASP y ROCK (Liebner et al., 2000; Escudero-Esparza et al., 2012). Así mismo en encefalitis por el virus VIH-1, la fosforilación de ocludina y Claudina-5, reduce la integridad de la BHE y aumenta la migración de monocitos a su través pero no se

conoce este mismo mecanismo opera en metástasis cerebrales (Persidsky et al., 2006; Yamamoto et al., 2010; Jia et al., 2014).

Por último, las neurotrofinas —principalmente NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5— son factores de crecimiento que promueven la supervivencia, diferenciación, y muerte neuronal, pero que también pueden afectar a la BHE. Las células de melanoma metastásico cerebral pueden inducir la producción de NTs por diferentes tipos celulares del SNC, lo que a su vez ayuda a su supervivencia e invasión en el SNC (Denkins et al., 2004). Además NGF favorece la síntesis de enzimas que degradan la matriz extracelular en células de melanoma (Nicolson et al., 1995). Así mismo, se sabe que las NTs y receptores (TrkaA y p75), aparte de su expresión por neuronas y astrocitos también operan en células endoteliales y pericitos, que son capaces de expresar NGF y BDNF (H. Kim et al., 2004; Lecht et al., 2010; Shimizu et al., 2011).

Los cambios en la estructura de las uniones estrechas afectan a la integridad de la BHE. La redistribución de las uniones estrechas en la cara interna y externa de la membrana de las células endoteliales cerebrales comprometen la función principal de la BHE y se ve alterada la polaridad del transportador de glucosa (GLUT-1) en ratas susceptibles de apoplejía hipertensiva espontanea, sin verse alterada la expresión de: ocludina, claudina-1, claudina-5 y zónula ocludens-1 (ZO-1) (Lippoldt et al., 2000). Las rutas transendoteliales están más restringidas en el sistema microvascular cerebral que en el endotelio periférico, la tasa de pinocitosis es baja y la difusión libre a través de la membrana se reduce a moléculas pequeñas lipofílicas, por ejemplo etanol o nicotina (Pardridge et al., 2002). Los sistemas de transporte activo o catalizado pueden dividirse en tres grupos. El transporte mediado por transportador actúa bidireccionalmente absorbiendo nutrientes al cerebro. En este grupo se incluyen el transportador GLUT-1 (Deli et al., 2005).

Trabajos recientes han identificado como las deficiencias en transportadores de macromoléculas como por ejemplo GLUT-1 y complejos paracelulares de uniones estrecha pueden afectar a la integridad de la BHE y vasculatura cerebral (Fischer et al., 2015; Luissint et al., 2012). El transportador de glucosa GLUT-1 (codificado por el gen SLC2A1) es abundante en las células endoteliales del SNC comparándolo con las

células del endotelio periférico (Harik et al., 1990). La importancia de GLUT-1 en el metabolismo de la glucosa cerebral se observa en síndromes con deficiencia en GLUT-1 en las que los individuos con esta afección, sufren convulsiones durante la infancia, deficiencias cognitivas y retraso mental (Rotstein et al., 2011; Keaney et al., 2015).

En base a todo lo expuesto y a modo de resumen, el trabajo realizado en esta tesis trata de profundizar en la interacción del microambiente tumoral en la microvasculatura cerebral y sobre los astrocitos. Y que biomarcadores son resultado de esta situación patológica.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

Estudios epidemiológicos sobre las metástasis cerebrales demuestran que son los tumores intracraneales más frecuentes en adultos, con una incidencia mundial que sobrepasa los 200.000 casos al año. Se considera que alrededor del 15% de los pacientes con tumores primarios acabarán desarrollando metástasis cerebrales sintomáticas y un 15-20% adicional podrían detectarse incidentalmente en la autopsia, aunque éstas no sean su causa de muerte (Omuro et al., 2004).

Con respecto a los tumores que producen metástasis cerebrales con más frecuencia destacan el cáncer de pulmón (40-50% de los casos), cáncer de mama (15-25%) y melanoma (5-20%). Su incidencia está aumentando en los últimos años debido al aumento de la esperanza de vida global de la población, a la mejora en las técnicas de diagnóstico por imagen y a la mayor eficacia en la terapéutica antitumoral que prolonga la supervivencia del paciente con cáncer.

La distribución y desarrollo de las metástasis cerebrales está condicionada por el flujo sanguíneo del encéfalo y la estructura del tejido nervioso. El 80% se localizan en los hemisferios cerebrales, el 15% en cerebelo y el 5% en tronco-encéfalo. Los pacientes pueden desarrollar una sintomatología variada (cefalea, trastornos nerviosos, deterioro cognitivo, etc.) dependiendo de la compresión y el desplazamiento del tejido cerebral y sus tractos nerviosos.

Las opciones terapéuticas de las metástasis cerebrales incluyen neurocirugía, radioterapia holocraneal, radiocirugía estereotáctica (SRS), quimioterapia, terapias dirigidas tales como inhibidores de factores de crecimiento o la combinación de algunos de éstos. Sin embargo, los resultados no son muy alentadores, siendo la supervivencia de los pacientes tratados con radioterapia holocraneal de 4-6 meses y hasta de 12-24 meses en pacientes muy seleccionados. Son factores de buen pronóstico: buena situación funcional, edad <65 años, ausencia de metástasis fuera del SNC, tumor primario bien controlado, metástasis cerebral

única, largo intervalo de tiempo entre diagnóstico del tumor primario y desarrollo de la enfermedad metastásica, expresión de HER2 en el cáncer de mama y mutación de EGFR en el carcinoma microcítico de pulmón. En más de la mitad de los pacientes la causa de muerte es atribuible a la progresión de la enfermedad metastásica encefálica (Witzel et al., 2016).

Con respecto a los resultados del tratamiento de las metástasis cerebrales, en estudios aleatorizados se ha demostrado que la cirugía o la radiocirugía combinada con la radioterapia holocraneal aumentan la supervivencia global comparado con la radioterapia holocraneal sola en pacientes con una metástasis cerebral única. En pacientes con cuatro o menos metástasis cerebrales la radiocirugía ofrece una supervivencia global equiparable, pero peor control de la enfermedad intracraneal que la radiocirugía con radioterapia holocraneal. La combinación de quimioterapia y radioterapia aumenta la tasa de respuesta y la supervivencia libre de progresión en algunos trabajos, pero no la supervivencia global. Sin embargo, en la mitad de los pacientes, especialmente en aquellos con una enfermedad tumoral maligna generalizada, la muerte está relacionada con sus lesiones metastásicas extra-cerebrales, y el tratamiento de la metástasis cerebral no mejora su supervivencia. En tales pacientes, el objetivo es mejorar o estabilizar el trastorno neurológico y mantener la calidad de vida. Los corticoides y la radioterapia de todo el cerebro por lo general cumplen con este propósito. Por tanto, los pacientes con metástasis cerebrales tienen necesidades complejas que requieren un enfoque multidisciplinar, siendo clave su detección precoz en la fase asintomática, un aspecto que es clave en el pronóstico y el resultado del tratamiento (Soffietti et al., 2002).

El proceso de metástasis cerebral tiene una etapa asintomática cuya duración depende del nivel de adaptación y autonomía de las células metastásicas en el microambiente del SNC. Esta etapa subclínica determina en gran medida la estructura y el patrón de crecimiento de la metástasis, siendo factores determinantes el grado de gliosis reactiva, la neoangiogénesis y la composición y fenotipo funcional

de células nerviosas e inmuno-inflamatorias intrametastásicas (Gavrilovic et al., 2005).

La **existencia de barreras hematotisulares que protegen el encéfalo** y regulan el acceso de moléculas, células y patógenos microbianos es un hecho diferencial en el proceso de metástasis del SNC y en creación de un microambiente tumoral órgano-específico. En concreto, la barrera hematoencefálica (BHE) limita el acceso de antígenos circulantes y agentes quimioterápicos hidrófilos al parénquima del encéfalo, convirtiéndolo en un santuario inmunológico y en un refugio para las células metastásicas frente a los efectos citotóxicos de la quimioterapia y del propio sistema inmune. Además, las células metastásicas que consiguen atravesar la BHE están condicionadas por un fluido intersticial cerebral con alto contenido en cloruro, que facilita la multiplicación de células de origen neuroepitelial como las del carcinoma microcítico de pulmón o las del melanoma, inhibiendo el crecimiento de aquellas que no tienen este requerimiento metabólico (Singh et al., 2014).

En los últimos años se han desarrollado numerosos estudios sobre **la patogenia de la metástasis cerebral** cuyo principal objetivo ha sido la identificación de los mecanismos celulares y moleculares que regulan el crecimiento de las células metastásicas en el cerebro. Algunos trabajos han centrado su atención en las relaciones funcionales entre células gliales y tumorales, neurotrofinas y factores de crecimiento nerviosos (Sierra et al., 1997). Otros han estudiado las alteraciones de la BHE asociadas a la metástasis cerebral y sus implicaciones en la accesibilidad y el efecto de los fármacos antitumorales sobre las células metastásicas (Wilhelm et al., 2013). También se ha investigado la angiogénesis de la metástasis cerebral con la idea de encontrar determinantes moleculares cuyo bloqueo pudiera reducir la neovascularización de la metástasis y por esto su nutrición y crecimiento (Svokos et al., 2014). En su conjunto, todos estos estudios han pretendido encontrar nuevas dianas moleculares de interés en la innovación terapéutica. Sin embargo, la mayoría de ellos se han desarrollado en modelos experimentales que no representan la realidad de la enfermedad metastásica en el ser humano, siendo por esto difícil la aplicación clínica de sus resultados.

En un plano clínico, uno de los principales problemas es la **identificación de los pacientes con riesgo de sufrir metástasis cerebrales**, o que ya las tengan, pero sean todavía asintomáticas. Se ha buscado en sangre periférica marcadores moleculares de las alteraciones que sufre el tejido nervioso durante la invasión metastásica del encéfalo (O'Sullivan et al., 2017). También se ha buscado características genómicas y de expresión génica que sean específicas de aquellos tumores primarios de pacientes que sufren metástasis cerebrales. Sin embargo, por el momento no existen marcadores moleculares o genéticos ni en sangre periférica, ni en la biopsia de los tumores primarios que puedan servir para estratificar con fiabilidad el nivel de riesgo de sufrir metástasis cerebral entre los pacientes con cáncer (Schulten et al., 2017).

Un alto porcentaje de pacientes con **cáncer de mama que expresa HER2** desarrollan metástasis cerebrales (N. U. Lin et al., 2013). El gen *HER2* (también conocido como *HER2* o *neu*) codifica una proteína transmembrana que pertenece a la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). HER2 es un receptor tirosin-cinasa que juega un papel muy importante en muchas patologías humanas, aunque su ligando aún no ha sido encontrado. El gen *HER2* se ha observado amplificado o sobreexpresado en aproximadamente el 30% de los casos de cáncer de mama y en muchos otros tipos de cáncer, incluidos los de ovario, estomago, vejiga, glándulas salivares y pulmón. En los últimos años esta proteína se ha convertido en un importante biomarcador y diana molecular para la terapéutica (McCormack et al., 2013).

Muchos estudios han demostrado que la sobrexpresión de *Her2* altera los mecanismos de control celular induciendo un comportamiento tumoral agresivo, y los pacientes con estos tumores tienen una esperanza de vida más corta que aquellos en los que no se detecta sobreexpresión de *Her2*, siendo la principal causa su enfermedad metastásica (Fischer et al., 2015; Melisko et al., 2009). Sin embargo, si sobreexpresar *Her2* ayuda o no al desarrollo de la metástasis cerebral y como lo hace se desconoce en gran medida.

Se ha desarrollado un **modelo ortotópico sobre el proceso de metástasis cerebral** mediante la inoculación intracarotídea o intramamaria de la línea MDA-MB-231 "brain seeking" (231-Br) de cáncer de mama humano en ratón desnudo. El modelo comparte algunas características con las biopsias de metástasis cerebrales de pacientes con cáncer de mama, incluidas las tasas de proliferación, apoptosis, la presencia de microambiente tumoral proinflamatorio y la sobreexpresión de *Her2* (Palmieri et al., 2007). Utilizando dicho modelo, en estudios del grupo en el que se ha desarrollado el presente proyecto, se ha demostrado que la metástasis cerebral inicia su crecimiento alrededor de la microcirculación cerebral, formando vainas perivasculares de células tumorales que están limitadas interiormente por la estructura microvascular a la que rodean, y exteriormente, por una barrera glial perimetastásica integrada por astrocitos y microglía reactiva. Más aún, el análisis inmunohistoquímico permitió identificar los fenotipos celulares integrados en la estructura de estas micrometástasis y las alteraciones moleculares de su eje microvascular interno (Gril et al., 2013).

De lo anteriormente expuesto se puede concluir que la metástasis cerebral es una importante causa de muerte en pacientes con cáncer avanzado, cuyo desarrollo se produce en el microambiente funcional condicionado por la BHE, y para la cual no existen por el momento biomarcadores que pronostiquen el riesgo de padecerlas, o que representen dianas moleculares para su prevención o tratamiento. Por tanto, para mejorar el diagnóstico y la terapéutica de las metástasis cerebrales es imprescindible seguir profundizando en el conocimiento sobre su patogenia y fisiopatología y los mecanismos genéticos que la regulan en los pacientes con cáncer.

B. PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS

El crecimiento metastásico precoz en el microambiente perivascular del cerebro podría alterar la función de los astrocitos que regulan el endotelio de la BHE; y dada la frecuente sobreexpresión de *Her2* en tumores malignos con metástasis cerebrales, la sobreexpresión de *Her2* podría contribuir a la clase de respuesta funcional del tumor en el microambiente perivascular, incluido su posible efecto regulador del endotelio cerebral a través de su acción sobre los astrocitos.

C. OBJETIVOS DEL PROYECTO

Para abordar el estudio de la hipótesis formulada, se planteó como objetivo principal del proyecto la determinación del patrón de crecimiento y la estructura microvascular de la metástasis cerebral; y el estudio, mediante proteómica de expresión, del secretoma del endotelio cerebral inducido por factores soluble de astrocitos activados por factores solubles del cáncer de mama con o sin sobreexpresión de *Her2* y exposición o no a factores característicos del microambiente tumoral.

A su vez el presente proyecto se desarrolló a través de tres objetivos de cuyo desarrollo comprendió una serie de ensayos experimentales que constituyeron la estructura del proyecto:

1. Identificación inmuno-histoquímica de la estructura histológica de la metástasis cerebral, con especial énfasis sobre su patrón de crecimiento tumoral, y las alteraciones en la microcirculación cerebral, la angiogénesis y la gliosis reactiva.
2. Creación de un modelo *in vitro* de gliosis reactiva inducida por factores tumorales solubles, a través del cultivo de astrocitos en presencia del medio condicionado de células tumorales expuestas a unas condiciones miméticas del microambiente tumoral.
3. Creación de un modelo *in vitro* de endotelio cerebral humano inducido por los astrocitos activados por tumor y estudio de la composición molecular del secretoma endotelial cerebral, mediante proteómica de expresión.

D. DISEÑO EXPERIMENTAL.

El proyecto se estructuró en los siguientes apartados de estudio:

1. **Estudios sobre el patrón de crecimiento de la metástasis cerebral, sus características estructurales y la composición celular del microambiente tumoral.**

   Este apartado del proyecto comprendió estudios sobre:

   - Características del proceso de colonización cerebral experimental de la línea celular humana MDA 231-BR-HER2 de cáncer de mama.
   - Verificación clínica del proceso de colonización cerebral experimental mediante el estudio del patrón de crecimiento de la metástasis cerebral, en biopsias de metástasis cerebrales, obtenidas de pacientes con cáncer de pulmón y mama, intervenidos en los servicios de Neurocirugía de HM-Hospitales (Madrid):

   Se centró en el estudio fenotípico del astrocito y la pared vascular asociados al crecimiento metastásico tumoral en cerebro, utilizando los siguientes marcadores inmunohistoquímicos:

   - Colágeno tipo IV: Sintetizado por las células epiteliales y endoteliales. Su función principal es la de sostén. forma un entramado de moléculas orientadas al azar, asociadas a proteoglucanos y proteínas estructurales laminina y fibronectina.
   - CD31: expresado por células endoteliales. Permite evaluar el grado de angiogénesis tumoral.
   - GFAP: filamento intermedio que se expresa en numerosos tipos celulares del SNC. Permite diferenciar astrocitos de otras células gliales.
   - SMA: expresado por células de musculo liso en las paredes del vaso. También se expresa en tumores derivados de células mioepiteliales
   - NG-2: expresado por pericitos y células progenitores de oligodendrocitos.
   - pPDGF-Rβ: expresado por astrocitos en estado de activación con fenotipo proliferativo e invasivo.

- MCK AE1/AE3: expresado por células de origen epitelial, tumores gliales y en ocasiones neoplasias mesenquimales que expresan GFAP.
- Claudina-5: expresado en las uniones estrechas localizadas en la BHE.
- CD11b: expresado por las células de la microglía.

2. **Estudios funcionales sobre la respuesta transcripcional del endotelio cerebrovascular a factores solubles de astrocito, tras su activación por factores solubles del cáncer de mama con o sin sobreexpresión de *Her2* y exposición o no a estímulos del microambiente tumoral**

Los estudios transcripcionales del Endotelio cerebrovascular (ECV) se efectuaron en cultivo, tras su exposición a factores solubles (medio condicionado) generados por astrocitos activados por factores solubles producidos por la línea MDA-231 de cáncer de mama metastásico, con o sin sobreexpresión de *Her2* y exposición o no a factores del microambiente tumoral (MAT).

Los genes de este estudio se escogieron por su diferente implicación en la regulación de la estructura y función del ECV. En concreto, se estudiaron genes asociados a la regulación de:

- Las relaciones intercelulares homo y heterotípicas (*Zonula-1, Claudina-5, Pecam-1, Vcam-1*).
- Los intercambios moleculares transcelulares (*receptor de LDL, Glut-1, Caveolina-1, glucoproteína P*).
- La diferenciación endotelial (*Colágeno-IV, Tgfβ1, Rage, Vegf-r2*).

Dada la heterogeneidad microambiental de cualquier lesión neoplásica primaria o metastásica, se escogieron el estímulo mecánico, la hipoxia, la IL-18 (factor proinflamatorio) y el estrés oxidativo como agentes representativos de las condiciones funcionales del tejido tumoral en su propio MAT. De hecho, los efectos funcionales sobre las células tumores de tales agentes del

MAT han sido ampliamente descritos en trabajos previos de este y otros grupos de investigación (Gonzalez-Gugel et al., 2016; Yu et al., 2017).

3. Estudio sobre la composición molecular del secretoma de endotelio cerebrovascular inducido por astrocitos activados por cáncer de mama, con o sin sobreexpresión de *Her2* y exposición a factores del microambiente tumoral.

El objetivo de este apartado del proyecto fue estudiar la naturaleza molecular del secretoma de ECV, su regulación paracrina por astrocitos activados por tumor, y el efecto que tienen la sobreexpresión de *Her2* y la respuesta a la acción combinada de factores característicos del microambiente tumoral (MAT) sobre la regulación tumoral del efecto estimulante endotelial de los astrocitos. Para determinar la naturaleza de las moléculas del secretoma de ECV, tras 24 horas de cultivo en todas las condiciones consideradas, se aplicó un análisis mediante LC-MS/MS, seguido de identificación molecular y análisis funcional con la ayuda de tecnología Bioinformática y bases de datos.

III. MATERIALES Y METODOS

A. LÍNEAS CELULARES

Para el estudio *in vitro* se utilizaron las células MDA-MB-231, provenientes de una línea inmortalizada de adenocarcinoma de mama con fenotipo altamente invasivo y metastásico, triple negativo (ER-/PR-/HER2-) y células de su variante MDA-231-br-HER2, que sobreexpresan Her2, cedidas por la Dra. Patricia Steeg del *National Cancer Institute* (Bethesda, MD).

También se utilizaron astrocitos normales humanos (Clonetics™ *Astrocyte Cell Systems)* en inglés "Normal Human *Astrocytes*", NHA) (Lonza, Wokingham, UK)., y células endoteliales procedentes de capilares cerebrales humano (del inglés "*human brain endotelial cells*", hMBEC), cedidas amablemente por el Prof. Kwang Sik Kim y Prof. Dennis Grab (John Hopkins University, Baltimore, MD, USA) (Tabla 2).

Las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-231-br-HER2 se sembraron en "*Dulbecco's Modified Eagle's Medium"* (DMEM; Gibco) suplementado con 10% de FBS (suero fetal bovino; SIGMA), 1% de L-Glutamina, 1% penicilina/streptomicina (Sigma Chemical co., St Louis, MO, EE. UU.). Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2. El medio se renovó cada 48 horas y para el mantenimiento de MDA-231-br-HER2 se le añadió además Zeocina (Invitrogen).

Para el cultivo hBMEC se empleó RPMI 1640 (Gibco), de FBS (suero fetal bovino; SIGMA), 2 mM L-Glutamina (Gibco), 1 mM de Piruvato Sódico (Gibco), MEM "*non essential Amino acids"* (Gibco), MEM vitamins (Gibco), penicilina/streptcomicina (100 U/ml) (Sigma Chemical co., St Louis, MO, EE. UU.). Previo a cualquier experimento fue necesario el tapizado ("*coating"*) de la superficie de cultivo con colágeno tipo I 50 ug/ml (Sigma Chemical co., St Louis, MO, EE. UU.) para obtener un sustrato y matriz extracelular.

Para el cultivo de ANHs se utilizó un kit comercial de Lonza llamado Clonetics™ AGM™ *BulletKit*™ (CC-3186) 500 ml de *Astrocyte Basal Medium* (ABM™) y los siguientes factores de crecimiento: rhEGF, 0.5 ml; Insulina, 1.25 ml; Ácido ascórbico, 0.5 ml; GA-1000, 0.5 ml, L- Glutamina 0,5 ml.

Cuando la tasa de proliferación de los cultivos alcanzó aproximadamente el 90% de confluencia celular se procedió a su subcultivo con la ayuda de Tripsina–EDTA 0.005% (Sigma Chemical co., St Louis, MO, EE. UU.). Seguido de dos lavados con Solución salina tamponada con fosfato (PBS 1x) para eliminar restos de suero (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, EE. UU.). A continuación, las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos, y el pellet se resuspendió en el medio de cultivo correspondiente, en función del tipo celular.

Las células viables se contaron utilizando una cámara de Neubauer y azul de tripano 0,1%) (Sigma Chemical co., St Louis, MO, EE. UU.) (P/v en suero salino) para identificar las células muertas. Finalmente, las células se sembraron de nuevo en una densidad adecuada para su expansión en el cultivo. Los cambios de medio y los pases de los cultivos se realizaron en condiciones estériles en cabina de flujo laminar y utilizando material y soluciones estériles previamente atemperadas a 37°C.

Tabla 2: Líneas celulares.

MDA-MB-231	Adenocarcinoma de mama
MDA-231-br-HER2	Adenocarcinoma de mama "brain-seeking" con sobreexpresión de *Her2*
NHA	Astrocitos Normales Humanos
HBMEC	Células endoteliales humanas de la microvascularización cerebral

B. CRIOPRESERVACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE LOS CULTIVOS

Para la criopreservación de todas las líneas celulares se procedió a la congelación de estas, mediante resuspensión del pellet en una densidad de 6 x 10^6 cels/ml en un medio compuesto por FBS previamente inactivado y dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma Chemical co., St Louis, MO, EEUU) al 10%. El DMSO se utilizó para

la criopreservación celular ya que es un solvente bipolar hidrosoluble que difunde fácilmente hacia el interior de las células, evitando el acúmulo de electrolitos, así como la formación de cristales de hielo, que, en caso de originarse, producirían la ruptura de la membrana celular y daños en los componentes citoplasmáticos. Las células en la concentración previamente descrita se resuspendieron en 1 ml de medio de congelación en criotubos (Nunc, Rochester, NY, EEUU) y se colocaron rápidamente a -80°C, ya que el DMSO es citotóxico a temperatura ambiente. A continuación, permanecieron 24 - 48h a -80°C y sufrieron una congelación progresiva hasta su almacenamiento definitivo en nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C.

Para descongelar células se empleó calor húmedo a 37°C observando en todo momento la descongelación gradual del criotubo. Ayudándonos de una pipeta se traspasó el contenido a un tubo de plástico de 15 ml donde previamente se añadió 1 ml de medio de cultivo atemperado. Se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min, con el fin de eliminar los restos de DMSO, se descartó el sobrenadante y se contaron las células antes de ser sembradas en frascos de cultivo de 75 cm^2con filtro de ventilación.

C. OBTENCIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS

1. *Líneas celulares en condiciones basales*

Las células de la línea MDA-MB-231 se sembraron en frascos de cultivo de 75 cm2 (*"cell culture flask"*; Corning), el medio empleado fue *"Dulbecco's Modified Eagle's Medium"* (DMEM; Gibco) suplemetado con 10% de FBS (suero fetal bovino; SIGMA), 1% de L-Glutamina (200 mM; Gibco), 1% penicilina/streptomicina (10,000 U/ml; Gibco). Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2. Se cambiaron de medio cada 48 horas. Para el cultivo de línea celular MDA-231-br-HER2 se emplearon los mismos medios de cultivo y factores, pero se añadió zeocina (Invitrogen). Para el cultivo de ANHs se utilizó un kit comercial de Lonza llamado Clonetics™ AGM™ BulletKit™ (CC-3186), que contenía 500 ml de *"Astrocyte Basal Medium"* (ABM™) y los siguientes factores de crecimiento: rhEGF, 0.5 ml;

insulina, 1.25 ml; ácido ascórbico, 0.5 ml; GA-1000, 0.5 ml, L- Glutamina 0,5ml. Una vez se alcanzó el 80-90% de confluencia celular, se descartó el medio de cultivo y se hicieron tres lavados con PBS. Luego se añadieron 15mL de medio de cultivo DMEM, 1% FBS, 1% penicilina/streptomicina, 1% L-Glutamina e incubaban a 37°C con 5% de CO_2. Transcurridas 24 horas se recogió el medio en un tubo de propileno de 15 ml (Falcon) y se centrifugó a 2000 g durante 10 min. Transcurrido este tiempo de centrifugación se obtuvieron los medios condicionados que se almacenaron a -80°C.

2. Líneas celulares tumorales de cáncer de mama con o sin sobreexpresión de Her2 y exposición o no a factores del microambiente tumoral

Todos los procedimientos para la obtención de medios condicionados siguieron la misma estructura metodológica. Las células de la línea MDA-MB-231 se sembraron en frascos de cultivo de 75 cm^2 ("*cell culture falsk*"; Corning), el medio empleado fue "*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*" (DMEM; Gibco) suplemetado con 10% de FBS (suero fetal bovino; SIGMA), 1% de L-Glutamina (200 mM; Gibco), 1% penicilina/streptomicina (10,000 U/ml; Gibco). Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2. Cambio de medio cada 48 horas. Para el cultivo de línea celular MDA-231-br-HER2 se emplearon los mismos medios de cultivo y factores, pero se añadió además zeocina (Invitrogen).

Una vez que se alcanzó una confluencia del 80-90%, se descartó el medio de cultivo, y se lavó 2 veces con PBS. Entonces, las células se sometieron a hipoxia mediante su incubación en condiciones de 37°C con 5% de CO_2 y al 1% de oxigeno durante 18 horas) en incubador Galaxy 170 (New Brunswick). Para la condición de estrés oxidativo las células se incubaron en presencia de 1 mM DL-butionina- (S, R)-sulfoximina (BSO; Sigma Chemical co., St Louis, MO, EEUU). Para obtener la condición de inflamación las células recibieron el factor rhIL-18 a 1mg/ml (R&D). Por último, para la condición de estímulo mecánico el procedimiento fue más laborioso. Primeramente, las células recibieron Tripsina-EDTA para su resuspensión y se sembraron 6 x 10^5 en soportes de cristal (Streamer Culture Slips, Flexcell, Hillsborough, Carolina del Norte, EEUU). Los cristales de cultivo fueron tratados,

previamente, con colágeno Tipo I de piel de cordero (Sigma Chemical co., St Louis, MO, EEUU) durante las 24 horas previas para facilitar la adhesión de las células a esta superficie. El volumen que se incubó fue de 2ml/ soportes de cristal, durante 18 horas. Después se sometieron a la estimulación mecánica generada a través de la tensión producida por el flujo continuo del medio de cultivo. Los soportes de cristal se introdujeron en una caja metálica conectada a una bomba peristáltica (MasterFlex Peristastic pump 2010) controlada por un programa informático que reguló la velocidad del flujo en un circuito cerrado ("Streamer FlexCell" FlexCell Internacional; Hillsborough, Carolina del Norte, EEUU) y se aplicó una fuerza de presión por fluido de 10 dinas/cm² (8,5 cm/s), durante un período de tiempo de 10 minutos, a una temperatura controlada de 37°C, en condiciones de esterilidad.

Una vez transcurrido los tiempos de tratamiento se hicieron dos lavados con PBS y se añadieron 15 mL de medio de cultivo DMEM, 1% FBS, 1% penicilina streptomicina, 1% L-Glutamina. Los frascos se volvieron a incubar a 37°C con 5% de CO_2 y al 1% de oxígeno durante 24 horas. Después se recogió el medio y se centrifugó 2000g durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo de centrifugación se recogió el medio condicionado y se almacenó a -80°C (Figura 5).

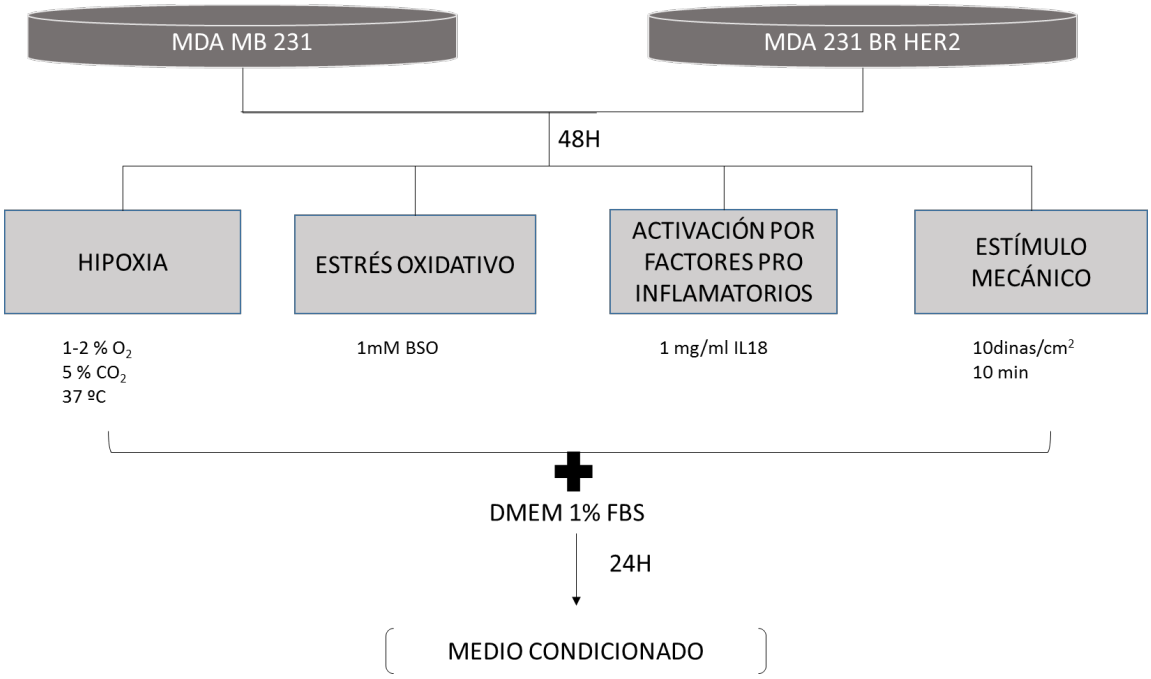


Figura 5: Esquema de la obtención de medios condicionados.

Los medios condicionados por las líneas celulares de cáncer de mama basales, se les denominó factor soluble tumoral (FST). Y para distinguir su procedencia se añadió una numeración:

- Si se obtuvieron por MDA-MB-231 y se le asignó el número 1
- Si se obtuvieron por MDA-231-Br-HER2 y se le asignó el número 2

Y, por último, medio combinado de microambiente tumoral (MAT) para designar los medios condicionados resultantes de las 4 condiciones a las que fueron sometidas nuestras células tumorales (Tabla 3).

Tabla 3: Siglas asignadas a los medios condicionados por células tumorales.

	Medio condicionado tumoral basal	Microambiente tumoral
MDA MB 231	FST-1	MAT-1
MDA 231 BR HER2	FST-2	MAT-2

3. Astrocitos activados por factores solubles tumorales y cocktail del microambiente tumoral

Los ANHs (Astrocitos Normales Humano) se cultivaron en frascos de 25 cm^2 utilizando un kit comercial de Lonza llamado Clonetics™ AGM™ BulletKit™ (CC-3186) que contenía 500 ml de Astrocyte Basal Medium (ABM™) y los siguientes factores de crecimiento: rhEGF, 0.5 ml; Insulina, 1.25 ml; Ácido ascórbico, 0.5 ml; GA-1000, 0.5 ml, L- Glutamina 0,5 ml.

Una vez han alcanzada una confluencia del 80-90%, se descartó el medio de cultivo y se lavó 2 veces con PBS. Después se añadieron los tratamientos (FST-1, FST-2, MAT-1, MAT-2) haciendo una dilución 1:1 con medio de cultivo DMEM, 1% FBS, 1% penicilina/streptomicina, 1% L-Glutamina. Los astrocitos fueron estimulados con los medios condicionados de los cultivos de células tumorales durante 24 y 48 horas. Después de este tiempo se lavó 2 veces con PBS y se añadieron 7 mL de medio de cultivo DMEM, 1% FBS, 1% penicilina/streptomicina, 1% L-Glutamina. Acto seguido,

los frascos se incubaron a 37°C con 5% de CO_2 y transcurridas 24 horas se recogieron los medios en tubos de propileno de 15 ml, se centrifugaron a 2000 g durante 10 min y se obtuvo el nuevo medio condicionado que se almacenó a -80°C hasta su utilización en los cultivos de ECV.

Así se obtuvieron los siguientes medios condicionados de astrocitos (AT):

- **AT-0,** procedente de astrocitos sin medio sin condicionar por el tumor.
- **AT-1 y AT-2,** procedentes de astrocitos tratados con medios condicionados por MDA-MB-231 y MDA-231-Br-HER2, respectivamente.
- **AT-1-MAT y AT-2-MAT** procedentes de astrocitos tratados durante 24 horas (24h) o 48 horas (48h) con medios condicionados por MDA-MB-231 y MDA-231-Br-HER2, sin o con exposición a al medio condicionado por el microambiente tumoral (MAT), respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4: Siglas asignadas a medios condicionados por astrocitos activados por medios condicionados tumorales durante 24 y 48 horas.

	Medio condicionado Astrocito tumoral		**Medio condicionado Astrocito Microambiente tumoral**	
Tiempo tratamiento	*24 horas*	*48 horas*	*24 horas*	*48 horas*
MDA-MB-231	AT-1	AT-1	AT-1-MAT	AT-1-MAT
MDA-231-BR HER2	AT-2	AT-2	AT-2-MAT	AT-2-MAT

Todos los medios condicionados generados se congelaron a -80°C, y aquellos que posteriormente fueron objeto de estudio mediante espectrometría de masa se liofilizaron (Telstar LyoQuest). Se introdujeron las muestras congeladas en tubos de propileno (con 5 ml de medio condicionado) cubiertos con *parafilm* agujereado en sustitución del tapón. Una vez depositados las muestras en las cámaras de secado del liofilizador se encendió la bomba de vacío, comenzando una transferencia de calor hacia el producto. El nivel de vacío requerido debe ser entre 50 y 100 µbar a -

80°C. Tras este proceso, se obtuvo un producto poroso, seco, activo y fácilmente soluble.

D. VIABILIDAD CELULAR

La respuesta de los cultivos de astrocitos y endoteliales a los diferentes tratamientos con medios condicionados se determinó a través del método del bromuro de 3,4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolio o MTT (CellTiter 96 *Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay*, Promega).

Los cultivos primarios se efectuaron en placas de 96 pocillos (Nunc) a una densidad de 3.000 células/pocillo en un volumen final de 200µl de medio AGM si lo que se sembró fueron Astrocitos o 200µl de medio específico para células endoteliales si fueron THBEC. Las células se dejaron crecer y agregarse durante 1-2 días. Trascurrido este tiempo se añadieron a las células los medios condicionados tumorales en una dilución 1:1 con medio AGM depletado y medio control AGM (en el caso de los astrocitos) y DMEM depletado más medio control DMEM (cuando en la placa hubo células endoteliales). Se incubaron durante distintos tiempos 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas. Posteriormente, a cada pocillo se le añadieron 20 µl de la sal de tetrazolio MTT durante 1.30 horas a 37°C en oscuridad.

Se leyeron las placas en el Varioskan Flash Multimode Reader (ThermoScientific) a 490 nm y 630 nm (para eliminar la señal de fondo y la absorbancia no específica) ya que lo que el lector muestra es la medida de la absorbancia, que se correlaciona directamente con el número de células viables. Se midió la absorbancia a distintos tiempos 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas y los ensayos se llevaron a cabo en 3 réplicas biológicas de cada línea (astrocito y células endoteliales). En todos los casos, cada tratamiento se realizó por cuadruplicado. La medida de la viabilidad se determinó comparando los valores de absorbancia de células control (no tratadas). Para el análisis estadístico de los resultados, se realizó un test ANOVA simple (one-way ANOVA) con corrección de Bonferroni mediante el programa informático GraphPad Prism 6 (GraphPad Software). Con los datos de

densidad óptica, se aplicó la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de crecimiento relativo de la placa de tratamiento respecto a la placa control:

$$Crecimiento\ relativo\ (\%) = \left[\frac{(DOcélulas - DOmedio\ cultivo)placa\ tto - (DOcélulas - DOcultivo)placa\ ctrol}{(DOcélulas\ ctrol - DOmedio\ cultivo)placa\ tto - (DOcélulas - DOcultivo)placa\ ctrol}\right] \times 100$$

E. ESTUDIO TRANSCRIPCIONAL

1. *Extracción de ARN de líneas celulares*

El pellet celular se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos y se resuspendió directamente en el tampón de lisis del kit *RNeasy Mini* (Quiagen) para evitar cualquier contaminación de ADN genómico que pudiese interferir en las técnicas posteriores. Las muestras se eluyeron en agua libre de ARNasas, en un volumen final de 30-50 µl, en función de la cantidad de material de partida. Para el control de cantidad y calidad del ARN obtenido para estudio de PCR cuantitativa se valoró la cantidad de ARN obtenido se utilizó un 1 µl de este. Se midió la absorbancia a 260 y 280 nm, se anotaron las ratios 260/280 (R260/280) y se calculó la concentración teniendo en cuenta el factor de dilución aplicado así la regla: el valor de 1 en densidad óptica (D.O.) correspondió a aproximadamente a 40 µg/ml de ADN para ADN de una sola cadena o de ARN.

2. *Métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa*

La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo a partir de 1 µg del ARN obtenido, utilizando el kit superscript ll (Invitrogen). Se incubó 1 µg de ARN en 20 µl de agua libre de RNasas con 25 ng/ml de oligonucleótidos aleatorios y 1 mM de mezcla de deoxi-nucleotidos trifosfato (dNTPs). Se incubó a 70°C durante 10 minutos. Luego se pasó a hielo y se le añadió, hasta llegar a 40 µl de volumen final, 1 µl de inhibidor de ARNasa (*RNase out*), 4 µl de 0.1 M DTT (concentración final de 5 mM), 8 µl del Buffer 5x de la enzima (concentración final 1x) y 1 µl de retrotranscriptasa (*superscript ll Treverse Transcriptase*, Invitrogen, 200 U por

reacción). La reacción tuvo lugar a 42°C durante 1 hora. Para los estudios de PCR cuantitativa, se efectuó una dilución de 1:10 de las muestras.

3. *qRT-PCR semicuantitativa*

Se realizó qRT-PCR semicuantitativa a tiempo real para analizar la expresión de un panel de genes implicados en la regulación de la angiogénesis, la inflamación, la formación de matriz extracelular y las uniones estrechas en la barrera hematoencefálica.

El estudio de expresión por qRT-PCR semicuantitativa se realizó en base a la emisión de fluorescencia del fluorocromo SYBR Green, se utilizó el equipo HT 7900 (Applied Biosystems). El fluorocromo SYBR Green, específico de ADN de doble cadena, se unió al ADN inmediatamente después de ser sintetizado y emitió luz fluorescente tras su estimulación. La emisión se recogió por el sistema detector del equipo en cada uno de los ciclos de la PCR. La fluorescencia detectada es proporcional a la cantidad de ADN formado, el ciclo de la PCR en el que empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina ciclo umbral (Ct, de *threshold cycle*). Por lo tanto, se comparó los Ct de las distintas muestras a estudio se puede calcular el incremento o disminución de la expresión génica de una determinada muestra respecto a un control.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 µl en un capilar, que incluye 2 µl de ADNc diluido 1:10, 5 µl de Premezcla SYBR (Takara), 0,2 µM de cada oligonucleótido (0.2 µl de cebadores 10 mM), completando la reacción con agua libre de nucleasas.

Todos los primers de los genes a estudiar, así como los cebadores fueron diseñados. El tamaño del amplicón (Tabla 5 y 6) y las temperaturas de fusión (*melting*) están detallados a continuación (Tabla 7).

Tabla 5: Secuencias de los cebadores específicos empleados en las reacciones de qRT-PCR con ADNc.

Gen	Secuencia cebadores 5' → 3'
Pdgfr-β	Fw-GTG CTG GGA AGA GAA GTT TG; Rv- TAACCTTCGCCCAACAGT
Gfap	Fw- GGACCTGCTCAATGTCAAG; Rv- GTTCTCCTCGCCCTCTAG
Ngfr	Fw- ACACACAGGAGGAGAAATCT; Rv- CCGAGCAGACCTCAATTC
Cav-1	Fw- GACATCTCTACACCGTTCC; Rv- CACTTGCTTCTCGCTCAG
Col-IV a1	Fw- GACCACCAGGCTTACCAG T; Rv- AAATCCTCTTTCACCTTTCAACAG
Vegfr-2	Fw- GCAGGACCAAGGAGACTATG; Rv- CCACACGCTCTAGGACTG
Clau-5	Fw- GTCTCACTCCAGCATCTC; Rv- ATTCTTAGCCTTCCCACTC
Zo-1	Fw- AGAGCCTAATCTGACCTATGAAC; Rv- GCTTGAGGACTCGTATCTGT
Pecam-1	Fw- TGTGCTCATCATGCTCTGTG; Rv- ACGCTTGTCACACTGCTTTG
Ldlr	Fw- GCTCTGTCCATTGTCCTC; Rv- CCGCCAGTTCTTCCATAG
Tgfβ-1	Fw- GCCGACTACTACGCCAAGGA; Rv- GCTGTGTGTACTCTGCTTGAACTT
Vcam-1	Fw- CGAACCCAAACAAAGGCAGAGT; Rv- AGGATGGAGGAAGGGCTGAC
Glut-1	Fw- CTTCCAAACCTGACAGATGT; Rv- GAGCCGTTAAGTCCTGAATA
Rage	Fw- CCAACTACCGAGTCCGTGTCTAC; Rv- ACCAGCCGTGAGTTCAGAGG
Pgp	Fw- ATGTGAAGAATAATCAGGAAAGTG; Rv- GTCGGCTATGCTGTCAAC

Tabla 6: Secuencias de los cebadores específicos empleados en las reacciones de qRT-PCR con ADNc.

Gen	Secuencia cebadores 5' → 3'
Gapdh	Fw- CTCTGGTAAAGTGGATATTGT; Rv- GGTGGAATCATATTGGAACA
Hprt-1	Fw- AGGCAGAAGTGTGACATT; Rv- TGACACTGGCAAAACAATGCA

Tabla 7: Condiciones empleadas en las qRT-PCRs sobre ADNc y las qPCRs sobre ADNc.

Desnaturalización inicial (1 ciclo)			
95 °C	10 min	20 °C/s	Sin lectura
Curva de Amplificación (45 ciclos)			
95 °C	10 s	20 °C/s	Sin lectura
55-60 °C (Tm según el gen)	10 s	20 °C/s	Sin lectura
72 °C	10 s	20 °C/s	Lectura simple
Curva de disociación (1 ciclo)			
95 °C	0 s	20 °C/s	Sin lectura
Tm + 5 °C	15 s	20 °C/s	Sin lectura
95 °C	0 s	0,1 °C/s	Lectura continua
40 °C	30 s	20 °C/s	Sin lectura

Para todas las muestras, los resultados se normalizaron a un gen de referencia, hipozantina-guanina fosforribosiltransferasa-1 (*Hprt-1*) o Gluceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*Gapdh*). La cuantificación relativa de la expresión génica se determinó aplicando el método comparativo descrito de las Ct (Y. Wang et al., 2002): número de veces de variación = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde ΔΔCt = ΔCt muestra problema - ΔCt muestra control, para un determinado gen de interés. Donde, ΔCt muestra problema es el valor de Ct de la muestra problema para un determinado gen normalizado y ΔCt muestra control es el valor de Ct de la muestra control sin tratar para ese mismo gen también normalizado según la expresión del gen de referencia *Hprt-1* y *Gapdh*.

El principal inconveniente del SYBR Green es su baja especificidad, debido a que se une de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores, frecuentes en la PCR. Por ello, y para detectar posibles errores de amplificación de productos no deseados o cuantificación de dímeros de cebadores, el sistema de PCR a tiempo real Light-Cycler 1.5 de Roche, presenta el sistema de análisis denominado "curva de Melting" o curva de desnaturalización por calor. En este análisis, las curvas de desnaturalización por calor correctas muestran un solo pico definido a temperaturas superiores a 81.5°C. Además, con el objetivo de comprobar que el producto amplificado presenta el tamaño esperado y confirmar

si el producto de la PCR es un único compuesto, el producto resultante de la PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE, obteniéndose para todos los casos resultados positivos de una única banda y del tamaño esperado.

F. DETERMINACIÓN POR WESTERN-BLOT DEL RECEPTOR HER2 EN LÍNEA CELULAR MDA 231 BR HER2

Se mantuvieron las células en hielo, y se lavaron con PBS frío. Después se añadió tampón de lisis RIPA (aproximadamente un ml por cada millón de células) y se agitó durante 30 minutos a 4°C. Se hizo el gel de poliacrilamida y se añadió en uno de los compartimentos el tampón de migración 25 mM Tris; 190 mM glicina; 0,1% SDS; pH 8,3. Los lisados proteicos se cargaron en los pocillos del gel 20 µg por pocillo. Se aplicó el campo eléctrico y provocó el movimiento de las proteínas hacia el polo positivo. Las proteínas se separaron en función del tamaño o peso molecular, las de menor tamaño quedan menos retenidas en la matriz y migran más rápidamente. Se marcó la proteína para poder visualizarla y para ello antes se transfirió. Se realizó una transferencia en medio húmedo utilizando un tampón de transferencia de 25 mM, 190 mM, glicina y 10% metanol, 0.1%SDS a una membrana de nitrocelulosa, la cual se bloqueó en PBS con leche al 5% durante una hora a temperatura ambiente, y con el anticuerpo HER2 (HER-2) policlonal (Thermo Fischer) a una concentración de 1:1000 en leche al 5% en PBS durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se lavó la membrana e incubó con el anticuerpo secundario *anti-rabbit* (1:1000 en leche al 5% en PBS) y se reveló con el kit ECL Plus (GE HEALTHCARE) en un transiluminador (DNr MF-ChrmiBIS 3.2) (Figura3).

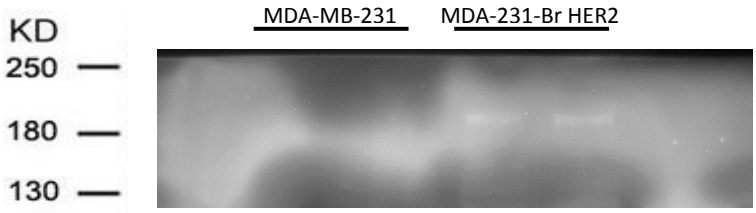


Figura 6: Detección por WB de HER2.

G. ESTUDIO PROTEÓMICO

1. Determinación de la concentración de proteínas en los medios condicionados de THBEC

Se determinó la concentración de los medios condicionados de las THBEC Para calcular la concentración de proteínas se utilizó el método de Bradford (Bradford et al. 1976), basado en la utilización del reactivo azul de *Comassie* brillante en condiciones acídicas, que forma complejos con las proteínas y cambia su pico de absorción de 465 a 595 nm.

2. Estudio del perfil de expresión proteico

Se identificaron las proteínas presentes en los secretomas obtenidos mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) en el equipo LTQ-Orbitrap Velos. En el análisis LC-MS/MS de las muestras, se obtuvieron espectros de fragmentación de buena calidad, identificándose varios péptidos y sus proteínas.

A continuación, se realizó una búsqueda en bases de datos (Uniprot-Homo sapiens y Uniprot-Bos Taurus) utilizando el motor de búsqueda Sequest, a través del software: Protemo Discoverer 1.4. Se utilizaron cantidades equivalentes de las muestras, sin ajustar por cantidad de proteína, asumiendo que las diferencias en la cantidad de proteína total suponen diferencias significativas para el experimento. Esto se verificó gracias a los cromatogramas, cuya intensidad fue similar en todos los casos. Para el procesamiento y análisis de las muestras de secretoma por LC-MS/MS se hizo lo siguiente:

a) Digestion del gel (stacking gel):

El extracto de proteínas se suspendió hasta un volumen de 50 µl de buffer, y después se introdujeron en pocillos del gel SDS-PAGE convencional de 1.2 cm de ancho (0.75mm de grosor, concentrador 4% y separador 10%). La corriente se paró tan pronto como la muestra se acercó a unos 3 mm del gel separador, de esa forma

todo el proteoma se concentra en la interfase del gel concentrador/separador. Las bandas de proteínas no separadas se visualizaron con la tinción Coomassie, se recortó e introdujo en tubos (2 x 2 mm) y se centrifugaron (Moreno et al., 2012). Los geles se destiñeron en acetonitrilo: agua (ACN: H_2O, 1:1), rebajados y alquilados; las uniones disulfito de los residuos de cistenilo fueron reducidos con 10mM DTT durante 1 h. a 56°C y después los grupos tiol se alquilaron con iodocetamida 50 mM durante 1 h. a temperatura ambiente y en oscuridad) se hizo digestión in situ con tripsina (Promega, Madison, WI) como describe Shevchenko y colaboradores (Shevchenko et al., 1996) con modificaciones menores. Se eliminó el excedente de acetonitrilo y se secaron los geles en un *speedvac*. Tras este procedimiento de secado, los geles se re-hidrataron con bicarbonato de amonio 50 mM pH 8.8 más tripsina 60 ng/ul a un ratio 5:1 de proteina:tripsina (w/w). Los tubos se mantuvieron en hielo durante 2 h. y se incubaron a 37°C otros 12 h. La digestión se paró añadiendo TFA 1%. Todos los sobrenadantes se secaron y desalaron en puntas OMIX C18 (Agilent Technologies) hasta que fueron analizados por espectrometría de masas.

b) LTQ ORBITRAP VELOS PRO:

Una vez que la digestión de las proteínas desaladas se secó, se resuspendieron en 10 µl de ácido fórmico 0.1% y se analizó por RP-LC-MS/MS en un sistema Esy-nLC II acoplado a un espectrómetro de masas ion trap LTQ-Orbitrap-velos-pro (Thermo Scientific). Los péptidos se concentraron por cromatografía en fase reversa usando columnas de 0.1 mm x 20 mm C18 RP (Thermo Scientific), y luego se separaron usando columnas de 0.075 mm x 250 mm C18 RP (Thermo scientific), y para separarlo se utilizó una columna de 0.075 mm x 250 mm C18 RP Precolumn (Thermo Scientific) a una velocidad de 0.3 µl/min. Los péptidos se eluyeron durante 190 min en un gradiente dual de 5 a 25% en el solvente B seguido por un gradiente de 25 a 49% del solvente B (solvente A: Ácido fórmico 0,1% en agua, solvente B: ácido fórmico, 80% de acetonitrilo en agua). La ionización se realizó utilizando una interfaz de nano emisores de acero inoxidable de 30 µm (Proxeon). Los péptidos se detectaron en el escaneo de 400 a 1600 amu (1 µscan), normalizando la energía de colisión del 35%, y aplicando la exclusión dinámica durante periodos de 30 segundos.

3. *Procesamiento de datos obtenidos por LC/MSMS*

Para comparar los patrones de expresión de la totalidad de las 451 proteínas entre las condiciones estudiadas a las 24 y 48 horas, se diferenció entre proteínas nuevas/aumentadas, disminuidas y desaparecidas, tras la aplicación de la siguiente fórmula para normalizar los resultados con respecto a los controles:

$$R_{sc} = \log_2 [(n_2 + f) / (n_1 + f)] + \log_2 [(t_1 - n_1 + f) / (t_2 - n_2 + f)]$$

Donde, para cada proteína, R_{sc} es el ratio en log2 de la abundancia entre la muestra 1 y la 2; n1 y n2 es el valor de la proteína detectada para la muestra 1 (control) y 2 (problema) respectivamente; t1 y t2 es el número total de detecciones para las dos muestras y f es el factor de corrección de 0,5 (Old et al., 2005). De esta forma se obtuvo una batería de resultados normalizados frente al control y una vez aplicada la fórmula, se determinó un valor de corte en el que aquellos valores ≤-1 fueron proteínas perdidas; >-1 pero <1 fueron las proteínas disminuidas, y por último valores ≥ 1 fueron proteínas nuevas. La identificación de péptidos de los datos en bruto se llevó a cabo usando un algoritmo de SEQUEST (Proteome Discoverer 1.4, Thermo Scientific). La búsqueda en la base de datos se realizó en uniprot-Homo sapiens.fasta y uniprot-Bos taurus.fasta. Se utilizaron las siguientes restricciones para la búsqueda: escisión tríptica después de Arginina y Lisina, más de dos residuos de escisión perdido (Alonso et al., 2015).

H. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE PACIENTES

Para el presente estudio se utilizaron muestras procedentes de pacientes con metástasis cerebral diagnosticada. Las muestras de los pacientes, diagnosticados con metástasis cerebral, fueron proporcionadas por el equipo de Dr. Diamantopoulos en el Hospital de Madrid-Sanchinarro. Dichas muestras se obtuvieron tras la aprobación por parte de los Comités de Ética de Investigación Clínica de la institución y el consentimiento informado del paciente.

Para el estudio de inmunohistoquímica se analizaron muestras de tejido tumoral cerebral procedentes de la cirugía (Tabla 8), así como muestras de sangre central venosa, antes y después de que el paciente fuera anestesiado. Se obtuvieron muestras de metástasis cerebrales y sangre de entre 30-50 pacientes intervenidos quirúrgicamente. Se aisló el plasma de dichas muestras y se procesar las biopsias para la posterior realización de estudios histológicos de diferentes marcadores.

Tabla 8: Listado de muestras de cerebro obtenidas por craneotomía.

Muestra	Fecha obtención	Diagnóstico/Tumor primario	Hospital
MET20	20/06/2013	Metástasis cerebral de cáncer de pulmón	H. Sanchinarro
MET21	11/07/2013	Metástasis cerebral de cáncer de mama	H. Sanchinarro
MET22	23/12/2013	Adenocarcinoma de mama	H. Sanchinarro
MET23	05/02/2014	Metástasis Adenocarcinoma de mama	H. Montepríncipe
MET24	20/02/2014	Glioblastoma Grado IV	H. Sanchinarro
MET25	20/02/2014	Metástasis cerebral (carcinoma de origen renal)	H.Sanchinarro
MET26	03/03/2014	Metástasis cerebral (neoplasia de fenotipo epitelial)	H.Sanchinarro
MET27	19/03/2014	Metástasis cerebral (adenocarcinoma mama)	H.Sanchinarro
MET28	03/09/2014	Metástasis cerebral origen mama	H. Sanchinarro
MET29	14/10/2014	Metástasis cerebral (carcinoma de pulmón)	H. Sanchinarro
MET30	04/12/2014	Adenocarcinoma pobremente diferenciado	H. Sanchinarro
MET31	11/12/2014	Radionecrosis, no se observan células neoplásicas	H. Sanchinarro
MET32	15/01/2015	Carcinoma de ovario	H. Sanchinarro
MET33	29/01/2015	Metástasis cerebral de origen ovárico	H. Sanchinarro
MET34	07/02/2015	Adenocarcinoma de pulmón	H. Sanchinarro
MET35	12/02/2015	Metástasis cerebral adenocarcinoma endometroide	H. Sanchinarro
MET36	25/03/2015	Adenocarcinoma de pulmón	H. Sanchinarro
MET37	08/04/2015	Adenocarcinoma de mama	H. Sanchinarro
MET38	15/04/2015	Adenocarcinoma de mama	H. Sanchinarro
MET39	2779202	Melanoma	H. Sanchinarro
MET40	30/04/2015	Radionecrosis (cáncer de pulmón)	H. Sanchinarro

MET41	26/05/2015	Hepatocarcinoma	H. Sanchinarro
MET42	28/05/2015	Linfoma B	H. Sanchinarro
MET43	04/06/2015	Adenocarcinoma de pulmón	H. Sanchinarro
MET44	25/06/2015	Adenocarcinoma testicular	H. Sanchinarro
MET45	16/07/2015	Adenocarcinoma gástrico	H. Sanchinarro
MET46	17/07/2015	Melanoma	H. Sanchinarro
MET47	23/07/2015	Adenocarcinoma microcítico de pulmón	H. Sanchinarro

I. PROCESADO DE MUESTRAS HISTOLOGICAS

Previo a cualquier procesado, las muestras estuvieron al menos 24 horas en paraformaldehído (o cualquier otro fijador) y se pasaron a etanol 70° antes de su procesado (Tabla 9). La inclusión en parafina de muestras histológicas fijadas previamente, en el procesador Leica TP1020.

Tabla 9: Pasos para el procesado de fijación e inclusión de biopsias humanas.

Cubeta	Solvente	Tiempo
1	Etanol 70°	1 hora 30 minutos
2, 3, 4, 5	Etanol 96°	4 horas
6	Etanol 100°	1 hora
7	Etanol 100°	1 hora
8	Etanol 100°	1 hora
9	Xilol	1 hora
10	Xilol	1 hora
11	Parafina	1 hora
12	Parafina	1 hora

1. *Estudio inmhohistoquímico*

La inmunohistoquímica es un método mediante el cual se visualizan las proteínas en el tejido usando anticuerpos frente a las proteínas que estamos buscando. Es un método indirecto, un anticuerpo primario reconoce el antígeno en el tejido y después se añade un anticuerpo secundario con afinidad por el anticuerpo primario. Todos las inmunohistoquimicas se hicieron en el Bond Max *automated stainer* (Leica Biosystems Newcastle, Ltd.) para asegurarnos que los resultados sean

estandarizados y reproducibles (Tabla 10). La solución Bond *Dewax* se utilizó para desparafinar las secciones. El buffer Bond *Wash* es el equivalente al buffer salino Tris, se usó como buffer de lavado estándar durante las IHC. La solución de bloqueo Bond peroxidasa se empleó para inactivar la peroxidasa endógena en todos los tejidos. El desenmascaramiento del epitopo por calor se realizó en los tejidos a una temperatura aproximada de 100°C usando Bond *Epitope Retrieval Buffer*, equivalente al buffer citrato (pH6) y EDTA buffer (pH8), durante 10-20 minutos previos a la incubación con los anticuerpos primarios. Y la DAB fue utilizada como cromógeno en todo el proceso. Human collagen type IV monoclonal de ratón (1:200, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), human Smooth muscle actin monoclonal de ratón (Ready to use Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Tabla 10: Protocolo F Bond Max IHC.

Bond Dewax Solution	**3 min**	**Temperatura ambiente**	**150 µL**
Bond wash solution (3 ciclos)	3 min	Temperatura ambiente	150 µL
Alcohol	15 min	Temperatura ambiente	150 µL
Bond wash solution (3 ciclos)	3 min	Temperatura ambiente	150 µL
Bond ER solución 1	15 min	Temperatura ambiente	150 µL
Bond wash solution (4 ciclos)	4 min	Temperatura ambiente	150 µL
Peroxide block	5 min	Temperatura ambiente	150 µL
Bond wash solution (3 ciclos)	3 min	Temperatura ambiente	150 µL
Anticuerpo Primario	15 min	Temperatura ambiente	150 µL
Bond wash solution (3 ciclos)	3 min	Temperatura ambiente	150 µL
Post Primario	8 min	Temperatura ambiente	150 µL
Bond wash solution (3 ciclos)	6 min	Temperatura ambiente	150 µL
Polimero	8 min	Temperatura ambiente	150 µL
Bond wash solution (2ciclos)	4 min	Temperatura ambiente	150 µL
Agua destilada	1 min	Temperatura ambiente	150 µL
Mixed DAB Refine	10 min	Temperatura ambiente	150 µL
Agua destilada	3 min	Temperatura ambiente	150 µL
Hematoxilina	5 min	Temperatura ambiente	150 µL
Agua destilada	5 min	Temperatura ambiente	150 µL
Bond wash solution	1min	Temperatura ambiente	150 µL
Agua destilada	1min	Temperatura ambiente	150 µL

Para el estudio se utilizaron 9 anticuerpos (Tabla 11). De los bloques se cortaron secciones de 3 µm y se secaron en estufa durante 18 horas a 56°C. para las IHQ se utilizó un método automatizado Leica Bond –max que permite realizar de forma conjunta y secuencial la desparafinización y desenmascaramiento antigénico de las secciones, en función del anticuerpo se utilizaron las siguientes soluciones: BOND *Epitope Retireval* pH6 en tampón citrato durante 10 a 15 minutos o solución BOND *Epitope Retrieval* 2 ph9 en tampón EDTA (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) durante 15 minutos.

Tabla 11: Panel de anticuerpos utilizados para describir: BHE, activación de astrocitos, marcaje tumoral y respuesta inmune.

Anticuerpo primario	Especie	Dilución	Proveedor	N.º Referencia
Anti-Human Collagen TypeIV	Ratón	1:100	Leica	NCL-COLL-IV
Anti-Smooth Muscle Actin (alphasm-1)	Ratón	RTU	Leica	PA0943
Anti-Multi-Ck (AE1/AR3)	Ratón	RTU	Leica	PA0909
Anti-CD31	Ratón	RTU	Leica	PA0250
Anti-Claudin-5 (c-terminal)	Ratón	1:100	Sigma aldrich	SAB4200538
Anti-CSPG4	Ratón	1:50-1:200	Sigma aldrich	HPA002951
Anti-CD11b	Rabbit	1:400	Abcam	ab75476
Anti-GFAP	Ratón	1:1500	Dako	M0761
Anti-pPDGFRb	Ratón	1:50	Santa-Cruz Biotechnology	sc-373805

2. *Inmunofluorescencia de las biopsias de ratón*

Los cortes de cerebro de ratón fueron bloqueados con PBS que contenía suero de cabra al 5% y 0,2% Triton X-100, durante 1 hora para que se permeabilizaran. Después se añadieron el anticuerpo primario y el secundario, se incubaron en la misma solución de PBS. Los anticuerpos primarios se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Después se añadieron al mix el anticuerpo secundario *Alexa 546-conjugated* o *Alexa 488-conjugated secondary antibody* (Invitrogen) y 200 mg/ml DAPI y se incubaron durante 1 horas (Tabla 12).

Tabla 12: Anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia en muestras de ratón

Anticuerpo primario	Dilución	Proveedor
Anti-mouse CD31	1/500	BD Pharmingen
Mouse anti human cytokeratin MNF116	1/50	Dako
Rabit anti-mouse NG2	1/200	Milipore
Rabit anti mouse collagen type IV	1/500	Milipore
Mouse anti desmin	1/50	Dako
Rat anti CD11b	1/50	Milipore
Rat anti-mouse CD45	1/200	Milipore
Rabbit anti-human GFAP	RTU	Dako
Mouse anti-human GFAP	1/100	Milipore
Rabbit anti-mouse PDGFRb phosphotyrosine 751	1/50	Santa Cruz
Rabbit anti-mouse PDGFRb phosphotyrosine 1021	1/50	Santa Cruz

3. *Microscopía y escaneado de imágenes y análisis estadístico*

Las imágenes de fluorescencia se capturaron en un microscopio Leica DM 5500. Se realizó escaneado digital con Escáner Leica SCN400 de todas las muestras con aumentos de 20x y 40x.

El análisis estadísico se realizó con el programa SPSS 32.0 (SPSS. Inc., Chicago, IL, EEUU), GraphPrism 6.0.

IV. RESULTADOS

A. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y MICROAMBIENTALES DEL PROCESO DE COLONIZACIÓN CEREBRAL EXPERIMENTAL DE LA LÍNEA CELULAR HUMANA 231-BR-HER2 DE CÁNCER DE MAMA

El estudio de la estructura y composición celular de la metástasis cerebral se realizó primeramente a través de un modelo experimental de micrometástasis, obtenidas en el encéfalo de ratones *nude* en el día 21 tras la inyección intraventricular izquierda de $50x10^4$ células de la línea 231-BR-HER2 de cáncer de mama. Las zonas del encéfalo afectadas por el proceso de colonización de las células metastásicas se pudieron identificar fácilmente por el agrupamiento anómalo de células con núcleos grandes y polimorfos, marcados con DAPI. El marcaje de los mismos cortes histológicos con anticuerpos anti-citoqueratina humana permitió verificar la naturaleza tumoral y humana de dichas células en el seno del tejido nervioso del encéfalo murino. El proceso de metástasis se produjo sin preferencias topográficas entre las sustancias gris y blanca del encéfalo murino. Por ejemplo, en la Figura 7A y 1B se observa el desarrollo de micrometástasis en la sustancia gris (Figura 7A) y la sustancia blanca

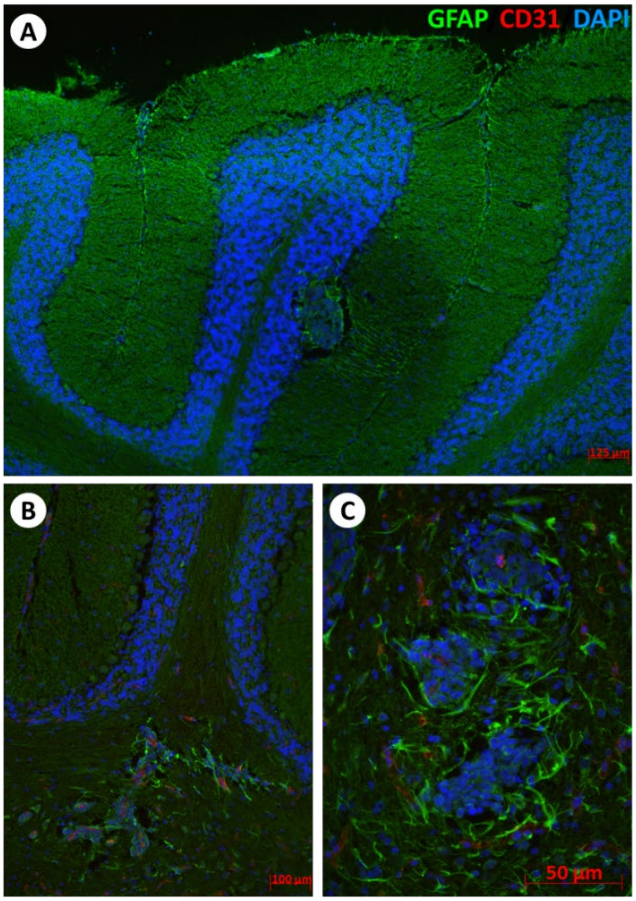


Figura 7: Caracterización del microambiente metastásico originado por células de cáncer de mama humanas 231-BR-HER2 en el cerebelo de ratón. **A-C** Astrocitos reactivos perimetastásicos (GFAP, verde) se concentran de forma anómala agrupados, además de células tumorales con núcleos grandes polimorfos (DAPI, azul) cerca de los vasos (CD31, rojo). **A)** Desarrollo de la metástasis en la sustancia gris, **B** y **C** en la sustancia blanca, en todos los casos se observa elevado nivel de expresión de GFAP, característica de la activación tumoral de astrocitos.

(Figura 7B) del mismo cerebelo. Así mismo, con independencia de su localización, siempre se produjo una reacción glial que pudo evidenciarse tras el marcaje del tejido encefálico con anticuerpos anti-GFAP. Así, en la Figura 7A se puede observar la sobreexpresión de GFAP en los astrocitos protoplasmáticos de la capa molecular del cerebelo próxima a la micrometástasis. Lo mismo se observó en los astrocitos fibrosos entorno a la micrometástasis de la sustancia blanca (Figura 7B). En las figuras 7C y 7A, se observan imágenes representativas de la reacción glial de los astrocitos alrededor de otras micrometástasis en la sustancia gris de la corteza cerebral.

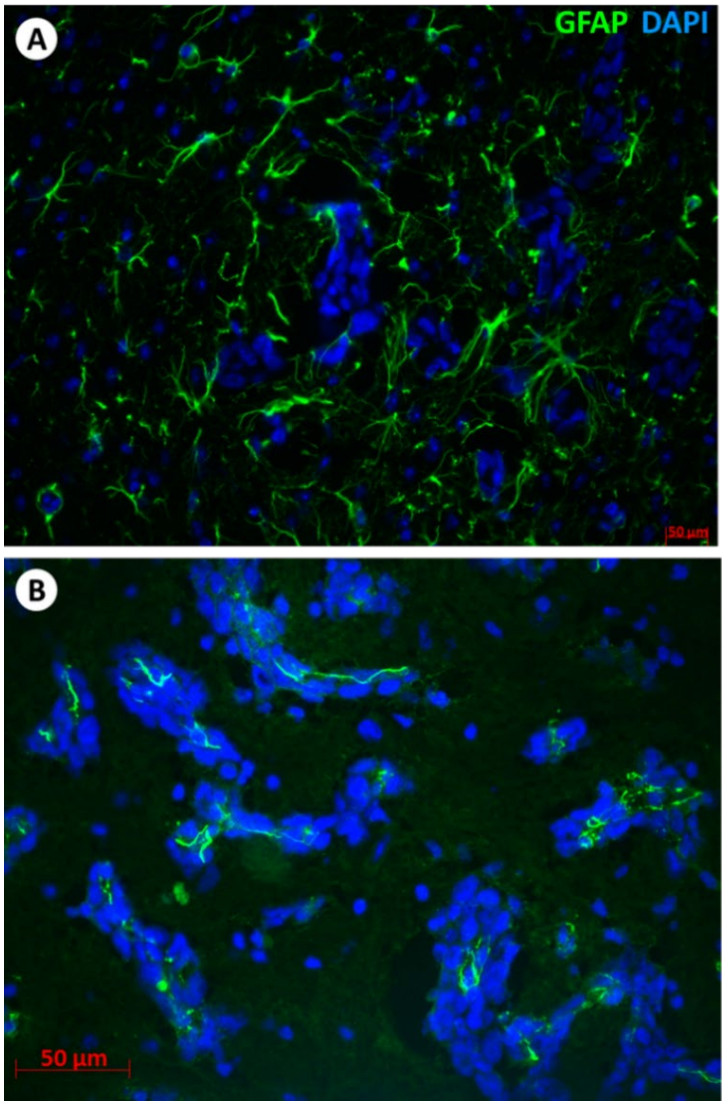


Figura 8: Caracterización del microambiente metastásico originado por células de cáncer de mama humanas 231-BR-HER2 en el cerebelo de ratón. **A)** Los astrocitos perimetastásicos muestran una alta expresión de GFAP. **B)** Microcirculación vascular (CD31, verde) y células metastásicas en localizaciones perivasculares.

Los astrocitos perimetastásicos mostraron una alta expresión de GFAP (Figura 8A), indicando que el nivel de expresión de GFAP fue característica de la activación tumoral de astrocitos.El crecimiento metastásico en esta etapa tan precoz se produjo de forma infiltrativa, sobre el tejido encefálico, sin existir zonas comprimidas o destruidas por el crecimiento e invasión tumoral. La utilización de anticuerpos anti-CD31 permitió demostrar la permanencia de las células metastásicas en localizaciones preferentemente perivasculares (Figura 8B), formando un recubrimiento microvascular que en

ocasiones afectó extensas áreas de la microcirculación sanguínea cerebral. Este patrón de crecimiento metastásico se produjo sin alteración de la arquitectura microvascular encefálica, sin alteración en la expresión de CD31 endotelial y sin evidencia de neoangiogénesis.

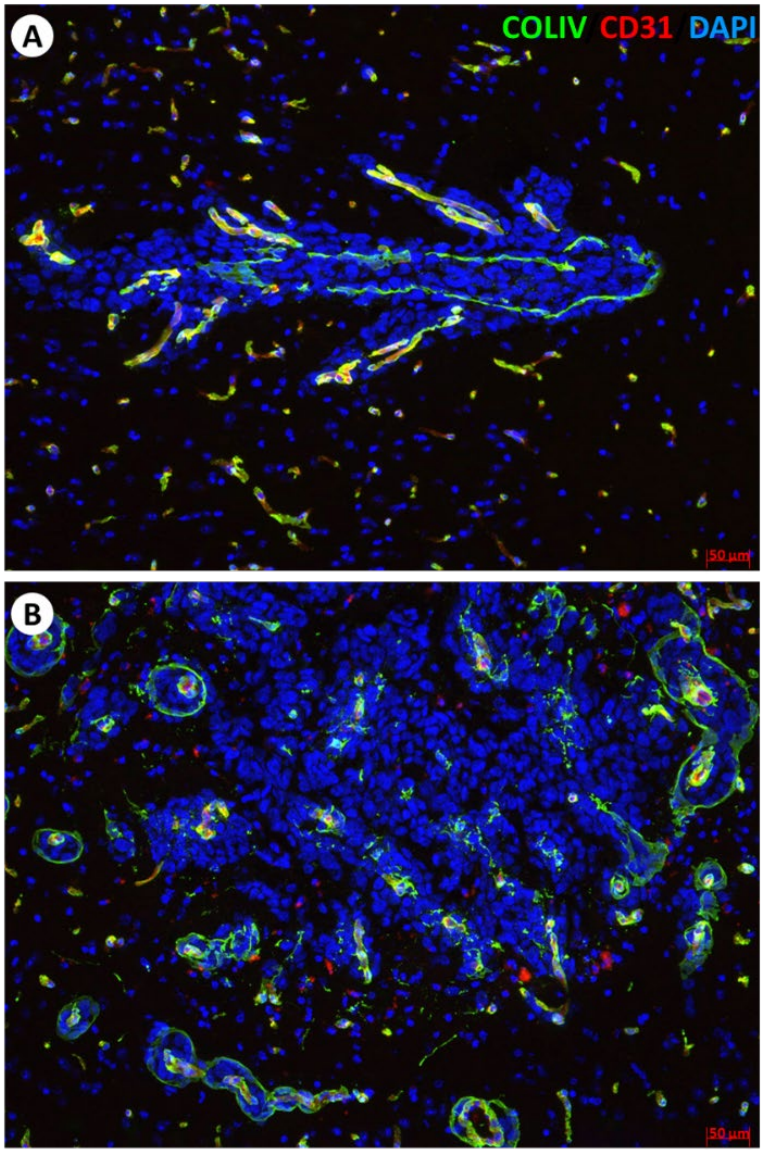


Figura 9: Marcaje con Col-IV y CD31. **A)** Las estructuras microvasculares periféricas carecen de zonas tumorales, en cambio se observan células tumorales en las estructuras centrales en la periferia del vaso gracias al doble marcaje para CD31 y colágeno IV. **B)** Dos capas de colágeno IV marcado de verde: rodeando el vaso y otra capa alrededor de las células que se encuentran en la periferia del vaso. Las células endoteliales de los vasos están marcadas con CD31 en rojo.

La utilización combinada de anticuerpos anti-CD31 y anti-Colágeno IV evidenció la co-localización de ambos anticuerpos sobre la mayoría de las estructuras microvasculares del encéfalo de estos ratones, lo que indica la existencia de Colágeno IV en las membranas basales que recubren dichas estructuras (Figuras 9A y 9B). En las estructuras microvasculares recubiertas por células tumorales metastásicas extravasculares, de nuevo se observó la existencia de capilares rodeados de Colágeno-IV y ocupando el eje central de la micrometástasis (Figura 9B). Tales capilares mantuvieron el colágeno-IV de sus membranas

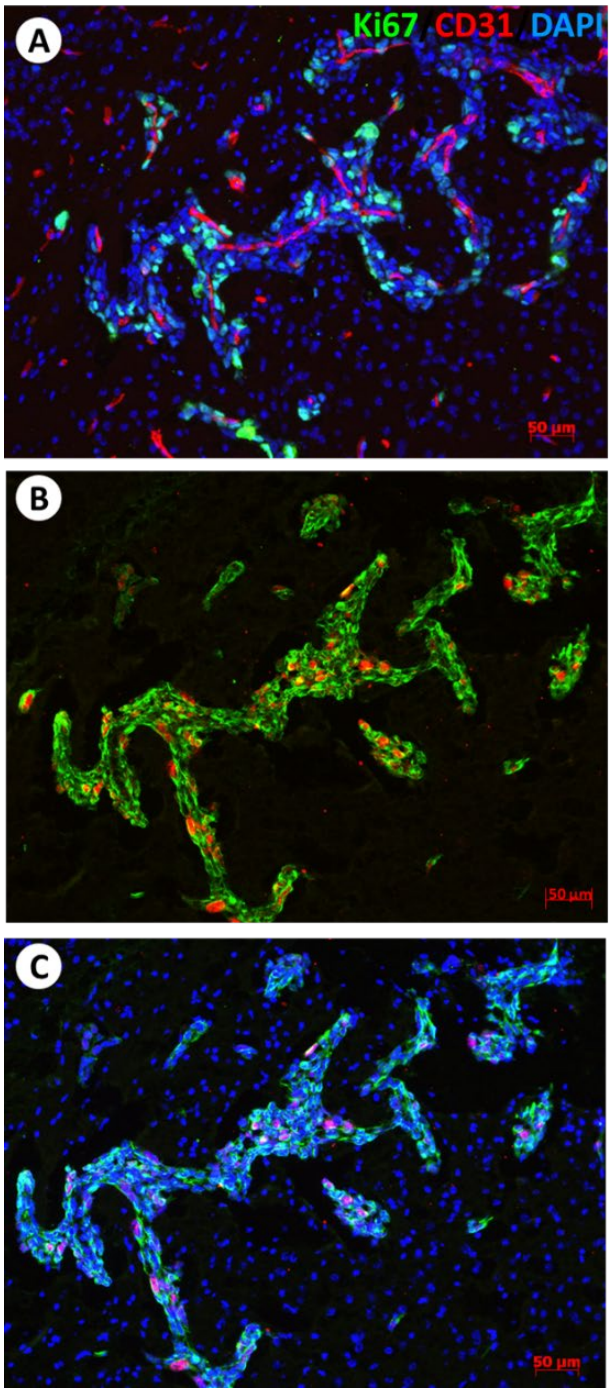


Figura 10: Marcaje con Ki67 y CD31. **A)** La utilización conjunta de anticuerpos anti-CD31 y anti-ki67 evidencia la localización exclusivamente perivascular de las células proliferativas. **B** y **C** La combinación de anticuerpos anti-ki67 con anticuerpos anti-citoqueratina permite verificar que las zonas perivasculares con células proliferativas ki-67+, corresponden a las zonas ocupadas por las células con expresión de citoqueratina.

basales a pesar de su posición intrametastásicas. Así mismo, muchas de las estructuras microvasculares rodeadas por tumor desarrollaron una capa más o menos continua, marcada con anticuerpos anti-Colágeno IV, pero no con anticuerpos anti-CD31 (Figura 9B). En ocasiones, dicha capa tuvo un carácter perimetastásico, formando la frontera externa entre las células metastásicas y el tejido nervioso circundante; y en otras ocasiones, dicha capa con Colágeno-IV delimitó de firma discontinua las zonas perivasculares con recubrimiento tumoral (Figuras 9A y 9B). Por tanto, en una primera etapa, las células metastásicas de este modelo tumoral crecieron en el cerebro de los ratones entre los límites marcados por las láminas con colágeno: internamente, el límite marcado por la membrana basal con Colágeno-IV del capilar rodeado, y externamente, el límite marcado por la lámina con Colágeno-IV existente alrededor de la micrometástasis, en ausencia de endotelio capilar.

La utilización conjunta de anticuerpos anti-CD31 y anti-ki67 evidenció la localización

exclusivamente perivascular de las células proliferativas (Figura 10A), no existiendo células con expresión de ki67 alejadas de las estructuras microvasculares con expresión de CD31.

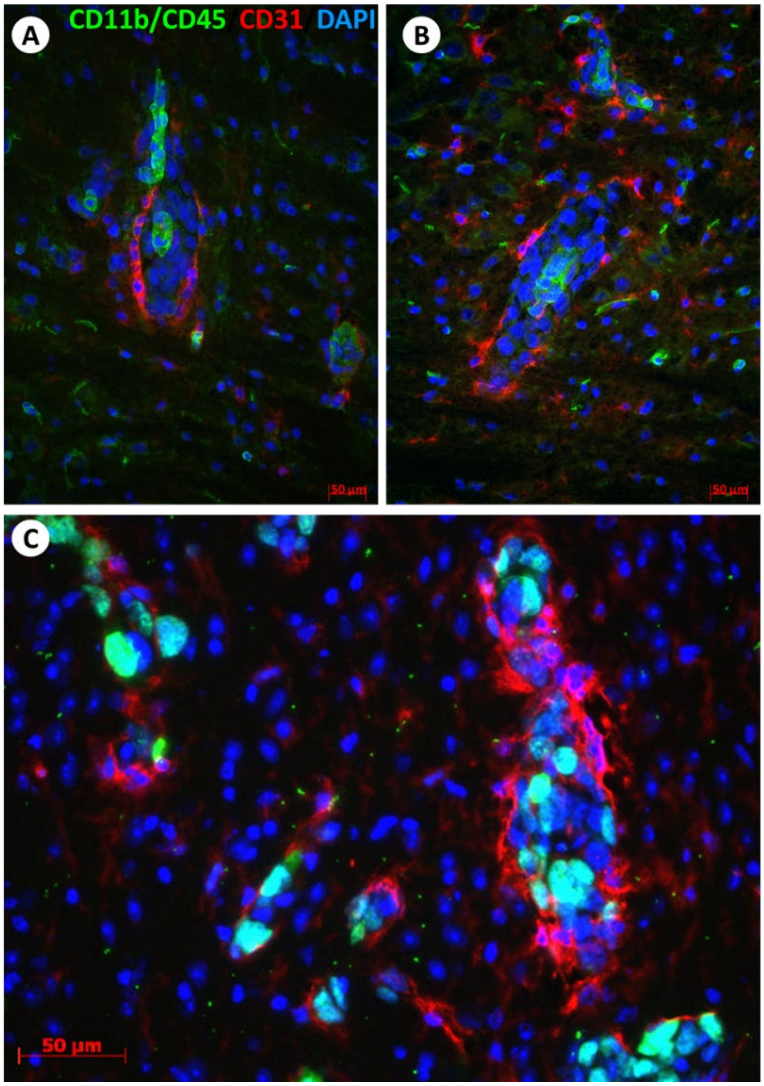


Figura 11: Marcaje CD11b/CD45 y CD31. Se emplean conjuntamente CD31 y CD11b/CD45 para el estudio de la microglía del encéfalo.

La combinación de anticuerpos anti-ki67 con anticuerpos anti-citoqueratina para identificar células de naturaleza epitelial, permitió verificar que las zonas perivasculares que contienen las células proliferativas con expresión de ki-67, se correspondieron con las zonas ocupadas por células con expresión de citoqueratina (Figuras 10B y 10C), demostrando que las células proliferativas fueron de naturaleza epitelial y, por tanto, del tumor inyectado.

Con el fin de estudiar si las células de la microglía están o no integradas en el microambiente de la micrometástasis cerebral de este modelo experimental de cáncer de mama, a continuación, se utilizaron de forma conjunta anticuerpos anti-CD31, como marcadores de los tractos microvasculares, y anti-CD11b/CD45, específicos de las células microgliales del encéfalo. Como se puede observar en las Figuras 11A y 11B, las células con expresión de CD11b/CD45 se concentraron en torno a las células tumorales perivasculares, no existiendo apenas células con expresión de

CD11b/CD45 alejadas de estas zonas. Así mismo, las células de la microglía formaron una barrera incompleta entre la zona tumoral perivascular y del parénquima cerebral, precisamente ocuparon el mismo sitio donde anteriormente se localizó el colágeno de tipo IV que marcó el límite externo de la micrometástasis. Al combinar anticuerpos anti-CD11b/CD45 con otros anti- ki-67 se pudo demostrar que las células proliferativas estuvieron generalmente asociadas también a las células microgliales con expresión de CD11b/CD45.

B. ESTUDIO DEL PROCESO METASTÁSICO CEREBRAL DE PACIENTES CON CÁNCER

El estudio del proceso metastásico tumoral en el encéfalo se llevó a cabo en biopsias obtenidas con consentimiento informado del paciente, y elegidas en zonas relevantes de la pieza quirúrgica tras el tratamiento de los pacientes con cáncer metastásico. Los 20 casos estudiados fueron representativos de la casuística de un quirófano de neurocirugía y se listan en la Tabla 8, siendo 7 metástasis de cáncer de pulmón, 3 de cáncer de mama, 2 de cáncer de ovario, una 1 de cáncer renal, hepatocarcinoma, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, melanoma, parótida, cáncer endometrial, y cáncer testicular.

De nuevo se utilizó el anticuerpo anti-MCK (AE1/AE3) con el fin de identificar la distribución y patrón de crecimiento de las células tumorales de origen epitelial localizadas en el encéfalo. Se aprecia como las células tumorales presentaron generalmente una elevada expresión citoplasmática de citoqueratinas, con independencia del linaje tumoral, de su estado funcional y de su localización en el encéfalo (Figura 12). Su buen marcaje inmunohistoquímico permitió constatar que las células metastásicas adoptaron un patrón de crecimiento altamente invasivo en la mayoría de los casos, con células dispersas, poco cohesivas y de morfología migratoria e invasiva, con tendencia a desarrollarse en torno a las estructuras vasculares, a las que generalmente respetaron, sin invadirlas (Figuras 12 A-B-C). También se observó la existencia de mitosis, pleomorfismo y multinucleación. En ocasiones las células adoptaron un patrón de crecimiento pseudoglandular

reminiscente de su origen carcinomatoso, siendo entonces su crecimiento generalmente más compresivo que infiltrativo (Figura 13).

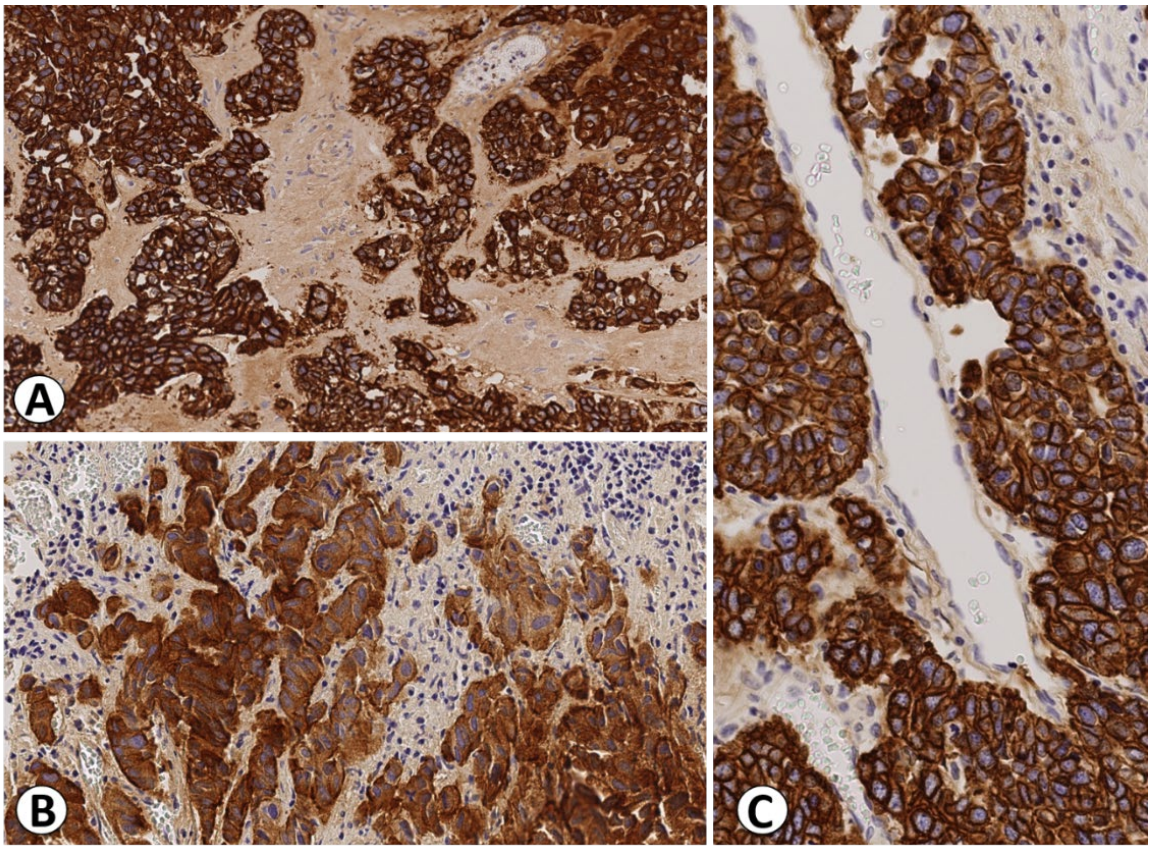


Figura 12: Técnica de Inmunohistoquímica realizada en muestras humanas de resecciones de metástasis cerebral utilizando anticuerpo frente a multicitoqueratina AE1/AE3. **A)** Metástasis cerebral de cáncer colorrectal (14x). **B)** Metástasis cerebral de carcinoma de pulmón (32x). **C)** Metástasis cerebral de tumor primario de origen ovárico (22x).

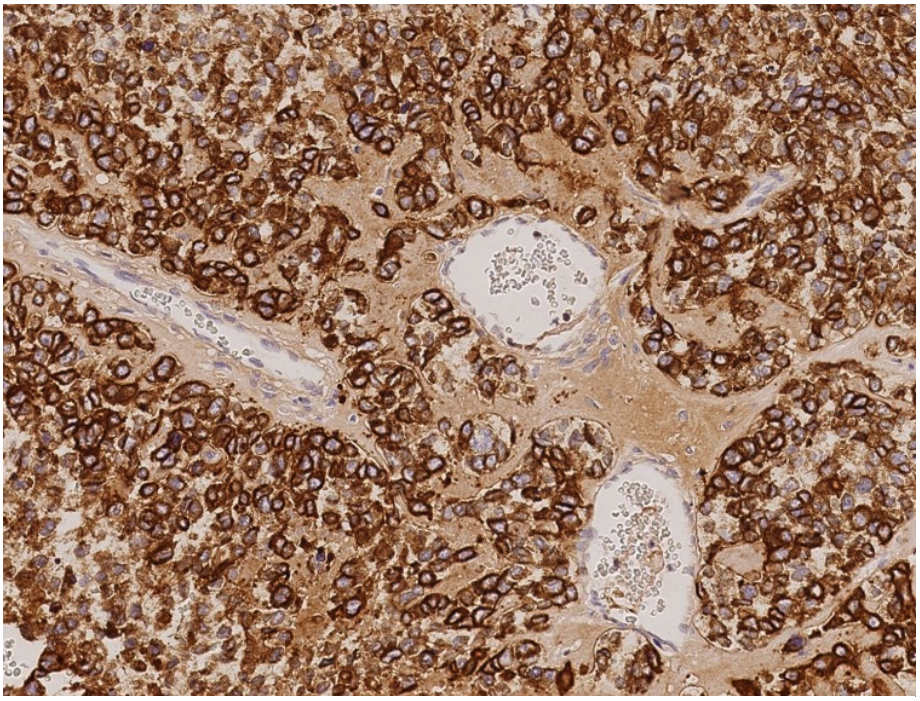


Figura 13: Técnica de Inmunohistoquímica realizada en muestras humanas de resecciones de metástasis cerebral utilizando anticuerpo frente a multicitoqueratina AE1/AE3. Metástasis cerebral de cáncer colorrectal (14x).

Estudio del patrón de crecimiento metastásico perivascular. Con el fin de confirmar la naturaleza microvascular de algunas de las estructuras englobadas por los focos metastásicos se utilizaron anticuerpos anti-CD31, específicos para células endoteliales. Como se aprecia en la Figura 14, las células metastásicas rodearon habitualmente tractos microvasculares de tipo venular y capilar (Figuras 14 A y B), en cuyo espacio perivascular crecieron en asociación con leucocitos migratorios y otras células estromales perivasculares. Con frecuencia, el desarrollo metastásico también se produjo alrededor de estructuras microvasculares arteriolares (Figuras 14 C y D), en cuyo caso las células metastásicas crecieron sobre la adventicia, siguiendo la trayectoria vascular, aunque sin aparente afectación de la pared microvascular.

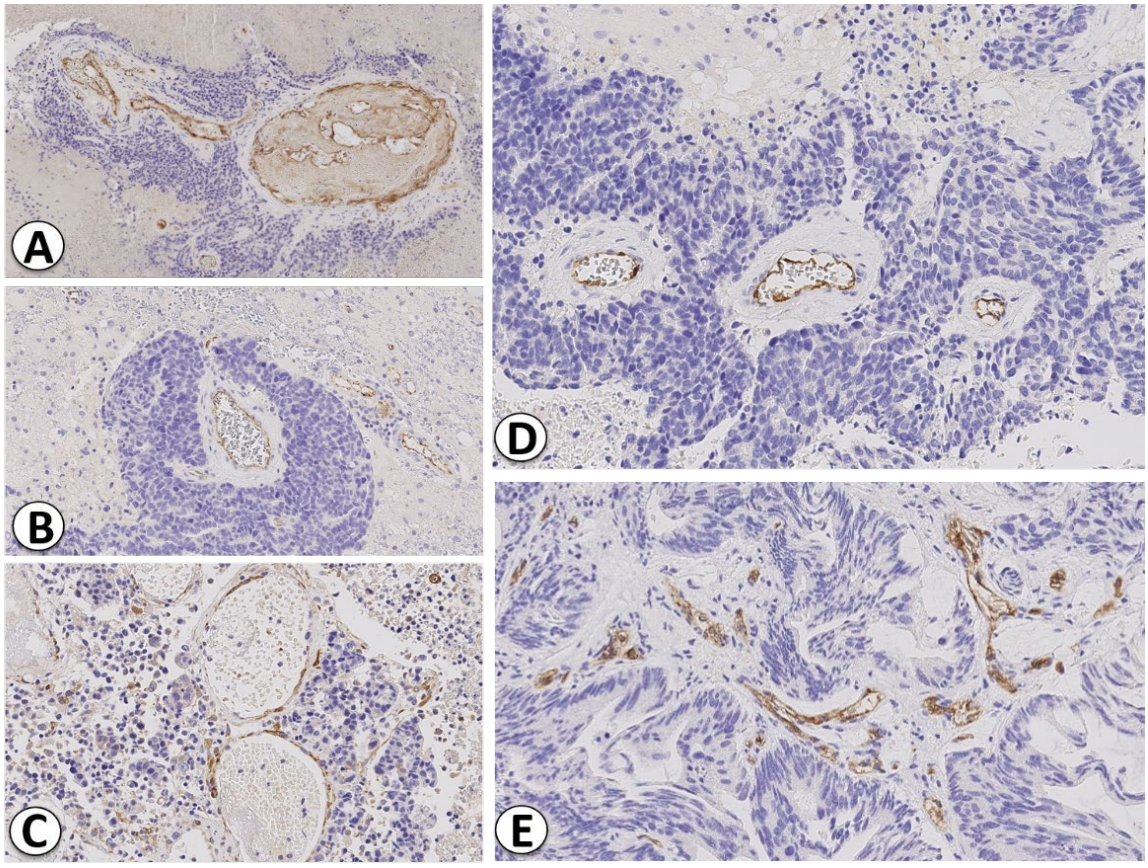


Figura 14: Técnica de Inmunohistoquímica realizada en muestras humanas de resecciones de metástasis cerebral utilizando anticuerpo frente a CD31. **A)** Metástasis cerebral de adenocarcinoma de mama (10x). **B)** Metástasis cerebral de adenocarcinoma de parótida (14x). **C)** Metástasis cerebral de adenocarcinoma de mama (12x). **D)** Metástasis cerebral cáncer de mama (14x). **E)** Metástasis cerebral de adenocarcinoma de mama (10x).

Por tanto, el crecimiento metastásico tumoral del encéfalo fue generalmente perivascular, con independencia del linaje tumoral, viéndose afectados tanto arteriolas, como capilares y vénulas pre-existentes en el tejido nervioso, no existiendo alteraciones en la estructura neurovascular, ni en su recubrimiento endotelial interno.

Para evaluar si el crecimiento metastásico perivascular del cerebro alteró la estructura molecular de las uniones estrechas inter-endoteliales de los vasos sanguíneos afectados, se aplicaron anticuerpos anti-Claudina 5. Dicho marcador permitió determinar los niveles de expresión de una molécula clave en la regulación de la permeabilización vascular del encéfalo tal como se ha descrito previamente (W. Jia et al., 2014). Como se puede apreciar en la Figura 15 A-D, las células endoteliales de las estructuras microvasculares afectadas por el crecimiento

metastásico presentaron una alta expresión de Claudina-5, con independencia del tipo de segmento microvascular y del linaje tumoral de la metástasis. De esta forma, se verificó que el crecimiento metastásico perivascular del cerebro no conllevó una debilitación o pérdida de la estructura molecular que regula la barrera de permeabilidad hematoencefálica (BHE), aunque en el caso de las estructuras microvasculares afectadas por metástasis, convendría denominarla la barrera hematotumoral existente entre la sangre y el tumor metastásico perivascular.

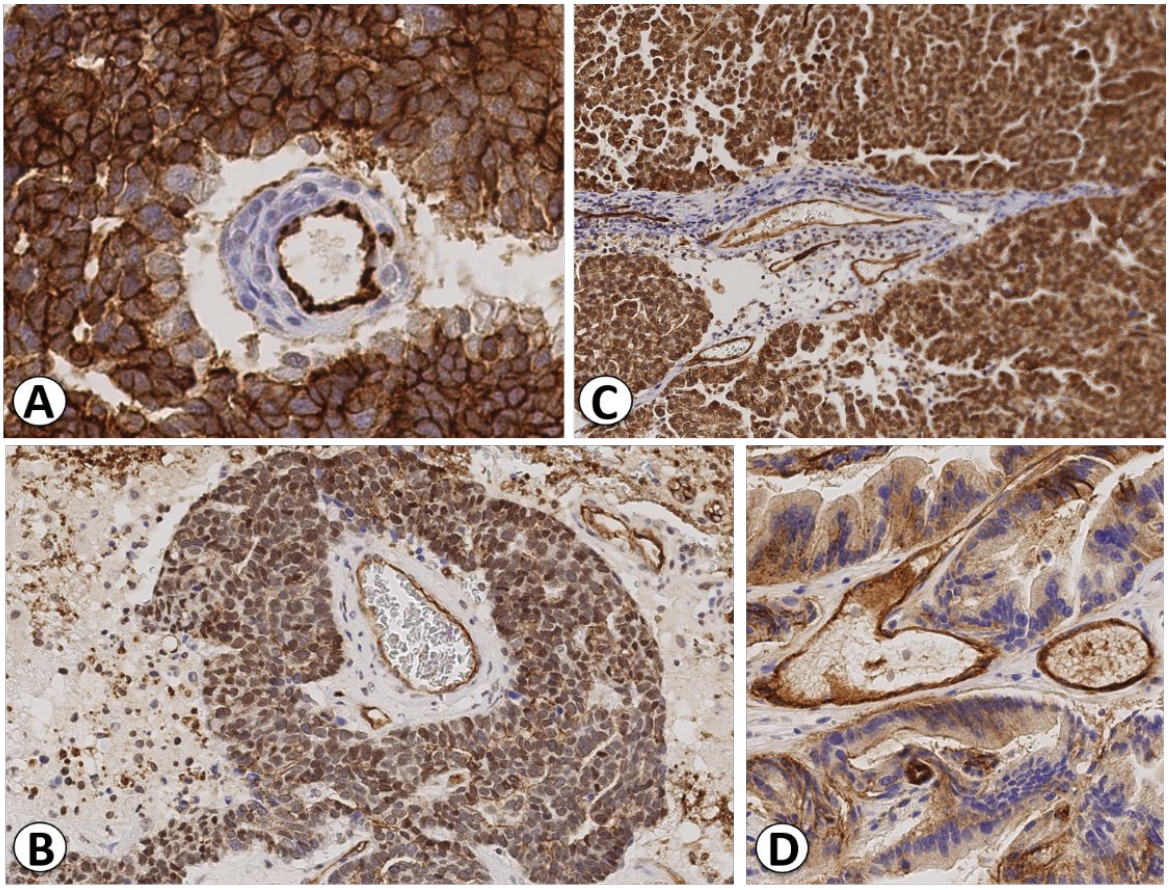


Figura 15: Técnica de Inmunohistoquímica realizada en muestras humanas de resecciones de metástasis cerebral utilizando anticuerpo frente a Claudina-5. **A)** Metástasis cerebral cáncer de mama. (20x). **B)** Metástasis cerebral de tumor primario de origen ovárico (12x). **C)** Metástasis cerebral de adenocarcinoma de parótida (12x). ***D)*** Metástasis cerebral de melanoma (15x).

Para profundizar en el estudio sobra la estructura celular de la pared neurovascular afectada por el proceso metastásico se utilizaron anticuerpos anti-NG2 para la detección de los pericitos específicos de la BHE, y anti-alfa actina de músculo liso (SMA), para la detección de miofibroblastos y de células musculares lisas perivasculares. En la Figura 16A se observa el marcaje de células subendoteliales en capilares y vénulas afectadas por el crecimiento metastásico. En la Figura 16B se

observa la debilitación del mismo marcaje en las células subendoteliales de vénulas con mayor calibre, aunque algunas de las células con expresión débil de NG2 se observaron entre las células tumorales, integradas en el tejido metastásico perivascular. No hubo células con expresión de NG2 en segmentos microvasculares arteriolas, estuvieran o no afectados por células metastásicas. En cambio, si se observó una alta expresión de alfa actina de músculo liso en las células subendoteliales de las estructuras neurovasculares afectadas por células metastásicas (Figuras 16C-E), aunque en ningún caso dichas células contribuyeron o se integraron en el tejido metastásico perivascular, a diferencia de lo que ocurre en tumores primitivos y metastásicos extracorticales.

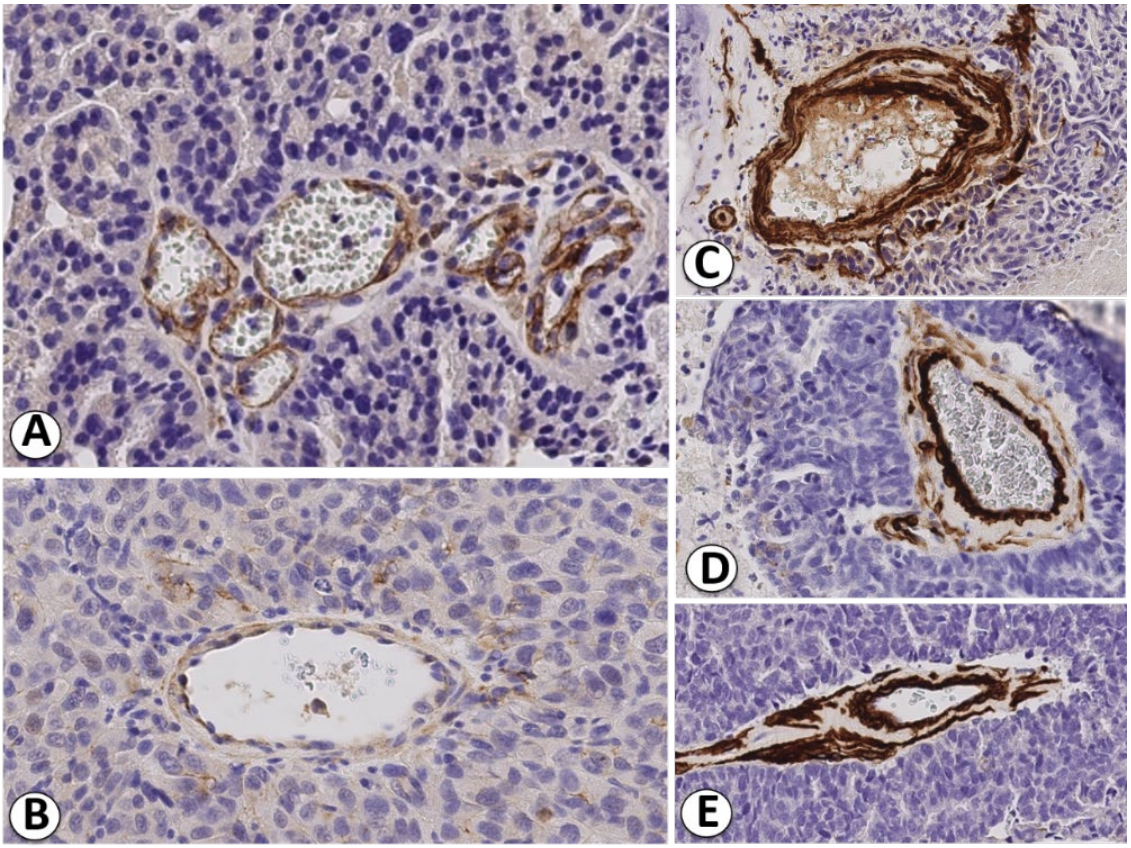


Figura 16: Técnica de Inmunohistoquímica realizada en muestras humanas de resecciones de metástasis cerebral utilizando anticuerpo frente a CSPG4 en **A** y **B**; mientras que, en **C**, **D** y **E** se ha utilizado el anticuerpo frente a SMA. **A)** Metástasis cerebral de carcinoma de ovario (11x). **B)** Metástasis cerebral de adenocarcinoma gástrico (17x). C) Metástasis cerebral de adenocarcinoma de mama (13x).**D)** Metástasis cerebral de adenocarcinoma de parótida (14x). **E)** Metástasis cerebral de adenocarcinoma de parótida (11x).

Dada la importancia del colágeno IV en las membranas basales que subyacen al revestimiento endotelial de todas las estructuras neurovasculares,

incluidas las de la BHE, a continuación, se aplicaron anticuerpos anti-Colágeno IV a nuevas preparaciones histológicas de los mismos 20 casos estudiados anteriormente. En las Figuras 17-18-19 se presentan imágenes de diferentes estructuras neurovasculares afectadas por el crecimiento metastásico de los tumores estudiados. En todos los casos se evidenció expresión de Col-IV subendotelial, aunque su nivel de intensidad varió con el segmento microvascular y la clase de metástasis.

Con frecuencia, además, existió también algo de marcaje de Col-IV en la zona de interfase entre el tejido metastásico y el nervioso, evidenciando la existencia de una lámina discontinua de matriz extracelular con Col-IV en el límite externo del tejido metastásico perivascular (Figuras 17-19), tal y como se ha descrito anteriormente en el modelo experimental de metástasis de cáncer de mama en ratones desnudos. Conviene recordar en este punto que dicha membrana bien podría derivar de la membrana basal externa de la pared vascular, generada por astrocitos alrededor de la BHE. Más aún, en algunos tipos de metástasis, el Col-IV también se observó entre las células tumorales, como molécula integrante de la matriz extracelular existente en el tejido metastásico perivascular. En este caso el Col-IV también podría derivar de la fragmentación de la membrana basal externa de la pared vascular por el crecimiento tumoral (Figuras 18A-C-D). De esta forma, las metástasis cerebrales presentaron Col-IV en tres localizaciones:

-Col-IV intrametastásico endovascular, como parte integrante de la barrera hematotumoral entre el tejido metastásico y la sangre.

-Col-IV intrametastásico intersticial, reutilizado como membrana basal de las células tumorales, o como componente de la matriz intersticial del tejido metastásico.

-Col-IV perimetastásico, integrado en la barrera neurotumoral constituida con frecuencia entre el tejido metastásico y el nervioso.

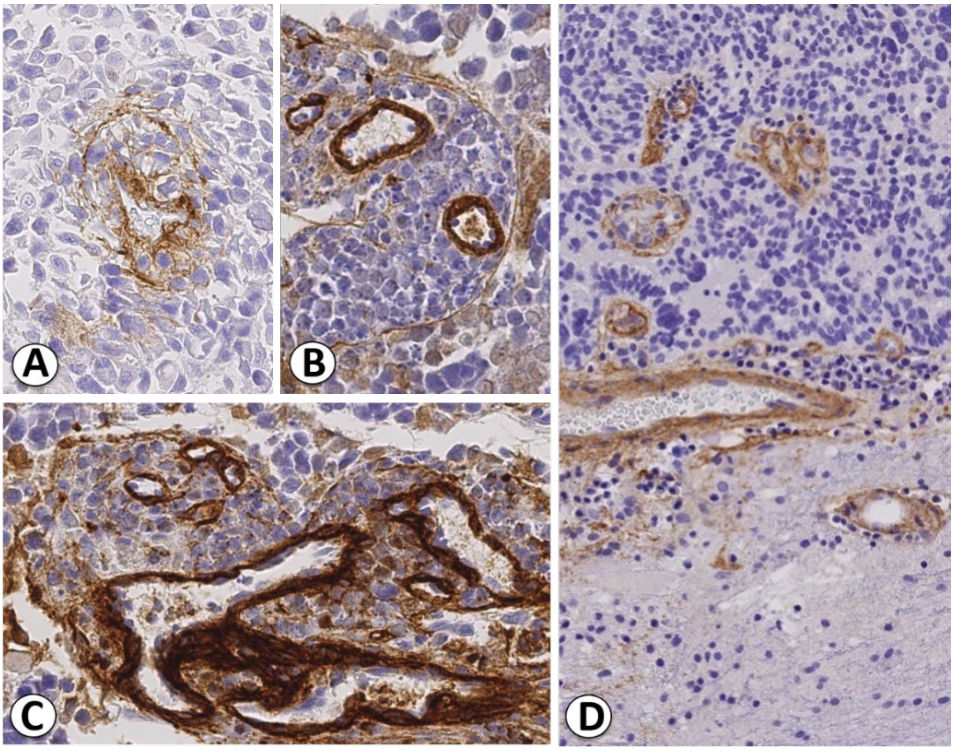


Figura 17: Técnica de Inmunohistoquímica realizada en muestras humanas de resecciones de metástasis cerebral utilizando anticuerpo frente a Colágeno tipo IV. **A)** Metástasis cerebral no sabemos su origen mamario (27x). **B)** Metástasis cerebral de carcinoma de pulmón (10x). **C)** Metástasis cerebral de carcinoma de pulmón (24x).**D)** Metástasis cerebral de carcinoma de ovario (10x).

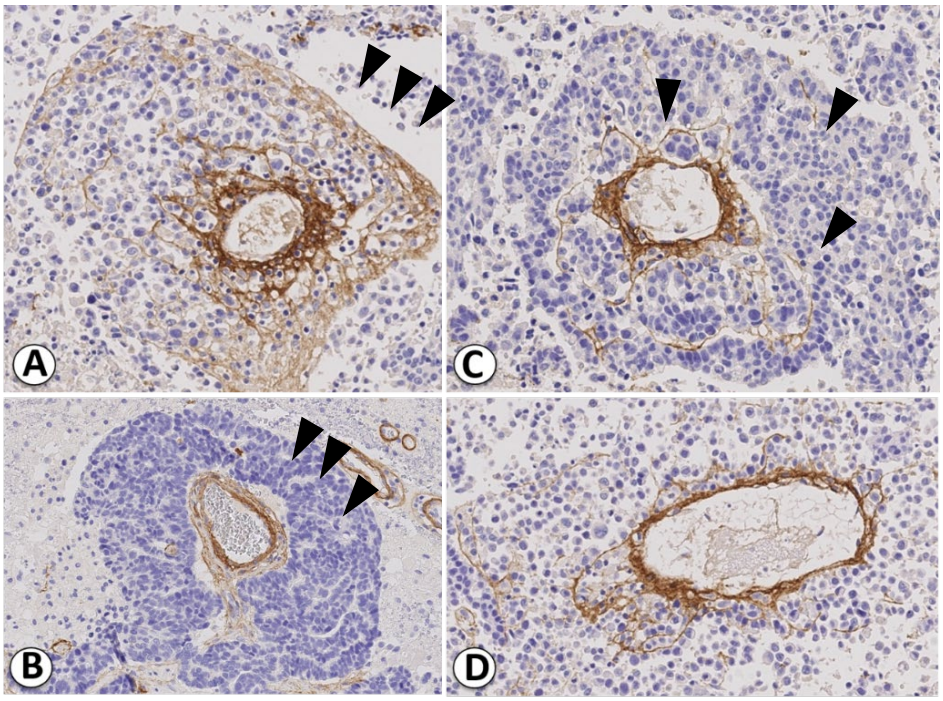


Figura 18: Colágeno tipo IV. **A)** Metástasis cerebral no sabemos su origen mamario (12x). **B)** Metástasis cerebral de adenocarcinoma de parótida (12x). **C)** Metástasis cerebral no sabemos su origen mamario (23x). **D)** Metástasis cerebral de cáncer de mama (12x).

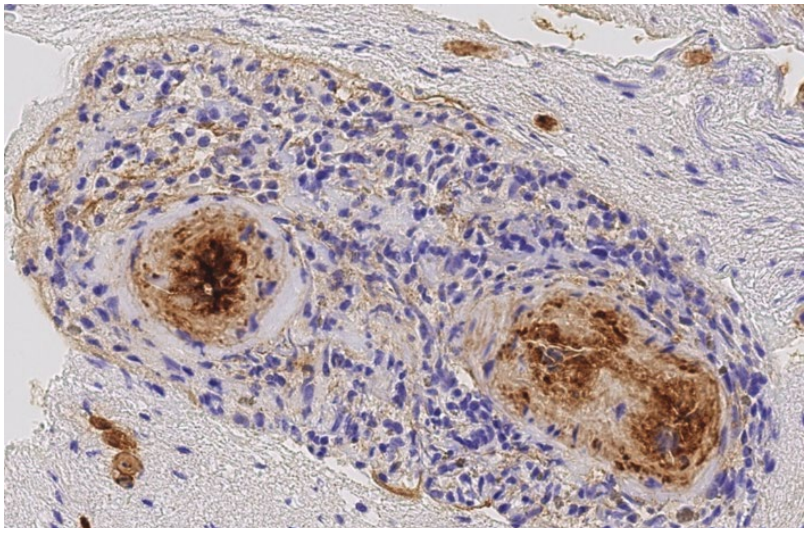


Figura 19: Técnica de Inmunohistoquímica realizada en muestras humanas de resecciones de metástasis cerebral utilizando anticuerpo frente a Colágeno tipo IV. Metástasis cerebral de cáncer de pulmón microcítico (23x).

Estudio de la glía perivascular durante el crecimiento metastásico. Con el fin de caracterizar funcionalmente la respuesta glial asociada al proceso de metástasis perivascular, se utilizaron anticuerpos anti-GFAP y anti-receptor beta fosforilado de PDGF (PDGFRB), cuyos antígenos están expresados por astrocitos activados del entorno neurovascular; y anticuerpos anti-CD11b para la detección de la microglía y de posibles células del sistema mononuclear-fagocítico incorporadas al encéfalo desde la sangre.

En las Figuras 20A y B se observan astrocitos perivasculares con alta expresión de GFAP en áreas del tejido nervioso alejadas de la metástasis. Como es bien sabido dichas células se conectan funcionalmente con las estructuras microvasculares a través de procesos (denominados pies) que forman la membrana glial perivascular, que es parte integrante de la BHE, siendo esta el origen del Col-IV que forma la membrana basal externa de la BHE. En la Figura 20C se observa como las células tumorales —que iniciaron el crecimiento metastásico perivascular tras su extravasación— separan los astrocitos perivasculares de la estructura endovascular, usurpando su posición subendotelial. Cuando el proceso de crecimiento metastásico perivascular se originó desde fuera de la estructura vascular y no desde dentro, entonces células metastásicas y astrocitos perivasculares se entremezclaron, aunque como se muestra en la Figura 20D, estos últimos quedaron progresivamente separados de la estructura vascular por el crecimiento tumoral, de forma similar a lo observado en metástasis perivasculares originadas tras la extravasación de células metastásicas.

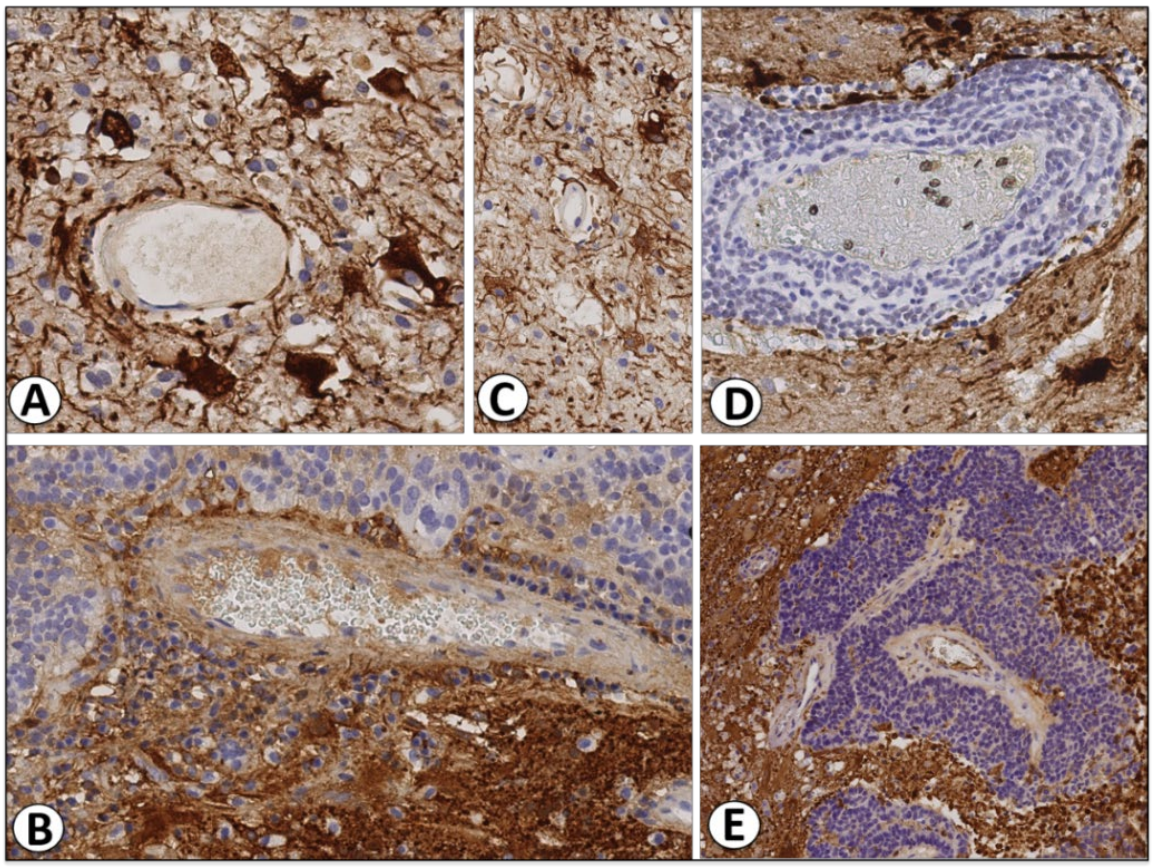


Figura 20: Técnica de Inmunohistoquímica realizada en muestras humanas de resecciones de metástasis cerebral utilizando anticuerpo frente a GFAP. **A)** Metástasis cerebral de cáncer microcítico de pulmón (30x). **B)** Metástasis cerebral de carcinoma de ovario (16x). **C)** Metástasis cerebral de cáncer microcítico de pulmón 4(34x). **D)** Metástasis cerebral origen primario desconocido (14x). **E)** Metástasis cerebral pobremente diferenciado de parótida (34x).

En muchos casos, el crecimiento perivascular de células tumorales se produjo de forma paralela al eje longitudinal de la estructura vascular, generando una vaina perivascular de un diámetro aproximado de 1-2 mm, rara vez infiltrada, ni por estroma perivascular —de localización exclusivamente endovascular—, ni por astrocitos —de localización exclusiva alrededor de la vaina de tejido metastásico perivascular (Figura 20D). En las Figuras 21A, B y C se observan imágenes representativas de la progresiva activación y proliferación de los astrocitos con alta expresión de GFAP, en las metástasis grandes, clínicamente visibles. En todos los casos, los astrocitos formaron una barrera perimetastásica, pero no se integraron como estroma del tejido metastásico tumoral, ni como parte integrante de estructuras neo-angiogénicas intrametastásicas si las hubiese.

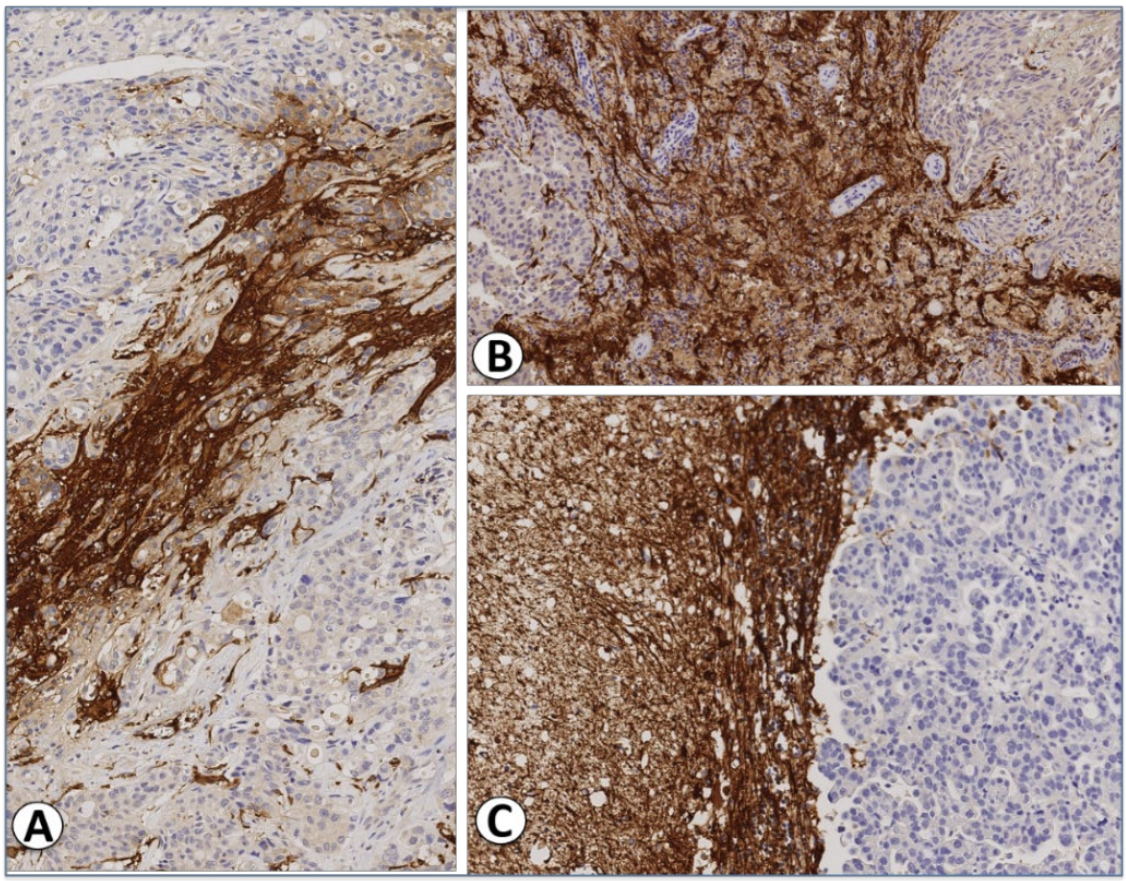


Figura 21: Técnica de Inmunohistoquímica realizada en muestras humanas de resecciones de metástasis cerebral utilizando anticuerpo frente a GFAP. **A)** Metástasis cerebral de adenocarcinoma de pulmón (19x). **B)** Metástasis cerebral de adenocarcinoma de pulmón (13x) **C)** Metástasis cerebral de cáncer de ovario (18x).

En concordancia con trabajos anteriores del grupo en el que se ha desarrollado el presente proyecto de tesis doctoral (Gril et al), los astrocitos del tejido nervioso no afectado por metástasis presentaron una alta expresión de pPDGFRβ (Figura 22A). Dichas células también se observaron en zonas de tejido nervioso atrapadas en el interior de metástasis grandes (Figuras 22B y C), e incluso entre células tumorales, aunque en este caso no se puede descartar que las propias células tumorales pudiesen expresar también pPDGFRβ en zonas altamente proliferativas e invasivas de la metástasis (Figura 22D).

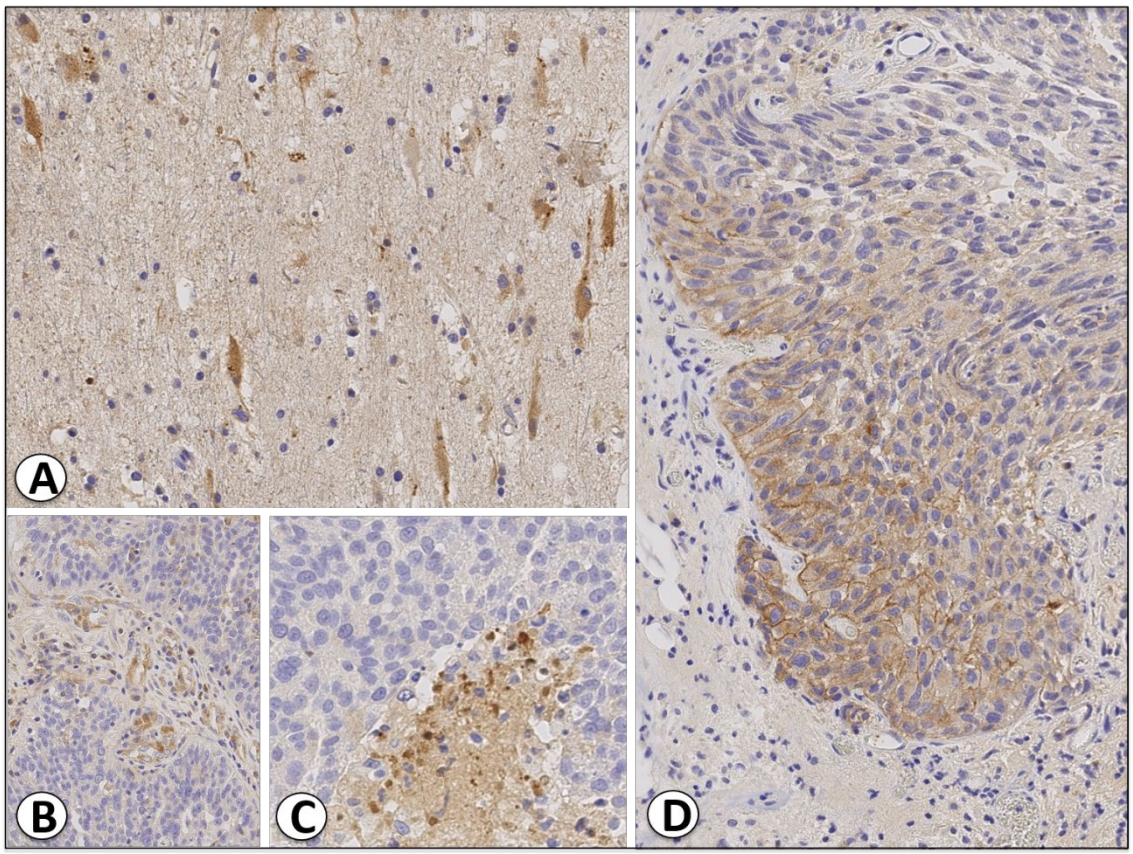


Figura 22: Técnica de Inmunohistoquímica realizada en muestras humanas de resecciones de metástasis cerebral utilizando anticuerpo frente a PDGFRβ fosforilado. **A)** Metástasis cerebral de carcinoma de ovario (13x). **B)** Metástasis cerebral de carcinoma de ovario (16x). **C)** Metástasis cerebral de carcinoma de ovario (18x). **D)** Metástasis cerebral de adenocarcinoma de pulmón (13x).

C. RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL DEL ENDOTELIO CEREBROVASCULAR A FACTORES SOLUBLES DEL ASTROCITO, TRAS SU ACTIVACIÓN POR FACTORES SOLUBLES DEL CÁNCER DE MAMA CON O SIN SOBREEXPRESIÓN DE *Her2* Y EXPOSICIÓN O NO A ESTÍMULOS DEL MICROAMBIENTE TUMORAL

Una vez analizada microscópicamente la composición celular y extracelular asociada al proceso de metástasis cerebrales experimentales y clínicas, el siguiente objetivo del proyecto fue estudiar la respuesta transcripcional del ECV en cultivo, mantenido en presencia de factores solubles (medio condicionado) generados por astrocitos activados a su vez por factores solubles producidos por la línea MDA-231 de cáncer de mama metastásico, con o sin sobreexpresión de *Her2* y exposición o no a factores del microambiente tumoral (MAT).

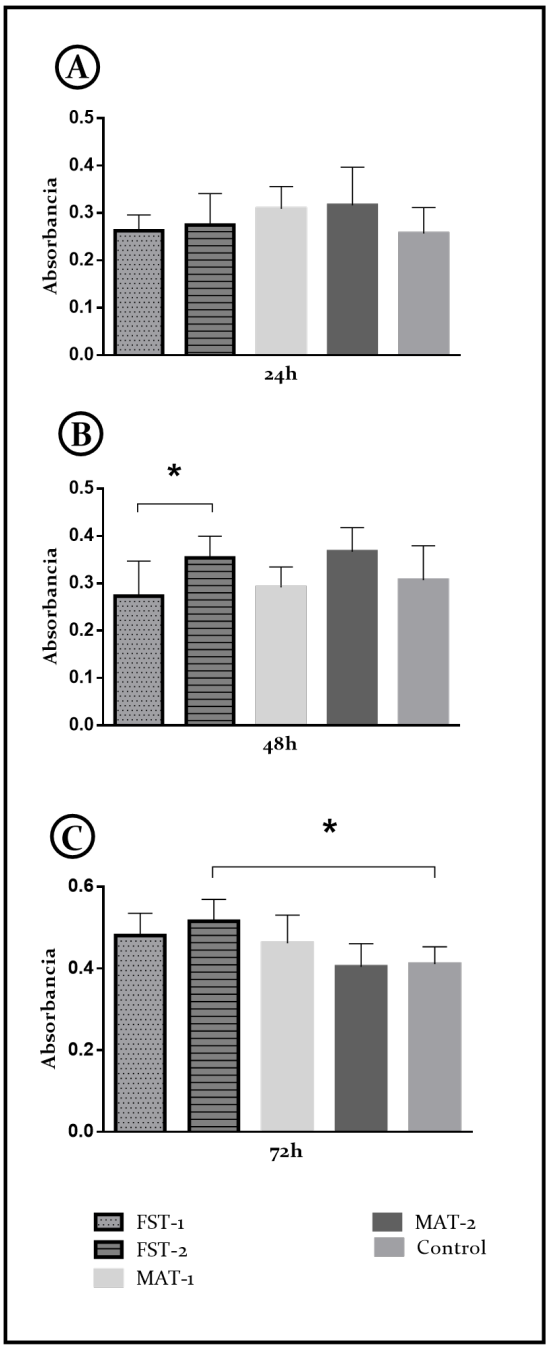


Figura 23: Ensayo de viabilidad y proliferación de astrocitos humanos durante 24 horas **(A)**, 48 horas **(B)** y 72 horas **(C)** en presencia de medio condicionado por células tumorales de cáncer de mama MDA 231 con o sin sobreexpresión de HER2 y exposición a factores del MAT. (*) Diferencias estadísticamente significativas con respecto al "Control" con medio de cultivo sin condicionar por el tumor ($p<0.05$, n= 3)

Sobre esta amplia basa de evidencias, en el presente proyecto se recogieron y mezclaron a partes iguales los medios condicionados por las células MDA-231, con o sin sobreexpresión de *Her2*, sometidas o no a los efectos de los 4 agentes del MAT. De esta forma se creó un nuevo medio condicionado con todos los factores solubles generados tras la respuesta de las células MDA-231 a los 4 agentes del MAT. Fue esta mezcla de medios condicionados tumorales, reminiscente de los factores solubles de la respuesta tumoral al MAT, la que se añadió a continuación, durante 24 y 48 horas, a cultivos de astrocitos, para crear nuevos fenotipos funcionales del astrocito tras su activación por los factores solubles de la respuesta tumoral al MAT.

En las Figuras 23A-C se presentan los resultados del estudio de la viabilidad funcional de los astrocitos mediante el ensayo MTT. Como se puede constatar, ningún medio condicionado por tumor inhibió los astrocitos con respecto a los niveles basales del control, incubado con medio de cultivo sin condicionar por el tumor. En concreto, tras 24 horas de incubación, los astrocitos expuestos al medio condicionado de tumor activado por MAT aumentaron levemente (25%) la proliferación, con

independencia de la sobreexpresión o no de *Her2* por el tumor. Tras 48 horas de incubación, el leve aumento de proliferación (25%) ya solo se produjo en los astrocitos incubados con los medios condicionados por tumores con sobreexpresión de *Her2*, con independencia de su exposición o no a MAT y tras 72 horas de incubación, el efecto estimulante sobre el astrocito solo fue algo visible con los medios condicionados por tumor con o sin sobreexpresión de *Her2* que no estuvieron expuestos a factores del MAT (Figuras 23A-C).

Una vez optimizado el modelo de astrocito activado por tumor, el siguiente objetivo de este apartado del proyecto fue el estudio de la respuesta funcional (proliferativa y transcripcional) del ECV a los factores solubles producidos por los diferentes estados del astrocito (8 condiciones), tras su exposición o no, durante 24 y 48 horas, a factores solubles del cáncer de mama, con o sin sobreexpresión de *Her2* y exposición o no a estímulos del MAT.

En las Figuras 24A-C se presentan los resultados de ensayos MTT sobre viabilidad y proliferación del ECV tras su incubación con los diferentes medios condicionados de astrocitos, estando expresados dichos resultados en relación con los valores de proliferación basal del ECV (sin exposición a medios condicionados por astrocitos).

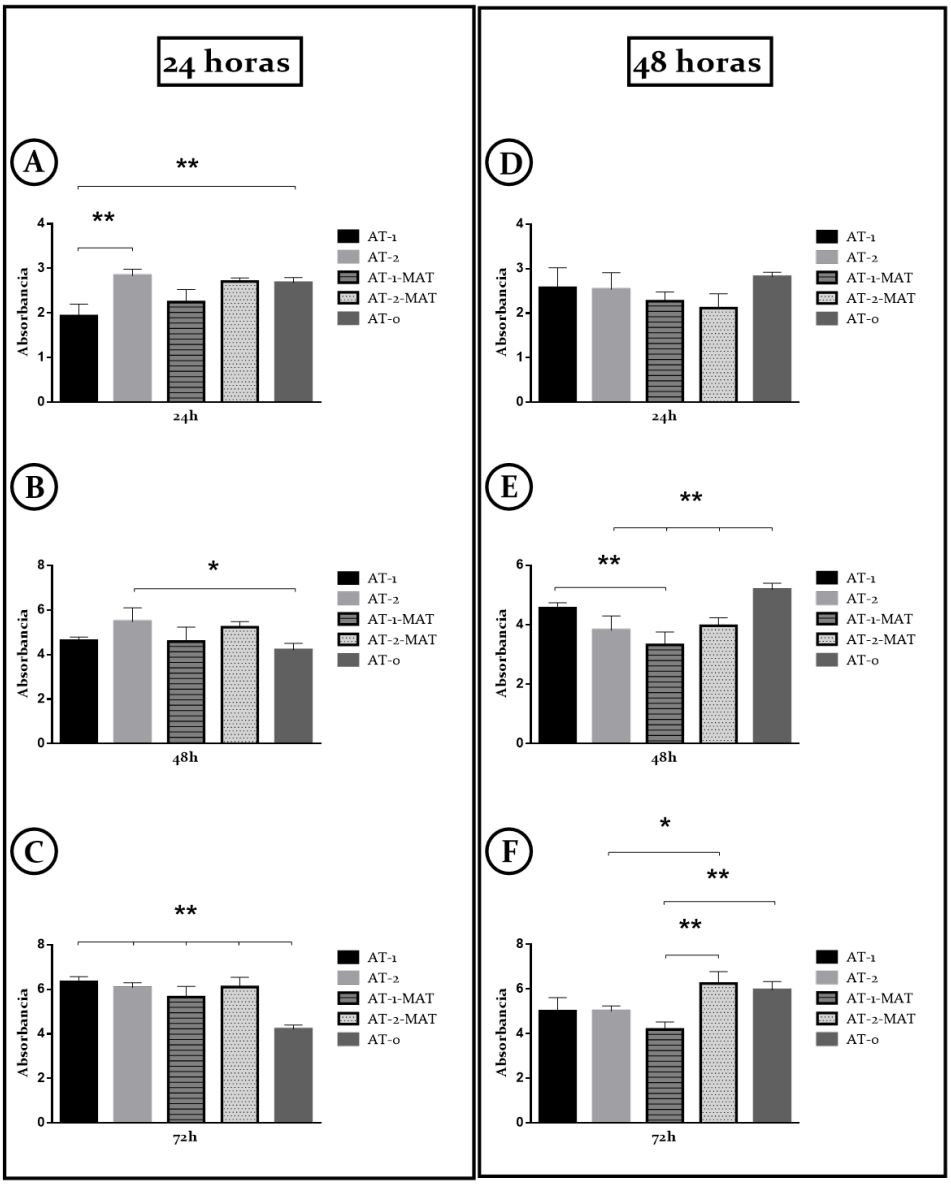


Figura 24: Ensayo de MTT sobre viabilidad y proliferación del ECV en cultivo tras su exposición a los medios condicionados de Astrocitos humanos activados durante 24 y 48 horas por medios condicionados de cáncer de mama con y sin HER2 y exposición a factores del MAT. Tiempos de lectura para los medios condicionados de Astrocitos activados durante 24 horas **(A)**, 48 horas **(B)** y 72 horas **(C)**. Tiempos de lectura para los medios condicionados de Astrocitos activados durante 48 horas **(D)**, 48 horas **(E)** y 72 horas **(F)**. (*) Diferencias estadísticamente significativas con respecto al "Control" con medio de cultivo sin condicionar por el tumor ($p<0.05$, n= 3) y (**) ($p<0.01$, n= 3).

Como se puede apreciar, el medio condicionado por el astrocito basal (sin exposición a ningún factor tumoral) aumentó a las 24 horas entre un 35% la proliferación endotelial con respecto al ECV incubado con medio sin condicionar por astrocitos utilizado como controles (Figuras 24A y C). Este mismo aumento se constató cuando el ECV recibió medios condicionados de astrocitos incubados

durante 24 horas (y algo menos marcado durante 48 horas) con el medio condicionado de tumores con y sin sobreexpresión de *Her2* y exposición a factores del MAT. Este efecto tendió a desaparecer tras 48 horas de incubación del ECV con los diferentes medios condicionados de astrocito, aunque en ningún caso se observó pérdida de viabilidad celular.

En la Figura 25 se presentan los resultados sobre la expresión de tres subgrupos funcionales de genes escogidos por su diferente implicación en la regulación de la estructura y función del ECV. En concreto, se estudiaron genes asociados a la regulación de:

- Las relaciones intercelulares homo y heterotípicas (*Zonula-1, Claudina-5, Pecam-1, Vcam-1*).
- Los intercambios moleculares transcelulares (*receptor de Ldl-r, Glut-1, Caveolina-1, glucoproteína P*).
- La diferenciación endotelial (*Colágeno-IV, Tgfβ-1, Rage y Vegf-r2*).

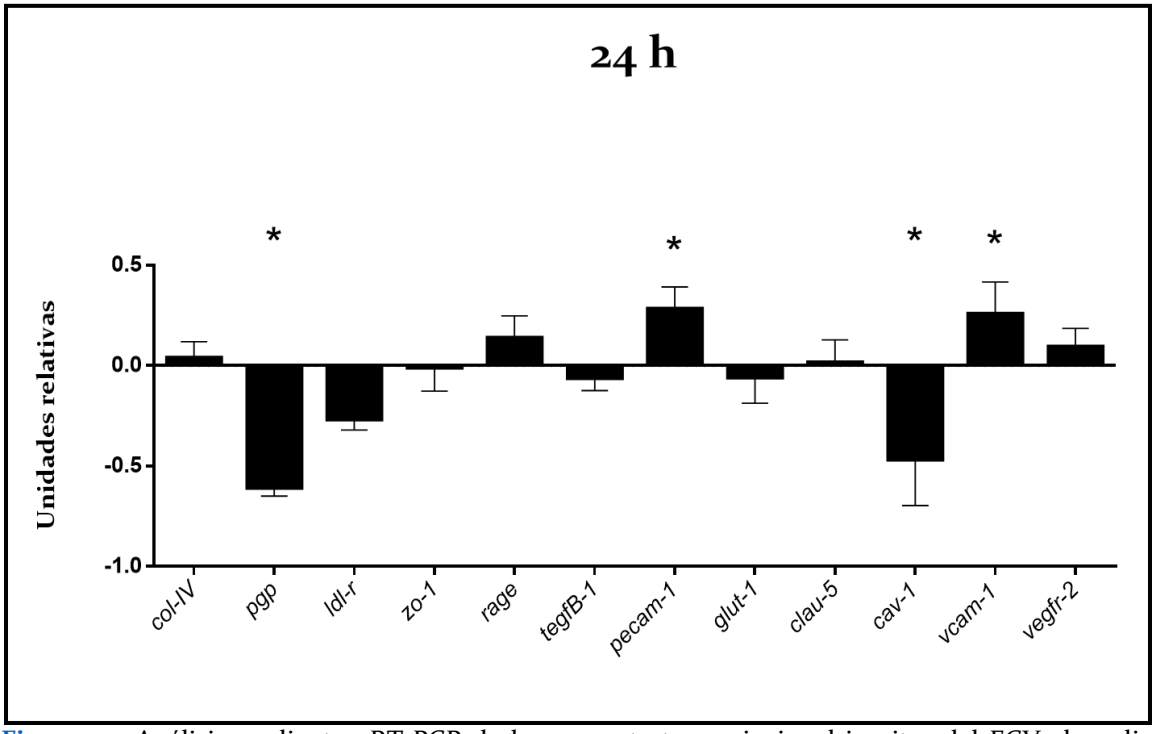


Figura 25: Análisis mediante qRT-PCR de la respuesta transcripcional in vitro del ECV al medio condicionado de astrocitos humanos en condiciones basales de cultivo. Los resultados se expresan con valores logarítmicos relativos con respecto a los obtenidos del ECV en cultivo basal. Los datos representan valores medios ±DE de dos experimentos independientes con muestras por

cuadriplicado (n=8). (*) Diferencias estadísticamente significativas en la expresión de 4 genes ($p<0.05$).

La transcripción de dichos genes se evaluó tras la incubación del ECV en presencia del medio condicionado por astrocitos cultivados en condiciones basales. Los resultados se expresaron en valores relativos con respecto a la expresión del ECV cultivado con su medio basal. En el grupo de genes asociados a las relaciones intercelulares se produjeron pequeños aumentos de alrededor del 25% en la expresión de *Pecam-1* y *Vcam-1*, mientras que la expresión de los genes de *Zo-1* y *Clau-5* no sufrieron cambios. En el grupo de genes asociados a los intercambios moleculares transcelulares se produjeron disminuciones de alrededor del 50% en la expresión de los genes de *Pgp* y *Cav-1*, y del 25% en la del gen de *Ldl-r*, no sufriendo cambios de expresión el gen de *Glut-1*. En el grupo de genes asociados a la diferenciación endotelial, ninguno de estos sufrió alteraciones de expresión.

A continuación, se cuantificó la expresión de los mismos genes tras la incubación del ECV en presencia de los diferentes medios condicionados de astrocitos, cultivados a su vez con medios condicionados del tumor MDA-231, con y sin sobreexpresión de *Her2* y exposición o no a factores del MAT. Los resultados se expresaron en valores relativos con respecto a los obtenidos del ECV con medio de cultivo condicionado por astrocitos basales.

En el análisis de la respuesta transcripcional del ECV a los factores de astrocitos se tuvieron en consideración: 1) las diferencias entre los tres grupos funcionales de genes; 2) la sobreexpresión o no de *Her2* por el tumor con exposición al MAT; y 3) la exposición o no al MAT del tumor con o sin sobreexpresión de *Her2*.

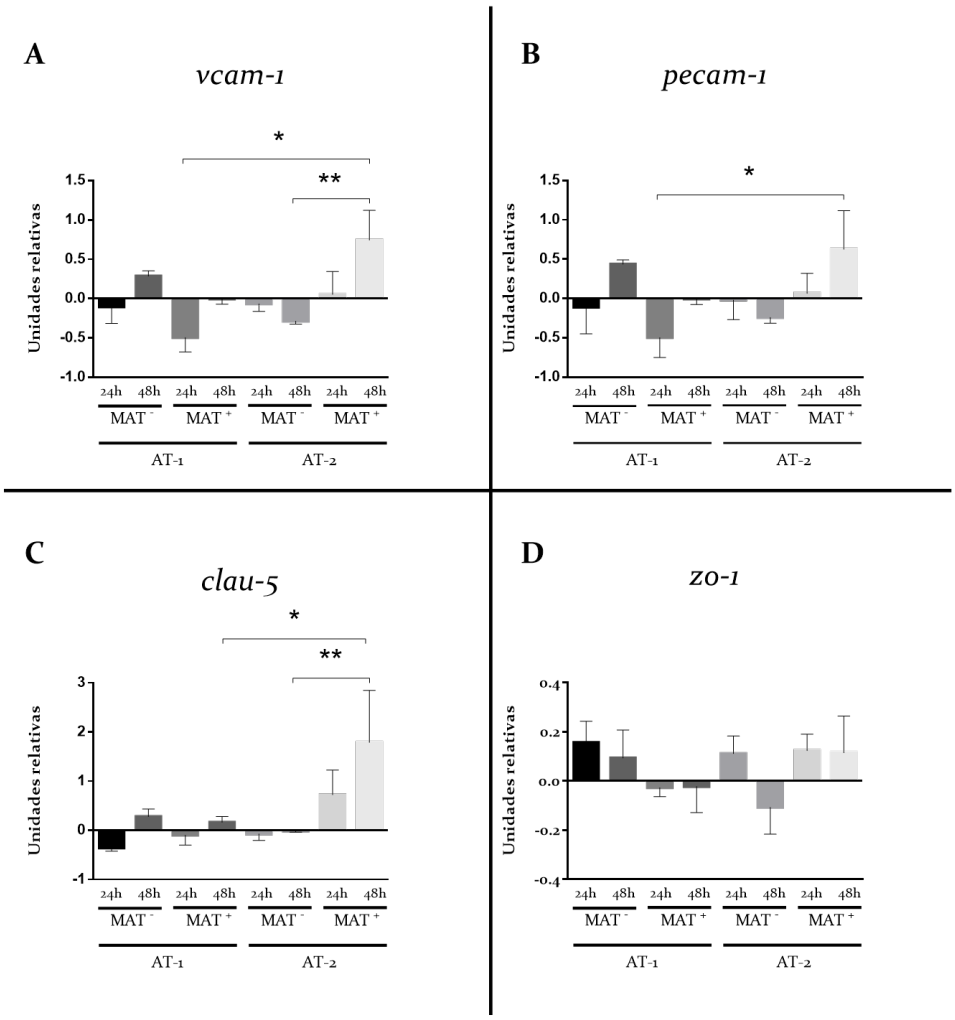


Figura 26: Resultados sobre la expresión del grupo de genes asociados a las relaciones intercelulares del ECV. **A)** Resultados de expresión Vcam-1. **B)** resultados de expresión *Pecam-1*. **C)** expresión de *Clau-5* y **D)** *Zo-1*. Los datos representan valores medios ±DE de dos experimentos independientes con muestras por cuadriplicado (n=8). (*) Diferencias estadísticamente significativas en la expresión de genes respecto a HER2+. (**) Diferencias estadísticamente significativas en la expresión de genes respecto a la ausencia de MAT ($p<0.05$).

Con respecto a la expresión del gen de *Clau-5*, se constató que los medios condicionados por astrocitos tratados durante 24 horas con el medio condicionado de tumores con sobreexpresión de *Her2* y exposición a factores del MAT produjeron un aumento estadísticamente significativo, que se todavía fue mayor cuando los astrocitos estuvieron tratados con el mismo medio condicionado tumoral durante 48 horas. Este mismo patrón de respuesta transcripcional se produjo en la expresión de *Vcam-1*, donde sobreexpresión tumoral de *Her2* y exposición al MAT determinaron un cambio en la expresión de *Vcam-1*, que pasó de ser inferior al del ECV con el medio de astrocitos basales, a un nivel de aumento muy significativo, cuando el astrocito estuvo expuesto 48 horas al medio condicionado tumoral. Lo

mismo ocurrió con el gen *Pecam-1*, donde se pasó de inhibición de la expresión (cuando el astrocito recibió el medio condicionado de tumor expuesto a MAT sin sobreexpresión de *Her2*) a un aumento cuando sobreexpresión tumoral de *Her2* y exposición a MAT se sumaron en su efecto sobre el astrocito. En cambio, la expresión del gen *Zo-1* no sufrió alteraciones estadísticamente significativas en ninguna de las condiciones de estudio consideradas (Figura 26).

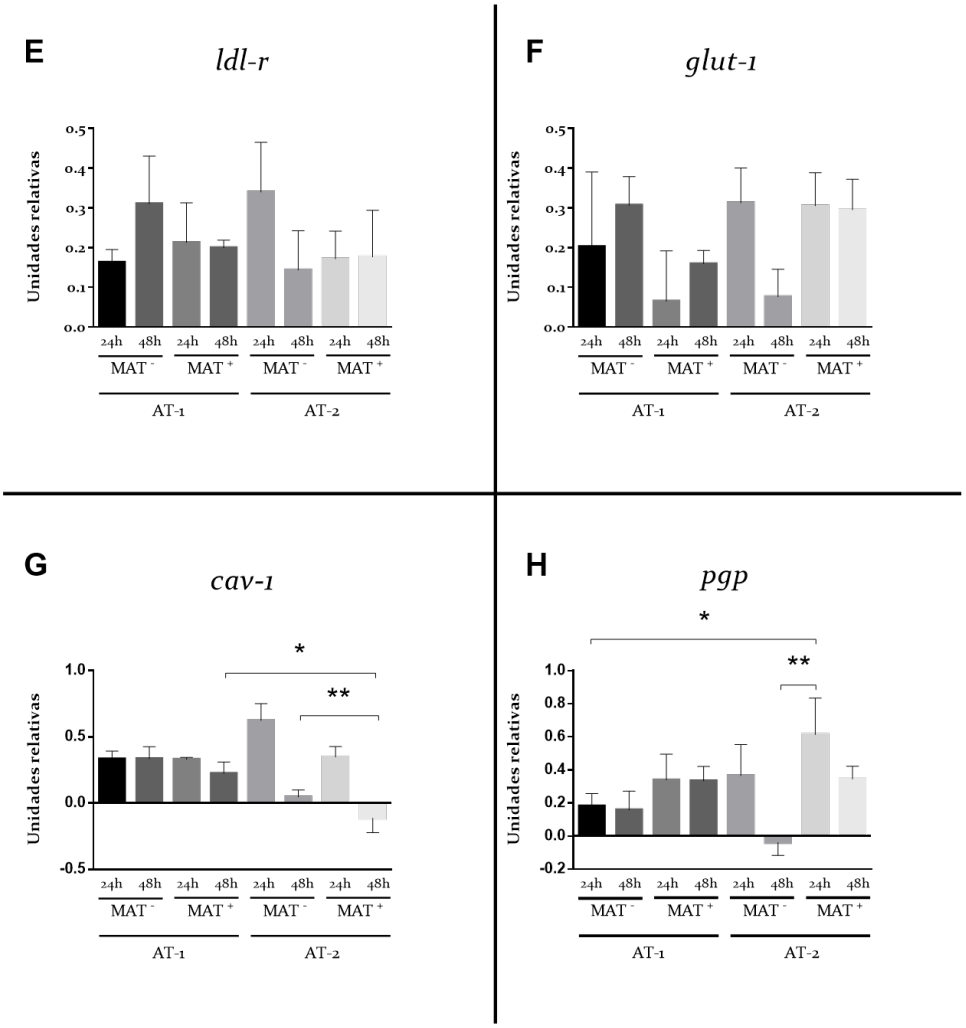


Figura 27: resultados sobre la expresión del grupo de genes asociados a los intercambios moleculares transcelulares del ECV. **E)** Resultados de expresión *Ldl-r*. **F)** resultados de expresión *Glut-1*. **G)** expresión de *Cav-1* y **H)** *Pgp*. Los datos representan valores medios ±DE de dos experimentos independientes con muestras por cuadriplicado (n=8). (*) Diferencias estadísticamente significativas en la expresión de genes respecto a HER2+. (**) Diferencias estadísticamente significativas en la expresión de genes respecto a la ausencia de MAT ($p<0.05$).

La mayoría de los medios condicionados obtenidos de astrocitos activados por factores tumorales revirtieron (con independencia de *Her2* y MAT) el efecto inhibidor transcripcional del astrocito basal sobre los genes *Cav-1*, *Ldl-r* y *Pgp* (Figura 27). Así mismo, en el caso de *Glut-1* se produjo un aumento ligero en su expresión

con independencia de la sobreexpresión o no de *Her2* y la exposición o no del tumor al MAT. Fueron llamativos los aumentos de expresión de los genes *Cav-1*, *Ldl-r* y *Pgp* (inhibidos por el medio de astrocito basal), por el efecto del medio del astrocito activado durante 24 o 48 horas con sobreexpresión de *Her2* (*Cav-1*, *Ldl-r*) y exposición al MAT (*Pgp)*.

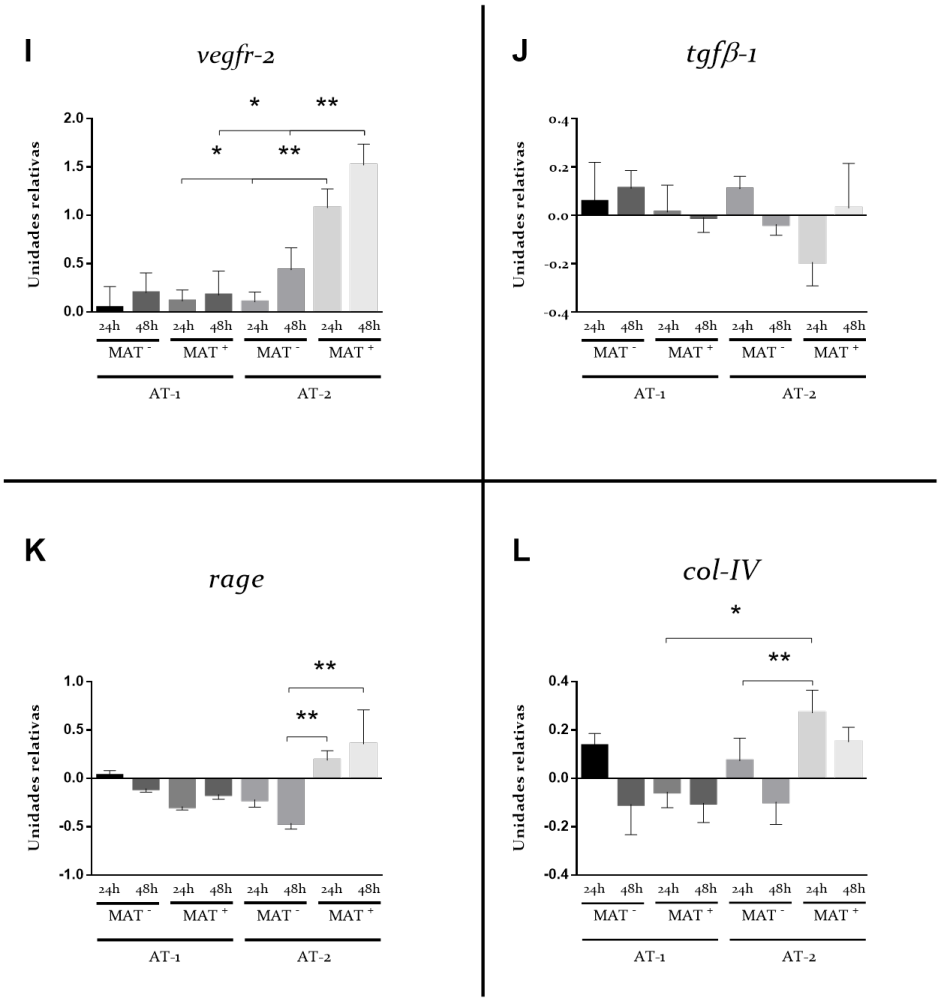


Figura 28. Resultados sobre la expresión del grupo de genes asociados a la diferenciación endotelial del ECV. **I)** Resultados de expresión *Vegfr-2*. **J)** resultados de expresión *Tgfβ-1*. **K)** expresión de *Rage* y **L)** *Col-IV*. Los datos representan valores medios ±DE de dos experimentos independientes con muestras por cuadriplicado (n=8). (*) Diferencias estadísticamente significativas en la expresión de genes respecto a HER2+. (**) Diferencias estadísticamente significativas en la expresión de genes respecto a la ausencia de MAT ($p<0.05$).

De nuevo hubo tres genes (*Vegfr-2, Rage* y *Col-IV*) con aumentos de expresión estadísticamente significativos, causados por astrocitos activados durante 24 y 48 horas por tumor con sobreexpresión de *Her2* y exposición al MAT. Un efecto inverso se constató en la expresión del *Tgfβ-1*, cuyo leve aumento de expresión en

respuesta al medio de astrocitos activados por tumor con sobreexpresión de *Her2* desapareció cuando con la exposición del tumor al MAT (Figura 28).

Por tanto, la respuesta del astrocito a factores de la línea celular MDA 231 de cáncer de mama, con sobreexpresión de *Her2* y exposición al microambiente tumoral, conllevó la producción de factores solubles, estimulantes del ECV, que activaron su expresión génica de *Clau-5*, *Vcam-1* y *Pecam-1* (implicados en la regulación de la relaciones intercelulares); de *Vegfr-2*, *Rage* y *Col-IV* (implicados en la regulación de la diferenciación endotelial) y de *Pgp* (implicado en la regulación de los intercambios moleculares transcelulares). Fueron la excepción, los aumentos de expresión de los genes *Cav-1* y *Ldl-r*, asociados a la sobreexpresión tumoral de *Her2* con independencia del efecto del microambiente tumoral; y la ausencia de cambios en la expresión génica de *Zo-1*, asociados a la sobreexpresión tumoral de *Her2* y la exposición al microambiente tumoral.

Finalmente, se representaron en forma de *Heatmaps* los resultados correspondientes a los dos experimentos de respuesta transcripcional del ECV, tras su incubación durante 24 horas con los diferentes medios condicionados de astrocitos estudiados (Figura 29). En este caso, el método de clasificación jerárquica enlace-promedio permitió crear conglomerados (*clusters*) de genes cuyas distancias Euclídeas de separación estuvieron representadas por las longitudes de los segmentos de interconexión entre éstos.

En el primer experimento, el agrupamiento de genes por su similitud transcripcional permitió constatar una segregación entre tres subgrupos de genes:

- *Vcam-1*, *Vegfr-2*, *Pecam-1* y *Clau-5*, cuya similitud fue su alta expresión por efecto de los medios condicionados por astrocitos activados por tumores con sobreexpresión de *Her2* y exposición a MAT.
- *Glut-1*, *Ldl-r* y *Cav-1*, cuya similitud la determinó su ausencia de cambios de expresión por efecto de la respuesta del astrocito al tumor con sobreexpresión de *Her2* y exposición a MAT.

- *Rage*, *Col-IV*, *Pgp*, *Zo-1* y *Tgfβ-1*, a su vez subdividido en dos subgrupos de genes (*Rage*/*Col-IV* y *Tgfβ1*/*Zo-1*), quedando excluido el gen *Pgp* por su diferente respuesta transcripcional.

Este patrón de agrupamiento génico se pudo reproducir en parte en el segundo experimento, donde de nuevo los genes *Vcam-1*, *Pecam-1* y *Clau-5* quedaron segregados del resto. Sin embargo, en este caso no se pudo segregar claramente entre genes con y sin aumento de expresión en respuesta a los medios condicionados por astrocitos activados por tumores con sobreexpresión de *Her2* y exposición a MAT.

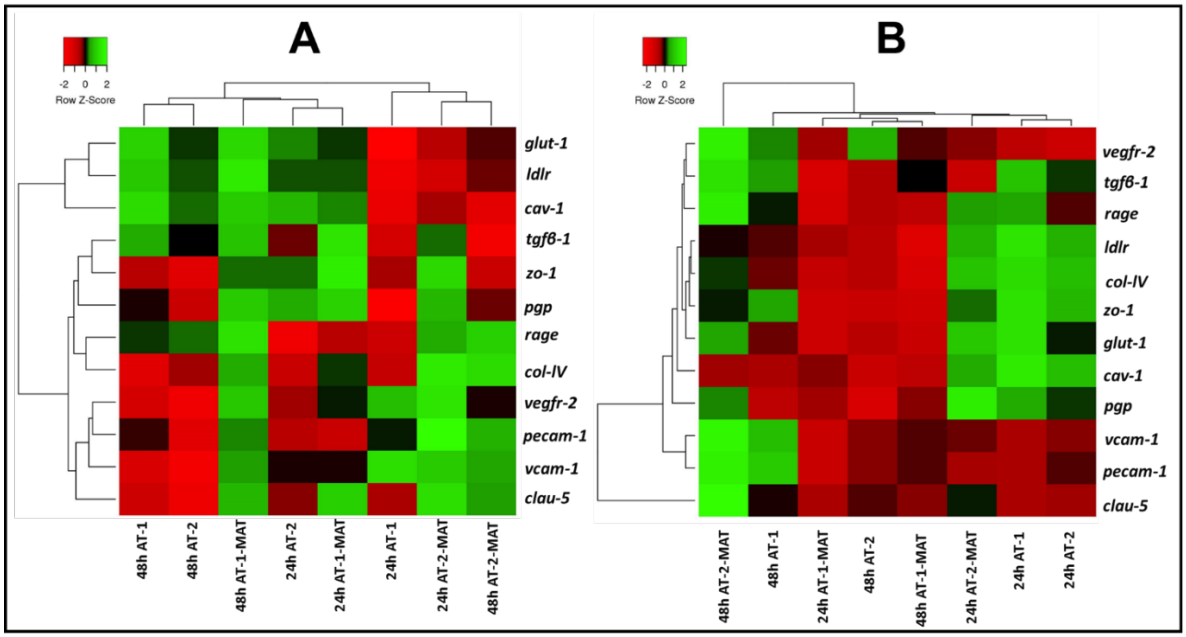


Figura 29: Heat map de dos experimentos independientes (**A** y **B**) sobre la expresión génica del ECV tras su incubación durante 24 con medios condicionados por astrocitos con o sin (controles) incubación durante 24 y 48 horas con medios condicionados de tumores con o sin sobreexpresión de *Her2*, y exposición o no a factores del MAT.

D. COMPOSICIÓN MOLECULAR DEL SECRETOMA DE ENDOTELIO CEREBROVASCULAR INDUCIDO POR ASTROCITOS ACTIVADOS POR CÁNCER DE MAMA, INFLUENCIA DE LA EXPRESIÓN DE *Her2* Y EXPOSICIÓN A FACTORES DEL MICROAMBIENTE TUMORAL

El objetivo fue estudiar la naturaleza del secretoma del ECV, su regulación paracrina por astrocitos activados por tumor, y el efecto que tienen la sobreexpresión de *Her2* y la respuesta a la acción combinada de factores característicos del microambiente tumoral (MAT) sobre la regulación tumoral del efecto estimulante endotelial de los astrocitos.

Las condiciones de estudio del ECV fueron las mismas que en el apartado anterior. En este caso recibieron durante 24h el sobrenadante del cultivo de astrocitos mantenidos en condiciones basales, o expuestos, durante 24 y 48 horas, al medio condicionado tumoral, teniendo el tumor sobreexpresión o no de *Her2* (AT-1 / AT-2), y estando o no expuesto al combinado de factores del MAT (AT-1-MAT / AT-2-MAT) evaluado también anteriormente. Para determinar la naturaleza de las moléculas del secretoma de ECV, tras 24 horas de cultivo en todas las condiciones consideradas, se aplicó un análisis mediante LC-MS/MS, seguido de identificación molecular y análisis funcional con la ayuda de tecnología Bioinformática y Bases de datos.

Se detectaron 451 proteínas en los secretomas de ECV obtenidos de astrocitos cultivados en condiciones basales. Sin embargo, como consecuencia de su respuesta a los medios condicionados por astrocitos tras su incubación en los diferentes medios condicionados tumorales, se detectaron numerosos cambios (aumentos, disminuciones o desapariciones) en dichas proteínas. Se aplicó la siguiente fórmula con el fin de normalizar los resultados del análisis proteómico frente al control, representado por los secretomas de ECV obtenidos en respuesta a los astrocitos, cultivados en condiciones basales:

$$Rsc = Log_2 [(n2 + f) / (n1 + f)] + log_2 [(t1 - n1 + f) / (t2 - n2 + f)]$$

Donde, para cada proteína, RSC fue el Ratio en log2 de su abundancia entre la muestra 1 (control) y la 2 (problema); siendo n1 y n2 los valores de la proteína detectada para las muestras 1 y 2, respectivamente; t1 y t2, el número total de detecciones para dichas muestras, y f el factor de corrección de Beissbarth (f=0.5). Tras la aplicación de la fórmula, se determinó un valor de corte donde los valores iguales o mayores de 1 fueron proteínas **aumentadas**, los valores entre 1 y -1 proteínas **disminuidas**, y los valores igual o menor de -1 proteínas desaparecidas.

A continuación, para determinar la influencia de cada una de estas condiciones sobre las características de los secretomas y su grado de similitud entre ellos, se llevó a cabo un análisis de conglomerados jerárquicos representado

mediante una matriz *HeatMap* obtenida con la ayuda de una herramienta web (Babicki et al., 2016). Como se puede apreciar en la Figura 30, hubo una segregación primaria de los 8 secretomas obtenidos en dos conglomerados, observándose que cada uno de ellos agrupó 3 de las 4 condiciones en función del tiempo de exposición del astrocito al medio condicionado tumoral. Secundariamente, prevaleció la expresión o no de *Her2* sobre la exposición o no al MAT en la forma de agregación de los secretomas inducidos por astrocitos tratados durante 24 horas; y la exposición o no al MAT sobre la expresión o no de *Her2*, en la forma de agregación de los secretomas inducidos por astrocitos tratados durante 48 horas.

Fueron la excepción el secretoma AT-1 —inducido por astrocitos que recibieron medio condicionado de tumores sin sobreexpresión de *Her2* ni exposición al MAT—, que se agrupó con los secretomas inducidos por astrocitos tratados durante 48 horas; y el secretoma AT-2-MAT—inducido por astrocitos que recibieron medio condicionado de tumores con sobreexpresión de *Her2* y exposición al MAT—, que se agrupó con los secretomas inducidos por astrocitos tratados durante 24 horas.

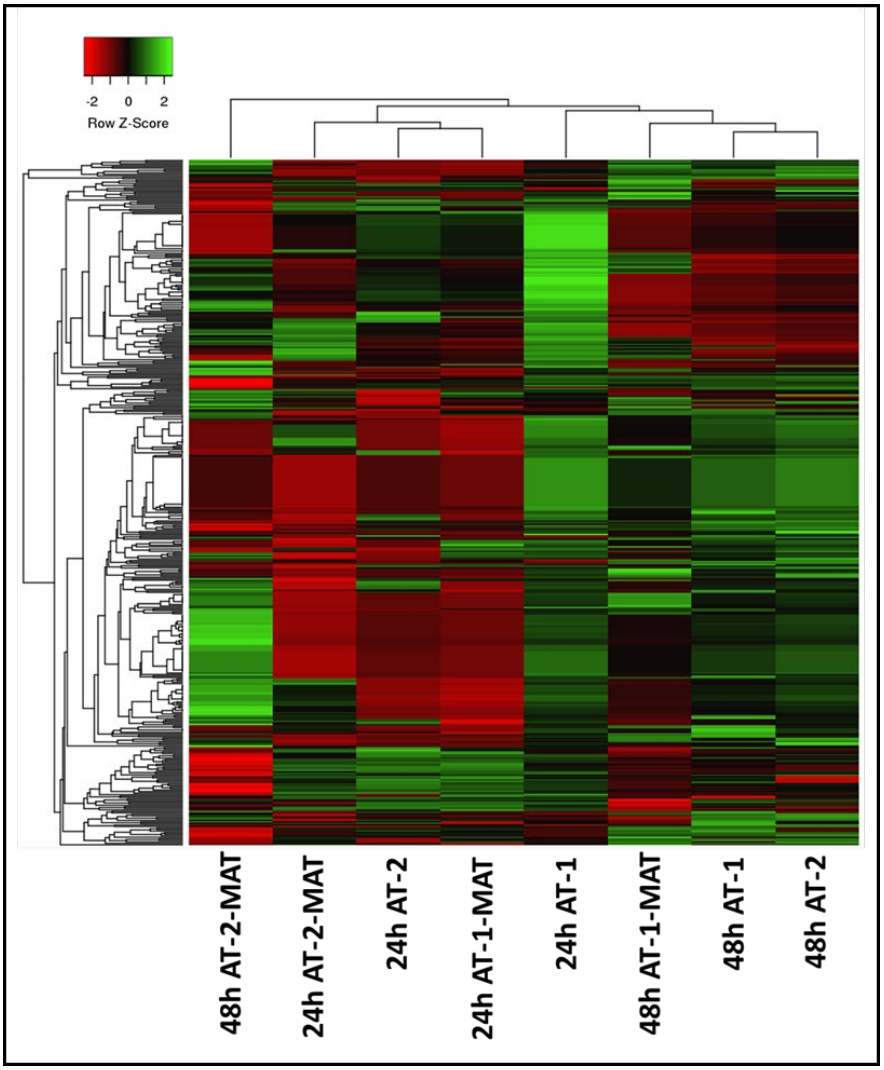


Figura 30: Representación mediante matriz de *HeatMap* del análisis de conglomerados jerárquicos sobre el nivel de similitud entre patrones moleculares de los secretomas del ECV obtenidos tras su exposición durante 24 y 48 horas al medio condicionado tumoral, teniendo el tumor sobreexpresión o no de Her2 (AT1/2), y estando o no expuesto al combinado de factores del microambiente tumoral (AT1/2-MAT).

A continuación, se representaron por separado los *HeatMaps* (Babicki et al., 2016) de ambos tiempos de tratamiento del astrocito (24 y 48 horas) (Figuras 31A y 31B). De nuevo, tras 24 horas de tratamiento (Figura 31A), fue el efecto de la sobreexpresión de *Her2* en el tumor y no del MAT, lo que más modificó el secretoma del ECV, quedando los secretomas AT-1 y AT-1-MAT separados de las condiciones AT-2 y AT-2-MAT respectivamente. En cambio, tras 48 horas de tratamiento (Figura 31B), fue el efecto del MAT sobre el tumor y no la sobreexpresión de *Her2* lo que más modificó el secretoma del ECV, quedando las condiciones AT-1-MAT y AT-2-MAT separadas del conglomerado formado por las condiciones AT-1 y AT-2.

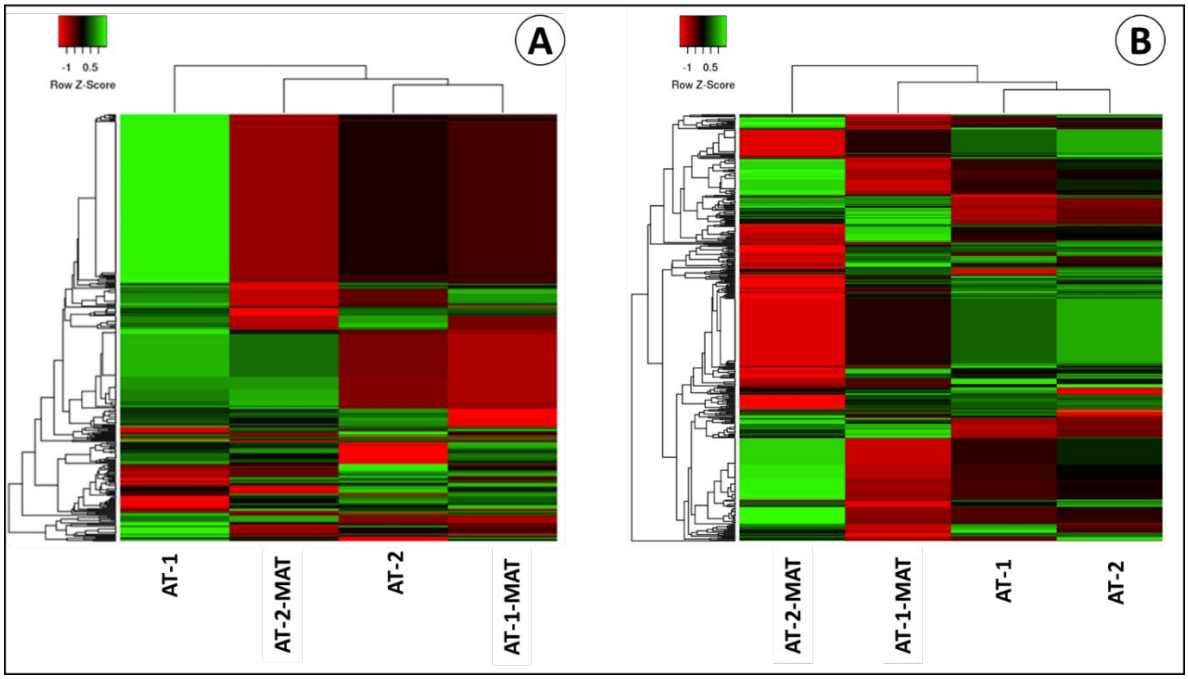


Figura 31: Matrices en forma de *Heat Map* para representar el grado de similitud y agrupamiento jerárquico de los perfiles de expresión de proteínas en los secretomas obtenidos tras la respuesta celular del ECV al medio condicionado por astrocitos incubados durante 24 (**A**) y 48 (**B**) horas al medio condicionado de tumores con sobreexpresión o no de *Her2* y exposición o no al MAT.

Como se observa en las Figuras 32A y B, el tiempo de incubación del astrocito en medio condicionado tumoral tuvo importancia sobre las proporciones de proteínas aumentadas, disminuidas y desaparecidas de los secretomas del ECV. Por ejemplo, fue importante el incremento en la proporción de proteínas con aumento de expresión obtenido cuando el astrocito estuvo expuesto 24 horas al medio condicionado por el tumor con sobreexpresión de *Her2*, con respecto a lo obtenido con tumor sin sobreexpresión de *Her2*. Así mismo, también se produjo un incremento muy llamativo en la proporción de proteínas aumentadas cuando el ECV recibió medios condicionados de astrocitos incubados 48 horas con tumores con sobreexpresión de *Her2* que estuvieron expuestos a MAT, con respecto a lo obtenido con el mismo tumor no expuesto a MAT. Sin embargo, estos efectos de la sobreexpresión tumoral de *Her2* y de la exposición tumoral al MAT no se observaron en las demás condiciones de cultivo del ECV. De este análisis obtuvimos pudimos diferenciar las proteínas nuevas para el tiempo de 24 horas (231) y 48 horas (351).

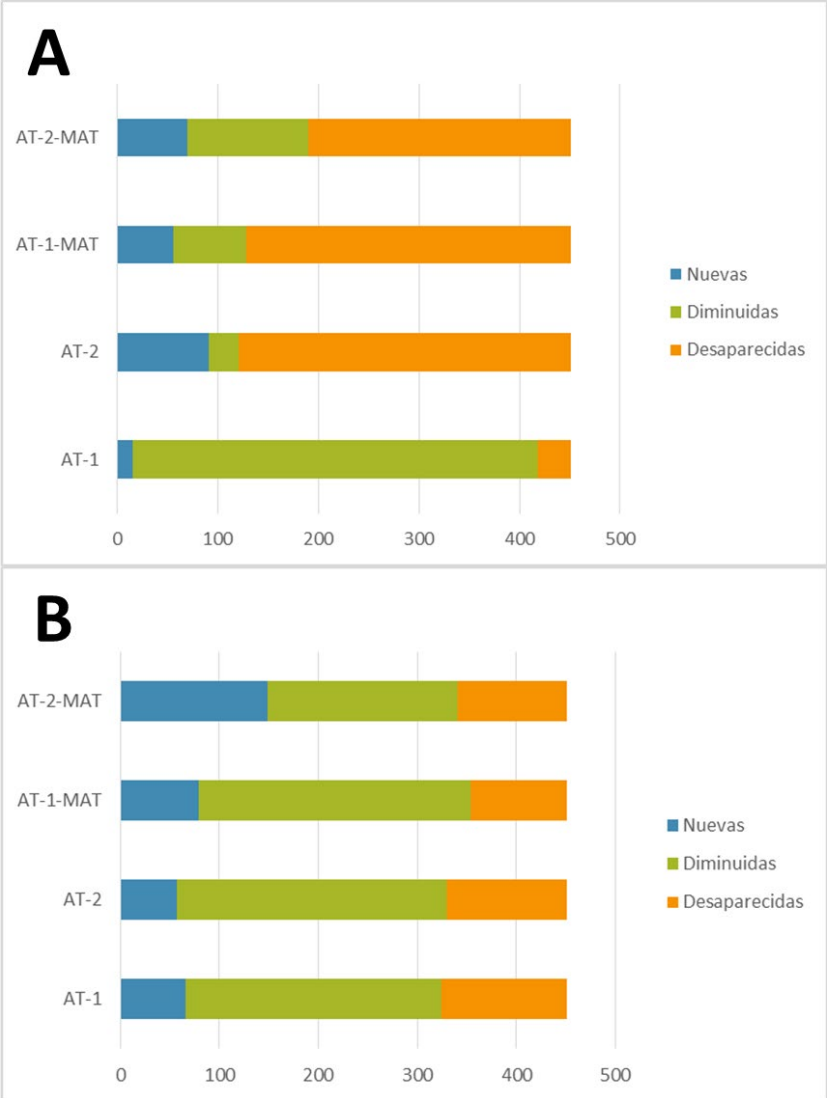


Figura 32: Distribución de las 451 proteínas identificadas en los secretomas obtenidos tras la respuesta del ECV al medio condicionado por astrocitos incubados durante 24 (**A**) y 48 (**B**) horas al medio condicionado de tumores con sobreexpresión o no de *Her2* y exposición o no al MAT.

A continuación, se generaron diagramas de Venn para analizar la distribución específica de las proteínas aumentadas entre los secretomas de ECV, estudiados en los dos tiempos de incubación del astrocito con medio condicionado tumoral (Figuras 33A y B, respectivamente).

Como se puede observar en la Figura 33A, el secretoma del ECV derivado de la respuesta al medio condicionado de astrocitos tratados durante 24 horas con el medio condicionado del tumor sin sobreexpresión de *Her2*, ni exposición a MAT, presentó 66 proteínas específicas, de las cuales 10 desaparecieron, 5 se mantuvieron y un amplio subgrupo de 51 aumentaron por efecto del medio condicionado de

astrocitos tratados con factores del tumor sin sobreexpresión de Her2, pero con exposición a MAT.

Del subgrupo de 51 proteínas aumentadas, 7 fueron exclusivas del pretratamiento con MAT del tumor sin sobreexpresión de *Her2* (AT-1-MAT); otras 7 también estuvieron asociadas a la exposición a MAT del tumor con sobreexpresión de *Her2* (AT-1-MAT/AT-2-MAT), indicando la existencia de algunas proteínas en el secretoma del ECV que surgieron del efecto del MAT sobre el tumor con independencia de su sobreexpresión o no de *Her2*; y otras 37 coincidieron con proteínas aumentadas en tumores con expresión de Her2 sin exposición a MAT.

Cuando este mismo estudio se repitió con astrocitos tratados 48 horas (Figura 33B) con el medio condicionado tumoral, se detectaron 109 proteínas específicas, de las que 30 desaparecieron, 36 se mantuvieron y 43 aumentaron cuando el tumor se expuso a MAT. De este último subgrupo de 43 proteínas, 9 fueron específicas del pretratamiento con MAT del tumor sin sobreexpresión de *Her2* (AT-1-MAT); 20 estuvieron asociadas al efecto del MAT en el tumor con independencia de su sobreexpresión o no de *Her2* (AT-1-MAT y AT-2-MAT); y 14 coincidieron con proteínas aumentadas en tumores con expresión de *Her2* sin exposición a MAT. Quedaron aparte los subgrupos de proteínas exclusivas del secretoma de ECV, derivadas de su respuesta al sobrenadante de astrocitos incubados durante 24 horas o 48 horas con sobrenadante de tumores con sobreexpresión de *Her2*, expuestos (19 y 49 proteínas, respectivamente) o no (88 y 34 proteínas, respectivamente) al MAT (AT-2-MAT).

Por tanto, el pretratamiento con MAT del tumor con o sin sobreexpresión de *Her2* indujo en el astrocito la producción de factores estimulantes de la expresión de un número importante de proteínas específicas por el ECV, algunas asociadas al fenotipo tumoral con o sin sobreexpresión de *Her2* y otras independientes de esta condición fenotípica del tumor.

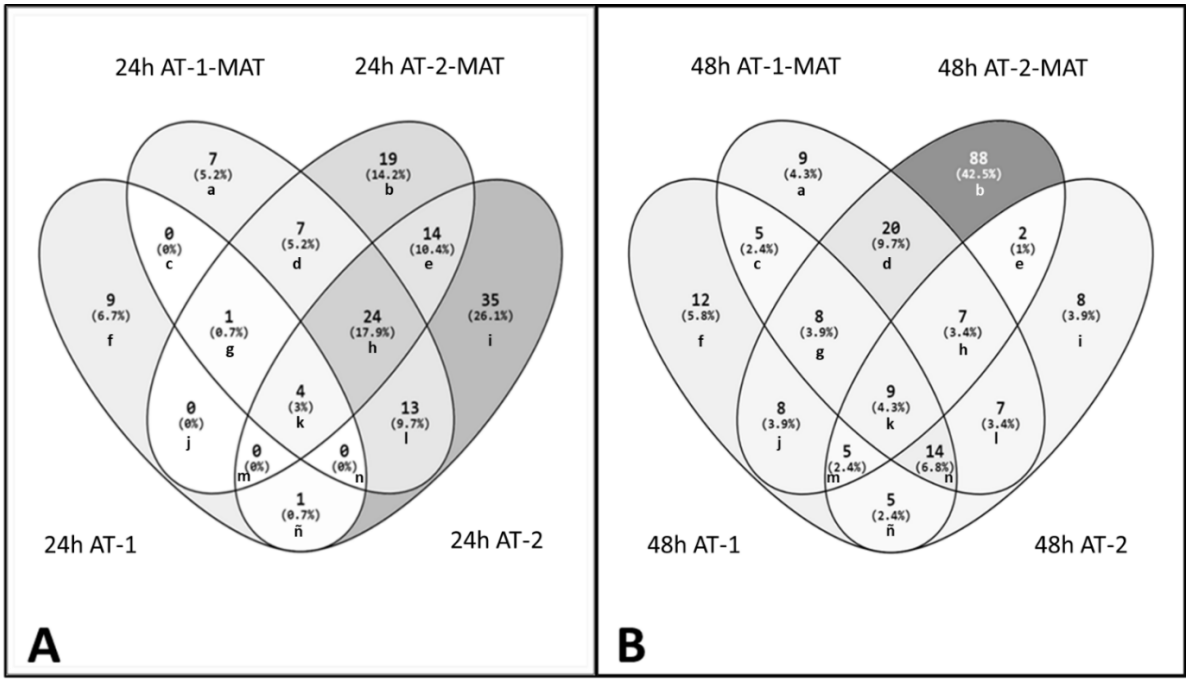


Figura 33: Distribución mediante diagramas de Venn de las proteínas específicas, observadas únicamente en secretomas de ECV tratados con astrocitos activados 24 (**A**) y 48 (**B**) horas por sobrenadante de tumor con o sin sobreexpresión de *Her2* y exposición a factores del MAT. AT-1 (astrocito activado con tumor sin sobreexpresión de *Her2*). AT-1-MAT (astrocito activado con tumor sin sobreexpresión de *Her2* y expuesto al MAT). AT-2 (astrocito activado con tumor con sobreexpresión de *Her2*). AT-2-MAT (astrocito activado con tumor con sobreexpresión de *Her2* y expuesto al MAT).

Por otro lado, al comparar los secretomas derivados de la respuesta del ECV a medios condicionados de astrocitos activados por tumores con o sin sobreexpresión de Her2, pero sin exposición a MAT, se observó que el secretoma del ECV asociado al tumor sin sobreexpresión de Her2 ni exposición a MAT presentó 101 proteínas específicas, de las que 10 desaparecieron, 5 se mantuvieron y 86 aumentaron con la sobreexpresión tumoral de Her2. De este subgrupo de 86 proteínas, 49 fueron exclusivas de la sobreexpresión de Her2 (AT-2), y 37 compartidas por la sobreexpresión tumoral de Her2 y la exposición tumoral a MAT (AT-2 y AT-1-MAT), indicando que la sobreexpresión tumoral de Her2 produjo sobre el astrocito un efecto estimulante endotelial similar al de la exposición a MAT del tumor sin sobreexpresión de Her2.

Tabla 13: Proteínas específicas observadas en secretomas de ECV tratados con astrocitos activados 24 y 48 horas por sobrenadante de tumor con o sin sobreexpresión de *Her2* y exposición a factores del MAT.

	Fenotipo Tumoral	Tiempo de tratamiento del Astrocito	
		24 Horas	48 Horas
a	"AT-1-MAT"	TF, HEXA, VCAN, IQGAP1, TUBA1B, KRT71, CLSTN3	LAMA5, PGK1, GAPDH, HNRNPA1, EZR, GOT1, CCT5, GANAB, VAT1
b	"AT-2-MAT"	IDH1, PGK1, ALDOA, KRT8, P4HB, CTSD, XRCC6, NCL, AHCY, EEF1G, ATIC, ACLY, RPS8, DSG1, MFGE8, KRT78, PA2G4, RUVBL2, RUVBL1	AGRN, DDX3X, PHGDH, PPL, SYNCRIP, WDR1, GGCT, IDH1, GOT2, IGHA2, KRT6A, FUCA1, KRT6B, HSPB1, ALDH2, SLC25A5, BCHE, PYGL, IVL, LTA4H, CTSA, HARS, XRCC6, RNH1, EEF2, KRT13, AKR1A1, IDE, JUP, RPS2, HIST1H1B, NCL, FLG, TGM1, AHCY, AZGP1, TARS, CALML3, LAP3, PPP2R1A, STIP1, S100A11, SERPINB6, RPL22, MYH9, KRT20, SERPINB5, RPL3, GSS, FASN, USP14, NPEPPS, TPI1, MYL6, RAB10, ACTR3, ACTR2, YWHAE, RAB11A, CLTC, KRT76, FKBP4, PLOD1, AHNAK, PKP1, TUBB2A, SEMA3A, PDIA6, PLEC, SEPT7, DPYSL2, KRT71, DMKN, POTEE, KRT27, MYH14, ST13P4, CANT1, NECTIN2, EVPL, FUBP1, CNDP2, CCT7, CALML5, MINPP1, PADI2, PKP3, PSAT1
c	"AT-1" ∩ "AT-1-MAT"		HEXB, NID1, PDIA3, HRNR, LOXL2
d	"AT-1-MAT" ∩ "AT-2-MAT"	APP, EEF2, KRT13, EZR, PRCP, FSCN1, KRT77	B4GAT1, ACTN4, PLAU, TGFB1, SERPINA7, S100A9, PROS1, C4A, CLU, B4GALT1, MDH1, GDI2, LUM, CTSC, GNB1, ACTC1, DSC2, HNRNPD, SIRPB1, LRRN4
e	"AT-2-MAT" ∩ "AT-2"	ACTN4, LMNA, HAPLN1, HSPA5, CD44, TCP1, MYH9, GSS, GDI2, PGD, CCT2, ALCAM, TUBA1A, CNDP2	IQGAP1, FLG2
f	"AT-1"	PLOD3, A2M, AHSG, ALB, GSN, HSPA8, LUM, KRT76, DKK3	LDHA, A2M, LDLR, PTPRF, TNC, MSN, SDC4, HNRNPK, EEF1A1, TUBB4B, SRPX, TUBA1A
g	"AT-1" ∩ "AT-1-MAT" ∩ "AT-2-MAT"	SEMA3C	HEXA, KRT7, KRT15, PZP, FLNA, GALNS, GARS, APLP2
h	"AT-1-MAT" ∩ "AT-2-MAT" ∩ "AT-2"	AGRN, FN1, ANXA2, SLC3A2, MET, VIM, PTPRF, PDIA4, VCL, UBA1, PDIA3, AXL, HSPA4, COL18A1, BCAM, CCT8, VCP, HIST1H4A, SIRPA, LGALS3BP, PTK7, GANAB, CD109, ADGRG6	SERPINC1, APP, S100A8, P4HB, PAM, CCT8, TUBA1C
i	"AT-2"	DDX39A, MATN3, COCH, SYNCRIP, WDR1, FLNB, AIFM1, GSR, CAT, ITGB1, LTA4H, CLU, PEPD, APEH, PVR, CDH2, FLNA, ITGA3, GRN, LAP3, GDI1, BTD, CCT4, EIF4A1, HNRNPK, YWHAG, YWHAE, TUBB4B, FKBP4, PTPRK, DPYSL2, GOLM1, LRRN4, FAM129B, CCT7	GBA, SLC3A2, CD44, AXL, KRT2, DSG2, ADGRG6, SEMA3C
j	"AT-1" ∩ "AT-2-MAT" ∩ "AT-2"		MATN3, FN1, TFRC, UBC, HSP90B1, ATIC, TUBA4A, PDCD6IP
k	"AT-1" ∩ "AT-1-MAT" ∩ "AT-2-MAT" ∩ "AT-2"	HSP90AA1, HSP90AB1 CFH, HSPA1A	AFP, TF, CFH, UBA1, CCT6A, KRT6C, CLSTN3, ISYNA1, OLFML3
l	"AT-1-MAT" ∩ "AT-2"	ADAM10, COL4A2, HSPD1, LAMC1, G6PD, DSP, TNC, CCT6A, CCT3, LAMB2, EEF1A1, ISYNA1, OLFML3	PLOD3, C3, GC, HSP90AB1, NUCB1, FSCN1, KRT74
m	"AT-1" ∩ "AT-2-MAT" ∩ "AT-2"		COL4A2, LAMC1, TCP1, SIRPA, CD109
n	"AT-1 " ∩ "AT-1-MAT" ∩ "AT-2"		COCH, ITGB1, GPI, THBS1, KRT16, HSPA1A, HSPD1, VCL, FBLN1, HSPA4, PRCP, CCT2, KRT77, KRT78
ñ	"AT-1" ∩ "AT-2"	THBS1	HSP90AA1, HSPA8, COL6A1, DSP, LAMB2

Cuando este mismo estudio se repitió con astrocitos tratados 48 horas con el medio condicionado tumoral, de las 90 proteínas específicas, 33 desaparecieron, 33 se mantuvieron y 24 aumentaron cuando el tumor se expuso a MAT. En este caso, fueron 10 las proteínas exclusivas de la sobreexpresión de *Her2* (AT-2) y 14 las compartidas (AT-2/AT-1-MAT) con tumores sin sobreexpresión de *Her2*, pero expuestos a MAT. Por tanto, de nuevo la incubación del astrocito durante 48 horas con sobrenadante de tumor con sobreexpresión de *Her2* conllevó un efecto estimulante endotelial similar al de la exposición a MAT del tumor sin sobreexpresión de Her2.

Las proteínas aumentadas en el secretoma del ECV activado por astrocitos expuestos al medio condicionado de tumor sin sobreexpresión de *Her2* ni exposición

a MAT (AT-1) fueron AHSG, GSN, DKK3 (tras 24 horas de exposición) y LDHA, SRPX, MSN, SDC4, LDLR (tras 48 horas de exposición).

Las proteínas aumentadas en el secretoma del ECV activado por astrocitos expuestos al medio condicionado de tumor con sobreexpresión de *Her2,* pero sin exposición a MAT (AT-2) fueron DDX39A, FLNB, AIFM1, GSR, CAT, PEPD, APEH, PVR, CDH2, GRN, BTD, CCT4, EIF4A1, PTPRK, GOLM1, FAM129B, ITGA3, GDI1, YWHAG (tras 24 horas de exposición) y GBA, KRT2, DSG2 (tras 48 horas de exposición).

Las proteínas aumentadas en el secretoma del ECV activado por astrocitos expuestos al medio condicionado de tumor con sobreexpresión de *Her2*, pero con exposición a MAT (AT-2-MAT) fueron KRT8, CTSD, EEF1G, ACLY, RPS8, DSG1, MFGE8, PA2G4, RUVBL2, RUVLBL1, ALDOA tras 24 horas de exposición; y LMAA5, GAPDH, GOT1, CCT5, VAT1, HNRNPA1 tras 48 horas de exposición.

Las proteínas aumentadas en el secretoma del ECV asociadas al efecto del MAT en tumor con independencia de *Her2* (AT-1-MAT/AT-2-MAT) fueron a las 24 horas: APP, EEF2, KRT13, EZR, PRCP, FSCN1, KRT77.

Las proteínas aumentadas en el secretoma del ECV asociadas al efecto del MAT en tumor sin sobreexpresión de *Her2*, expresadas en tumor con sobreexpresión de *Her2* no expuesto a MAT (AT-1-MAT/AT-2) fueron a las 24 horas: ADAM10, COL4A2, HSPD1, LAMC1, G6PD, DSP, TNC, CCT6A, CCT3, LAMB2, EEF1A1, ISYNA1, OLFML.

V. DISCUSIÓN

El presente proyecto estudió el patrón de crecimiento perivascular y la estructura del microambiente de la metástasis cerebral experimental y clínica. A continuación, desarrolló un modelo in vitro para estudiar la actividad transcripcional y composición del secretoma del endotelio cerebrovascular (ECV) en respuesta a los factores solubles del astrocito activado por células del cáncer de mama con o sin sobreexpresión de Her2, tras su exposición o no a factores característicos del microambiente tumoral.

Los resultados obtenidos demostraron que el crecimiento inicial de las metástasis cerebrales, tanto experimentales como clínicas, se produjo en los espacios perivasculares de la microcirculación cerebral, quedando la barrera hematoencefálica original desdoblada en dos nuevas barreras, una interna hematotumoral (entre sangre y tejido metastásico) y otra externa, neurotumoral (entre tejido metastásico y tejido nervioso).

Al profundizar mediante modelos in vitro en las interrelaciones funcionales entre células metastásicas, astrocitos perivasculares y ECV que acontecieron en el microambiente tumoral de estos nichos perivasculares de la metástasis cerebral en desarrollo, el presente trabajo constató por vez primera la alteración en la expresión génica y la composición del secretoma del ECV en respuesta a los factores solubles derivados de astrocitos activados por células tumorales.

En concreto demostró que el microambiente de la hipoxia, el estrés oxidativo, el estímulo mecánico y la inflamación activaron en tumores con, pero no sin sobreexpresión de *Her2*, la producción tumoral de ciertos factores solubles, cuyo efecto sobre los astrocitos, durante 24 y 48 horas, conllevó a su vez la producción glial de nuevos factores solubles con efectos estimulantes sobre el ECV.

Más aún, la respuesta del ECV a factores solubles del astrocito activado por tumor conllevó su expresión de un fenotipo funcional neuroinflamatorio, caracterizado por el aumento en la expresión génica de *Clau-5*, *Vcam-1* y *Pecam-1* (implicados en la regulación de las relaciones intercelulares), de *Vegfr-2*, *Rage* y *Col-*

IV (implicados en la regulación de la diferenciación endotelial) y de *Pgp* (implicado en la regulación de los intercambios moleculares transcelulares).

Finalmente, el estudio mediante métodos de proteómica de expresión de la composición molecular del secretoma de ECV, tras su exposición al medio condicionado por astrocito activados por tumor, demostró su llamativo enriquecimiento en proteínas conocidas por sus funciones neuroprotectoras, neuroinflamatorias, neurorregenerativas y neurodegenerativas. Así mismo, dichas moléculas se pudieron clasificar por su asociación: 1) a la sobreexpresión tumoral de *Her2*, con independencia de los efectos del microambiente tumoral; 2) a los efectos del microambiente tumoral, con independencia de la sobreexpresión de *Her2*; y 3) a los efectos del microambiente tumoral en células con sobreexpresión de *Her2*.

De esta forma se pudo verificar la hipótesis planteada en el proyecto y concluir que el crecimiento metastásico precoz en el microambiente perivascular del cerebro alteró la función de los astrocitos que regulan el endotelio microvascular de la BHE, siendo la sobreexpresión tumoral de *Her2* el determinante de una clase de respuesta tumoral a los factores del microambiente perivascular, lo que a su vez conllevó una activación compleja y multifuncional del ECV por intermediación de los astrocitos perivasculares, activados por factores tumorales solubles. Fig del esquema

A. CONTRIBUCIÓN DE LA ESTRUCTURA NEUROVASCULAR AL DESARROLLO DEL MICROAMBIENTE FUNCIONAL DE LA METÁSTASIS CEREBRAL

Los resultados obtenidos del estudio histológico inmunohistoquímico sobre el proceso experimental de metástasis cerebral, de la línea celular humana MDA 231 de cáncer de mama con sobreexpresión de *Her2*, demostraron el inicio y desarrollo de la colonización cerebral desde las zonas perivasculares microcirculatorias del encéfalo. Allí las células tumorales metastásicas usurparon la posición perivascular de los astrocitos, formando nuevas estructuras de recubrimiento vascular, cuyo microambiente tumoral proliferativo estuvo delimitado por dos barreras

funcionales: una interna, **hematotumoral**, constituida por el endotelio y su membrana basal rica en colágeno-IV y pericitos; y otra externa, **neurotumoral**, formada también por una membrana basal de colágeno-IV, rodeada por astrocitos con alta expresión de GFAP y microglía (Figura 34).

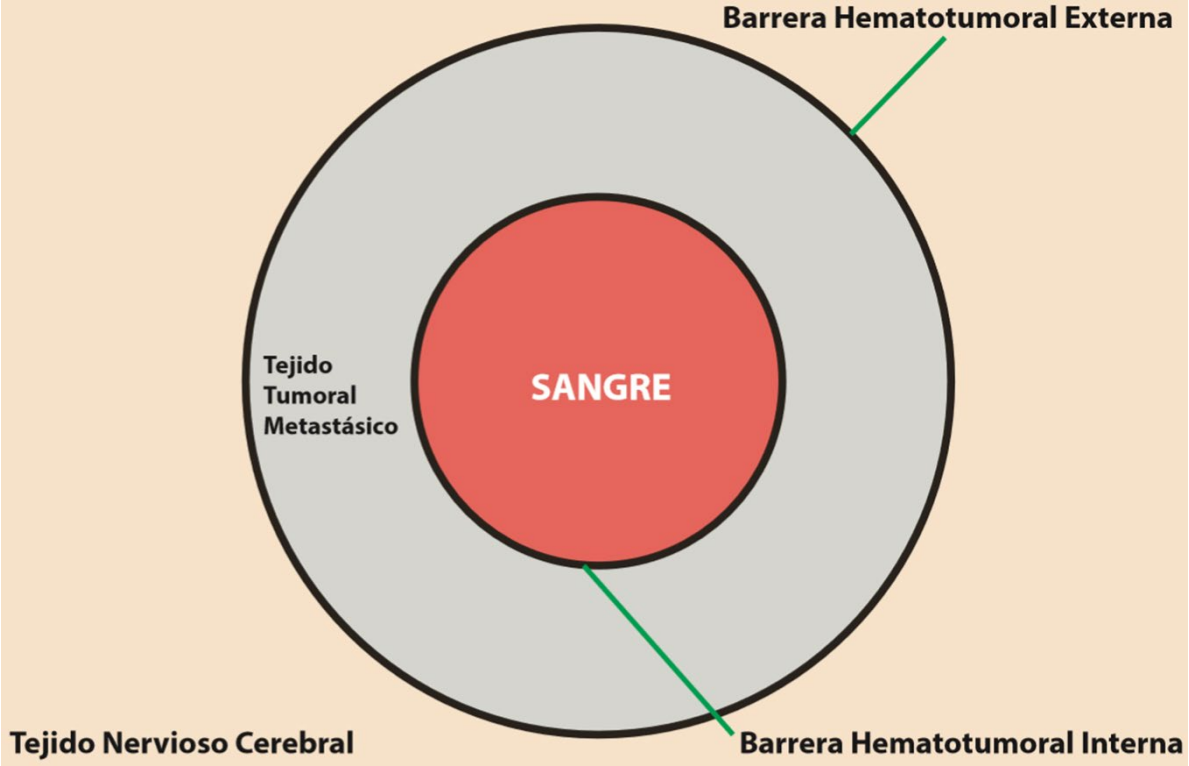


Figura 34: Modelo sobre la regulación del microambiente tumoral en la estructura de la metástasis cerebral en desarrollo. El colágeno-IV define los límites de una doble barrera funcional para la regulación del paso de células y moléculas entre la sangre o el tejido nervioso y el tejido metastásico en desarrollo.

Estudios previos han descrito que, desde la época fetal, y coincidiendo con la diferenciación de los astrocitos (Baello et al., 2016), el ECV de la BHE crea uniones estrechas entre sus células, que confieren una barrera selectiva al paso indiscriminado de células migratorias, microorganismos, macromoléculas y péptidos. Cuando las células tumorales invaden la BHE y se inicia la metástasis, las células del ECV forman una barrera hematotumoral ineficiente, que se acompaña con frecuencia de edema intersticial alrededor de la lesión metastásica, con entrada de proteínas y agua al parénquima cerebral que rodea al tumor (Lesniak et al., 2004). Las observaciones histológicas del presente estudio verificaron una preservación de la barrera definida por el ECV, sin discontinuidades en el ECV, alta expresión de

Claudina-5 y de Colágeno IV, y presencia de pericitos activados (transdiferenciados) con alta expresión de alfa-actina de músculo liso. Sin embargo, en la estructura de la BHE no se observó la presencia de astrocitos perivasculares, que quedaron apartados por el crecimiento subendotelial de las propias células metastásicas.

Se han descrito numerosos factores secretados por astrocitos que regulan la BHE (Daneman et al., 2015) y que incluso pueden inducir propiedades de barrera en vasos sanguíneos que no pertenecen al SNC (Abbott et al., 2006). Sin embargo, es posible que la progresiva interposición de células tumorales entre endotelio y astrocitos altere la acción de tales factores sobre el control fisiológico de la BHE, y explique la presencia de edema intersticial en el entorno de las metástasis cerebrales. Así mismo, antes de que esto ocurra, es posible que algunos de los factores soluble del astrocito activado por el medio condicionado de los tumores de mama utilizados en el presente trabajo pudieran alterar la forma en la que los astrocitos regulan la barrera del ECV a través de su acción paracrina. Más aun, es posible que tales efectos pudieran ser diferentes en función de la sobreexpresión o no de Her2 por el tumor metastásico en cuestión.

Por otro lado, se ha descrito que, en la zona de desarrollo inicial de la metástasis cerebral, los astrocitos reactivos se localizan junto a las células tumorales de cáncer de mama contribuyendo a regular su proceso de migración y crecimiento (Lorger et al., 2010). Incluso, se ha propuesto que los astrocitos podrían favorecer la protección de las células tumorales frente a la quimioterapia, secuestrando el calcio del citoplasma de las células tumorales y activando la regulación de genes de supervivencia en células tumorales (S.-J. Kim et al., 2011a; Q. Lin et al., 2010). Así mismo, también se ha descrito que los astrocitos secretan factores solubles que estimulan la proliferación de células tumorales en el microambiente cerebral. Por ejemplo, las neurotrofinas tienen una importancia especial en el crecimiento de las células de melanoma en la metástasis (Menter et al., 1995) y la liberación de IL-1β, TNF-α y IL-6 podría contribuir a la proliferación de células metastásicas del cáncer de pulmón y de mama (Seike et al., 2011; Sierra et al., 1997).

En el presente estudio, el crecimiento metastásico cerebral fue también perivascular en pacientes con cáncer avanzado, con independencia del linaje tisular de la metástasis. Allí, las células metastásicas crecieron en asociación con leucocitos migratorios y otras células del estroma vascular, formando una barrera hematotumoral interna con alta expresión de PECAM-1 y claudina-5 en el endotelio; de Colágeno IV y α-actina de músculo liso en la zona subendotelial; y cuya barrera externa neurotumoral también presentó células de la microglía y astrocitos con alta expresión de GFAP. Sin embargo, en general los astrocitos no se integraron como estroma tumoral en ningún caso, sugiriendo que su efecto regulador sobre las células metastásicas pudiera ser más importante en la fase de iniciación de la metástasis y no una vez ya consolidadas y de mayor tamaño. De hecho, como muestra el esquema (Figura 35), la mejor oportunidad que tiene el astrocito para poder interactuar, directamente o a través de sus factores paracrinos solubles, con las células metastásicas es al inicio de su proceso de crecimiento perivascular en el cerebro, durante la fase oculta y asintomática de esta enfermedad.

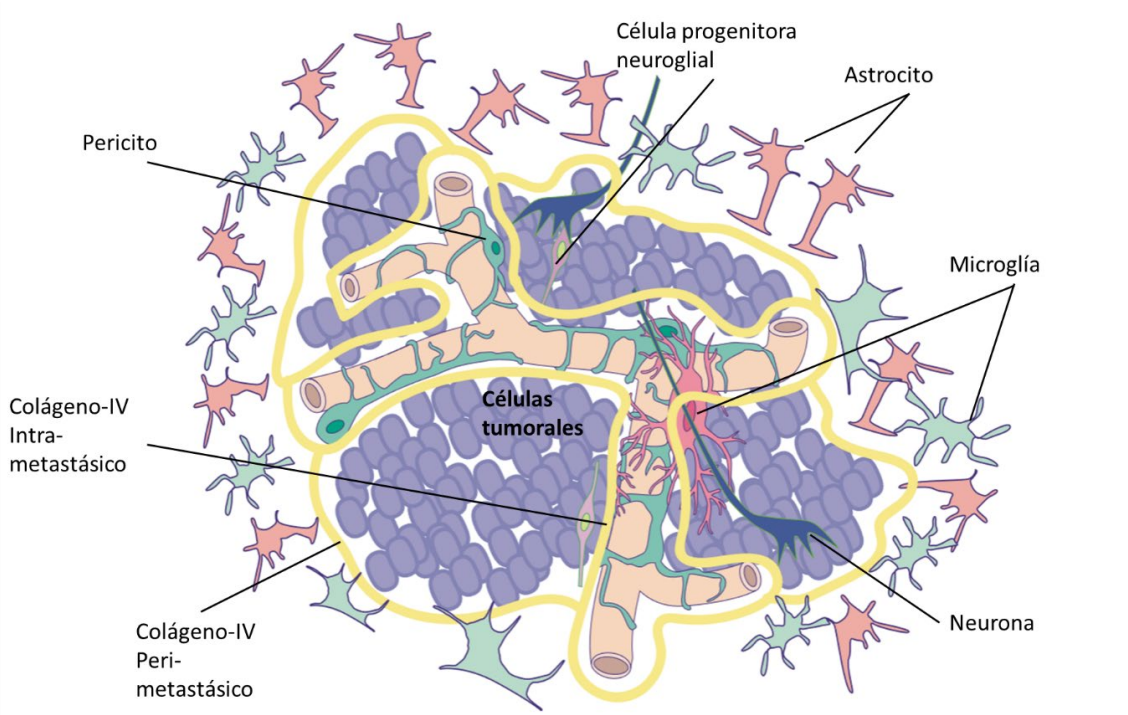


Figura 35: Modelo sobre la composición de la metástasis cerebral en su fase de crecimiento perivascular. Endotelio cerebrovascular (tubos anaranjados), Pericitos (células verdes, adheridas al endotelio), Astrocitos (células rojas pálido), Células progenitores neurogliales (células rosas), Células tumorales (células moradas), microglía (células verdes pálido) y Colágeno-IV (amarillo).

El papel de los astrocitos en la metástasis cerebral ha sido abordado por numerosos grupos de investigación y ahora más que nunca parece que su contribución al proceso es indispensable. Algunos trabajos han descrito su efecto de señalización paracrina a través de la liberación de citocinas que podrían favorecer la metástasis cerebral. Así mismo, los astrocitos reactivos también podría activar la sobreexpresión de genes relacionados con la supervivencia (GSTA5, BCL2L1, TWIST1) en células de cáncer de mama, confiriendo una mayor resistencia a la quimioterapia (S.-J. Kim et al., 2011b), y se ha propuesto que la inhibición con pazoapanib del receptor β de PDGF en astrocitos activados por tumores de mama con sobreexpresión de *Her2* podría prevenir el crecimiento de metástasis cerebrales en modelos animales (Gril et al., 2013). Los astrocitos también producen heparanasa, que contribuye a la especificidad de la metástasis cerebral del melanoma (Marchetti et al., 2000), y MMP-9, que puede favorecer la invasión tumoral y la liberación de factores de crecimiento tras la degradación de la matriz extracelular (Lorger et al., 2010; Wilhelm et al., 2013).

B. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL ENDOTELIO CEREBROVASCULAR POR ASTROCITOS ACTIVADOS POR FACTORES TUMORALES

El estudio mediante qRT-PCR semicuantitativa de la actividad transcripcional del endotelio cerebrovascular, tras su cultivo en presencia de medio condicionado de astrocitos humanos, demostró que la respuesta del astrocito a factores solubles de la línea celular MDA 231 de cáncer de mama, con sobreexpresión de *Her2* y exposición al microambiente tumoral, conllevó la producción de factores solubles, estimulantes del ECV, que activaron su expresión génica de *Clau-5*, *Vcam-1* y *Pecam-1* (implicados en la regulación de la relaciones intercelulares); de *Vegfr-2*, *Rage* y *Col-IV* (conlleva la regulación de la diferenciación endotelial) y de *Pgp* (ligado a la regulación de los intercambios moleculares transcelulares).

Fueron la excepción, el aumento de expresión del gen *Cav-1 y Ldl-r*, asociados a la sobreexpresión tumoral de *Her2* con independencia del efecto del

microambiente tumoral; y la ausencia de cambios asociados a la sobreexpresión tumoral de *Her2* y la exposición al microambiente tumoral, en la expresión génica de *Zo-1, Glut-1, Tgfβ-1,* asociados a la sobreexpresión tumoral de Her2 y la exposición al microambiente tumoral.

Las células endoteliales que revisten los capilares del encéfalo forman una barrera para el control selectivo de su permeabilidad a pequeñas moléculas y fármaco que es prácticamente impermeable a las terapias macromoleculares y nanoterapias. Numerosos estudios han demostrado que los astrocitos inducen y mantienen las características de la BHE. Cuando las células del ECV que cultivan con astrocitos muestran una mayor actividad en sus enzimas y transportadores específicos de la BHE, mientras disminuyen su transporte paracelular en comparación con células endoteliales cultivadas sin astrocitos (Berezowski et al., 2004; Haseloff et al., 2005).Los astrocitos también inducen estas propiedades en células endoteliales derivadas de tejido no neural (Kuchler-Bopp et al., 1999) sugiriendo que el medio condicionado por astrocitos contiene factores que imitan estos efectos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio aportan luz sobre cómo el ECV de la BHE adapta su fisiología transcripcional, biosintética y secretora molecular tras la activación de los astrocitos perivasculares por factores tumorales, y cómo las características del microambiente tumoral y el fenotipo del tumor, con respecto a su sobreexpresión o no de HER2, pueden determinar esta clase de efecto.

Por ejemplo, la Cav-1 es una proteína integral de membrana ubicada en caveolas, que previene la degradación de las proteínas de las uniones estrechas y protege la integridad de la BHE al inhibir la producción de intermediarios reactivos del oxígeno y la actividad de las MMPs (Gu Y et al., 2011). Su aumento de expresión sugiere una respuesta transcripcional protectora de la BHE, que concuerda con la ausencia de cambios en la expresión de *Zo-1* y el aumento en la expresión de *Clau*-5.

Resulta también llamativo el hecho de que fueran principalmente los genes asociados a la respuesta neuroinflamatoria *(Vcam-1*) los que aumentaran de

expresión por efecto de los astrocitos activados por sobreexpresión de *Her2* y exposición al microambiente tumoral. Tales genes fueron de los tres subgrupos funcionales estudiados (reguladores de las interacciones celulares, de los intercambios moleculares y de la diferenciación celular).

Por su parte, la *Pgp* también aumentó su expresión en respuesta al medio de astrocitos activados, lo que concuerda con el aumento de expresión de *Pgp* para impedir el paso de factores endógenos y xenobióticos al cerebro fetal, que se produce en las células del ECV, por efecto de la diferenciación de los astrocitos, en las fase final de la gestación (Baello et al., 2016).

Los radicales libres desempeñan un papel importante en la lesión cerebral asociada a la inflamación y la isquemia-reperfusión post-trombótica. Las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno no solo aumentan la susceptibilidad del tejido cerebral al daño isquémico y proinflamatorio, sino que también activan cascadas moleculares que alteran la permeabilidad de la BHE, promoviendo el edema cerebral y la muerte neuronal. La activación de metaloproteinasas de matriz (MMPs) por radicales libres es clave en la alteración de la BHE ya que degradan las proteínas de las uniones estrechas y de la matriz extracelular que rodea los vasos sanguíneos cerebrales. A este respecto es interesante el aumento transcripcional de *Cav-1* y de *Ldl-r* en el ECV estimulado por los factores del astrocito activado por tumor con sobreexpresión de Her2 y la pérdida de estos aumentos por efecto del MAT sobre el mismo tumor.

Cav-1 y especies reactivas del nitrógeno (óxido nítrico y peroxinitritos) se oponen en la disfunción de la BHE durante la lesión cerebral por isquemia-reperfusión y la pérdida de Cav-1 podría contribuir a las alteraciones de la BHE durante el desarrollo de la metástasis cerebral (Chen et al., 2018). A este respecto, en un estudio reciente, describieron que las metástasis cerebrales experimentales de cáncer de mama presentan distintos patrones de expresión de genes microambientales en función de su permeabilidad (baja o alta) a un tinte de dextrano (como prueba de alteración o no de la BHE)(Gril et al., 2018). El receptor-3-fosfato de esfingosina-1 astrocítico (S1P3) reguló al aumento en la respuesta

neuroinflamatoria de las lesiones metastásicas altamente permeables y su inhibición reforzó la BHE. El mecanismo estuvo mediado por la secreción astrocítica de IL-6 y CCL2, que a su vez inhibieron la adhesión entre células del ECV. Un hecho importante fue que la sobreexpresión tumoral de S1P3 imitó esta vía de regulación glial sobre el ECV, induciendo también la producción de IL-6 y CCL-2 y elevando la permeabilidad de la BHE. Por tanto, junto con la predisposición genética de las células tumorales a colonizar el encéfalo, los procesos de adaptación celular dentro del microambiente tumoral también pudieran determinar el proceso de colonización y la fisiopatología de la enfermedad metastásica cerebral, su evolución y respuesta al tratamiento..

Otros estudios recientes han descrito también cambios transcripcionales en el ECV durante la isquemia cerebral (Llombart et al., 2016), la diabetes (Rom et al., 2018), y la esquizofrenia (Cai et al., 2018). Sin embargo, el presente estudio es el primero en describir cambios en la expresión génica del ECV inducidos por células tumorales a través de su acción sobre astrocitos perivasculares. Dado el importante papel regulador del astrocito sobre el ECV, el presente estudio se centró en los efectos —que a continuación se discuten— del astrocito activado por factores tumorales sobre la composición molecular del secretoma de ECV. En futuros estudios se deberá estudiar si los factores solubles del tumor pueden también generar directamente cambios transcripcionales en el ECV.

C. COMPOSICIÓN MOLECULAR DEL SECRETOMA ENDOTELIAL CEREBROVASCULAR Y SU REGULACIÓN POR ASTROCITOS ACTIVADOS POR FACTORES TUMORALES

El estudio mediante LC-MS/MS demostró que la composición molecular del secretoma de ECV cambió en función de la sobreexpresión o no de Her2 y activación o no por factores del microambiente tumoral del cáncer de mama cuyo sobrenadante sirvió para activar la producción por astrocitos de factores estimulantes del ECV.
De esta forma, en la composición del secretoma del ECV las moléculas identificadas se clasificaron en varios subtipos funcionales:

- Asociadas a la sobreexpresión tumoral de Her2, con independencia de los efectos del microambiente tumoral **(Asociadas a Her2+)**
- Asociadas a los efectos del microambiente tumoral, con independencia de la sobreexpresión de Her2 **(Asociadas al MAT)**
- Asociadas a los efectos del microambiente tumoral en células con sobreexpresión de Her2 **(Asociadas a MAT$^+$/Her2$^+$)**
- Asociadas a los efectos del microambiente tumoral en células sin sobreexpresión de Her2 **(Asociadas a MAT$^-$/Her2$^-$)**

Algunos estudios han analizado el secretoma de la línea celular hCMEC/D3 inmortalizada de endotelio cerebral en condiciones de hipoxia (Smyth et al., 2018), con la finalidad de identificar posibles biomarcadores precoces de isquemia cerebral por trombosis para uso en muestras de sangre periférica En otros trabajos se ha estudiado el secretoma específico de la respuesta proinflamatoria del ECV. Sin embargo, el presente estudio es el primero en analizar la respuesta del ECV a factores soluble de astrocitos activados por tumores con diferentes fenotipos funcionales.

Por tanto, a los efectos interpretativos de esta Discusión, podría ser relevante distinguir las moléculas identificadas en los secretomas del ECV en función de sus implicaciones funcionales en:

- Desarrollo y regeneración del SNC.
- Neuroinflamación.
- Neuroprotección y neurotrofismo.
- Regulación vascular y de la BHE.
- Isquemia del SNC.
- Neurodegeneración.
- Cáncer y enfermedad metastásica del SNC.

Las proteínas aumentadas en el secretoma del ECV activado por **astrocitos expuestos al medio condicionado de tumor sin sobreexpresión de Her2 ni exposición a MAT (AT-1)** fueron AHSG, GSN, DKK3 (tras 24 horas de exposición) y

LDHA, SRPX, MSN, SDC4, LDLR (tras 48 horas de exposición). De estas, las siguientes podrían tener relevancia funcional en el espacio extracelular:

- **AHSG (**Glucoproteína alfa 2HS**).** También conocida como Fetuina A, es una conocida proteína plasmática multifuncional fetal que el organismo adulto produce principalmente en el hígado (hepatocina) y que juega un papel importante en la regulación de la sensibilidad a la insulina y la diabetes. Las células tumorales de páncreas, próstata y glioblastoma multiforme también sintetizan fetuina-A y su detección sérica en pacientes podría ser un biomarcador precoz de cáncer (Ochieng et al., 2018). La fetuina A está en el cerebro humano en desarrollo (Elsas et al., 2012) y adulto, y también en el líquido cefalorraquídeo. Se ha sugerido un papel en la remodelación del cerebro neonatal, que se inactiva en el cerebro adulto normal, para reactivarse tras el daño cerebral por su función neuroprotectora durante la isquemia cerebral e inflamación (Heinen et al., 2018). Hasta ahora se desconocía su producción por el ECV como demuestra el presente estudio.
- **GSN (**Gelsolina**).** Es la cuarta proteína más abundante en el cuerpo y actúa como reguladora del citoesqueleto junto con la actina y filamina A; y todas ellas experimentan importantes cambios cuantitativos para la reinducción de las funciones de BHE durante los co-cultivo del endotelio con células gliales. Su sobreexpresión aumenta los niveles de especies reactivas de oxigeno mediante la inhibición de la actividad de la Cu/Zn superóxido dismutasa (J. C. Kim et al., 2018). Aunque se produce principalmente en tejido muscular, también se expresa en el SNC humano (Kwiatkowski, 1988; J. Tanaka et al., 1993) y participa en la homeostasis de la actina durante la exocitosis celular, motilidad celular, fagocitosis, apoptosis, formación y activación de plaquetas (W. M. Lee et al., 1992; Osborn et al., 2019; Silacci et al., 2004). Tiene formas intracelulares y secretadas (Yins et al., 1984). En la encefalomielitis autoinmune experimental los niveles de gelsolina disminuyen en suero, pero aumentan en el cerebro y la administración de gelsolina disminuye

la actividad de la enzima inflamatoria mieloperoxidasa y mejora el curso de la enfermedad sugiriendo un efecto inhibidor de enfermedades neuroinflamatorias.

- **Dkk3** (Dickkopf-3). Es un miembro de la familia Dkk de inhibidores de Wnt, implicado en la fisiopatología de los trastornos neurodegenerativos. Dkk3 recombinante humano (hrDkk3) protege contra el estrés oxidativo tanto de las neuronas como de los astrocitos (Busceti et al., 2018).
- **LDHA** (Lactato Deshidrogenasa-A)**.** Es un enzima que cataliza la conversión de L-lactato a piruvato en la etapa final de la glucólisis anaerobia y se ha visto que está implicada en la progresión tumoral. Un metabolismo acelerado de la glucosa es una característica determinante de las células tumorales, y se ha visto que la inhibición de LDHA o la limitación de su actividad en células de cáncer de páncreas son suficientes para inhibir el crecimiento celular y la metástasis. En estudios clínicos e in vitro se ha demostrado que la expresión de LDHA aumenta la actividad de las células de cáncer de páncreas y favorecen la formación de un microambiente tumoral. Se ha propuesta la inhibición de LDHA como estrategia terapéutica para el control de la metástasis, así como el crecimiento tumoral de cáncer de páncreas (Xian et al., 2015).
- **SRPX** (*Sushi repeat containing protein*)**.** Es la proteína 1 que contiene repeticiones de sushi. Se trata de una peroxirredoxina y actúan como gen supresor de tumor estando sobreexpresada en células tumorales de cáncer gástrico después de la depleción de TWIST, el cual promueve la transición epitelio mesénquima que ocurre durante las fases iniciales de la metástasis. Sin embargo, también mediante análisis proteómico se ha demostrado que SRPX1 se expresa específicamente en los vasos sanguíneos cerebrales afectados por la angiopatía amiloide cerebral esporádica que se caracteriza por depósitos beta-amiloides cerebrovasculares (Aβ) y causa hemorragia cerebral y demencia. Su aumento en los depósitos de Aβ cerebrovascular se produce

comúnmente en personas de edad avanzada y en pacientes con enfermedad de Alzheimer y podría aumentar la degeneración cerebrovascular inducida por Aβ (Inoue et al., 2017).

- **MSN** (Moesina)**.** Un componente de la familia ezrina-radixina-moesina (ERM) de proteínas implicadas en la organización de la membrana, la señalización y la regulación de la BHE. Las proteínas ERM promueven la señalización de muchos receptores de superficie, como CD43, CD44, CD146, ICAM1-3 y S1PR1. La principal función de la moesina en los linfocitos es de regular su activación y migración; y la de promover la generación de Linfocitos T reguladores inducidos por TGF-beta (*TGFb-induced T-regs*) (Ansa-Addo et al., 2017).
- **SDC4** (Sindecano-4)**.** En su forma soluble que aparece por desprendimiento de la molécula existente en el glucocálix tras proteólisis durante el estrés celular. En el encéfalo indicaría daño vascular y activación endotelial pero no se ha estudiado. También participa en la regulación de la proliferación neuronal y la axogénesis (Luo et al., 2016).
- **LDLR** (Receptor de LDL)**.** Su forma soluble tiene efectos reguladores del LDL circulante. LDLR soluble aumenta en respuesta a IFN, actuando como receptor del virus de la estomatitis vesicular (Finkelshtein et al., 2013) y contribuyendo a regular la BHE. En el presente estudio su expresión aumentó solamente por efecto del astrocito activado por factores del tumor con sobreexpresión de Her2.

Las proteínas aumentadas en el secretoma del ECV activado por astrocitos expuestos al medio condicionado de **tumor con sobreexpresión de Her2, pero sin exposición a MAT (AT-2)** fueron DDX39A, FLNB, AIFM1, CAT, PEPD, PVR, CDH2, GRN, EIF4A1, PTPRK, GOLM1, ITGA3, GDI1, GSR, APEH, BTD, CCT4, FAM129B, YWHAG (tras 24 horas de exposición) y GBA, KRT2, DSG2 (tras 48 horas de exposición). De entre ellas, podrían tener implicaciones funcionales como factores solubles las siguientes:

- **DDX39** (*ATP-dependent RNA helicase*). Enzima de procesos celulares que implican la alteración de la estructura secundaria del ARN. DDX39 forma parte de la maquinaria homeostática que regula la proliferación y diferenciación celular; y está muy expresado en el SNC en desarrollo y en la copa óptica (Zhang et al., 2018).
- **FLNB** (Filamina B). Proteína citoplásmica multifuncional involucrada en el desarrollo del esqueleto. En un modelo in vitro de crecimiento en hipoxia de células de glioblastoma se observó que la hipoxia induce la expresión de la VE-cadherina (implicada en la formación de vasos) y de filamina B (gen presente en células del endotelio requerido para la motilidad) (Nissou et al., 2013).
- **AIFM1** (*Apoptosis-inducing factor mitochondrion-associated-1*). Actúa tanto como NADH oxidorreductasa, como regulador de la apoptosis. En respuesta a un estímulo apoptótico, se libera desde el espacio intermembrana de la mitocondria al citosol y al núcleo, donde ejerce su función de factor proapoptótico en la cascada independiente de caspasa. Tiene también una función antagónica como factor anti-apoptótico en mitocondrias normales vía NADH oxidorreductasa. Además, Interacciona con EIF3G, y de esa forma inhibe la maquinaria EIF3 y la síntesis de proteína, activando la caspasa 7 que amplifica la apoptosis (J. T. Kim et al., 2006). Su mutación está asociada a enfermedades mitocondriales y comporta la aparición de encefalopatía y neuropatías, algunas degenerativas (Bano et al., 2018). En concreto, la variabilidad y severidad fenotípicas de los trastornos relacionados con AIFM1 dependen de qué característica de AIF se vea afectada y en qué medida (es decir, nivel de producción celular, estructura, función redox o apoptogénica). Solo una disminución drástica en el nivel de expresión y/o la actividad redox de AIF tiende a causar una neurodegeneración precoz y severa, mientras que los cambios menos pronunciados en las propiedades de AIF podrían conducir a una amplia gama de trastornos neurológicos lentamente progresivos (Sevrioukova et al., 2016).

- **CAT** (catalasa). Enzima antioxidante endógena que cataboliza el peróxido de hidrógeno producido por la superóxido dismutasa. Enzima neuroprotector de vida media corta más efectivo que la glutatión peroxidasa en las neuronas y una fuente alternativa de oxígeno, ayudando en la neuroprotección durante condiciones hipóxicas.
- **PEPD** (prolidasa). Es un miembro de la familia de las metaloproteinasas de matriz que juega un papel importante en el recambio de colágeno, la remodelación de la matriz y el crecimiento celular. Se ha descrito una asociación entre el aumento de los niveles de estrés oxidativo, la disminución de los niveles de antioxidantes y el aumento de la actividad de la enzima prolidasa en pacientes con accidente cerebrovascular hemorrágico agudo (Gonullu et al., 2014). Así mismo, PEPD es un ligando de alta afinidad del receptor de membrana ErbB2 que se une como un homodimero al subdominio 3 en la parte extracelular del receptor. El impacto sobre Her2 es predominantemente inhibitorio. PEPD está presente en la sangre, y sus concentraciones aumentan significativamente cuando existe una lesión y también en paciente con cáncer de mama y otros tumores (Lu et al., 2014). PEPD también es una dipeptidasa, pero su función enzimática no está implicada en la modulación de ErbB2.
- **PVR** (receptor del poliovirus/CD155). Es receptor de reconocimiento viral (poliovirus) y de adhesión intercelular que está presente en uniones adherente y que sirve como receptor para células con expresión de DNAM-1, como las células NK y los linfocitos T citotóxicos. Es una molécula de la superfamilia de las Ig y su presencia como molécula soluble se detecta en LCR, orina y en suero, siendo su principal función la de bloquear el virus antes de que infecte (Blanchardie et al., 2003). También se ha demostrado su aumento en sangre de pacientes con cáncer, donde se propone su uso como marcador de progresión tumoral ya que podría tener efectos inmunosupresores neutralizantes de la respuesta antitumoral de NKs y LTC (Iguchi-manaka et al., 2016). Las formas solubles de PVR corresponden a CD155-β y CD155-γ, que carecen

del dominio transmembrana de la molécula. Su procedencia podría ser principalmente hepática, aunque CD155 se expresa en otros tejidos (pulmón, cerebro, intestino) y como demuestra el presente estudio, también lo produce el ECV activado por astrocitos. En este caso, la producción podría tener efectos protectores antivirales pero facilitadores del desarrollo de la metástasis cerebral.

- **CDH2** (cadherina 2). La mayoría de las células nerviosas expresan N-cadherina (CDH2) mientras que las células epiteliales expresan E-cadherina (CDH1). Se ha observado que la forma soluble de CDH2 aumenta la liberación microglial de TNF-α tras la activación de NF-κβ (Conant et al., 2017). El mediador de este efecto proinflamatorio en la microglía podría ser un TLR y el aumento de CDH2 en fluidos intersticiales podría representar una forma más de DAMP, es decir de patrón molecular asociado al daño tisular (inducido por MMPs) (Conant et al., 2017). Por tanto, la producción de CDH2 soluble por el ECV es de nuevo una evidencia de su activación proinflamatoria, cuya consecuencia inmediata sería la activación de la microglía en el lugar de la metástasis cerebral. Dicho efecto estaría promovido por factores solubles del astrocito activado por tumores con sobreexpresión de HER2.
- **GRN** (Progranulina). Es un factor de crecimiento secretado implicado en multitud de procesos, que van desde la embriogénesis e inflamación hasta la curación de heridas y el cáncer. Se expresa de forma ubicua en todo el cuerpo, incluido el cerebro, en el que se localiza en las neuronas, la microglía y la estructura vascular en desarrollo (Matsuwaki et al., 2011). La PGRN está implicada en el desarrollo neurovascular y la señalización de Wnt, una vía involucrada en la formación de la BHE. Las mutaciones en el gen PGRN se han relacionado con la demencia frontotemporal (FTD), una causa frecuente de deterioro cognitivo en la mediana edad caracterizada por la neurodegeneración selectiva de las cortezas prefrontal y antero-temporal (Prudencio et al., 2012). Sin embargo, los mecanismos patogénicos por los cuales la deficiencia de

PGRN conduce a disfunción cerebral y daños aún no están claros. PGRN tiene fuertes propiedades neurotróficas (Muynck et al., 2013), antiinflamatorias (Tang et al., 2011), neuroprotectoras y la pérdida de PGRN endógena puede alterar la estructura y función de los segmentos microvasculares cerebrales y de su BHE.

- **PTPRK** (Proteína tirosina fosfatasa kappa de tipo receptor). Se expresa en gran medida en el cerebro humano donde juega un papel en el crecimiento y orientación axonal. Se asocia al riesgo de trastornos neuropsiquiátricos. Su dominio extracelular de RPTPκ comparte características estructurales con moléculas de adhesión celular (Eswaran et al., 2006) y en su forma soluble puede contribuir a la adhesión hemofílica y estimular el desarrollo de las dendritas neuronales (Drosopoulos et al., 1999).
- **GOLM1 o GP73** (Proteína-1 de la membrana del Golgi). Es una proteína de membrana integral localizada en el Golgi-cis cuya forma soluble se detecta en el sobrenadante de las células cultivadas como resultado de su escisión durante el tráfico endosomal. Los niveles séricos de GP73 aumentan en pacientes con cirrosis y carcinoma hepatocelular pero se desconoce su función como molécula extracelular (L. Chen et al., 2013). En el encéfalo podría tener un papel oncogénico a través de la activación de AKT vía PDGFA/PDGFRα (J. Zhao et al., 2017). Numerosos tumores sobreexpresan GOLM1, siendo su acción oncogénica e inmunosupresora (Ying Yang et al., 2017), siendo también secretada por linfocitos activados.
- **ITGA3** (integrina alfa-3). Es una proteína codificada por el gen ITGA3 que forma la subunidad alfa de la integrina α3β1 implicada en la migración neural y la corticogénesis. ITGA3 sufre una escisión postraduccional en su dominio extracelular para producir cadenas ligeras y pesadas unidas por disulfuro que se unen con beta 1 para formar una integrina que interactúa con muchas proteínas de la matriz extracelular. Se desconoce la función de su forma soluble.

- **DSG2** (Desmogleina-2). Es una cadherina que se localiza en los desmosomas de las células epiteliales y musculares cardíacas. La desmogleina 2 se ha detectado en sangre pero su significado funcional se desconoce (Hongjie Wang et al., 2012). También se ha demostrado que la sobreexpresión de DSG2 en exosomas aumenta su liberación en tumores (Overmiller et al., 2017).
- **YWHAG** (14-3-3 proteína γ). Familia de proteínas multifuncionales que se expresan en el cerebro durante su desarrollo. Las siete isoformas de esta proteína representan el 1% del total de proteínas solubles del cerebro. Se han encontrado evidencias de que están implicadas en el desarrollo del SNC, en particular en numerosos procesos de regulación de la diferenciación neuronal y la sinaptogénesis (Cornell et al., 2017).

Las proteínas aumentadas en el secretoma del ECV inducido por astrocitos activados por **tumores con sobreexpresión de Her2 y exposición al MAT (AT-2-MAT)** fueron CTSD, MFGE8, DSG1, ALDOA, PA2G4, KRT8, EEF1G, ACLY, RPS8, RUVBL2, RUVLBL1, tras 24 horas de exposición; y LAMA5, GAPDH, GOT1, CCT5, VAT1, HNRNPA1 tras 48 horas de exposición. Coincidiendo con estudios anteriores, algunas de estas moléculas tienen una acción extracelular y estuvieron asociadas a la inflamación y la bioprotección del SNC frente a su lesión tisular y celular (CTSD, MFGE8, DSG1, GAPDH).

- **CTSD** (catepsina-D). Proteína enzimática intra y extracelular implicada en la degradación metabólica de proteínas intracelulares, la activación y degradación de hormonas polipeptídicas y factores de crecimiento, la activación de los precursores enzimáticos en los compartimentos pre-lisosómicos, el procesamiento de los activadores e inhibidores enzimáticos, el procesamiento del antígeno cerebral y la regulación de la muerte celular programada. Se activa en respuesta a la granulina en el SNC para colaborar en su acción neurotrófica (Beel et al., 2017), mientras que la deficiencia de la progranulina en la demencia frontotemporal reduce la actividad de la CTSD contribuyendo a la disfunción lisosomal implicada en la patogenia de dicha enfermedad

neurodegenerativa (Valdez et al., 2017). También se demuestra un aumento en la expresión de la CTSD en las microvesículas de la saliva de individuos con contusiones craneales y lesión traumática cerebral (Cheng et al., 2019).

- **MFGE8** (factor-8 glóbulo de grasa de la leche-EGF). Es la lactadherina, una glucoproteína multifuncional secretada descubierta en la leche del ratón y en el epitelio mamario factor. Como factor soluble proporciona neuroprotección a través de la modulación de la inflamación, el estrés oxidativo y especialmente la apoptosis en la isquemia cerebral y la enfermedad neurodegenerativa. Sin embargo, su papel en el SNC puede ser neuroprotector y neurodegenerativo. Se le atribuye un papel mediador en las interacciones celulares durante la respuesta inmune innata, la angiogénesis y la fertilización; siendo producida por células epiteliales mamarias, macrófagos, oligodendrocitos, células endoteliales, así como células epiteliales intestinales y de la retina. En el SNC, MFG-E8 se expresa principalmente en microglía, y algo en astrocitos y neuronas, y la regulación farmacológica de su expresión tiene efectos neuroprotectores en la enfermedad de Alzheimer. Además, su administración como molécula recombinante atenúa la lesión cerebral por supresión de la inflamación y la apoptosis durante la isquemia cerebral (Zhou et al., 2017) (Zhou et al., 2018). También ejerce efectos beneficiosos en los modelos de enfermedad de Alzheimer y hemorragia subaracnoidea al reducir el estrés oxidativo a través de la modulación del receptor de integrina y la hemooxigenasa-1.
- **DSG1** (Desmogleina 1). Es un componente de las uniones intercelulares que forman desmosomas. Participa en la interacción de las proteínas de la placa y los filamentos intermedios que median la adhesión entre células. Es una cadherina desmosomal esencial para la integridad de las barreras epidérmica y vascular. LDL-oxidada disminuye la expresión de DSG1 y aumenta permeabilidad en las células endoteliales de la vena del cordón umbilical (Yuan-bin Li et al., 2015). Sin embargo, nada se sabe

por el momento sobre la expresión y liberación de Desmogleína-1 por el ECV activado, ni sobre sus implicaciones en la regulación de la BHE.

- **ALDOA** (Aldolasa-1). enzima glucolítico que cataliza la conversión reversible de fructosa-1,6-bifosfato a gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato. Se encuentra en el embrión en desarrollo, se produce en cantidades aún mayores en el músculo adulto y se reprime en hígado, riñón e intestino adulto. Promueve la glucólisis anaerobia al aumentar la actividad de HIF-1α durante el crecimiento de los tumores sólidos en un ambiente hipóxico (Jiang et al., 2018) .
- **PA2G4** (*proliferation-associated 2G4*) Proteína de unión al ARN presente en los complejos ribonucleoproteínicos pre-ribosómicos que participa en la regulación del crecimiento. Esta proteína puede interactuar con el dominio citoplasmático del receptor ErbB3, contribuyendo a la transducción de señales reguladoras del crecimiento. También es un represor transcripcional de los genes regulados por el receptor de andrógenos y otros genes reguladores del ciclo celular a través de sus interacciones con las histonas deacetilasas. Está implicada en la inhibición del crecimiento y la inducción de la diferenciación de células cancerosas humanas. En embriones de *Xenopus*, aumenta la regulación de los genes de la placa neural. La interacción de Pa2G4 y Six1, han demostrado que el papel en el desarrollo de tejidos afectados por el trastorno branquio otorrenal (Molon et al., 2016).
- **GAPDH** (Gliceraldheído-3-fosfato deshidrogenasa). Es un enzima relacionado con el metabolismo energético, que genera NADH en la glucólisis. Además de esta función metabólica, GAPDH está implicado en procesos no metabólicos, como la activación de la transcripción, el inicio de la apoptosis, y el flujo axoplásmico rápido. A nivel extracelular, GAPDH exógeno regula funciones fisiológicas de los macrófagos estimulados por LPS, induciendo macrófagos intermedios M1 / M2 para la terminación de la inflamación, en parte a través de su actividad enzimática para la generación de NADH que a su vez inhibe la

producción de TNF-α y aumenta la de IL-10 (Nakano et al., 2017). Por sus funciones no metabólicas, GAPDH ha dejado de ser una proteína "constitutiva" usada para normalizar datos de expresión. GAPDH se ha implicado en la apoptosis, la enfermedad neurodegenerativa, la neuroprotección y el cáncer (Kawada et al., 2015) y la patogénesis viral.

- **GOT1** (transaminasa glutámico-oxaloacética 1). Enzima intra y extracelular que cataliza la transformación reversible de oxaloacetato y glutamato en aspartato y α-cetoglutarato, lo que disminuye la concentración de glutamato en sangre y a su vez en el cerebro, al crear un gradiente de glutamato entre cerebro y sangre que promueve el flujo de exceso de glutamato extracelular en el cerebro a la sangre (Pérez-Mato et al., 2014).
- **HNRNPA1** (ribonucleoproteína nuclear heterogénea A1). Es una ribonucleoproteína nuclear heterogénea (hnRNP). Actúa como proteína de unión a ARN que se asocia con pre-mRNAs en el núcleo e influye en el procesamiento de pre-mRNA, así como otros aspectos del metabolismo y transporte del mRNA. La proteína codificada por este gen es una de las proteínas centrales más abundantes de los complejos hnRNP y se han observado mutaciones en este gen en individuos con esclerosis lateral amiotrófica.
- **LAMA5** (Laminina-α-5). Proteína de la subfamilia alfa de las cadenas de laminina, que representa un componente principal de las membranas basales. En el SNC regula la estabilidad de la sinapsis en el cerebro durante el desarrollo posnatal tardío y su pérdida desestabiliza la sinapsis, interrumpe la transmisión sináptica y altera la función cerebral. La laminina α5 actúa a través de la integrina α3β1 y se asocia con la laminina β2 para regular la densidad y estabilidad de las espinas dendríticas y las sinapsis en el cerebro.
- **VAT1** (transportador de aminas vesiculares-1). Es una proteína integral de membrana de las vesículas sinápticas colinérgicas. También participa en la biosíntesis y liberación sináptica de dopamina, así como en el

crecimiento axonal, y su alteración contribuye a la neuropatía diabética (L. Jia et al., 2018). Su existencia como factor extracelular no se ha descrito.

Las proteínas aumentadas en el **secretoma del ECV asociadas al efecto del MAT sobre tumor con independencia de su expresión de Her2 (AT-1-MAT/AT-2-MAT)** fueron a las 24 horas: APP, EEF2, KRT13, EZR, PRCP, FSCN1, KRT77. De entre éstas, las más relevantes funcionalmente son las siguientes:

- **APP** (proteína precursora de amiloide-β). Es una proteína integral de membrana que se expresa en muchos tejidos y se concentra en las sinapsis de las neuronas. De hecho, APP es mejor conocida como una molécula precursora cuya proteólisis genera beta amiloide (Aβ), un polipéptido cuya forma fibrilar amiloide es el componente principal de las placas amiloides del cerebro en pacientes con enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, su función principal no se conoce, aunque se ha implicado como un regulador de la formación de sinapsis y la plasticidad neuronal. Se expresa en el endotelio vascular de los vasos sanguíneos cerebrales, coronarios y periféricos (D'Uscio et al., 2017). Además, la expresión y la actividad de las enzimas responsables de la escisión proteolítica de APP se ha detectado también en células endoteliales, aunque la función vascular de la APP y sus productos no se comprende completamente. Se expresa durante el desarrollo y desempeña un papel clave en la reproducción, con el procesamiento diferencial de AβPP por las secretasas que regulan la proliferación de células madre embrionarias humanas, así como su diferenciación en células precursora neural. La hormona del embarazo gonadotropina coriónica humana aumenta la expresión de AβPP y la proliferación de células madre, mientras que la progesterona dirige el procesamiento de AβPP hacia la vía no amiloidogénica, lo que promueve la diferenciación de células madre en precursoras neurales. Se postula que la pérdida de esteroides sexuales (incluida la progesterona), con elevación de la hormona luteinizante, la menopausia y la andropausia impulsan la

producción de amiloide-β y la re-entrada en ciclo de neuronas postmitóticas.

- **PRCP** (prolyl-carboxipeptidasa). Proteasa que produce o degrada las proteínas de señalización en el sistema renina-angiotensina, el sistema de calicreína-cinina y el sistema pro-opiomelanocortin, siendo un objetivo terapéutico para enfermedades cardiovasculares, inflamatorias y metabólicas. Genera calicreína plasmática a partir de la prekallikrein (PK); y degrada la angiotensina II y la hormona estimulante de melanocitos α (α-MSH) al proteolizar sus enlaces Pro-X C-terminales. Sin embargo, su principal función es en el metabolismo donde promueve la adipogénesis, y en el desarrollo vascular y la angiogénesis asociada a la inflamación (Hagedorn, 2013).
- **FSCN1** (Fascina-1). Las fascinas son proteínas de unión a la actina que entrecruzan la actina filamentosa en paquetes paralelos compactos que facilitan la formación de estructuras dinámicas y estables en la superficie celular, que contribuyen a la interacción célula-célula y la migración celular. Las fascinas desempeñan también un papel central en la reorganización del citoesqueleto de actina que acompaña a la transición epitelio-mesenquimal. FSCN1 es el miembro más expresado de esta familia de moléculas y regula la dinámica de adhesión y organización de los microfilamentos de actina en haces para la extensión de filopodios e invadopodios y su funcionalidad durante la migración celular. FSCN1 está ausente en la mayoría de los epitelios normales, pero sus niveles de expresión se correlacionan con tumores más agresivos y metástasis. Dado que fascin-1 carece de una secuencia de señal ER que sugiera la vía secretora, su presencia extracelular podría explicarse por mecanismos de secreción no clásicos, como los exosomas secretores. Su relación con los exosomas endoteliales se desconoce.

Por último, ciertas proteínas del **secretoma del ECV asociadas al tumor con sobreexpresión de Her2 no expuesto a MAT se detectaron también en el secretoma asociado al efecto del MAT sobre tumor sin sobreexpresión de**

Her2 (AT-2/AT-1-MAT). Son proteínas típicas del tumor con sobreexpresión de Her2 que también se asociaron a los efectos del tumor sin sobreexpresión de HER2 tras su respuesta al MAT. Estas fueron las siguientes a las 24 horas de tratamiento del astrocito: ADAM10, COL4A2, HSPD1, LAMC1, G6PD, DSP, TNC, CCT6A, CCT3, LAMB2, EEF1A1, ISYNA1, OLFML3. De éstas podrían ser de interés por su acción extracelular las siguientes:

- **ADAM10** (A Desintegrina y metaloproteinasa proteína que contiene el dominio 10). ADAM10 es una metaloproteasa anclada a la membrana que desprende el ectodominio de una gran variedad de proteínas de la superficie celular, incluidas citocinas, moléculas de adhesión y receptores diversos. Tiene efectos reguladores de la BHE. Por ejemplo, es la principal α-secretasa que escinde la APP (proteína precursora amiloide) en la vía no amiloidogénica que inhibe la formación del péptido β-amiloide, cuya acumulación y agregación conduce a la degeneración neuronal en la enfermedad de Alzheimer. La fragmentación de APP da lugar a un fragmento derivado de APP, sAPPα, que es neuroprotector y el aumento de la actividad de ADAM10 protege al cerebro de la acumulación de β-amiloide (Peron et al., 2018). Así mismo, uno de los receptores responsables del transporte del péptido β-amiloide en la BBB es la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1). LRP1 es susceptible a desprendimiento proteolítico en la superficie celular, lo que evita el transporte endocítico de los ligandos, y existe una correlación inversa entre el desprendimiento de LRP1 en el cerebro y el tránsito de Aβ a través de la BBB, siendo ADAM10 una de las proteasas que contribuyen a la eliminación de ectodominio de LRP1 (Shackleton et al., 2016).
- **COL4A2** (cadena alfa 2 del colágeno IV). Aumenta en sangre de pacientes con cáncer y se detecta en el secretoma de células de glioma activadas por TGFβ por un mecanismo inhibido por IL-1β (Tarassishin et al., 2015). En el presente trabajo se detecta en el secretoma de ECV activado por astrocitos que responden a factores del tumor con HER2 o sin HER2, pero activados por MAT.

- **HSPD1/HSP60** (Proteína de shock térmico 60). Chaperona multifuncional con efectos mitocondriales y extracelulares. Hsp60 puede ser liberado de las células lesionadas del SNC para activar la microglía (Feng et al., 2013). IL-1β induce la expresión de HSP60 en microglía que a su vez aumenta la inflamación a través del eje MAPR TLR4-p38 (Swaroop et al., 2016). En general, HSP60 tiene una función de señalización extracelular en la inflamación y la regeneración de tejidos, probablemente a través de la promoción de la fase M2 para macrófagos (Pei et al., 2016).
- **TNC** (Tenascina-C). Es una glucoproteína grande y multimodular de la matriz extracelular que presenta un patrón de expresión muy restringido pero una gama de funciones enormemente diversa. Está presente en el torrente sanguíneo y aumenta en el suero de pacientes con cáncer en general. También se ha observado que es secretado por astrocitos, neuronas y el ECV. Se ha propuesto como biomarcador sérico de lesión cerebral precoz, por ejemplo, por hemorragia subaracnoidea tras aneurisma (Suzuki et al., 2018).
- **OLFML3** (Olfactomedin-tipo 3). El gen de la Olfactomedina-tipo 3 codifica una proteína extracelular secretada conocida como OLF44 en humanos que pertenece a una familia de proteínas que contienen el dominio de la olfactomedina con funciones distintas en el patrón embrionario, la regulación del ciclo celular, la angiogénesis y tumorigénesis y la capacidad para modular circuitos de señalización como Notch o Wnt y los tratamientos con anti olflm3 reducen la vascularización, el área que ocupa el pericito en los vasos tumorales y su crecimiento (Miljkovic-Licina et al., 2012).

En un sentido estricto, el secretoma celular estudiado (las moléculas del medio condicionado por células del ECV en cultivo), comprende el conjunto de proteínas que contienen un péptido señal y se procesan a través del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi para su traslado al espacio extracelular a través de la vía de secreción clásica. Sin embargo, de acuerdo con las moléculas identificadas, el

secretoma del ECV activado por astrocitos abarcó también proteínas eliminadas de la superficie celular por la acción enzimática, e intracelulares liberadas en forma de exosomas por una vía de secreción no clásica. Como se puede observar en la Tabla 14, las proteínas identificadas en el secretoma incluyeron numerosos enzimas, factores de crecimiento, citocinas y hormonas u otros mediadores solubles fundamentales en los procesos de desarrollo y regeneración del SNC, de regulación vascular y de la BHE, de inflamación y estrés oxidativo, de neuroprotección y neurotrofismo, de neurodegeneración, y de desarrollo tumoral y metástasis.

Tabla 14: Distribución funcional de las moléculas del secretoma de ECV inducidas por factores solubles del astrocito activado por células del cáncer de mama con o sin sobreexpresión de Her2 y exposición o no a MAT.

Implicación Funcional	(HER2-)MAT-	(HER2-)MAT+	(HER2+)MAT-	(HER2+)MAT+	(HER2-/HER2+)MAT+
Desarrollo del SNC	**AHSG** (Fetuina A) **SRPX** (Sushi repeat containing Protein)		**YWHAG** (14-3-3 protein gamma) **DDX39** (ATP-dependent RNA helicase) **AIFM1** (Apoptosis-inducing factor mitochondrion-associated-1) **CDH2** (cadherina 2) **PTPRK** (Proteína tirosina fosfatasa kappa de tipo receptor) **ITGA3** (integrina alfa-3) **14-3-3 protein gamma** (YWHAG)	**PA2G4** **LAMA5** (laminina alfa 5)	**APP** (proteína precursora de amiloide-beta)
Inflamación del SNC	**SDC4** (Sindecano-4)	**HSPD1/HSP60** (Proteína de shock térmico 60) **OLFML3** (Olfactomedin-like 3)	**CDH2** (N-Cadherina) **HSPD1/HSP60** (Proteína de shock térmico 60) **OLFML3** (Olfactomedin-like 3)		**HSPD1/HSP60** (Proteína de shock térmico 60) **OLFML3** (Olfactomedin-like 3)
Neuroprotección y Neurotrofismo			**GRN** (Progranulina). **CAT** (Catalasa) **PVR** (receptor del poliovirus)	**CTSD** (cathepsin-D) **MFGE8** (lactadherina) **GAPDH** (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)	
Regulación neurovascular y de la BHE	**LDLR** (receptor LDL) **GSN** (Gelsolina) **MSN** (Moesina)	**ADAM10** (Desintegrina-MMP-proteina 10) **TNC** (Tenascin-C)	**DSG2** (Desmogleina 2) **ADAM10** (Desintegrina-MMP-proteina 10) **PEPD** (Prolidasa)	**DSG1** (desmoglein 1) **GOT1** (glutamic-oxaloacetic transaminase 1)	**PRCP** (prolylcarboxypeptidase) **FSCN1** (Fascin-1) **TNC** (Tenascin-C)
Enfermedades Neuro-Degenerativas	**Dkk3** (Dickkopf-3)		**FLNB** (Filamina B)	**HNRNPA1** (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1) **VAT1** (vesicle amine transport 1)	
Neuro-Oncogénesis y Metástasis	**LDHA** (lactato deshidrogenasa)	**COL4A2** (cadena alfa 2 del colágeno IV)	**GOLM1** (Golgi Membr. Protein 1) **COL4A2** (cadena alfa 2 del colágeno IV) **TNC** (Tenascin-C)	**ALDOA** (Aldolase-1)	**COL4A2** (cadena alfa 2 del colágeno IV)

Una gran mayoría de estas moléculas ya han asociadas por trabajos previos con la regulación de la fisiología y patología del SNC, lo que concuerda con el papel del astrocito como inductor de un fenotipo neuroendotelial órgano-específico que capacita al ECV para su implicación en la fisiología y patología del SNC.

Así mismo, las moléculas identificadas en el secretoma del ECV variaron en función de la expresión o no de Her2 por el cáncer de mama y de su exposición o no a los factores del MAT. Por tanto, el estado funcional del cáncer de mama pudo haber

determinado la naturaleza de los factores estimulantes de astrocito derivados del tumor, que a su vez conllevó la producción por astrocitos de diferentes factores solubles estimulantes del ECV, responsables de los diferentes patrones moleculares identificados en el secretoma del ECV.

D. IMPLICACIONES TRASLACIONALES Y FUTUROS ESTUDIOS

En su conjunto, los resultados obtenidos verificaron la hipótesis planteada, demostrando el crecimiento perivascular de metástasis cerebrales experimentales y clínicas; la secreción molecular del ECV en respuesta a factores paracrinos de astrocitos activados por factores tumorales; y la importancia de sobreexpresar o no Her2 y de responder al microambiente tumoral, en la composición molecular de las secreciones del ECV inducidas por astrocitos activados por tumor. Así mismo el presente trabajo identifica por vez primera la importancia funcional de las moléculas de secreción del ECV activado por astrocitos en la regulación de la inflamación, el estrés oxidativo, la permeabilidad de la BHE y la regulación de la respuesta inmune en el microambiente perivascular, donde se inicia la enfermedad metastásica cerebral (Tabla 15). Algunos de los factores identificados ya se han administrado como moléculas recombinantes o se han inhibido con anticuerpos en modelos de terapéutica experimental de enfermedades cerebrales vasculares y neurodegenerativas. De esta forma el presente estudio abre la puerta al ensayo de algunos de estos tratamientos en modelos experimentales de enfermedad metastásica cerebral.

Tabla 15: Perfil neurofuncional de las moléculas del secretoma de ECV inducidas por factores solubles del astrocito activado por células del cáncer de mama con o sin sobreexpresión de Her2 y exposición o no a MAT.

Secretoma de ECV inducido por astrocitos activados por cáncer de mama	Molécula Extracelular	Desarrollo del SNC	Neuroprotección y Neurotrofismo	Inflamación del SNC	Regulación Neurovascular y de la BHE	Enfermedades Neuro-Degenerativas	Neuro-Oncogénesis y Metástasis
AHSG (Fetuina A)	Soluble	■	■				
GSN (Gelsolina)	Exosomal		■		■		
Dkk3 (Dickkopf-3)	Exosomal		■				
LDHA (lactato deshidrogenasa)	Soluble						■
SRPX (Sushi repeat containing Protein)	Soluble					■	■
MSN (Moesina)	Exosomal				■		
SDC4 (Sindecano-4)	Soluble			■	■		
LDLR (receptor LDL)	Soluble			■	■		
DDX39 (ATP-dependent RNA helicase)	Exosomal	■					
FLNB (Filamina B)	Exosomal					■	
AIFM1 (Apoptosis-inducing factor mitochondrion-associated-1)	Exosomal					■	
CAT (Catalasa)	Soluble		■				
PEPD (Prolidasa)	Soluble			■			
PVR (receptor del poliovirus)	Soluble		■				■
CDH2 (N-Cadherina)	Soluble			■			
GRN (Progranulina)	Soluble	■	■		■		
PTPRK (Proteína tirosina fosfatasa kappa de tipo receptor)	Exosomal	■					
GOLM1 (Golgi Membrane Protein 1)	Soluble		■				■
ITGA3 (integrina alfa-3)	Soluble	■					
DSG2 (Desmogleina 2)	Exosomal						■
YWHAG (14-3-3 protein gamma)	Exosomal	■					
CTSD (cathepsin-D)	Soluble		■				
MFGE8 (lactadherina)	Soluble		■				
DSG1 (Desmogleina 1)	Soluble				■		
ALDOA (Aldolase-1)	Exosomal		■				■
PA2G4 (proliferation-associated 2G4)	Exosomal	■					
GOT1 (glutamic-oxaloacetic transaminase 1)	Exosomal		■				
GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)	Exosomal		■				
HNRNPA1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1)	Exosomal					■	
LAMA5 (laminina alfa 5)	Soluble	■					
VAT1 (vesicle amine transport 1)	Soluble					■	
APP (proteína precursora de amiloide-beta)	Soluble	■				■	
PRCP (prolylcarboxypeptidase)	Exosomal				■		
FSCN1 (Fascina-1)	Exosomal				■		
HSPD1/HSP60 (Proteína de shock térmico 60)	Soluble			■			
OLFML3 (Olfactomedin-like 3)	Soluble	■			■		■
ADAM10 (Desintegrina-MMP-proteina 10)	Soluble		■		■		
COL4A2 (cadena alfa 2 del colágeno IV)	Soluble						■
TNC (Tenascin-C)	Soluble				■		■

Durante el proceso de metástasis cerebral, las células tumorales circulantes que atraviesan la BHE asientan en posiciones perivasculares, donde liberan factores solubles que generan una gliosis reactiva en el microambiente del nicho premetastásico cerebral. Debido a la estrecha relación funcional entre astrocitos perivasculares y ECV, las alteraciones gliales inducidas por células metastásicas podrían generar cambios funcionales en el ECV, cuya alteración de su secretoma podría identificarse en sangre periférica, ayudando así a anticipar la detección una enfermedad metastásica cerebral, cuyo diagnóstico actualmente solo es posible por imagen tras las primeras manifestaciones neurológicas de los pacientes.

Por tanto, futuros estudios deberán estudiar la naturaleza de los factores tumorales reguladores del astrocito, cuya activación es diferente en el microambiente perivascular de tumores con o sin sobreexpresión de Her2, y de los factores gliales reguladores del ECV producidos por los astrocitos activados por tumores de diferente fenotipo.

Así mismo, también queda para futuros estudios determinar si algunas de las moléculas identificadas en el secretoma del endotelio cerebrovascular, activadas por la respuesta de astrocitos a tumores metastásicos con o sin sobreexpresión de Her2, tiene un papel relevante en la regulación del crecimiento metastásico cerebral y si pudieran o no servir como biomarcadores para el diagnóstico de la enfermedad metastásica cerebral subclínica en muestras de sangre periférica de pacientes con cáncer avanzado de mama.

VI. CONCLUSIONES

1. El proceso experimental de metástasis cerebral, de la línea celular humana MDA 231 de cáncer de mama con sobreexpresión de *Her2*, se inició y desarrolló en zonas perivasculares, donde sus células usurparon la posición perivascular de los astrocitos, formando un tejido neoplásico de recubrimiento vascular, cuyo microambiente tumoral proliferativo estuvo delimitado por dos barreras funcionales: una interna, hematotumoral, constituida por el endotelio y su membrana basal rica en colágeno IV y pericitos; y otra externa, neurotumoral, formada también por una membrana basal de colágeno IV, rodeada por astrocitos con alta expresión de GFAP y microglía.

2. El crecimiento metastásico cerebral en pacientes con cáncer avanzado también se produjo en el espacio perivascular con independencia del linaje tisular de la metástasis. Allí, las células metastásicas crecieron en asociación con leucocitos migratorios y otras células del estroma vascular, formando una barrera hematotumoral interna con alta expresión de PECAM-1 y claudina-5 en el endotelio, y de Colágeno IV y alfa-actina de músculo liso en la zona subendotelial; y cuya barrera externa neurotumoral también presentó células de la microglía y astrocitos con alta expresión de GFAP.

3. El estudio mediante qRT-PCR semicuantitativa de la actividad transcripcional del endotelio cerebrovascular, tras su cultivo en presencia de medio condicionado de astrocitos humanos, demostró que la respuesta del astrocito a factores de la línea celular MDA 231 de cáncer de mama, con sobreexpresión de *Her2* y exposición al microambiente tumoral, conllevó la producción de factores solubles que propiciaron el paso del endotelio cerebrovascular a un estado neuroespecífico proinflamatorio, caracterizado por su aumento en la expresión génica de *Clau-1*, *Vcam-1* y *Pecam-1* (reguladores de las relaciones intercelulares), de *Vegfr-2*, *Rage* y *Col-IV* (reguladoresde la diferenciación endotelial) y de *Pgp* (regulador de los intercambios moleculares transcelulares).

4. El estudio mediante LC-MS/MS de la identidad molecular del secretoma generado por el endotelio cerebrovascular, inducido por astrocitos activados por tumor, demostró su enriquecimiento en proteínas implicadas en: el desarrollo neural, la regulación neurovascular y de la BHE, neuroinflamación, neuroprotección y neurotrofismo, la neurodegeneración y el desarrollo tumoral; variando su composición molecular en función de la sobreexpresión o no de *Her2* por el tumor, y de su exposición o no a los factores el microambiente tumoral.

En su conjunto, los resultados obtenidos verificaron la hipótesis planteada, demostrando el crecimiento perivascular de metástasis cerebrales experimentales y clínicas; la alteración transcripcional y secreción molecular del endotelio cerebrovascular en respuesta a factores paracrinos de astrocitos activados por factores tumorales; y la importancia de sobreexpresar *Her2* y responder al microambiente tumoral en la composición molecular de las secreciones del endotelio cerebrovascular, inducidas por astrocitos activados por tumor.

Futuros estudios deberán abordar:

1) La naturaleza de los factores reguladores del astrocito que activa el microambiente tumoral en tumores con sobreexpresión de *Her2*, y de los factores reguladores del ECV producidos por astrocitos activados por dichos tumores.

2) Si algunas de las moléculas identificadas en el secretoma del endotelio cerebrovascular, activadas por la respuesta de astrocitos a tumores metastásicos con sobreexpresión de *Her2*, sirven como biomarcadores para el diagnóstico de la enfermedad metastásica cerebral subclínica en muestras de sangre periférica de pacientes con cáncer avanzado de mama.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, *7*(1), 41–53. https://doi.org/10.1038/nrn1824

Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., Tetzlaff, W., & Rossi, F. M. V. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nature Neuroscience*, *10*(12), 1538–1543. https://doi.org/10.1038/nn2014

Alonso, R., Pisa, D., Marina, A. I., Morato, E., Rábano, A., Rodal, I., & Carrasco, L. (2015). Evidence for fungal infection in cerebrospinal fluid and brain tissue from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *International Journal of Biological Sciences*, *11*(5), 546–558. https://doi.org/10.7150/ijbs.11084

Anderson, M. a, Ao, Y., & Sofroniew, M. V. (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes Mark. *Neuroscience Letters*, 23–29. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.030.Heterogeneity

Ansa-Addo, E. A., Zhang, Y., Yang, Y., Hussey, G. S., Howley, B. V., Salem, M., … Li, Z. (2017). Membrane-organizing protein moesin controls Treg differentiation and antitumor immunity via TGF-? signaling. *Journal of Clinical Investigation*, *127*(4), 1321–1337. https://doi.org/10.1172/JCI89281

Armulik, A., Abramsson, A., & Betsholtz, C. (2005). Endothelial/pericyte interactions. *Circulation Research*, *97*(6), 512–523. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7

Armulik, A., Genové, G., & Betsholtz, C. (2011). Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Developmental Cell*, *21*(2), 193–215. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.001

Babicki, S., Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., Grant, J. R., Maciejewski, A., & Wishart, D. S. (2016). Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Research*, *44*(W1), W147–W153. https://doi.org/10.1093/nar/gkw419

Baello, S., Iqbal, M., Gibb, W., & Matthews, S. G. (2016). Astrocyte-mediated regulation of multidrug resistance P-glycoprotein in fetal and neonatal brain endothelial cells : age-dependent effects. *Physiological Reports*, *4*, 1–17. https://doi.org/10.14814/phy2.12853

Balduzzi, S., Mantarro, S., Guarneri, V., Tagliabue, L., Pistotti, V., Moja, L., & Amico, D. R. (2014). Trastuzumab-containing regimens formetastatic breast cancer (Review). *The Cochrane Library*, (6).

Bano, D., & Prehn, J. H. M. (2018). EBioMedicine Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease : The Tale of a Repented Natural Born Killer. *EBioMedicine*, *30*, 29–37. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.03.016

Bearer, E. L., Orci, L., & Sors, P. (1985). Endothelial Fenestral Diaphragms : A Quick-Freeze , Deep-Etch Study. *The Journal of Cell Biology*, *100*(February), 418–428. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2113429&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Beel, S., Moisse, M., Damme, M., Muynck, L. De, Robberecht, W., Bosch, L. Van Den, … Damme, P. Van. (2017). Progranulin functions as a cathepsin D chaperone to stimulate axonal outgrowth in vivo. *Human Molecular Genetics*, *26*(15), 2850–2863. https://doi.org/10.1093/hmg/ddx162

Berezowski, V., Landry, C., & Dehouck, M. (2004). Contribution of glial cells and pericytes to the mRNA profiles of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in an in vitro model of the blood – brain barrier. *Brain Research*, *1018*, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.05.092

Berghoff, A. S., Preusser, M., A.S., B., & M., P. (2013). Biology in prevention and treatment of brain metastases. *Expert Review of Anticancer Therapy*, *13*(11), 1339–1348. https://doi.org/10.1586/14737140.2013.852067

Berghuis, A., Koffijberg, H., Prakash, J., Terstappen, L., & IJzerman, M. (2017). Detecting Blood-Based Biomarkers in Metastatic Breast Cancer: A Systematic Review of Their Current Status and Clinical Utility. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(2), 363. https://doi.org/10.3390/ijms18020363

Bhowminck, N., Neilson, E., & Moses, H. (2011). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Inflammation*, *432*(7015), 332–337. https://doi.org/10.1038/nature03096.Stromal

Binder, C., Chuang, E., Habla, C., Bleckmann, A., Schulz, M., Bathgate, R., & Einspanier, A. (2014). Relaxins enhance growth of spontaneous murine breast cancers as well as metastatic colonization of the brain. *Clinical and Experimental Metastasis*, *31*(1), 57–65. https://doi.org/10.1007/s10585-013-9609-2

Blanchardie, P., Laboisse, C. L., Lustenberger, P., Racaniello, V. R., & Denis, M. G. (2003). Identification of secreted CD155 isoforms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *309*, 175–182. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01560-2

Bonifazi, M., Franchi, M., Rossi, M., Zambelli, A., Moja, L., Zambon, A., … Negri, E. (2014). Long term survival of HER2-positive early breast cancer treated with trastuzumab-

based adjuvant regimen: A large cohort study from clinical practice. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, *23*(5), 2–7. https://doi.org/10.1016/j.breast.2014.05.022

Bos, P. D., Zhang, X. H.-F., Nadal, C., Shu, W., Gomis, R. R., Nguyen, D. X., … Massagué, J. (2009). Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature*, *459*(7249), 1005–1009. https://doi.org/10.1038/nature08021

Boutaud, A., Borza, D. B., Bondar, O., Gunwar, S., Netzer, K. O., Singh, N., … Hudson, B. G. (2000). Type IV collagen of the glomerular basement membrane. Evidence that the chain specificity of network assembly is encoded by the noncollagenous NC1 domains. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(39), 30716–30724. https://doi.org/10.1074/jbc.M004569200

Boyd, N. L., Park, H., Yi, H., Boo, Y. C., Sorescu, G. P., Sykes, M., & Jo, H. (2003). Chronic shear induces caveolae formation and alters ERK and Akt responses in endothelial cells. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *285*(3), H1113-22. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00302.2003

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248–254.

Brightman, M. W., & Reese, T. S. (1969). Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *Journal of Cell Biology*, *40*(3), 648–677. https://doi.org/10.1083/jcb.40.3.648

Busceti, C. L., Menna, L. Di, Bianchi, F., Mastroiacovo, F., Pietro, P. Di, Traficante, A., … Volpe, M. (2018). Dickkopf-3 Causes Neuroprotection by Inducing Vascular Endothelial Growth Factor. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*(September), 1–9. https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00292

Busch, S. A., Horn, K. P., Cuascut, F. X., & Hawthorne, A. L. (2010). Adult NG2+ cells are permissive to neurite outgrowth and stabilize sensory axons during macrophage-induced axonal dieback after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, *30*(1), 1–27. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3705-09.2010.Adult

Cai, H. Q., Catts, V. S., Webster, M. J., Galletly, C., Liu, D., O'Donnell, M., … Weickert, C. S. (2018). Increased macrophages and changed brain endothelial cell gene expression in the frontal cortex of people with schizophrenia displaying inflammation. *Molecular Psychiatry*. https://doi.org/10.1038/s41380-018-0235-x

Cameron, M. D., Schmidt, E. E., Kerkvliet, N., Nadkarni, K. V, Morris, V. L., Groom, A. C., … MacDonald, I. C. (2000). Temporal progression of metastasis in lung: cell survival,

dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Research*, *60*(9), 2541–2546.

Carbonell, W. S., Ansorga, O., Sibson, N., & Muschel, R. (2009). The vascular basement membrane as "soil" in brain metastasis. *PLoS ONE*, *4*(6). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005857

Cetin, B., Benekli, M., Turker, I., Koral, L., Ulas, A., Dane, F., … Buyukberber, S. (2014). Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer: a multicentre study of Anatolian Society of Medical Oncology (ASMO). *Journal of Chemotherapy (Florence, Italy)*, *26*(5), 300–305. https://doi.org/10.1179/1973947813Y.0000000147

Chaffer, C. L., & Weinberg, R. A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science (New York, N.Y.)*, *331*(6024), 1559–1564. https://doi.org/10.1126/science.1203543

Chaitanya, G. V., Minagar, A., & Alexander, J. S. (2014). Neuronal and astrocytic interactions modulate brain endothelial properties during metabolic stresses of in vitro cerebral ischemia. *Cell Communication and Signaling : CCS*, *12*(1), 7. https://doi.org/10.1186/1478-811X-12-7

Chanmee, T., Ontong, P., Konno, K., & Itano, N. (2014). Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers*, *6*(3), 1670–1690. https://doi.org/10.3390/cancers6031670

Chen, E. I., Hewel, J., Krueger, J. S., Tiraby, C., Weber, M. R., Kralli, A., … Felding-Habermann, B. (2007). Adaptation of energy metabolism in breast cancer brain metastases. *Cancer Research*, *67*(4), 1472–1486. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3137

Chen, L., Wang, H., Yao, H., Guan, T., Wu, F., He, X., … Tao, H. (2013). GP73 is down-regulated in gastric cancer and associated with tumor differentiation. *World Journal of Surgical Oncology*, *11*(1), 1. https://doi.org/10.1186/1477-7819-11-132

Cheng, Y., Pereira, M., Reagan, J. L., Queseneberry, M., Jr, W. C. L., Goldberg, L., … Quesenberry, P. (2019). Potential biomarkers to detect traumatic brain injury by the profiling of salivary extracellular vesicles. *Journal of Cellular Physiology*, (October 2018), 1–12. https://doi.org/10.1002/jcp.28139

Cohen, Z., Molinatti, G., & Hamel, E. (1997). Astroglial and vascular interactions of noradrenaline terminals in the rat cerebral cortex. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *17*(8), 894–904. https://doi.org/10.1097/00004647-199708000-00008

Conant, K., Daniele, S., Bozzelli, P. L., Abdi, T., Edwards, A., Szklarczyk, A., … Maguire-

zeiss, K. (2017). Matrix metalloproteinase activity stimulates N-cadherin shedding and the soluble N- cadherin ectodomain promotes classical microglial activation. *Journal of Neuroinflammation*, 1–12. https://doi.org/10.1186/s12974-017-0827-4

Cornell, B., & Toyo-oka, K. (2017). 14-3-3 Proteins in Brain Development: Neurogenesis, Neuronal Migration and Neuromorphogenesis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *10*(October), 1–17. https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00318

Correale, J., & Villa, A. (2009). Cellular Elements of the Blood-Brain Barrier. *Neurochemical Research*, *34*(12), 2067–2077. https://doi.org/10.1007/s11064-009-0081-y

Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, *420*(6917), 860–867. https://doi.org/10.1038/nature01322

D'Uscio, L. V, He, T., & Santhanam, A. V. (2017). Endothelium-specific amyloid precursor protein deficiency causes endothelial dysfunction in cerebral arteries. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. https://doi.org/10.1177/0271678X17735418

Dalkara, T., & Alarcon-Martinez, L. (2015). Cerebral microvascular pericytes and neurogliovascular signaling in health and disease. *Brain Research*. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.03.047

Daneman, R., & Prat, A. (2015). The Blood – Brain Barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *7*, 1–24. https://doi.org/10.1002/ana.23648

Daneman, R., Zhou, L., Agalliu, D., Cahoy, J. D., Kaushal, A., & Barres, B. a. (2010). The mouse blood-brain barrier transcriptome: A new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PLoS ONE*, *5*(10), 1–16. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013741

De Mattos-Arruda, L., Cortes, J., Santarpia, L., Vivancos, A., Tabernero, J., Reis-Filho, J. S., & Seoane, J. (2013). Circulating tumour cells and cell-free DNA as tools for managing breast cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *10*(7), 377–389. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.80

Delattre, J. Y., Krol, G., Thaler, H. T., & Posner, J. B. (1988). Distribution of brain metastases. *Archives of Neurology*, *45*(7), 741–744.

Deli, M. A., Abraham, C. S., Kataoka, Y., & Niwa, M. (2005). Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: Physiology, pathology, and pharmacology. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *25*(1), 59–127. https://doi.org/10.1007/s10571-004-1377-8

Denkins, Y., Reiland, J., Roy, M., Sinnappah-Kang, N. D., Galjour, J., Murry, B. P., … Marchetti, D. (2004). Brain Metastases in Melanoma: Roles of Neurotrophins. *Neuro-Oncology*, *6*(2), 154–165. https://doi.org/10.1215/S1152

Diaz-Flores, L., Gutierrez, R., Madrid, J. F., Varela, H., Valladares, F., Acosta, E., … Diaz-Flores, L. J. (2009). Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histology and Histopathology*, *24*(7), 909–969.

Dorovini-Zis, K., Prameya, R., & Bowman, P. D. (1991). Culture and characterization of microvascular endothelial cells derived from human brain. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, *64*(3), 425–436.

Drosopoulos, N. E., Walsh, F. S., & Doherty, P. (1999). A Soluble Version of the Receptor-like Protein. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *449*, 441–449.

Eichler, A. F., Chung, E., Kodack, D. P., Loeffler, J. S., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2012). The biology of brain metastases - translation to new therapies. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *8*(6), 344–356. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.58.The

Elsas, J., Sellhaus, B., Herrmann, M., Kinkeldey, A., Weis, J., Jahnen-dechent, W., & Ha, M. (2012). Fetuin-A in the Developing Brain. *Wiley Periodicals, Inc. Develop Neurobiol*, *73*, 354–369. https://doi.org/10.1002/dneu.22064

Escudero-Esparza, A., Jiang, W. G., & Martin, T. A. (2012). Claudin-5 is involved in breast cancer cell motility through the N-WASP and ROCK signalling pathways. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *31*(1), 1. https://doi.org/10.1186/1756-9966-31-43

Eswaran, J., & Knapp, S. (2006). The crystal structure of human receptor protein tyrosine phosphatase k phosphatase domain 1. *Protein Science*, 1500–1505. https://doi.org/10.1110/ps.062128706.members

Fan, J., & Fu, B. M. (2015). Quantification of Malignant Breast Cancer Cell MDA-MB-231 Transmigration Across Brain and Lung Microvascular Endothelium. *Annals of Biomedical Engineering*, 1–13. https://doi.org/10.1007/s10439-015-1517-y

Feng, M. jiang, Ling, F., & Zhengxia, Z. (2013). The Expression and Release of Hsp60 in 6-OHDA Induced In Vivo and In Vitro Models of Parkinson ' s Disease. *Neurochemical Research*, *38*, 2180–2189. https://doi.org/10.1007/s11064-013-1127-8

Fidler, I. J., Yano, S., Zhang, R.-D., Fujimaki, T., & Bucana, C. D. (2002). The seed and soil hypothesis: vascularisation and brain metastases. *The Lancet. Oncology*, *3*(1), 53–57.

Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S., & Rubinstein, M. (2013). LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *PNAS*, *110*(18), 2–7. https://doi.org/10.1073/pnas.1214441110

Fischer, E. S., Böhm, K., Lydeard, J. R., Yang, H., Stadler, M. B., Cavadini, S., … Thomä, N.

H. (2015). GLUT1 reductions exacerbate Alzheimer's disease vasculo-neuronal dysfunction and degeneration. *Nat Neurosci.*, *512*(7512), 49–53. https://doi.org/10.1038/nature13527.Structure

Fomby, P., & Cherlin, A. J. (2011). Central nervous system pericytes in health and disease., *72*(2), 181–204. https://doi.org/10.1038/nature13314.A

Fomby, P., & Cherlin, A. J. (2014). Serpins promote cancer cell survival and vascular co-option in brain metastasis. *Cell*, *156*(5), 1002–1016. https://doi.org/10.1038/nature13314.A

Friedl, P., & Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews. Cancer*, *3*(5), 362–374. https://doi.org/10.1038/nrc1075

Furuse, M. (2010). Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(1), 1–14. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002907

Gaspar, L. E., Mehta, M. P., Patchell, R. A., Burri, S. H., Robinson, P. D., Morris, R. E., … Kalkanis, S. N. (2010). The role of whole brain radiation therapy in the management of newly diagnosed brain metastases: A systematic review and evidence-based clinical practice guideline. *Journal of Neuro-Oncology*, *96*(1), 17–32. https://doi.org/10.1007/s11060-009-0060-9

Gavrilovic, I. T., & Posner, J. B. (2005). Brain metastases: Epidemiology and pathophysiology. *Journal of Neuro-Oncology*, *75*(1), 5–14. https://doi.org/10.1007/s11060-004-8093-6

Gerhardt, H., Wolburg, H., & Redies, C. (2000). N-cadherin mediates pericytic-endothelial interaction during brain angiogenesis in the chicken. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *218*(3), 472–479. https://doi.org/10.1002/1097-0177(200007)218:3<472::AID-DVDY1008>3.0.CO;2-#

Gianni, L., Pienkowski, T., Im, Y. H., Roman, L., Tseng, L. M., Liu, M. C., … Valagussa, P. (2012). Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): A randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, *13*(1), 25–32. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70336-9

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Mehler, M. F., … Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, *330*(6005), 841–845. https://doi.org/10.1126/science.1194637.Fate

Giri, R., Shen, Y. M., Stins, M., Yan, S. D., Schmidt, A. M., Stern, D., … Kalra, V. K. (2000).

β-Amyloid-induced migration of monocytes across human brain endothelial cells involves RAGE and PECAM-1. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *279*(6), C1772–C1781.

Gonullu, Y. E., Aslan, M., Karadas, S., Kati, C., Duran, F., Aysel, M. I., & Dem, T. I. (2014). Serum prolidase enzyme activity and oxidative stress levels in patients with acute hemorrhagic stroke. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, *90*(December 2013), 199–205. https://doi.org/10.3109/00365513.2013.873949

Gonzalez-Gugel, E., Saxena, M., & Bhardwaj, N. (2016). Modulation of innate immunity in the tumor microenvironment. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *65*(10), 1261–1268. https://doi.org/10.1007/s00262-016-1859-9

Gordon, G. R. J., Howarth, C., & MacVicar, B. a. (2011). Bidirectional control of arteriole diameter by astrocytes. *Experimental Physiology*, *96*(4), 393–399. https://doi.org/10.1113/expphysiol.2010.053132

Graells, J., Vinyals, A., Figueras, A., Llorens, A., Moreno, A., Marcoval, J., … Fabra, A. (2004). Overproduction of VEGF165 concomitantly expressed with its receptors promotes growth and survival of melanoma cells through MAPK and PI3K signaling. *Journal of Investigative Dermatology*, *123*(6), 1151–1161. https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23460.x

Gril, B., Palmieri, D., Qian, Y., Anwar, T., Liewehr, D. J., Steinberg, S. M., … Vidal-Vanaclocha, F. (2013). Pazopanib inhibits the activation of PDGFRβ-expressing astrocytes in the brain metastatic microenvironment of breast cancer cells. *American Journal of Pathology*, *182*(6), 2368–2379. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.02.043

Gril, B., Paranjape, A. N., Woditschka, S., Hua, E., Dolan, E. L., Hanson, J., … Steeg, P. S. (2018). Reactive astrocytic S1P3 signaling modulates the blood-tumor barrier in brain metastases. *Nature Communications*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-018-05030-w

Gu Y, Dee CM, S. J. (2011). Interaction of free radicals, matrix metalloproteinases and caveolin-1 impacts blood-brain barrier permeability. *Frontiers in Bioscience*, (4), 1216–1231.

Gupta, I. R., & Ryan, A. K. (2010). Claudins: Unlocking the code to tight junction function during embryogenesis and in disease. *Clinical Genetics*, *77*(4), 314–325. https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01397.x

Halford, J., Shen, S., Itamura, K., Levine, J., Chong, A. C., Czerwieniec, G., … Wanner, I.-B. (2017). New astroglial injury-defined biomarkers for neurotrauma assessment. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 0271678X1772468.

https://doi.org/10.1177/0271678X17724681

Hall, C. N., Reynell, C., Gesslein, B., Hamilton, N. B., Mishra, A., Sutherland, B. a, … Attwell, D. (2014). Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*, *508*(7494), 55–60. https://doi.org/10.1038/nature13165

Harik, S. I., Kalaria, R. N., Andersson, L., Lundahl, P., & Perry, G. (1990). Immunocytochemical localization of the erythroid glucose transporter: abundance in tissues with barrier functions. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *10*(12), 3862–3872. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2269888

Harrell, J. C., Prat, A., Parker, J. S., Fan, C., He, X., Carey, L., … Perou, C. M. (2012). Genomic analysis identifies unique signatures predictive of brain, lung, and liver relapse. *Breast Cancer Research and Treatment*, *132*(2), 523–535. https://doi.org/10.1007/s10549-011-1619-7

Hartz, A. M. S., Bauer, B., Fricker, G., & Miller, D. S. (2004). Rapid regulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier by endothelin-1. *Molecular Pharmacology*, *66*(3), 387–394. https://doi.org/10.1124/mol.104.001503

Haseloff, R. F., Blasig, I. E., Bauer, H. C., & Bauer, H. (2005). In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *25*(1), 25–39.

Heinen, M. C., Babler, A., Weis, J., Elsas, J., Nolte, K., Kipp, M., … Ha, M. (2018). Fetuin-A protein distribution in mature inflamed and ischemic brain tissue. *PLoS ONE*, *13*(11), 1–17.

Hickey, W. F., & Kimura, H. (1988). Perivascular Microglial Cells of the CNS Are Bone Marrow-Derived and Present Antigen in Vivo. *Science*, *239*(4837), 290–292. https://doi.org/10.1126/science.3276004

Hollestelle, A., Nagel, J. H. A., Smid, M., Lam, S., Elstrodt, F., Wasielewski, M., … Schutte, M. (2010). Distinct gene mutation profiles among luminal-type and basal-type breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment*, *121*(1), 53–64. https://doi.org/10.1007/s10549-009-0460-8

Hu, G., Chong, R. A., Yang, Q., Wei, Y., Blanco, M. A., Reiss, M., … Kang, Y. (2009). MTDH activation by 8q22 genomic gain promotes chemoresistance and metastasis of poor-prognosis breast cancer. *Cancer*, *15*(1), 9–20. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.11.013.MTDH

Huang, C. F., Li, G., Ma, R., Sun, S. G., & Chen, J. G. (2008). Thrombin-induced microglial

activation contributes to the degeneration of nigral dopaminergic neurons in vivo. *Neuroscience Bulletin*, *24*(2), 66–72. https://doi.org/10.1007/s12264-008-0066-x

Hudson, L. C., Bragg, D. C., Tompkins, M. B., & Meeker, R. B. (2005). Astrocytes and microglia differentially regulate trafficking of lymphocyte subsets across brain endothelial cells. *Brain Research*, *1058*(1–2), 148–160. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.07.071

Iguchi-manaka, A., Okumura, G., Kojima, H., Cho, Y., & Hirochika, R. (2016). Increased Soluble CD155 in the Serum of Cancer Patients. *PLoS ONE*, *1*, 1–12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152982

Inoue, K., Oliveira, L. M. A., Abeliovich, A., & Biology, C. (2017). CRISPR Transcriptional Activation Analysis Unmasks an Occult γ-Secretase Processivity Defect in Familial Alzheimer's Disease Skin Fibroblasts. *Cell Reports*, *21*(7), 1727–1736. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.075.CRISPR

Janzer, R. C., & Raff, M. C. (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*. https://doi.org/10.1038/325253a0

Jeon, J. S., Bersini, S., Gilardi, M., Dubini, G., Charest, J. L., Moretti, M., & Kamm, R. D. (2014). Human 3D vascularized organotypic microfluidic assays to study breast cancer cell extravasation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(1), 214–219. https://doi.org/10.1073/pnas.1417115112

Jia, L., Chopp, M., Wang, L., Lu, X., Zhang, Y., Szalad, A., … Hospital, X. (2018). MiR-34a Regulates Axonal Growth of Dorsal Root Ganglia Neurons by Targeting FOXP2 and VAT1 in Postnatal and Adult Mouse. *Mol Neurobiol.*, *55*(12), 9089–9099. https://doi.org/10.1007/s12035-018-1047-3.MiR-34a

Jia, W., Lu, R., Martin, T. a., & Jiang, W. G. (2014). The role of claudin-5 in blood-brain barrier (BBB) and brain metastases (Review). *Molecular Medicine Reports*, *9*(3), 779–785. https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1875

Jiang, Z., Wang, X., Li, J., Yang, H., & Lin, X. (2018). Aldolase A as a prognostic factor and mediator of progression via inducing epithelial–mesenchymal transition in gastric cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *22*(9), 4377–4386. https://doi.org/10.1111/jcmm.13732

Jones, S. E. (2008). Metastatic breast cancer: the treatment challenge. *Clinical Breast Cancer*, *8*(3), 224–233. https://doi.org/10.3816/CBC.2008.n.025

Junya, T., Kira, M., & Sobue, K. (1993). Gelsolin is localized in neuronal growth cones. *Developmental Biology Research*, (76), 268–271.

Kacem, K., Lacombe, P., Seylaz, J., & Bonvento, G. (1998). Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia*, *23*(1), 1–10.

Kawada, M., Inoue, H., Ohba, S. I., Yoshida, J., Masuda, T., Yamasaki, M., … Nomoto, A. (2015). Stromal cells positively and negatively modulate the growth of cancer cells: Stimulation via the PGE2-TNFα-IL-6 pathway and inhibition via secreted GAPDH-E-cadherin interaction. *PLoS ONE*, *10*(3), 1–26. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119415

Keaney, J., & Campbell, M. (2015). The dynamic blood-brain barrier. *FEBS Journal*, *282*(21), 4067–4079. https://doi.org/10.1111/febs.13412

Kienast, Y., von Baumgarten, L., Fuhrmann, M., Klinkert, W. E. F., Goldbrunner, R., Herms, J., & Winkler, F. (2010). Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nature Medicine*, *16*(1), 116–122. https://doi.org/10.1038/nm.2072

Kim, H., Li, Q., Hempstead, B. L., & Madri, J. A. (2004). Paracrine and autocrine functions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain-derived endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(32), 33538–33546. https://doi.org/10.1074/jbc.M404115200

Kim, J. C., Ha, Y. J., Tak, K. H., Roh, S. A., Kwon, Y. H., Kim, C. W., … Kim, Y. S. (2018). Opposite functions of GSN and OAS2 on colorectal cancer metastasis, mediating perineural and lymphovascular invasion, respectively. *PLoS ONE*, *13*(8), 1–16. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202856

Kim, J. T., Kim, K. D., Song, E. Y., Lee, H. G., Kim, J. W., Kim, J. W., … Lim, J. S. (2006). Apoptosis-inducing factor (AIF) inhibits protein synthesis by interacting with the eukaryotic translation initiation factor 3 subunit p44 (eIF3g). *FEBS Letters*, *580*(27), 6375–6383. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.049

Kim, S.-J., Kim, J.-S., Park, E. S., Lee, J.-S., Lin, Q., Langley, R. R., … Fidler, I. J. (2011a). Astrocytes upregulate survival genes in tumor cells and induce protection from chemotherapy. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, *13*(3), 286–298. https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM10-3428

Kim, S.-J., Kim, J.-S., Park, E. S., Lee, J.-S., Lin, Q., Langley, R. R., … Fidler, I. J. (2011b). Astrocytes upregulate survival genes in tumor cells and induce protection from chemotherapy. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, *13*(3), 286–298. https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM10-3428

Kondziolka, D., Kalkanis, S. N., Mehta, M. P., Ahluwalia, M., & Loeffler, J. S. (2014). It is

time to reevaluate the management of patients with brain metastases. *Neurosurgery*, *75*(1), 1–9. https://doi.org/10.1227/NEU.0000000000000354

Kuchler-Bopp, S., Delaunoy, J. P., Artault, J. C., Zaepfel, M., & Dietrich, J. B. (1999). Astrocytes induce several blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells. *Neuroreport*, *10*(6), 1347–1353.

Kwiatkowski, D. J. (1988). Predominant Induction of Gelsolin and Actin-binding Protein during Myeloid Differentiation *. *The Journal of Biological Chemistry*, *263*(27), 13857–1386.

Lacroix, M., & Leclercq, G. (2004). Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Research and Treatment*, *83*(3), 249–289. https://doi.org/10.1023/B:BREA.0000014042.54925.cc

Lane, N. J., Reese, T. S., & Kachar, B. (1992). Structural domains of the tight junctional intramembrane fibrils. *Tissue and Cell*, *24*(2), 291–300. https://doi.org/10.1016/0040-8166(92)90102-D

Langley, R. R., Carlisle, R., Specian, R. D., Gerritsen, M. E., & Granger, D. N. (2001). Endothelial Expression of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Correlates with Metastatic Pattern in Spontaneous Melanoma. *Microcirculation*, *8*(5), 335–345. https://doi.org/10.1111/j.1549-8719.2001.tb00180.x

Langley, R. R., & Fidler, I. J. (2013). The biology of brain metastasis. *Clinical Chemistry*, *59*(1), 180–189. https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.193342

Lecht, S., Arien-Zakay, H., Kohan, M., Lelkes, P. I., & Lazarovici, P. (2010). Angiostatic effects of K252a, a Trk inhibitor, in murine brain capillary endothelial cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *339*(1–2), 201–213. https://doi.org/10.1007/s11010-010-0386-9

Lee, S. H., Jeong, D., Han, Y.-S., & Baek, M. J. (2015). Pivotal role of vascular endothelial growth factor pathway in tumor angiogenesis. *Annals of Surgical Treatment and Research*, *89*, 1–8. https://doi.org/10.4174/astr.2015.89.1.1

Lee, T.-H., Avraham, H. K., Jiang, S., & Avraham, S. (2003). Vascular endothelial growth factor modulates the transendothelial migration of MDA-MB-231 breast cancer cells through regulation of brain microvascular endothelial cell permeability. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(7), 5277–5284. https://doi.org/10.1074/jbc.M210063200

Lee, W. M. (1992). The Extracellular Actin-Scavenger System and Actin Toxitcity. *The New England Journal of Medicine*, *326*(20), 1335–1341.

Lesniak, M. S., & Brem, H. (2004). Targeted therapy for brain tumours. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *3*(6), 499–508. https://doi.org/10.1038/nrd1414

Li, B., Wang, C., Zhang, Y., Zhao, X. Y., Huang, B., Wu, P. F., ... Chen, Y. H. (2012). Elevated PLGF contributes to small-cell lung cancer brain metastasis. *Oncogene*, (January 2012), 2952–2962. https://doi.org/10.1038/onc.2012.313

Li, Y., Dammer, E. B., Zhang-Brotzge, X., Chen, S., Duong, D. M., Seyfried, N. T., ... Sun, Y.-Y. (2017). Osteopontin Is a Blood Biomarker for Microglial Activation and Brain Injury in Experimental Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Eneuro*, *4*(1), 1–8. https://doi.org/10.1523/ENEURO.0253-16.2016

Li, Y., Zhang, Q., Chen, Z., He, Z., & Yi, G. (2015). Oxidized low-density lipoprotein attenuated desmoglein 1 and desmocollin 2 expression via LOX-1/Ca(2+)/PKC-β signal in human umbilical vein endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.079

Liebner, S., Fischmann, A., Rascher, G., Duffner, F., Grote, E. H., Kalbacher, H., & Wolburg, H. (2000). Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathologica*, *100*(3), 323–331.

Lin, N. U., Amiri-Kordestani, L., Palmieri, D., Liewehr, D. J., & Steeg, P. S. (2013). CNS metastases in breast cancer: Old challenge, new frontiers. *Clinical Cancer Research*, *19*(23), 6404–6418. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0790

Lin, Q., Balasubramanian, K., Fan, D., Kim, S.-J., Guo, L., Wang, H., ... Fidler, I. J. (2010). Reactive Astrocytes Protect Melanoma ells from Chemotherapy by Sequestering Intracellular Calcium through Gap Junction Communication Channels. *Neoplasia*, *12*(9), 748–754. https://doi.org/10.1593/neo.10602

Lippoldt, a, Kniesel, U., Liebner, S., Kalbacher, H., Kirsch, T., Wolburg, H., & Haller, H. (2000). Structural alterations of tight junctions are associated with loss of polarity in stroke-prone spontaneously hypertensive rat blood-brain barrier endothelial cells. *Brain Research*, *885*, 251–261. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02954-1

Liu, Y., Komohara, Y., Domenick, N., Ohno, M., Ikeura, M., Hamilton, R. L., ... Okada, H. (2012). Expression of antigen processing and presenting molecules in brain metastasis of breast cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *61*(6), 789–801. https://doi.org/10.1007/s00262-011-1137-9

Liu, Y., Kosaka, A., Ikeura, M., Kohanbash, G., Fellows-Mayle, W., Snyder, L. A., & Okada, H. (2013). Premetastatic soil and prevention of breast cancer brain metastasis. *Neuro-Oncology*, *15*(7), 891–903. https://doi.org/10.1093/neuonc/not031

Llombart, V., García-Berrocoso, T., Bech-Serra, J. J., Simats, A., Bustamante, A., Giralt, D.,

… Montaner, J. (2016). Characterization of secretomes from a human blood brain barrier endothelial cells in-vitro model after ischemia by stable isotope labeling with aminoacids in cell culture (SILAC). *Journal of Proteomics*, *133*, 100–112. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.12.011

Lorger, M. (2012). Tumor microenvironment in the brain. *Cancers*, *4*(4), 218–243. https://doi.org/10.3390/cancers4010218

Lorger, M., & Felding-Habermann, B. (2010). Capturing changes in the brain microenvironment during initial steps of breast cancer brain metastasis. *The American Journal of Pathology*, *176*(6), 2958–2971. https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090838

Louie, E., Chen, X. F., Coomes, A., Ji, K., Tsirka, S., & Chen, E. I. (2013). Neurotrophin-3 modulates breast cancer cells and the microenvironment to promote the growth of breast cancer brain metastasis. *Oncogene*, *32*(35), 4064–4077. https://doi.org/10.1038/onc.2012.417

Lu, X., Wang, Z., Cai, Y., Huang, J., Zhu, L., Yang, Q., & Chen, C. (2014). [Construction and identification of anti-HER2 phage display single chain fragment of variable region library in human breast cancer]. *Zhejiang da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Zhejiang University. Medical sciences*, *43*(4), 434–440.

Ludwig, R. J., Zollner, T. M., Santoso, S., Hardt, K., Gille, J., Baatz, H., … Podda, M. (2005). Junctional adhesion molecules (JAM)-B and -C contribute to leukocyte extravasation to the skin and mediate cutaneous inflammation. *Journal of Investigative Dermatology*, *125*(5), 969–976. https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23912.x

Luissint, A.-C., Artus, C., Glacial, F., Ganeshamoorthy, K., & Couraud, P.-O. (2012). Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids and Barriers of the CNS*, *9*(1), 23. https://doi.org/10.1186/2045-8118-9-23

Luo, N., Li, H., Xiang, B., Qiao, L., He, J., Ji, Y., … Li, S. (2016). Syndecan-4 modulates the proliferation of neural cells and the formation of CaP axons during zebrafish embryonic neurogenesis. *Scientific Reports*, (June 2015), 1–12. https://doi.org/10.1038/srep25300

Luzzi, K. J., MacDonald, I. C., Schmidt, E. E., Kerkvliet, N., Morris, V. L., Chambers, a F., & Groom, a C. (1998). Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *The American Journal of Pathology*, *153*(3), 865–873. https://doi.org/10.1016/S0002-

9440(10)65628-3

Majesky, M. W. (2007). Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *27*(6), 1248–1258. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.141069

Marchetti, D., Li, J., & Shen, R. (2000). Astrocytes Contribute to the Brain-metastatic Specificity of Melanoma Cells by Producing Heparanase Advances in Brief Astrocytes Contribute to the Brain-metastatic Specificity of Melanoma Cells by, 4767–4770.

Massagué, J. (2014). Metastatic Stem Cells: Sources, Niches, and Vital Pathways. *Cell Stem Cell*, *29*(6), 997–1003. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted

Matsuwaki, T., Asakura, R., Suzuki, M., & Yamanouchi, K. (2011). Age-Dependent Changes in Progranulin Expression in the Mouse Brain. *Journal of Reproducion and Development*, *57*(1), 113–119.

McCormack, P. L. (2013). Pertuzumab: A review of its use for first-line combination treatment of her2-positive metastatic breast cancer. *Drugs*, *73*(13), 1491–1502. https://doi.org/10.1007/s40265-013-0109-0

Mego, M., Mani, S. a, & Cristofanilli, M. (2010). Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer--clinical applications. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, *7*(12), 693–701. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.171

Melisko, M. E., Glantz, M., & Rugo, H. S. (2009). New challenges and opportunities in the management of brain metastases in patients with ErbB2-positive metastatic breast cancer. *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, *6*(1), 25–33. https://doi.org/10.1038/ncponc1243

Menter, D. G., Herrmann, J. L., & Nicolson, G. L. (1995). The role of trophic factors and autocrine/paracrine growth factors in brain metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis*, *13*(2), 67–88.

Michelle B. Chen, Jordan A. Whisler, Jessie S. Jeon, R. D. K. (2013). Mechanisms of tumor cell extravasation in an in vitro microvascular network platform. *Integr Biol (Camb)*, *72*(2), 181–204. https://doi.org/10.1038/nature13314.A

Miljkovic-Licina, M., Hammel, P., Garrido-Urbani, S., Lee, B. P.-L., Meguenani, M., Chaabane, C., … Imhof, B. A. (2012). Targeting Olfactomedin-like 3 Inhibits Tumor Growth by Impairing Angiogenesis and Pericyte Coverage. *Molecular Cancer Therapeutics*, *11*(12), 2588–2599. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-0245

Minshall, R. D., Sessa, W. C., Stan, R. V, Anderson, R. G. W., & Malik, A. B. (2003). Caveolin regulation of endothelial function. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, *285*(6), L1179-83.

https://doi.org/10.1152/ajplung.00242.2003

Moja, L., Brambilla, C., Compagnoni, A., & Pistotti, V. (2006). Trastuzumab containing regimens for early breast cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (4). https://doi.org/10.1002/14651858.CD006243

Molon, B., & Viola, A. (2016). T Cells and Cancer : How Metabolism Shapes immunity. *Frontiers in Immunology*, *7*(February), 1–7. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00020

Moreno□, M. L., Escobar, J., Gil, A., Izquierdo-Álvarez, A., Martínez-Ruíz, A., & Sastre, J. (2012). Disulfide stress as a novel type of oxidative stress in acute inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*, *53*, S39. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.503

Müller, a, Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., … Zlotnik, a. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, *410*(6824), 50–56. https://doi.org/10.1038/35065016

Muynck, L. De, Herdewyn, S., Beel, S., Scheveneels, W., Bosch, L. Van Den, Robberecht, W., & Damme, P. Van. (2013). Neurobiology of Aging The neurotrophic properties of progranulin depend on the granulin E domain but do not require sortilin binding. *Neurobiology of Aging*, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.04.022

Nag, S., Manias, J. L., & Stewart, D. J. (2009). Expression of endothelial phosphorylated caveolin-1 is increased in brain injury. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *35*(4), 417–426. https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2008.01009.x

Nag, S., Venugopalan, R., & Stewart, D. J. (2007). Increased caveolin-1 expression precedes decreased expression of occludin and claudin-5 during blood-brain barrier breakdown. *Acta Neuropathologica*, *114*(5), 459–469. https://doi.org/10.1007/s00401-007-0274-x

Nakano, T., Goto, S., & Tseng, H. (2017). phosphate dehydrogenase (GAPDH) for immunomodulation. *Biofactors*, (March), 1–12. https://doi.org/10.1002/biof.1379

Nathoo, N., Chahlavi, a, Barnett, G. H., & Toms, S. a. (2005). Pathobiology of brain metastases. *Journal of Clinical Pathology*, *58*(3), 237–242. https://doi.org/10.1136/jcp.2003.013623

Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Frederick, L., Fevr, T., … Berkeley, L. (2009). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally. *Cancer Cell*, *10*(6), 515–527. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.008.A

Nicolson, G. L., & Menter, D. G. (1995). Trophic factors and central nervous system metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, *14*(4), 303–321.

Nieswandt, B., Hafner, M., Echtenacher, B., & Männel, D. N. (1999). Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Research*, *59*(6), 1295–1300.

Nissou, M. F., El Atifi, M., Guttin, A., Godfraind, C., Salon, C., Garcion, E., … Wion, D. (2013). Hypoxia-induced expression of VE-cadherin and filamin B in glioma cell cultures and pseudopalisade structures. *Journal of Neuro-Oncology*, *113*(2), 239–249. https://doi.org/10.1007/s11060-013-1124-4

Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., … Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *Journal of Cell Biology*, *161*(3), 653–660. https://doi.org/10.1083/jcb.200302070

Noda, M., Yamakawa, Y., Matsunaga, N., Naoe, S., Jodoi, T., Yamafuji, M., … Iguchi, H. (2013). IL-6 receptor is a possible target against growth of metastasized lung tumor cells in the brain. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(1), 515–526. https://doi.org/10.3390/ijms14010515

O'Sullivan, C. C., Davarpanah, N. N., Abraham, J., & Bates, S. E. (2017). Current challenges in the management of breast cancer brain metastases. *Seminars in Oncology*, *44*(2), 85–100. https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2017.06.006

Ochieng, J., Nangami, G., Sakwe, A., Moye, C., Alvarez, J., Whalen, D., … Lammers, P. (2018). Impact of fetuin-A (AHSG) on tumor progression and type 2 diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(8). https://doi.org/10.3390/ijms19082211

Old, W. M., Meyer-Arendt, K., Aveline-wolf, L., Pierce, K. G., Mendoza, A., Sevinsky, J. R., … Ahn, N. G. (2005). Comparison of Label-free Methods for Quantifying Human Proteins by Shotgun Proteomics * □. *Molecular & Cellular Proteomics*, *4*(10), 1487–1502. https://doi.org/10.1074/mcp.M500084-MCP200

Omuro, A. M. P., & Abrey, L. E. (2004). Brain metastases. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, *4*(3), 205–210. Retrieved from http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-3042676120&partnerID=40&md5=da4e079b1508c5a75eef553597e8b244

Osborn, T. M., Dahlgren, C., Hartwig, J. H., & Stossel, T. P. (2019). Modifications of cellular responses to lysophosphatidic acid and platelet-activating factor by plasma gelsolin. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *02115*, 1323–1330. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00510.2006.

Overmiller, A. M., Pierluissi, J. A., Wermuth, P. J., Sauma, S., Martinez-Outschoorn, U., Tuluc, M., … Mahoney, M. G. (2017). Desmoglein 2 modulates extracellular vesicle

release from squamous cell carcinoma keratinocytes. *FASEB Journal*, *31*(8), 3412–3424. https://doi.org/10.1096/fj.201601138RR

Paget, S. (1989). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Reviews*, *8*(2), 98–101.

Palmieri, D., Bronder, J. L., Herring, J. M., Yoneda, T., Weil, R. J., Stark, A. M., … Steeg, P. S. (2007). Her-2 Overexpression Increases the Metastatic Outgrowth of Breast Cancer Cells in the Brain. *Cancer Research*, *67*(9), 4190–4198. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3316

Pardridge, W. M. (2002). Drug and Gene Targeting To the Brain With Molecular Trojan Horses. *Nature Reviews Drug Discovery*, *1*(2), 131–139. https://doi.org/10.1038/nrd725

Paspalas, C. D., & Papadopoulos, G. C. (1996). Ultrastructural relationships between noradrenergic nerve fibers and non-neuronal elements in the rat cerebral cortex. *Glia*, *17*(2), 133–146. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199606)17:2<133::AID-GLIA5>3.0.CO;2-3

Pei, W., Tanaka, K., Huang, S. C., Xu, L., Liu, B., Sinclair, J., … Burgess, S. M. (2016). Extracellular HSP60 triggers tissue regeneration and wound healing by regulating inflammation and cell proliferation. *Npj Regenerative Medicine*, *1*(1), 16013. https://doi.org/10.1038/npjregenmed.2016.13

Pérez-Mato, M., Sobrino, T., Blanco, M., Ruban, A., Mirelman, D., Menendez, P., … Campos, F. (2014). Human recombinant glutamate oxaloacetate transaminase 1 (GOT1) supplemented with oxaloacetate induces a protective effect after cerebral ischemia. *Cell Death and Disease*, *5*, 1–9. https://doi.org/10.1038/cddis.2013.507

Peron, R., Vatanabe, I. P., Manzine, P. R., Camins, A., & Cominetti, R. (2018). Alpha-Secretase ADAM10 Regulation : Insights into Alzheimer ' s Disease Treatment. *Pharmaceuticals*, 1–19. https://doi.org/10.3390/ph11010012

Persidsky, Y., Heilman, D., Haorah, J., Zelivyanskaya, M., Persidsky, R., Weber, G. A., … Ikezu, T. (2006). Rho-mediated regulation of tight junctions during monocyte migration across the blood-brain barrier in HIV-1 encephalitis (HIVE). *Blood*, *107*(12), 4770–4780. https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-4721

Pietras, K., & Östman, A. (2010). Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma. *Experimental Cell Research*, *316*(8), 1324–1331. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.045

Polfliet, M. M., Zwijnenburg, P. J., van Furth, a M., van der Poll, T., Döpp, E. a, Renardel de Lavalette, C., … van den Berg, T. K. (2001). Meningeal and perivascular

macrophages of the central nervous system play a protective role during bacterial meningitis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *167*, 4644–4650. https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.8.4644

Prat, A., Parker, J. S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J. I., … Perou, C. M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research : BCR*, *12*(5), R68. https://doi.org/10.1186/bcr2635

Price, D. J., Miralem, T., Jiang, S., Steinberg, R., & Avraham, H. (2001). Role of Vascular Endothelial Growth Factor in the Stimulation of Cellular Invasion and Signaling of Breast Cancer Cells. *Cell Growth Differentation*, *12*(March), 129–135.

Prudencio, M., Jansen-west, K. R., Lee, W. C., Gendron, T. F., Zhang, Y., & Xu, Y. (2012). Misregulation of human sortilin splicing leads to the generation of a nonfunctional progranulin receptor. *PNAS*, *109*(52), 21510–21515. https://doi.org/10.1073/pnas.1211577110/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1211577110

Pukrop, T., Dehghani, F., Chuang, H. N., Lohaus, R., Bayanga, K., Heermann, S., … Binder, C. (2010). Microglia promote colonization of brain tissue by breast cancer cells in a Wnt-dependent way. *Glia*, *58*(12), 1477–1489. https://doi.org/10.1002/glia.21022

Rahmathulla, G., Toms, S. A., & Weil, R. J. (2012). The Molecular Biology of Brain Metastasis. *Journal of Oncology*, *2012*, 1–16. https://doi.org/10.1155/2012/723541

Rak, J., & Yu, J. L. (2004). Oncogenes and tumor angiogenesis: The question of vascular "supply" and vascular "demand." *Seminars in Cancer Biology*, *14*(2), 93–104. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2003.09.014

Rao, J., Oz, G., & Seaquist, E. (2006). Regulation of cerebral glucose metabolism. *Minerva Endocrinologica*, *31*(May), 149–158. Retrieved from http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=17837263

Regina, A., Demeule, M., Laplante, A., Jodoin, J., Dagenais, C., Berthelet, F., … Beliveau, R. (2001). Multidrug resistance in brain tumors: roles of the blood-brain barrier. *Cancer Metastasis Reviews*, *20*(1–2), 13–25.

Rizzo, V., Morton, C., DePaola, N., Schnitzer, J. E., & Davies, P. F. (2003). Recruitment of endothelial caveolae into mechanotransduction pathways by flow conditioning in vitro. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *285*, H1720–H1729. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00344.2002

Robert S. Kerbel. (2008). Tumor Angiogenesis. *N Engl J Med.*, *358*(19), 2039–2049.

https://doi.org/10.1056/NEJMra0706596.Tumor

Rom, S., Zuluaga-Ramirez, V., Gajghate, S., Seliga, A., Winfield, M., Heldt, N. A., … Persidsky, Y. (2018). Hyperglycemia-Driven Neuroinflammation Compromises BBB Leading to Memory Loss in Both Diabetes Mellitus (DM) Type 1 and Type 2 Mouse Models. *Molecular Neurobiology*, (DM), 1–14. https://doi.org/10.1007/s12035-018-1195-5

Rotstein, M., Chung, W., & De Vivo, D. (2011). Glut1 deficiency: inheritance pattern determined by haploinsufficiency. *Annals of Neurology*, *68*(212), 955–958. https://doi.org/10.1002/ana.22088.Glut1

Sahu, S., Nag, D. S., Swain, A., Samaddar, D. P., & Sanjay Nag, D. (2017). Biochemical changes in the injured brain World Journal of Biological Chemistry. *World J Biol Chem February World J Biol Chem*, *26*(81), 21–31. https://doi.org/10.4331/wjbc.v8.i1.21

Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J. D., Fromm, M., Takano, H., … Tsukita, S. (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Molecular Biology of the Cell*, *11*(12), 4131–4142. https://doi.org/10.1091/mbc.11.12.4131

Sartorius, C. A., Hanna, C. T., Gril, B., Cruz, H., Serkova, N. J., Huber, K. M., … Cittelly, D. M. (2015). Estrogen promotes the brain metastatic colonization of triple negative breast cancer cells via an astrocyte-mediated paracrine mechanism. *Oncogene*, (April), 1–12. https://doi.org/10.1038/onc.2015.353

Saxena, M., & Christofori, G. (2013). Rebuilding cancer metastasis in the mouse. *Molecular Oncology*, *7*(2), 283–296. https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.02.009

Schackert, G., & Fidler, I. J. (1988). Development of in vivo models for studies of brain metastasis. *International Journal of Cancer*, *41*(4), 589–594.

Schulten, H.-J., Bangash, M., Karim, S., Dallol, A., Hussein, D., Merdad, A., … Al-Qahtani, M. H. (2017). Comprehensive molecular biomarker identification in breast cancer brain metastases. *Journal of Translational Medicine*, *15*(1), 269. https://doi.org/10.1186/s12967-017-1370-x

Seike, T., Fujita, K., Yamakawa, Y., Kido, M. A., Takiguchi, S., Teramoto, N., … Noda, M. (2011). Interaction between lung cancer cells and astrocytes via specific inflammatory cytokines in the microenvironment of brain metastasis. *Clinical and Experimental Metastasis*, *28*(1), 13–25. https://doi.org/10.1007/s10585-010-9354-8

Selvais, C., D'Auria, L., Tyteca, D., Perrot, G., Lemoine, P., Troeberg, L., … Emonard, H. (2011). Cell cholesterol modulates metalloproteinase-dependent shedding of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) and clearance function. *FASEB*

Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, *25*(8), 2770–2781. https://doi.org/10.1096/fj.10-169508

Sevrioukova, I. F. (2016). Structure/Function Relations in AIFM1 Variants Associated with Neurodegenerative Disorders. *Journal of Molecular Biology*. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.05.004

Shackleton, B., Crawford, F., & Bachmeier, C. (2016). Inhibition of ADAM10 promotes the clearance of Aβ across the BBB by reducing LRP1 ectodomain shedding. *Fluids and Barriers of the CNS*, 1–9. https://doi.org/10.1186/s12987-016-0038-x

Shepro, D., & Morel, N. M. (1993). Pericyte physiology. *FASEB J.*, (7), 1031–1038.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., & Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, *68*(5), 850–858.

Shimizu, F., Sano, Y., Abe, M. aki, Maeda, T., Ohtsuki, S., Terasaki, T., & Kanda, T. (2011). Peripheral nerve pericytes modify the blood-nerve barrier function and tight junctional molecules through the secretion of various soluble factors. *Journal of Cellular Physiology*, *226*(1), 255–266. https://doi.org/10.1002/jcp.22337

Sierra, A., Price, J. E., Garcia-Ramirez, M., Mendez, O., Lopez, L., & Fabra, A. (1997). Astrocyte-derived cytokines contribute to the metastatic brain specificity of breast cancer cells. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, *77*(4), 357–368.

Silacci, P., Mazzolai, L., Gauci, C., Stergiopulos, N., Yin, H. L., & Hayoz, D. (2004). Cellular and Molecular Life Sciences Gelsolin superfamily proteins : key regulators of cellular. *Cell. Mol. Life Sci.*, *61*, 2614–2623. https://doi.org/10.1007/s00018-004-4225-6

Silver, D. J., Siebzehnrubl, F. A., Schildts, M. J., Yachnis, A. T., Smith, G. M., Smith, A. A., … Steindler, D. A. (2013). Chondroitin sulfate proteoglycans potently inhibit invasion and serve as a central organizer of the brain tumor microenvironment. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *33*(39), 15603–15617. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3004-12.2013

Sims, D. E. (1986). The pericyte-A review. *Tissue and Cell*, *18*(2), 153–174. https://doi.org/10.1016/0040-8166(86)90026-1

Singh, M., Manoranjan, B., Mahendram, S., McFarlane, N., Venugopal, C., & Singh, S. K. (2014). Brain metastasis-initiating cells: Survival of the fittest. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(5), 9117–9133. https://doi.org/10.3390/ijms15059117

Smyth, L. C. D., Rustenhoven, J., Park, T. I. H., Schweder, P., Jansson, D., Heppner, P. A., … Dragunow, M. (2018). Unique and shared inflammatory profiles of human brain

endothelia and pericytes. *Journal of Neuroinflammation*, *15*(1), 1–18. https://doi.org/10.1186/s12974-018-1167-8

Soffietti, R., Ruda, R., & Mutani, R. (2002). Management of brain metastases. *Journal of Neurology*, *249*(10), 1357–1369. https://doi.org/10.1007/s00415-002-0870-6

Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, *119*(1), 7–35. https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8

Sorokin, L. (2010). The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nature Reviews. Immunology*, *10*(10), 712–723. https://doi.org/10.1038/nri2852

Stammet, P. (2017). Blood biomarkers of hypoxic-ischemic brain injury after cardiac arrest. *Seminars in Neurology*, *37*(1), 75–80. https://doi.org/10.1055/s-0036-1593858

Suzuki, H., Fujimoto, M., Kawakita, F., Liu, L., Nakatsuka, Y., Nakano, F., … Shiba, M. (2018). Tenascin - C in brain injuries and edema after subarachnoid hemorrhage : Findings from basic and clinical studies. *Neuroscience Research*, (June), 1–15. https://doi.org/10.1002/jnr.24330

Svokos, K. A., Salhia, B., & Toms, S. A. (2014). Molecular biology of brain metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(6), 9519–9530. https://doi.org/10.3390/ijms15069519

Swaroop, S., Sengupta, N., Suryawanshi, A. R., Adlakha, Y. K., & Basu, A. (2016). HSP60 plays a regulatory role in IL-1 β - induced microglial inflammation via TLR4- p38 MAPK axis. *Journal of Neuroinflammation*, 1–19. https://doi.org/10.1186/s12974-016-0486-x

Tang, W., Lu, Y., Tian, Q., Zhang, Y., Guo, F., Liu, G., … Yu, X. (2011). The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. *Science*, *332*(6028), 478–484. https://doi.org/10.1126/science.1199214.The

Tarassishin, L., Lim, J., Weatherly, D. B., & Angeletti, R. H. (2015). nterleukin-1-induced changes in the glioblastoma secretome suggest its role in tumor progression. *J Proteomics*, *99*, 152–168. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.01.024.Interleukin-1-induced

Termini, J., Neman, J., & Jandial, R. (2014). Role of the neural niche in brain metastatic cancer. *Cancer Research*, *74*(15), 4011–4015. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1226

Valdez, C., Wong, Y. C., Schwake, M., Bu, G., Wszolek, Z. K., & Krainc, D. (2017). Progranulin-mediated deficiency of cathepsin D results in FTD and NCL-like phenotypes in neurons derived from FTD patients. *Human Molecular Genetics*,

26(24), 4861–4872. https://doi.org/10.1093/hmg/ddx364

Villegas, J. C., & Broadwell, R. D. (1993). Transcytosis of protein through the mammalian cerebral epithelium and endothelium. II. Adsorptive transcytosis of WGA-HRP and the blood-brain and brain-blood barriers. *Journal of Neurocytology*, *22*(2), 67–80.

Wang, H., Beyer, I., Persson, J., Song, H., Li, Z., Richter, M., … Rensburg, R. Van. (2012). A New Human DSG2-Transgenic Mouse Model for Studying the Tropism and Pathology of Human Adenoviruses. *Journal of Virology*, *86*(11), 6286–6302. https://doi.org/10.1128/JVI.00205-12

Wang, H., Ramakrishnan, A., Fletcher, S., Prochownik, E. V, & Genetics, M. (2011). Integrin beta4 signaling promotes mammary tumor cell adhesion to brain microvascular endothelium by inducing ErbB2-mediated secretion of VEGF. *Annals of Biomedical Engineering*, *2*(2), 2223–2241. https://doi.org/10.14440/jbm.2015.54.A

Wang, Y., Friedl, W., Sengteller, M., Jungck, M., Filges, I., Propping, P., & Mangold, E. (2002). A modified multiplex PCR assay for detection of large deletions in MSH2 and MLH1. *Human Mutation*, *19*(3), 279–286. https://doi.org/10.1002/humu.10042

Wilhelm, I., Molnár, J., Fazakas, C., Haskó, J., & Krizbai, I. (2013). Role of the Blood-Brain Barrier in the Formation of Brain Metastases. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(1), 1383–1411. https://doi.org/10.3390/ijms14011383

Witzel, I., Oliveira-Ferrer, L., Pantel, K., Müller, V., & Wikman, H. (2016). Breast cancer brain metastases: biology and new clinical perspectives. *Breast Cancer Research*, *18*(1), 8. https://doi.org/10.1186/s13058-015-0665-1

Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Fallier-Becker, P., Noell, S., & Mack, A. F. (2011). *Structure and Functions of Aquaporin-4-Based Orthogonal Arrays of Particles*. *International Review of Cell and Molecular Biology* (1st ed., Vol. 287). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386043-9.00001-3

Wood, E. R. (2004). A Unique Structure for Epidermal Growth Factor Receptor Bound to GW572016 (Lapatinib): Relationships among Protein Conformation, Inhibitor Off-Rate, and Receptor Activity in Tumor Cells. *Cancer Research*, *64*(18), 6652–6659. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1168

X, P., Yinling, C., Yuanyuan, T., Xuhui, T., Jianfeng, W. U., Yan, L. I., & Shuying, D. (2018). Protective effects of P2X7 receptor inhibition in cerebral ischemia / reperfusion injury in rats. *J Cent South Univ (Med Sci)*, *43*(11), 0–2. https://doi.org/10.11817/j.issn.1672-7347.2018.11.001

Xian, Z. Y., Liu, J. M., Chen, Q. K., Chen, H. Z., Ye, C. J., Xue, J., … Kuang, S. J. (2015).

Inhibition of LDHA suppresses tumor progression in prostate cancer. *Tumor Biology*, *36*(10), 8093–8100. https://doi.org/10.1007/s13277-015-3540-x

Xing, F., Kobayashi, A., Okuda, H., Watabe, M., Pai, S. K., Pandey, P. R., … Watabe, K. (2013). Reactive astrocytes promote the metastatic growth of breast cancer stem-like cells by activating Notch signalling in brain. *EMBO Molecular Medicine*, *5*(3), 384–396. https://doi.org/10.1002/emmm.201201623

Yamamoto, M., Ramirez, S. H., Sato, S., Kiyota, T., Cerny, R. L., Kaibuchi, K., … Ikezu, T. (2010). Phosphorylation of Claudin-5 and Occludin by Rho Kinase in Brain Endothelial Cells. *The American Journal of Pathology*, *172*(2), 521–533. https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070076

Yang, Y., Liu, Q., Zhang, H., Zhao, H., & Mao, R. (2017). Silencing of GP73 inhibits invasion and metastasis via suppression of epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports*, *37*, 1182–1188. https://doi.org/10.3892/or.2017.5351

Yang, Y., & Rosenberg, G. A. (2013). Blood–brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. *Stroke*, *42*(11), 3323–3328. https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.608257.Blood-Brain

Yin, X., Wright, J., Wall, T., & Grammas, P. (2010). Brain Endothelial Cells Synthesize Neurotoxic Thrombin in Alzheimer's Disease. *The American Journal of Pathology*, *176*(4), 1600–1606. https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090406

Yins, H. L., Kwiatkowskis, D. J., Moletiij, J. E., & Cole, F. S. (1984). Structure and Biosynthesis of Cytoplasmic and Secreted Variants of Gelsolin. *The Journal of Biological Chemistry*, *25*(2), 5271–5276.

Yu, T., & Di, G. (2017). Role of tumor microenvironment in triple-negative breast cancer and its prognostic significance. *Chinese Journal of Cancer Research*, *29*(3), 237–252. https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2017.03.10

Zhang, T., Ma, Z., Liu, L., Sun, J., Tang, H., Zhang, B., … Li, H. (2018). DDX39 promotes hepatocellular carcinoma growth and metastasis through activating Wnt / β -catenin pathway. *Cell Death and Disease*. https://doi.org/10.1038/s41419-018-0591-0

Zhao, H., Cui, K., Nie, F., Wang, L., Brandl, M. B., Jin, G., … Wong, S. T. C. (2012). The effect of mTOR inhibition alone or combined with MEK inhibitors on brain metastasis: An in vivo analysis in triple-negative breast cancer models. *Breast Cancer Research and Treatment*, *131*(2), 425–436. https://doi.org/10.1007/s10549-011-1420-7

Zhao, J., Xu, T., Wang, F., Cai, W., & Chen, L. (2017). ScienceDirect miR-493-5p suppresses hepatocellular carcinoma cell proliferation through targeting GP73. *Biomedicine et*

Pharmacotherapy, *90*, 744–751. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.029

Zhao, Y., Li, D., Zhao, J., Song, J., & Zhao, Y. (2016). The role of the low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) in regulating blood-brain barrier integrity. *Reviews in the Neurosciences*, *27*(6), 623–634. https://doi.org/10.1515/revneuro-2015-0069

Zhou, C., Chao, F., Zhang, Y., & Jiang, L. (2018). Fluoxetine delays the cognitive function decline and synaptic changes in a transgenic mouse model of early Alzheimer's disease. *Journal of Comparative Neurology*. https://doi.org/10.1002/cne.24616

Zhou, Y., Cai, W., Zhao, Z., Hilton, T., Wang, M., Yeon, J., … Li, M. (2017). Lactadherin Promotes Microvesicle Clearance to Prevent Coagulopathy and Improves Survival of Severe TBI Mice †. *Blood Journal*. https://doi.org/10.1182/blood-2017-08-801738

Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, *7*(1), 41–53. https://doi.org/10.1038/nrn1824

Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., Tetzlaff, W., & Rossi, F. M. V. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nature Neuroscience*, *10*(12), 1538–1543. https://doi.org/10.1038/nn2014

Alonso, R., Pisa, D., Marina, A. I., Morato, E., Rábano, A., Rodal, I., & Carrasco, L. (2015). Evidence for fungal infection in cerebrospinal fluid and brain tissue from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *International Journal of Biological Sciences*, *11*(5), 546–558. https://doi.org/10.7150/ijbs.11084

Anderson, M. a, Ao, Y., & Sofroniew, M. V. (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes Mark. *Neuroscience Letters*, 23–29. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.030.Heterogeneity

Ansa-Addo, E. A., Zhang, Y., Yang, Y., Hussey, G. S., Howley, B. V., Salem, M., … Li, Z. (2017). Membrane-organizing protein moesin controls Treg differentiation and antitumor immunity via TGF-? signaling. *Journal of Clinical Investigation*, *127*(4), 1321–1337. https://doi.org/10.1172/JCI89281

Armulik, A., Abramsson, A., & Betsholtz, C. (2005). Endothelial/pericyte interactions. *Circulation Research*, *97*(6), 512–523. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7

Armulik, A., Genové, G., & Betsholtz, C. (2011). Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Developmental Cell*, *21*(2), 193–215. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.001

Babicki, S., Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., Grant, J. R., Maciejewski, A., & Wishart, D. S.

(2016). Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Research*, *44*(W1), W147–W153. https://doi.org/10.1093/nar/gkw419

Baello, S., Iqbal, M., Gibb, W., & Matthews, S. G. (2016). Astrocyte-mediated regulation of multidrug resistance P-glycoprotein in fetal and neonatal brain endothelial cells : age-dependent effects. *Physiological Reports*, *4*, 1–17. https://doi.org/10.14814/phy2.12853

Balduzzi, S., Mantarro, S., Guarneri, V., Tagliabue, L., Pistotti, V., Moja, L., & Amico, D. R. (2014). Trastuzumab-containing regimens formetastatic breast cancer (Review). *The Cochrane Library*, (6).

Bano, D., & Prehn, J. H. M. (2018). EBioMedicine Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease : The Tale of a Repented Natural Born Killer. *EBioMedicine*, *30*, 29–37. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.03.016

Bearer, E. L., Orci, L., & Sors, P. (1985). Endothelial Fenestral Diaphragms : A Quick-Freeze , Deep-Etch Study. *The Journal of Cell Biology*, *100*(February), 418–428. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2113429&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Beel, S., Moisse, M., Damme, M., Muynck, L. De, Robberecht, W., Bosch, L. Van Den, … Damme, P. Van. (2017). Progranulin functions as a cathepsin D chaperone to stimulate axonal outgrowth in vivo. *Human Molecular Genetics*, *26*(15), 2850–2863. https://doi.org/10.1093/hmg/ddx162

Berezowski, V., Landry, C., & Dehouck, M. (2004). Contribution of glial cells and pericytes to the mRNA profiles of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in an in vitro model of the blood – brain barrier. *Brain Research*, *1018*, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.05.092

Berghoff, A. S., Preusser, M., A.S., B., & M., P. (2013). Biology in prevention and treatment of brain metastases. *Expert Review of Anticancer Therapy*, *13*(11), 1339–1348. https://doi.org/10.1586/14737140.2013.852067

Berghuis, A., Koffijberg, H., Prakash, J., Terstappen, L., & IJzerman, M. (2017). Detecting Blood-Based Biomarkers in Metastatic Breast Cancer: A Systematic Review of Their Current Status and Clinical Utility. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(2), 363. https://doi.org/10.3390/ijms18020363

Bhowminck, N., Neilson, E., & Moses, H. (2011). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Inflammation*, *432*(7015), 332–337. https://doi.org/10.1038/nature03096.Stromal

Binder, C., Chuang, E., Habla, C., Bleckmann, A., Schulz, M., Bathgate, R., & Einspanier, A.

(2014). Relaxins enhance growth of spontaneous murine breast cancers as well as metastatic colonization of the brain. *Clinical and Experimental Metastasis*, *31*(1), 57–65. https://doi.org/10.1007/s10585-013-9609-2

Blanchardie, P., Laboisse, C. L., Lustenberger, P., Racaniello, V. R., & Denis, M. G. (2003). Identification of secreted CD155 isoforms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *309*, 175–182. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01560-2

Bonifazi, M., Franchi, M., Rossi, M., Zambelli, A., Moja, L., Zambon, A., … Negri, E. (2014). Long term survival of HER2-positive early breast cancer treated with trastuzumab-based adjuvant regimen: A large cohort study from clinical practice. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, *23*(5), 2–7. https://doi.org/10.1016/j.breast.2014.05.022

Bos, P. D., Zhang, X. H.-F., Nadal, C., Shu, W., Gomis, R. R., Nguyen, D. X., … Massagué, J. (2009). Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature*, *459*(7249), 1005–1009. https://doi.org/10.1038/nature08021

Boutaud, A., Borza, D. B., Bondar, O., Gunwar, S., Netzer, K. O., Singh, N., … Hudson, B. G. (2000). Type IV collagen of the glomerular basement membrane. Evidence that the chain specificity of network assembly is encoded by the noncollagenous NC1 domains. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(39), 30716–30724. https://doi.org/10.1074/jbc.M004569200

Boyd, N. L., Park, H., Yi, H., Boo, Y. C., Sorescu, G. P., Sykes, M., & Jo, H. (2003). Chronic shear induces caveolae formation and alters ERK and Akt responses in endothelial cells. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *285*(3), H1113-22. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00302.2003

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248–254.

Brightman, M. W., & Reese, T. S. (1969). Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *Journal of Cell Biology*, *40*(3), 648–677. https://doi.org/10.1083/jcb.40.3.648

Busceti, C. L., Menna, L. Di, Bianchi, F., Mastroiacovo, F., Pietro, P. Di, Traficante, A., … Volpe, M. (2018). Dickkopf-3 Causes Neuroprotection by Inducing Vascular Endothelial Growth Factor. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*(September), 1–9. https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00292

Busch, S. A., Horn, K. P., Cuascut, F. X., & Hawthorne, A. L. (2010). Adult NG2+ cells are permissive to neurite outgrowth and stabilize sensory axons during macrophage-

induced axonal dieback after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, *30*(1), 1–27. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3705-09.2010.Adult

Cai, H. Q., Catts, V. S., Webster, M. J., Galletly, C., Liu, D., O'Donnell, M., … Weickert, C. S. (2018). Increased macrophages and changed brain endothelial cell gene expression in the frontal cortex of people with schizophrenia displaying inflammation. *Molecular Psychiatry*. https://doi.org/10.1038/s41380-018-0235-x

Cameron, M. D., Schmidt, E. E., Kerkvliet, N., Nadkarni, K. V, Morris, V. L., Groom, A. C., … MacDonald, I. C. (2000). Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Research*, *60*(9), 2541–2546.

Carbonell, W. S., Ansorga, O., Sibson, N., & Muschel, R. (2009). The vascular basement membrane as "soil" in brain metastasis. *PLoS ONE*, *4*(6). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005857

Cetin, B., Benekli, M., Turker, I., Koral, L., Ulas, A., Dane, F., … Buyukberber, S. (2014). Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer: a multicentre study of Anatolian Society of Medical Oncology (ASMO). *Journal of Chemotherapy (Florence, Italy)*, *26*(5), 300–305. https://doi.org/10.1179/1973947813Y.0000000147

Chaffer, C. L., & Weinberg, R. A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science (New York, N.Y.)*, *331*(6024), 1559–1564. https://doi.org/10.1126/science.1203543

Chaitanya, G. V., Minagar, A., & Alexander, J. S. (2014). Neuronal and astrocytic interactions modulate brain endothelial properties during metabolic stresses of in vitro cerebral ischemia. *Cell Communication and Signaling : CCS*, *12*(1), 7. https://doi.org/10.1186/1478-811X-12-7

Chanmee, T., Ontong, P., Konno, K., & Itano, N. (2014). Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers*, *6*(3), 1670–1690. https://doi.org/10.3390/cancers6031670

Chen, E. I., Hewel, J., Krueger, J. S., Tiraby, C., Weber, M. R., Kralli, A., … Felding-Habermann, B. (2007). Adaptation of energy metabolism in breast cancer brain metastases. *Cancer Research*, *67*(4), 1472–1486. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3137

Chen, L., Wang, H., Yao, H., Guan, T., Wu, F., He, X., … Tao, H. (2013). GP73 is down-regulated in gastric cancer and associated with tumor differentiation. *World Journal of Surgical Oncology*, *11*(1), 1. https://doi.org/10.1186/1477-7819-11-132

Cheng, Y., Pereira, M., Reagan, J. L., Queseneberry, M., Jr, W. C. L., Goldberg, L., …

Quesenberry, P. (2019). Potential biomarkers to detect traumatic brain injury by the profiling of salivary extracellular vesicles. *Journal of Cellular Physiology*, (October 2018), 1–12. https://doi.org/10.1002/jcp.28139

Cohen, Z., Molinatti, G., & Hamel, E. (1997). Astroglial and vascular interactions of noradrenaline terminals in the rat cerebral cortex. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *17*(8), 894–904. https://doi.org/10.1097/00004647-199708000-00008

Conant, K., Daniele, S., Bozzelli, P. L., Abdi, T., Edwards, A., Szklarczyk, A., … Maguire-zeiss, K. (2017). Matrix metalloproteinase activity stimulates N-cadherin shedding and the soluble N- cadherin ectodomain promotes classical microglial activation. *Journal of Neuroinflammation*, 1–12. https://doi.org/10.1186/s12974-017-0827-4

Cornell, B., & Toyo-oka, K. (2017). 14-3-3 Proteins in Brain Development: Neurogenesis, Neuronal Migration and Neuromorphogenesis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *10*(October), 1–17. https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00318

Correale, J., & Villa, A. (2009). Cellular Elements of the Blood-Brain Barrier. *Neurochemical Research*, *34*(12), 2067–2077. https://doi.org/10.1007/s11064-009-0081-y

Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, *420*(6917), 860–867. https://doi.org/10.1038/nature01322

D'Uscio, L. V, He, T., & Santhanam, A. V. (2017). Endothelium-specific amyloid precursor protein deficiency causes endothelial dysfunction in cerebral arteries. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. https://doi.org/10.1177/0271678X17735418

Dalkara, T., & Alarcon-Martinez, L. (2015). Cerebral microvascular pericytes and neurogliovascular signaling in health and disease. *Brain Research*. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.03.047

Daneman, R., & Prat, A. (2015). The Blood – Brain Barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *7*, 1–24. https://doi.org/10.1002/ana.23648

Daneman, R., Zhou, L., Agalliu, D., Cahoy, J. D., Kaushal, A., & Barres, B. a. (2010). The mouse blood-brain barrier transcriptome: A new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PLoS ONE*, *5*(10), 1–16. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013741

De Mattos-Arruda, L., Cortes, J., Santarpia, L., Vivancos, A., Tabernero, J., Reis-Filho, J. S., & Seoane, J. (2013). Circulating tumour cells and cell-free DNA as tools for managing breast cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *10*(7), 377–389. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.80

Delattre, J. Y., Krol, G., Thaler, H. T., & Posner, J. B. (1988). Distribution of brain metastases. *Archives of Neurology*, *45*(7), 741–744.

Deli, M. A., Abraham, C. S., Kataoka, Y., & Niwa, M. (2005). Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: Physiology, pathology, and pharmacology. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *25*(1), 59–127. https://doi.org/10.1007/s10571-004-1377-8

Denkins, Y., Reiland, J., Roy, M., Sinnappah-Kang, N. D., Galjour, J., Murry, B. P., … Marchetti, D. (2004). Brain Metastases in Melanoma: Roles of Neurotrophins. *Neuro-Oncology*, *6*(2), 154–165. https://doi.org/10.1215/S1152

Diaz-Flores, L., Gutierrez, R., Madrid, J. F., Varela, H., Valladares, F., Acosta, E., … Diaz-Flores, L. J. (2009). Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histology and Histopathology*, *24*(7), 909–969.

Dorovini-Zis, K., Prameya, R., & Bowman, P. D. (1991). Culture and characterization of microvascular endothelial cells derived from human brain. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, *64*(3), 425–436.

Drosopoulos, N. E., Walsh, F. S., & Doherty, P. (1999). A Soluble Version of the Receptor-like Protein. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *449*, 441–449.

Eichler, A. F., Chung, E., Kodack, D. P., Loeffler, J. S., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2012). The biology of brain metastases - translation to new therapies. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *8*(6), 344–356. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.58.The

Elsas, J., Sellhaus, B., Herrmann, M., Kinkeldey, A., Weis, J., Jahnen-dechent, W., & Ha, M. (2012). Fetuin-A in the Developing Brain. *Wiley Periodicals, Inc. Develop Neurobiol*, *73*, 354–369. https://doi.org/10.1002/dneu.22064

Escudero-Esparza, A., Jiang, W. G., & Martin, T. A. (2012). Claudin-5 is involved in breast cancer cell motility through the N-WASP and ROCK signalling pathways. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *31*(1), 1. https://doi.org/10.1186/1756-9966-31-43

Eswaran, J., & Knapp, S. (2006). The crystal structure of human receptor protein tyrosine phosphatase k phosphatase domain 1. *Protein Science*, 1500–1505. https://doi.org/10.1110/ps.062128706.members

Fan, J., & Fu, B. M. (2015). Quantification of Malignant Breast Cancer Cell MDA-MB-231 Transmigration Across Brain and Lung Microvascular Endothelium. *Annals of Biomedical Engineering*, 1–13. https://doi.org/10.1007/s10439-015-1517-y

Feng, M. jiang, Ling, F., & Zhengxia, Z. (2013). The Expression and Release of Hsp60 in 6-

OHDA Induced In Vivo and In Vitro Models of Parkinson ' s Disease. *Neurochemical Research*, *38*, 2180–2189. https://doi.org/10.1007/s11064-013-1127-8

Fidler, I. J., Yano, S., Zhang, R.-D., Fujimaki, T., & Bucana, C. D. (2002). The seed and soil hypothesis: vascularisation and brain metastases. *The Lancet. Oncology*, *3*(1), 53–57.

Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S., & Rubinstein, M. (2013). LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *PNAS*, *110*(18), 2–7. https://doi.org/10.1073/pnas.1214441110

Fischer, E. S., Böhm, K., Lydeard, J. R., Yang, H., Stadler, M. B., Cavadini, S., … Thomä, N. H. (2015). GLUT1 reductions exacerbate Alzheimer's disease vasculo-neuronal dysfunction and degeneration. *Nat Neurosci.*, *512*(7512), 49–53. https://doi.org/10.1038/nature13527.Structure

Fomby, P., & Cherlin, A. J. (2011). Central nervous system pericytes in health and disease., *72*(2), 181–204. https://doi.org/10.1038/nature13314.A

Fomby, P., & Cherlin, A. J. (2014). Serpins promote cancer cell survival and vascular co-option in brain metastasis. *Cell*, *156*(5), 1002–1016. https://doi.org/10.1038/nature13314.A

Friedl, P., & Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews. Cancer*, *3*(5), 362–374. https://doi.org/10.1038/nrc1075

Furuse, M. (2010). Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(1), 1–14. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002907

Gaspar, L. E., Mehta, M. P., Patchell, R. A., Burri, S. H., Robinson, P. D., Morris, R. E., … Kalkanis, S. N. (2010). The role of whole brain radiation therapy in the management of newly diagnosed brain metastases: A systematic review and evidence-based clinical practice guideline. *Journal of Neuro-Oncology*, *96*(1), 17–32. https://doi.org/10.1007/s11060-009-0060-9

Gavrilovic, I. T., & Posner, J. B. (2005). Brain metastases: Epidemiology and pathophysiology. *Journal of Neuro-Oncology*, *75*(1), 5–14. https://doi.org/10.1007/s11060-004-8093-6

Gerhardt, H., Wolburg, H., & Redies, C. (2000). N-cadherin mediates pericytic-endothelial interaction during brain angiogenesis in the chicken. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *218*(3), 472–479. https://doi.org/10.1002/1097-0177(200007)218:3<472::AID-DVDY1008>3.0.CO;2-#

Gianni, L., Pienkowski, T., Im, Y. H., Roman, L., Tseng, L. M., Liu, M. C., … Valagussa, P. (2012). Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women

with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): A randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, *13*(1), 25–32. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70336-9

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Mehler, M. F., ... Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, *330*(6005), 841–845. https://doi.org/10.1126/science.1194637.Fate

Giri, R., Shen, Y. M., Stins, M., Yan, S. D., Schmidt, A. M., Stern, D., ... Kalra, V. K. (2000). β-Amyloid-induced migration of monocytes across human brain endothelial cells involves RAGE and PECAM-1. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *279*(6), C1772–C1781.

Gonullu, Y. E., Aslan, M., Karadas, S., Kati, C., Duran, F., Aysel, M. I., & Dem, T. I. (2014). Serum prolidase enzyme activity and oxidative stress levels in patients with acute hemorrhagic stroke. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, *90*(December 2013), 199–205. https://doi.org/10.3109/00365513.2013.873949

Gonzalez-Gugel, E., Saxena, M., & Bhardwaj, N. (2016). Modulation of innate immunity in the tumor microenvironment. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *65*(10), 1261–1268. https://doi.org/10.1007/s00262-016-1859-9

Gordon, G. R. J., Howarth, C., & MacVicar, B. a. (2011). Bidirectional control of arteriole diameter by astrocytes. *Experimental Physiology*, *96*(4), 393–399. https://doi.org/10.1113/expphysiol.2010.053132

Graells, J., Vinyals, A., Figueras, A., Llorens, A., Moreno, A., Marcoval, J., ... Fabra, A. (2004). Overproduction of VEGF165 concomitantly expressed with its receptors promotes growth and survival of melanoma cells through MAPK and PI3K signaling. *Journal of Investigative Dermatology*, *123*(6), 1151–1161. https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23460.x

Gril, B., Palmieri, D., Qian, Y., Anwar, T., Liewehr, D. J., Steinberg, S. M., ... Vidal-Vanaclocha, F. (2013). Pazopanib inhibits the activation of PDGFRβ-expressing astrocytes in the brain metastatic microenvironment of breast cancer cells. *American Journal of Pathology*, *182*(6), 2368–2379. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.02.043

Gril, B., Paranjape, A. N., Woditschka, S., Hua, E., Dolan, E. L., Hanson, J., ... Steeg, P. S. (2018). Reactive astrocytic S1P3 signaling modulates the blood-tumor barrier in brain metastases. *Nature Communications*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-018-05030-w

Gu Y, Dee CM, S. J. (2011). Interaction of free radicals, matrix metalloproteinases and

caveolin-1 impacts blood-brain barrier permeability. *Frontiers in Bioscience*, (4), 1216–1231.

Gupta, I. R., & Ryan, A. K. (2010). Claudins: Unlocking the code to tight junction function during embryogenesis and in disease. *Clinical Genetics*, *77*(4), 314–325. https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01397.x

Halford, J., Shen, S., Itamura, K., Levine, J., Chong, A. C., Czerwieniec, G., … Wanner, I.-B. (2017). New astroglial injury-defined biomarkers for neurotrauma assessment. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 0271678X1772468. https://doi.org/10.1177/0271678X17724681

Hall, C. N., Reynell, C., Gesslein, B., Hamilton, N. B., Mishra, A., Sutherland, B. a, … Attwell, D. (2014). Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*, *508*(7494), 55–60. https://doi.org/10.1038/nature13165

Harik, S. I., Kalaria, R. N., Andersson, L., Lundahl, P., & Perry, G. (1990). Immunocytochemical localization of the erythroid glucose transporter: abundance in tissues with barrier functions. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *10*(12), 3862–3872. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2269888

Harrell, J. C., Prat, A., Parker, J. S., Fan, C., He, X., Carey, L., … Perou, C. M. (2012). Genomic analysis identifies unique signatures predictive of brain, lung, and liver relapse. *Breast Cancer Research and Treatment*, *132*(2), 523–535. https://doi.org/10.1007/s10549-011-1619-7

Hartz, A. M. S., Bauer, B., Fricker, G., & Miller, D. S. (2004). Rapid regulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier by endothelin-1. *Molecular Pharmacology*, *66*(3), 387–394. https://doi.org/10.1124/mol.104.001503

Haseloff, R. F., Blasig, I. E., Bauer, H. C., & Bauer, H. (2005). In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *25*(1), 25–39.

Heinen, M. C., Babler, A., Weis, J., Elsas, J., Nolte, K., Kipp, M., … Ha, M. (2018). Fetuin-A protein distribution in mature inflamed and ischemic brain tissue. *PLoS ONE*, *13*(11), 1–17.

Hickey, W. F., & Kimura, H. (1988). Perivascular Microglial Cells of the CNS Are Bone Marrow-Derived and Present Antigen in Vivo. *Science*, *239*(4837), 290–292. https://doi.org/10.1126/science.3276004

Hollestelle, A., Nagel, J. H. A., Smid, M., Lam, S., Elstrodt, F., Wasielewski, M., … Schutte,

M. (2010). Distinct gene mutation profiles among luminal-type and basal-type breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment*, *121*(1), 53–64. https://doi.org/10.1007/s10549-009-0460-8

Hu, G., Chong, R. A., Yang, Q., Wei, Y., Blanco, M. A., Reiss, M., … Kang, Y. (2009). MTDH activation by 8q22 genomic gain promotes chemoresistance and metastasis of poor-prognosis breast cancer. *Cancer*, *15*(1), 9–20. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.11.013.MTDH

Huang, C. F., Li, G., Ma, R., Sun, S. G., & Chen, J. G. (2008). Thrombin-induced microglial activation contributes to the degeneration of nigral dopaminergic neurons in vivo. *Neuroscience Bulletin*, *24*(2), 66–72. https://doi.org/10.1007/s12264-008-0066-x

Hudson, L. C., Bragg, D. C., Tompkins, M. B., & Meeker, R. B. (2005). Astrocytes and microglia differentially regulate trafficking of lymphocyte subsets across brain endothelial cells. *Brain Research*, *1058*(1–2), 148–160. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.07.071

Iguchi-manaka, A., Okumura, G., Kojima, H., Cho, Y., & Hirochika, R. (2016). Increased Soluble CD155 in the Serum of Cancer Patients. *PLoS ONE*, *1*, 1–12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152982

Inoue, K., Oliveira, L. M. A., Abeliovich, A., & Biology, C. (2017). CRISPR Transcriptional Activation Analysis Unmasks an Occult γ-Secretase Processivity Defect in Familial Alzheimer's Disease Skin Fibroblasts. *Cell Reports*, *21*(7), 1727–1736. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.075.CRISPR

Janzer, R. C., & Raff, M. C. (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*. https://doi.org/10.1038/325253a0

Jeon, J. S., Bersini, S., Gilardi, M., Dubini, G., Charest, J. L., Moretti, M., & Kamm, R. D. (2014). Human 3D vascularized organotypic microfluidic assays to study breast cancer cell extravasation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(1), 214–219. https://doi.org/10.1073/pnas.1417115112

Jia, L., Chopp, M., Wang, L., Lu, X., Zhang, Y., Szalad, A., … Hospital, X. (2018). MiR-34a Regulates Axonal Growth of Dorsal Root Ganglia Neurons by Targeting FOXP2 and VAT1 in Postnatal and Adult Mouse. *Mol Neurobiol.*, *55*(12), 9089–9099. https://doi.org/10.1007/s12035-018-1047-3.MiR-34a

Jia, W., Lu, R., Martin, T. a., & Jiang, W. G. (2014). The role of claudin-5 in blood-brain barrier (BBB) and brain metastases (Review). *Molecular Medicine Reports*, *9*(3), 779–785. https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1875

Jiang, Z., Wang, X., Li, J., Yang, H., & Lin, X. (2018). Aldolase A as a prognostic factor and mediator of progression via inducing epithelial–mesenchymal transition in gastric cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *22*(9), 4377–4386. https://doi.org/10.1111/jcmm.13732

Jones, S. E. (2008). Metastatic breast cancer: the treatment challenge. *Clinical Breast Cancer*, *8*(3), 224–233. https://doi.org/10.3816/CBC.2008.n.025

Junya, T., Kira, M., & Sobue, K. (1993). Gelsolin is localized in neuronal growth cones. *Developmental Biology Research*, (76), 268–271.

Kacem, K., Lacombe, P., Seylaz, J., & Bonvento, G. (1998). Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia*, *23*(1), 1–10.

Kawada, M., Inoue, H., Ohba, S. I., Yoshida, J., Masuda, T., Yamasaki, M., … Nomoto, A. (2015). Stromal cells positively and negatively modulate the growth of cancer cells: Stimulation via the PGE2-TNFα-IL-6 pathway and inhibition via secreted GAPDH-E-cadherin interaction. *PLoS ONE*, *10*(3), 1–26. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119415

Keaney, J., & Campbell, M. (2015). The dynamic blood-brain barrier. *FEBS Journal*, *282*(21), 4067–4079. https://doi.org/10.1111/febs.13412

Kienast, Y., von Baumgarten, L., Fuhrmann, M., Klinkert, W. E. F., Goldbrunner, R., Herms, J., & Winkler, F. (2010). Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nature Medicine*, *16*(1), 116–122. https://doi.org/10.1038/nm.2072

Kim, H., Li, Q., Hempstead, B. L., & Madri, J. A. (2004). Paracrine and autocrine functions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain-derived endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(32), 33538–33546. https://doi.org/10.1074/jbc.M404115200

Kim, J. C., Ha, Y. J., Tak, K. H., Roh, S. A., Kwon, Y. H., Kim, C. W., … Kim, Y. S. (2018). Opposite functions of GSN and OAS2 on colorectal cancer metastasis, mediating perineural and lymphovascular invasion, respectively. *PLoS ONE*, *13*(8), 1–16. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202856

Kim, J. T., Kim, K. D., Song, E. Y., Lee, H. G., Kim, J. W., Kim, J. W., … Lim, J. S. (2006). Apoptosis-inducing factor (AIF) inhibits protein synthesis by interacting with the eukaryotic translation initiation factor 3 subunit p44 (eIF3g). *FEBS Letters*, *580*(27), 6375–6383. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.049

Kim, S.-J., Kim, J.-S., Park, E. S., Lee, J.-S., Lin, Q., Langley, R. R., … Fidler, I. J. (2011a).

Astrocytes upregulate survival genes in tumor cells and induce protection from chemotherapy. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, *13*(3), 286–298. https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM10-3428

Kim, S.-J., Kim, J.-S., Park, E. S., Lee, J.-S., Lin, Q., Langley, R. R., … Fidler, I. J. (2011b). Astrocytes upregulate survival genes in tumor cells and induce protection from chemotherapy. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, *13*(3), 286–298. https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM10-3428

Kondziolka, D., Kalkanis, S. N., Mehta, M. P., Ahluwalia, M., & Loeffler, J. S. (2014). It is time to reevaluate the management of patients with brain metastases. *Neurosurgery*, *75*(1), 1–9. https://doi.org/10.1227/NEU.0000000000000354

Kuchler-Bopp, S., Delaunoy, J. P., Artault, J. C., Zaepfel, M., & Dietrich, J. B. (1999). Astrocytes induce several blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells. *Neuroreport*, *10*(6), 1347–1353.

Kwiatkowski, D. J. (1988). Predominant Induction of Gelsolin and Actin-binding Protein during Myeloid Differentiation *. *The Journal of Biological Chemistry*, *263*(27), 13857–1386.

Lacroix, M., & Leclercq, G. (2004). Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Research and Treatment*, *83*(3), 249–289. https://doi.org/10.1023/B:BREA.0000014042.54925.cc

Lane, N. J., Reese, T. S., & Kachar, B. (1992). Structural domains of the tight junctional intramembrane fibrils. *Tissue and Cell*, *24*(2), 291–300. https://doi.org/10.1016/0040-8166(92)90102-D

Langley, R. R., Carlisle, R., Specian, R. D., Gerritsen, M. E., & Granger, D. N. (2001). Endothelial Expression of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Correlates with Metastatic Pattern in Spontaneous Melanoma. *Microcirculation*, *8*(5), 335–345. https://doi.org/10.1111/j.1549-8719.2001.tb00180.x

Langley, R. R., & Fidler, I. J. (2013). The biology of brain metastasis. *Clinical Chemistry*, *59*(1), 180–189. https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.193342

Lecht, S., Arien-Zakay, H., Kohan, M., Lelkes, P. I., & Lazarovici, P. (2010). Angiostatic effects of K252a, a Trk inhibitor, in murine brain capillary endothelial cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *339*(1–2), 201–213. https://doi.org/10.1007/s11010-010-0386-9

Lee, S. H., Jeong, D., Han, Y.-S., & Baek, M. J. (2015). Pivotal role of vascular endothelial growth factor pathway in tumor angiogenesis. *Annals of Surgical Treatment and Research*, *89*, 1–8. https://doi.org/10.4174/astr.2015.89.1.1

Lee, T.-H., Avraham, H. K., Jiang, S., & Avraham, S. (2003). Vascular endothelial growth factor modulates the transendothelial migration of MDA-MB-231 breast cancer cells through regulation of brain microvascular endothelial cell permeability. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(7), 5277–5284. https://doi.org/10.1074/jbc.M210063200

Lee, W. M. (1992). The Extracellular Actin-Scavenger System and Actin Toxitcity. *The New England Journal of Medicine*, *326*(20), 1335–1341.

Lesniak, M. S., & Brem, H. (2004). Targeted therapy for brain tumours. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *3*(6), 499–508. https://doi.org/10.1038/nrd1414

Li, B., Wang, C., Zhang, Y., Zhao, X. Y., Huang, B., Wu, P. F., … Chen, Y. H. (2012). Elevated PLGF contributes to small-cell lung cancer brain metastasis. *Oncogene*, (January 2012), 2952–2962. https://doi.org/10.1038/onc.2012.313

Li, Y., Dammer, E. B., Zhang-Brotzge, X., Chen, S., Duong, D. M., Seyfried, N. T., … Sun, Y.-Y. (2017). Osteopontin Is a Blood Biomarker for Microglial Activation and Brain Injury in Experimental Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Eneuro*, *4*(1), 1–8. https://doi.org/10.1523/ENEURO.0253-16.2016

Li, Y., Zhang, Q., Chen, Z., He, Z., & Yi, G. (2015). Oxidized low-density lipoprotein attenuated desmoglein 1 and desmocollin 2 expression via LOX-1/Ca(2+)/PKC-β signal in human umbilical vein endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.079

Liebner, S., Fischmann, A., Rascher, G., Duffner, F., Grote, E. H., Kalbacher, H., & Wolburg, H. (2000). Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathologica*, *100*(3), 323–331.

Lin, N. U., Amiri-Kordestani, L., Palmieri, D., Liewehr, D. J., & Steeg, P. S. (2013). CNS metastases in breast cancer: Old challenge, new frontiers. *Clinical Cancer Research*, *19*(23), 6404–6418. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0790

Lin, Q., Balasubramanian, K., Fan, D., Kim, S.-J., Guo, L., Wang, H., … Fidler, I. J. (2010). Reactive Astrocytes Protect Melanoma ells from Chemotherapy by Sequestering Intracellular Calcium through Gap Junction Communication Channels. *Neoplasia*, *12*(9), 748–754. https://doi.org/10.1593/neo.10602

Lippoldt, a, Kniesel, U., Liebner, S., Kalbacher, H., Kirsch, T., Wolburg, H., & Haller, H. (2000). Structural alterations of tight junctions are associated with loss of polarity in stroke-prone spontaneously hypertensive rat blood-brain barrier endothelial cells. *Brain Research*, *885*, 251–261. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02954-1

Liu, Y., Komohara, Y., Domenick, N., Ohno, M., Ikeura, M., Hamilton, R. L., … Okada, H. (2012). Expression of antigen processing and presenting molecules in brain metastasis of breast cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *61*(6), 789–801. https://doi.org/10.1007/s00262-011-1137-9

Liu, Y., Kosaka, A., Ikeura, M., Kohanbash, G., Fellows-Mayle, W., Snyder, L. A., & Okada, H. (2013). Premetastatic soil and prevention of breast cancer brain metastasis. *Neuro-Oncology*, *15*(7), 891–903. https://doi.org/10.1093/neuonc/not031

Llombart, V., García-Berrocoso, T., Bech-Serra, J. J., Simats, A., Bustamante, A., Giralt, D., … Montaner, J. (2016). Characterization of secretomes from a human blood brain barrier endothelial cells in-vitro model after ischemia by stable isotope labeling with aminoacids in cell culture (SILAC). *Journal of Proteomics*, *133*, 100–112. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.12.011

Lorger, M. (2012). Tumor microenvironment in the brain. *Cancers*, *4*(4), 218–243. https://doi.org/10.3390/cancers4010218

Lorger, M., & Felding-Habermann, B. (2010). Capturing changes in the brain microenvironment during initial steps of breast cancer brain metastasis. *The American Journal of Pathology*, *176*(6), 2958–2971. https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090838

Louie, E., Chen, X. F., Coomes, A., Ji, K., Tsirka, S., & Chen, E. I. (2013). Neurotrophin-3 modulates breast cancer cells and the microenvironment to promote the growth of breast cancer brain metastasis. *Oncogene*, *32*(35), 4064–4077. https://doi.org/10.1038/onc.2012.417

Lu, X., Wang, Z., Cai, Y., Huang, J., Zhu, L., Yang, Q., & Chen, C. (2014). [Construction and identification of anti-HER2 phage display single chain fragment of variable region library in human breast cancer]. *Zhejiang da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Zhejiang University. Medical sciences*, *43*(4), 434–440.

Ludwig, R. J., Zollner, T. M., Santoso, S., Hardt, K., Gille, J., Baatz, H., … Podda, M. (2005). Junctional adhesion molecules (JAM)-B and -C contribute to leukocyte extravasation to the skin and mediate cutaneous inflammation. *Journal of Investigative Dermatology*, *125*(5), 969–976. https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23912.x

Luissint, A.-C., Artus, C., Glacial, F., Ganeshamoorthy, K., & Couraud, P.-O. (2012). Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids and Barriers of the CNS*, *9*(1), 23. https://doi.org/10.1186/2045-8118-9-23

Luo, N., Li, H., Xiang, B., Qiao, L., He, J., Ji, Y., ... Li, S. (2016). Syndecan-4 modulates the proliferation of neural cells and the formation of CaP axons during zebrafish embryonic neurogenesis. *Scientific Reports*, (June 2015), 1–12. https://doi.org/10.1038/srep25300

Luzzi, K. J., MacDonald, I. C., Schmidt, E. E., Kerkvliet, N., Morris, V. L., Chambers, a F., & Groom, a C. (1998). Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *The American Journal of Pathology*, *153*(3), 865–873. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65628-3

Majesky, M. W. (2007). Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *27*(6), 1248–1258. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.141069

Marchetti, D., Li, J., & Shen, R. (2000). Astrocytes Contribute to the Brain-metastatic Specificity of Melanoma Cells by Producing Heparanase Advances in Brief Astrocytes Contribute to the Brain-metastatic Specificity of Melanoma Cells by, 4767–4770.

Massagué, J. (2014). Metastatic Stem Cells: Sources, Niches, and Vital Pathways. *Cell Stem Cell*, *29*(6), 997–1003. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted

Matsuwaki, T., Asakura, R., Suzuki, M., & Yamanouchi, K. (2011). Age-Dependent Changes in Progranulin Expression in the Mouse Brain. *Journal of Reproducion and Development*, *57*(1), 113–119.

McCormack, P. L. (2013). Pertuzumab: A review of its use for first-line combination treatment of her2-positive metastatic breast cancer. *Drugs*, *73*(13), 1491–1502. https://doi.org/10.1007/s40265-013-0109-0

Mego, M., Mani, S. a, & Cristofanilli, M. (2010). Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer--clinical applications. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, *7*(12), 693–701. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.171

Melisko, M. E., Glantz, M., & Rugo, H. S. (2009). New challenges and opportunities in the management of brain metastases in patients with ErbB2-positive metastatic breast cancer. *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, *6*(1), 25–33. https://doi.org/10.1038/ncponc1243

Menter, D. G., Herrmann, J. L., & Nicolson, G. L. (1995). The role of trophic factors and autocrine/paracrine growth factors in brain metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis*, *13*(2), 67–88.

Michelle B. Chen, Jordan A. Whisler, Jessie S. Jeon, R. D. K. (2013). Mechanisms of tumor cell extravasation in an in vitro microvascular network platform. *Integr Biol (Camb)*,

72(2), 181–204. https://doi.org/10.1038/nature13314.A

Miljkovic-Licina, M., Hammel, P., Garrido-Urbani, S., Lee, B. P.-L., Meguenani, M., Chaabane, C., … Imhof, B. A. (2012). Targeting Olfactomedin-like 3 Inhibits Tumor Growth by Impairing Angiogenesis and Pericyte Coverage. *Molecular Cancer Therapeutics*, *11*(12), 2588–2599. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-0245

Minshall, R. D., Sessa, W. C., Stan, R. V, Anderson, R. G. W., & Malik, A. B. (2003). Caveolin regulation of endothelial function. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, *285*(6), L1179-83. https://doi.org/10.1152/ajplung.00242.2003

Moja, L., Brambilla, C., Compagnoni, A., & Pistotti, V. (2006). Trastuzumab containing regimens for early breast cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (4). https://doi.org/10.1002/14651858.CD006243

Molon, B., & Viola, A. (2016). T Cells and Cancer : How Metabolism Shapes immunity. *Frontiers in Immunology*, *7*(February), 1–7. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00020

Moreno□, M. L., Escobar, J., Gil, A., Izquierdo-Álvarez, A., Martínez-Ruíz, A., & Sastre, J. (2012). Disulfide stress as a novel type of oxidative stress in acute inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*, *53*, S39. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.503

Müller, a, Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., … Zlotnik, a. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, *410*(6824), 50–56. https://doi.org/10.1038/35065016

Muynck, L. De, Herdewyn, S., Beel, S., Scheveneels, W., Bosch, L. Van Den, Robberecht, W., & Damme, P. Van. (2013). Neurobiology of Aging The neurotrophic properties of progranulin depend on the granulin E domain but do not require sortilin binding. *Neurobiology of Aging*, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.04.022

Nag, S., Manias, J. L., & Stewart, D. J. (2009). Expression of endothelial phosphorylated caveolin-1 is increased in brain injury. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *35*(4), 417–426. https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2008.01009.x

Nag, S., Venugopalan, R., & Stewart, D. J. (2007). Increased caveolin-1 expression precedes decreased expression of occludin and claudin-5 during blood-brain barrier breakdown. *Acta Neuropathologica*, *114*(5), 459–469. https://doi.org/10.1007/s00401-007-0274-x

Nakano, T., Goto, S., & Tseng, H. (2017). phosphate dehydrogenase (GAPDH) for immunomodulation. *Biofactors*, (March), 1–12. https://doi.org/10.1002/biof.1379

Nathoo, N., Chahlavi, a, Barnett, G. H., & Toms, S. a. (2005). Pathobiology of brain metastases. *Journal of Clinical Pathology*, *58*(3), 237–242. https://doi.org/10.1136/jcp.2003.013623

Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Frederick, L., Fevr, T., … Berkeley, L. (2009). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally. *Cancer Cell*, *10*(6), 515–527. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.008.A

Nicolson, G. L., & Menter, D. G. (1995). Trophic factors and central nervous system metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, *14*(4), 303–321.

Nieswandt, B., Hafner, M., Echtenacher, B., & Männel, D. N. (1999). Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Research*, *59*(6), 1295–1300.

Nissou, M. F., El Atifi, M., Guttin, A., Godfraind, C., Salon, C., Garcion, E., … Wion, D. (2013). Hypoxia-induced expression of VE-cadherin and filamin B in glioma cell cultures and pseudopalisade structures. *Journal of Neuro-Oncology*, *113*(2), 239–249. https://doi.org/10.1007/s11060-013-1124-4

Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., … Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *Journal of Cell Biology*, *161*(3), 653–660. https://doi.org/10.1083/jcb.200302070

Noda, M., Yamakawa, Y., Matsunaga, N., Naoe, S., Jodoi, T., Yamafuji, M., … Iguchi, H. (2013). IL-6 receptor is a possible target against growth of metastasized lung tumor cells in the brain. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(1), 515–526. https://doi.org/10.3390/ijms14010515

O'Sullivan, C. C., Davarpanah, N. N., Abraham, J., & Bates, S. E. (2017). Current challenges in the management of breast cancer brain metastases. *Seminars in Oncology*, *44*(2), 85–100. https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2017.06.006

Ochieng, J., Nangami, G., Sakwe, A., Moye, C., Alvarez, J., Whalen, D., … Lammers, P. (2018). Impact of fetuin-A (AHSG) on tumor progression and type 2 diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(8). https://doi.org/10.3390/ijms19082211

Old, W. M., Meyer-Arendt, K., Aveline-wolf, L., Pierce, K. G., Mendoza, A., Sevinsky, J. R., … Ahn, N. G. (2005). Comparison of Label-free Methods for Quantifying Human Proteins by Shotgun Proteomics * □. *Molecular & Cellular Proteomics*, *4*(10), 1487–1502. https://doi.org/10.1074/mcp.M500084-MCP200

Omuro, A. M. P., & Abrey, L. E. (2004). Brain metastases. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, *4*(3), 205–210. Retrieved from

http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-3042676120&partnerID=40&md5=da4e079b1508c5a75eef553597e8b244

Osborn, T. M., Dahlgren, C., Hartwig, J. H., & Stossel, T. P. (2019). Modifications of cellular responses to lysophosphatidic acid and platelet-activating factor by plasma gelsolin. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *02115*, 1323–1330. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00510.2006.

Overmiller, A. M., Pierluissi, J. A., Wermuth, P. J., Sauma, S., Martinez-Outschoorn, U., Tuluc, M., … Mahoney, M. G. (2017). Desmoglein 2 modulates extracellular vesicle release from squamous cell carcinoma keratinocytes. *FASEB Journal*, *31*(8), 3412–3424. https://doi.org/10.1096/fj.201601138RR

Paget, S. (1989). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Reviews*, *8*(2), 98–101.

Palmieri, D., Bronder, J. L., Herring, J. M., Yoneda, T., Weil, R. J., Stark, A. M., … Steeg, P. S. (2007). Her-2 Overexpression Increases the Metastatic Outgrowth of Breast Cancer Cells in the Brain. *Cancer Research*, *67*(9), 4190–4198. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3316

Pardridge, W. M. (2002). Drug and Gene Targeting To the Brain With Molecular Trojan Horses. *Nature Reviews Drug Discovery*, *1*(2), 131–139. https://doi.org/10.1038/nrd725

Paspalas, C. D., & Papadopoulos, G. C. (1996). Ultrastructural relationships between noradrenergic nerve fibers and non-neuronal elements in the rat cerebral cortex. *Glia*, *17*(2), 133–146. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199606)17:2<133::AID-GLIA5>3.0.CO;2-3

Pei, W., Tanaka, K., Huang, S. C., Xu, L., Liu, B., Sinclair, J., … Burgess, S. M. (2016). Extracellular HSP60 triggers tissue regeneration and wound healing by regulating inflammation and cell proliferation. *Npj Regenerative Medicine*, *1*(1), 16013. https://doi.org/10.1038/npjregenmed.2016.13

Pérez-Mato, M., Sobrino, T., Blanco, M., Ruban, A., Mirelman, D., Menendez, P., … Campos, F. (2014). Human recombinant glutamate oxaloacetate transaminase 1 (GOT1) supplemented with oxaloacetate induces a protective effect after cerebral ischemia. *Cell Death and Disease*, *5*, 1–9. https://doi.org/10.1038/cddis.2013.507

Peron, R., Vatanabe, I. P., Manzine, P. R., Camins, A., & Cominetti, R. (2018). Alpha-Secretase ADAM10 Regulation : Insights into Alzheimer ' s Disease Treatment. *Pharmaceuticals*, 1–19. https://doi.org/10.3390/ph11010012

Persidsky, Y., Heilman, D., Haorah, J., Zelivyanskaya, M., Persidsky, R., Weber, G. A., …

Ikezu, T. (2006). Rho-mediated regulation of tight junctions during monocyte migration across the blood-brain barrier in HIV-1 encephalitis (HIVE). *Blood*, *107*(12), 4770–4780. https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-4721

Pietras, K., & Östman, A. (2010). Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma. *Experimental Cell Research*, *316*(8), 1324–1331. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.045

Polfliet, M. M., Zwijnenburg, P. J., van Furth, a M., van der Poll, T., Döpp, E. a, Renardel de Lavalette, C., … van den Berg, T. K. (2001). Meningeal and perivascular macrophages of the central nervous system play a protective role during bacterial meningitis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *167*, 4644–4650. https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.8.4644

Prat, A., Parker, J. S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J. I., … Perou, C. M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research : BCR*, *12*(5), R68. https://doi.org/10.1186/bcr2635

Price, D. J., Miralem, T., Jiang, S., Steinberg, R., & Avraham, H. (2001). Role of Vascular Endothelial Growth Factor in the Stimulation of Cellular Invasion and Signaling of Breast Cancer Cells. *Cell Growth Differentation*, *12*(March), 129–135.

Prudencio, M., Jansen-west, K. R., Lee, W. C., Gendron, T. F., Zhang, Y., & Xu, Y. (2012). Misregulation of human sortilin splicing leads to the generation of a nonfunctional progranulin receptor. *PNAS*, *109*(52), 21510–21515. https://doi.org/10.1073/pnas.1211577110/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1211577110

Pukrop, T., Dehghani, F., Chuang, H. N., Lohaus, R., Bayanga, K., Heermann, S., … Binder, C. (2010). Microglia promote colonization of brain tissue by breast cancer cells in a Wnt-dependent way. *Glia*, *58*(12), 1477–1489. https://doi.org/10.1002/glia.21022

Rahmathulla, G., Toms, S. A., & Weil, R. J. (2012). The Molecular Biology of Brain Metastasis. *Journal of Oncology*, *2012*, 1–16. https://doi.org/10.1155/2012/723541

Rak, J., & Yu, J. L. (2004). Oncogenes and tumor angiogenesis: The question of vascular "supply" and vascular "demand." *Seminars in Cancer Biology*, *14*(2), 93–104. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2003.09.014

Rao, J., Oz, G., & Seaquist, E. (2006). Regulation of cerebral glucose metabolism. *Minerva Endocrinologica*, *31*(May), 149–158. Retrieved from http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=17837263

Regina, A., Demeule, M., Laplante, A., Jodoin, J., Dagenais, C., Berthelet, F., … Beliveau, R. (2001). Multidrug resistance in brain tumors: roles of the blood-brain barrier. *Cancer Metastasis Reviews*, *20*(1–2), 13–25.

Rizzo, V., Morton, C., DePaola, N., Schnitzer, J. E., & Davies, P. F. (2003). Recruitment of endothelial caveolae into mechanotransduction pathways by flow conditioning in vitro. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *285*, H1720–H1729. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00344.2002

Robert S. Kerbel. (2008). Tumor Angiogenesis. *N Engl J Med.*, *358*(19), 2039–2049. https://doi.org/10.1056/NEJMra0706596.Tumor

Rom, S., Zuluaga-Ramirez, V., Gajghate, S., Seliga, A., Winfield, M., Heldt, N. A., … Persidsky, Y. (2018). Hyperglycemia-Driven Neuroinflammation Compromises BBB Leading to Memory Loss in Both Diabetes Mellitus (DM) Type 1 and Type 2 Mouse Models. *Molecular Neurobiology*, (DM), 1–14. https://doi.org/10.1007/s12035-018-1195-5

Rotstein, M., Chung, W., & De Vivo, D. (2011). Glut1 deficiency: inheritance pattern determined by haploinsufficiency. *Annals of Neurology*, *68*(212), 955–958. https://doi.org/10.1002/ana.22088.Glut1

Sahu, S., Nag, D. S., Swain, A., Samaddar, D. P., & Sanjay Nag, D. (2017). Biochemical changes in the injured brain World Journal of Biological Chemistry. *World J Biol Chem February World J Biol Chem*, *26*(81), 21–31. https://doi.org/10.4331/wjbc.v8.i1.21

Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J. D., Fromm, M., Takano, H., … Tsukita, S. (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Molecular Biology of the Cell*, *11*(12), 4131–4142. https://doi.org/10.1091/mbc.11.12.4131

Sartorius, C. A., Hanna, C. T., Gril, B., Cruz, H., Serkova, N. J., Huber, K. M., … Cittelly, D. M. (2015). Estrogen promotes the brain metastatic colonization of triple negative breast cancer cells via an astrocyte-mediated paracrine mechanism. *Oncogene*, (April), 1–12. https://doi.org/10.1038/onc.2015.353

Saxena, M., & Christofori, G. (2013). Rebuilding cancer metastasis in the mouse. *Molecular Oncology*, *7*(2), 283–296. https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.02.009

Schackert, G., & Fidler, I. J. (1988). Development of in vivo models for studies of brain metastasis. *International Journal of Cancer*, *41*(4), 589–594.

Schulten, H.-J., Bangash, M., Karim, S., Dallol, A., Hussein, D., Merdad, A., … Al-Qahtani, M. H. (2017). Comprehensive molecular biomarker identification in breast cancer brain metastases. *Journal of Translational Medicine*, *15*(1), 269.

https://doi.org/10.1186/s12967-017-1370-x

Seike, T., Fujita, K., Yamakawa, Y., Kido, M. A., Takiguchi, S., Teramoto, N., … Noda, M. (2011). Interaction between lung cancer cells and astrocytes via specific inflammatory cytokines in the microenvironment of brain metastasis. *Clinical and Experimental Metastasis*, *28*(1), 13–25. https://doi.org/10.1007/s10585-010-9354-8

Selvais, C., D'Auria, L., Tyteca, D., Perrot, G., Lemoine, P., Troeberg, L., … Emonard, H. (2011). Cell cholesterol modulates metalloproteinase-dependent shedding of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) and clearance function. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *25*(8), 2770–2781. https://doi.org/10.1096/fj.10-169508

Sevrioukova, I. F. (2016). Structure/Function Relations in AIFM1 Variants Associated with Neurodegenerative Disorders. *Journal of Molecular Biology*. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.05.004

Shackleton, B., Crawford, F., & Bachmeier, C. (2016). Inhibition of ADAM10 promotes the clearance of Aβ across the BBB by reducing LRP1 ectodomain shedding. *Fluids and Barriers of the CNS*, 1–9. https://doi.org/10.1186/s12987-016-0038-x

Shepro, D., & Morel, N. M. (1993). Pericyte physiology. *FASEB J.*, (7), 1031–1038.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., & Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, *68*(5), 850–858.

Shimizu, F., Sano, Y., Abe, M. aki, Maeda, T., Ohtsuki, S., Terasaki, T., & Kanda, T. (2011). Peripheral nerve pericytes modify the blood-nerve barrier function and tight junctional molecules through the secretion of various soluble factors. *Journal of Cellular Physiology*, *226*(1), 255–266. https://doi.org/10.1002/jcp.22337

Sierra, A., Price, J. E., Garcia-Ramirez, M., Mendez, O., Lopez, L., & Fabra, A. (1997). Astrocyte-derived cytokines contribute to the metastatic brain specificity of breast cancer cells. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, *77*(4), 357–368.

Silacci, P., Mazzolai, L., Gauci, C., Stergiopulos, N., Yin, H. L., & Hayoz, D. (2004). Cellular and Molecular Life Sciences Gelsolin superfamily proteins : key regulators of cellular. *Cell. Mol. Life Sci.*, *61*, 2614–2623. https://doi.org/10.1007/s00018-004-4225-6

Silver, D. J., Siebzehnrubl, F. A., Schildts, M. J., Yachnis, A. T., Smith, G. M., Smith, A. A., … Steindler, D. A. (2013). Chondroitin sulfate proteoglycans potently inhibit invasion and serve as a central organizer of the brain tumor microenvironment. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *33*(39), 15603–15617.

https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3004-12.2013

Sims, D. E. (1986). The pericyte-A review. *Tissue and Cell*, *18*(2), 153–174. https://doi.org/10.1016/0040-8166(86)90026-1

Singh, M., Manoranjan, B., Mahendram, S., McFarlane, N., Venugopal, C., & Singh, S. K. (2014). Brain metastasis-initiating cells: Survival of the fittest. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(5), 9117–9133. https://doi.org/10.3390/ijms15059117

Smyth, L. C. D., Rustenhoven, J., Park, T. I. H., Schweder, P., Jansson, D., Heppner, P. A., … Dragunow, M. (2018). Unique and shared inflammatory profiles of human brain endothelia and pericytes. *Journal of Neuroinflammation*, *15*(1), 1–18. https://doi.org/10.1186/s12974-018-1167-8

Soffietti, R., Ruda, R., & Mutani, R. (2002). Management of brain metastases. *Journal of Neurology*, *249*(10), 1357–1369. https://doi.org/10.1007/s00415-002-0870-6

Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, *119*(1), 7–35. https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8

Sorokin, L. (2010). The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nature Reviews. Immunology*, *10*(10), 712–723. https://doi.org/10.1038/nri2852

Stammet, P. (2017). Blood biomarkers of hypoxic-ischemic brain injury after cardiac arrest. *Seminars in Neurology*, *37*(1), 75–80. https://doi.org/10.1055/s-0036-1593858

Suzuki, H., Fujimoto, M., Kawakita, F., Liu, L., Nakatsuka, Y., Nakano, F., … Shiba, M. (2018). Tenascin - C in brain injuries and edema after subarachnoid hemorrhage : Findings from basic and clinical studies. *Neuroscience Research*, (June), 1–15. https://doi.org/10.1002/jnr.24330

Svokos, K. A., Salhia, B., & Toms, S. A. (2014). Molecular biology of brain metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(6), 9519–9530. https://doi.org/10.3390/ijms15069519

Swaroop, S., Sengupta, N., Suryawanshi, A. R., Adlakha, Y. K., & Basu, A. (2016). HSP60 plays a regulatory role in IL-1 β - induced microglial inflammation via TLR4- p38 MAPK axis. *Journal of Neuroinflammation*, 1–19. https://doi.org/10.1186/s12974-016-0486-x

Tang, W., Lu, Y., Tian, Q., Zhang, Y., Guo, F., Liu, G., … Yu, X. (2011). The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. *Science*, *332*(6028), 478–484. https://doi.org/10.1126/science.1199214.The

Tarassishin, L., Lim, J., Weatherly, D. B., & Angeletti, R. H. (2015). nterleukin-1-induced changes in the glioblastoma secretome suggest its role in tumor progression. *J*

Proteomics, *99*, 152–168. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.01.024.Interleukin-1-induced

Termini, J., Neman, J., & Jandial, R. (2014). Role of the neural niche in brain metastatic cancer. *Cancer Research*, *74*(15), 4011–4015. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1226

Valdez, C., Wong, Y. C., Schwake, M., Bu, G., Wszolek, Z. K., & Krainc, D. (2017). Progranulin-mediated deficiency of cathepsin D results in FTD and NCL-like phenotypes in neurons derived from FTD patients. *Human Molecular Genetics*, *26*(24), 4861–4872. https://doi.org/10.1093/hmg/ddx364

Villegas, J. C., & Broadwell, R. D. (1993). Transcytosis of protein through the mammalian cerebral epithelium and endothelium. II. Adsorptive transcytosis of WGA-HRP and the blood-brain and brain-blood barriers. *Journal of Neurocytology*, *22*(2), 67–80.

Wang, H., Beyer, I., Persson, J., Song, H., Li, Z., Richter, M., … Rensburg, R. Van. (2012). A New Human DSG2-Transgenic Mouse Model for Studying the Tropism and Pathology of Human Adenoviruses. *Journal of Virology*, *86*(11), 6286–6302. https://doi.org/10.1128/JVI.00205-12

Wang, H., Ramakrishnan, A., Fletcher, S., Prochownik, E. V, & Genetics, M. (2011). Integrin beta4 signaling promotes mammary tumor cell adhesion to brain microvascular endothelium by inducing ErbB2-mediated secretion of VEGF. *Annals of Biomedical Engineering*, *2*(2), 2223–2241. https://doi.org/10.14440/jbm.2015.54.A

Wang, Y., Friedl, W., Sengteller, M., Jungck, M., Filges, I., Propping, P., & Mangold, E. (2002). A modified multiplex PCR assay for detection of large deletions in MSH2 and MLH1. *Human Mutation*, *19*(3), 279–286. https://doi.org/10.1002/humu.10042

Wilhelm, I., Molnár, J., Fazakas, C., Haskó, J., & Krizbai, I. (2013). Role of the Blood-Brain Barrier in the Formation of Brain Metastases. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(1), 1383–1411. https://doi.org/10.3390/ijms14011383

Witzel, I., Oliveira-Ferrer, L., Pantel, K., Müller, V., & Wikman, H. (2016). Breast cancer brain metastases: biology and new clinical perspectives. *Breast Cancer Research*, *18*(1), 8. https://doi.org/10.1186/s13058-015-0665-1

Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Fallier-Becker, P., Noell, S., & Mack, A. F. (2011). *Structure and Functions of Aquaporin-4-Based Orthogonal Arrays of Particles*. *International Review of Cell and Molecular Biology* (1st ed., Vol. 287). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386043-9.00001-3

Wood, E. R. (2004). A Unique Structure for Epidermal Growth Factor Receptor Bound to

GW572016 (Lapatinib): Relationships among Protein Conformation, Inhibitor Off-Rate, and Receptor Activity in Tumor Cells. *Cancer Research*, *64*(18), 6652–6659. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1168

X, P., Yinling, C., Yuanyuan, T., Xuhui, T., Jianfeng, W. U., Yan, L. I., & Shuying, D. (2018). Protective effects of P2X7 receptor inhibition in cerebral ischemia / reperfusion injury in rats. *J Cent South Univ (Med Sci)*, *43*(11), 0–2. https://doi.org/10.11817/j.issn.1672-7347.2018.11.001

Xian, Z. Y., Liu, J. M., Chen, Q. K., Chen, H. Z., Ye, C. J., Xue, J., … Kuang, S. J. (2015). Inhibition of LDHA suppresses tumor progression in prostate cancer. *Tumor Biology*, *36*(10), 8093–8100. https://doi.org/10.1007/s13277-015-3540-x

Xing, F., Kobayashi, A., Okuda, H., Watabe, M., Pai, S. K., Pandey, P. R., … Watabe, K. (2013). Reactive astrocytes promote the metastatic growth of breast cancer stem-like cells by activating Notch signalling in brain. *EMBO Molecular Medicine*, *5*(3), 384–396. https://doi.org/10.1002/emmm.201201623

Yamamoto, M., Ramirez, S. H., Sato, S., Kiyota, T., Cerny, R. L., Kaibuchi, K., … Ikezu, T. (2010). Phosphorylation of Claudin-5 and Occludin by Rho Kinase in Brain Endothelial Cells. *The American Journal of Pathology*, *172*(2), 521–533. https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070076

Yang, Y., Liu, Q., Zhang, H., Zhao, H., & Mao, R. (2017). Silencing of GP73 inhibits invasion and metastasis via suppression of epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports*, *37*, 1182–1188. https://doi.org/10.3892/or.2017.5351

Yang, Y., & Rosenberg, G. A. (2013). Blood–brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. *Stroke*, *42*(11), 3323–3328. https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.608257.Blood-Brain

Yin, X., Wright, J., Wall, T., & Grammas, P. (2010). Brain Endothelial Cells Synthesize Neurotoxic Thrombin in Alzheimer's Disease. *The American Journal of Pathology*, *176*(4), 1600–1606. https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090406

Yins, H. L., Kwiatkowskis, D. J., Moletiij, J. E., & Cole, F. S. (1984). Structure and Biosynthesis of Cytoplasmic and Secreted Variants of Gelsolin. *The Journal of Biological Chemistry*, *25*(2), 5271–5276.

Yu, T., & Di, G. (2017). Role of tumor microenvironment in triple-negative breast cancer and its prognostic significance. *Chinese Journal of Cancer Research*, *29*(3), 237–252. https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2017.03.10

Zhang, T., Ma, Z., Liu, L., Sun, J., Tang, H., Zhang, B., … Li, H. (2018). DDX39 promotes

hepatocellular carcinoma growth and metastasis through activating Wnt / β -catenin pathway. *Cell Death and Disease*. https://doi.org/10.1038/s41419-018-0591-0

Zhao, H., Cui, K., Nie, F., Wang, L., Brandl, M. B., Jin, G., ... Wong, S. T. C. (2012). The effect of mTOR inhibition alone or combined with MEK inhibitors on brain metastasis: An in vivo analysis in triple-negative breast cancer models. *Breast Cancer Research and Treatment*, *131*(2), 425–436. https://doi.org/10.1007/s10549-011-1420-7

Zhao, J., Xu, T., Wang, F., Cai, W., & Chen, L. (2017). ScienceDirect miR-493-5p suppresses hepatocellular carcinoma cell proliferation through targeting GP73. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, *90*, 744–751. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.029

Zhao, Y., Li, D., Zhao, J., Song, J., & Zhao, Y. (2016). The role of the low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) in regulating blood-brain barrier integrity. *Reviews in the Neurosciences*, *27*(6), 623–634. https://doi.org/10.1515/revneuro-2015-0069

Zhou, C., Chao, F., Zhang, Y., & Jiang, L. (2018). Fluoxetine delays the cognitive function decline and synaptic changes in a transgenic mouse model of early Alzheimer's disease. *Journal of Comparative Neurology*. https://doi.org/10.1002/cne.24616

Zhou, Y., Cai, W., Zhao, Z., Hilton, T., Wang, M., Yeon, J., ... Li, M. (2017). Lactadherin Promotes Microvesicle Clearance to Prevent Coagulopathy and Improves Survival of Severe TBI Mice †. *Blood Journal*. https://doi.org/10.1182/blood-2017-08-801738

VIII. ANEXO

Anexo I: Proteínas detectadas por LCMS/MS

Accesion number	Descripción	Proteína
A6NMY6	*Putative annexin A2-like protein OS=Homo sapiens GN=ANXA2P2 PE=5 SV=2 - [AXA2L_HUMAN]*	ANXA2P2
O00148	*ATP-dependent RNA helicase DDX39A OS=Homo sapiens GN=DDX39A PE=1 SV=2 - [DX39A_HUMAN]*	DDX39A
O00299	*Chloride intracellular channel protein 1 OS=Homo sapiens GN=CLIC1 PE=1 SV=4 - [CLIC1_HUMAN]*	CLIC1
O00391-2	*Isoform 2 of Sulfhydryl oxidase 1 OS=Homo sapiens GN=QSOX1 - [QSOX1_HUMAN]*	QSOX1
O00468-2	*Isoform 2 of Agrin OS=Homo sapiens GN=AGRN - [AGRIN_HUMAN]*	AGRN
O00468-6	*Isoform 6 of Agrin OS=Homo sapiens GN=AGRN - [AGRIN_HUMAN]*	AGRN
O00571-2	*Isoform 2 of ATP-dependent RNA helicase DDX3X OS=Homo sapiens GN=DDX3X - [DDX3X_HUMAN]*	DDX3X
O00622	*Protein CYR61 OS=Homo sapiens GN=CYR61 PE=1 SV=1 - [CYR61_HUMAN]*	CYR61
O14672	*Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 OS=Homo sapiens GN=ADAM10 PE=1 SV=1 - [ADA10_HUMAN]*	ADAM10
O14773	*Tripeptidyl-peptidase 1 OS=Homo sapiens GN=TPP1 PE=1 SV=2 - [TPP1_HUMAN]*	TPP1
O14818-2	*Isoform 2 of Proteasome subunit alpha type-7 OS=Homo sapiens GN=PSMA7 - [PSA7_HUMAN]*	PSMA7
O15144	*Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 OS=Homo sapiens GN=ARPC2 PE=1 SV=1 - [ARPC2_HUMAN]*	ARPC2
O15230	*Laminin subunit alpha-5 OS=Homo sapiens GN=LAMA5 PE=1 SV=8 - [LAMA5_HUMAN]*	LAMA5
O15230-2	*Isoform 2 of Laminin subunit alpha-5 OS=Homo sapiens GN=LAMA5 - [LAMA5_HUMAN]*	LAMA5
O15232-2	*Isoform 2 of Matrilin-3 OS=Homo sapiens GN=MATN3 - [MATN3_HUMAN]*	MATN3
O43175	*D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=PHGDH PE=1 SV=4 - [SERA_HUMAN]*	PHGDH
O43405	*Cochlin OS=Homo sapiens GN=COCH PE=1 SV=1 - [COCH_HUMAN]*	COCH
O43405-2	*Isoform 2 of Cochlin OS=Homo sapiens GN=COCH - [COCH_HUMAN]*	COCH
O43505	*Beta-1,4-glucuronyltransferase 1 OS=Homo sapiens GN=B4GAT1 PE=1 SV=1 - [B4GA1_HUMAN]*	B4GAT1
O43707	*Alpha-actinin-4 OS=Homo sapiens GN=ACTN4 PE=1 SV=2 - [ACTN4_HUMAN]*	ACTN4
O60437	*Periplakin OS=Homo sapiens GN=PPL PE=1 SV=4 - [PEPL_HUMAN]*	PPL
O60506-4	*Isoform 4 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q OS=Homo sapiens GN=SYNCRIP - [HNRPQ_HUMAN]*	SYNCRIP
O60568	*Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3 OS=Homo sapiens GN=PLOD3 PE=1 SV=1 - [PLOD3_HUMAN]*	PLOD3
O60814	*Histone H2B type 1-K OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BK PE=1 SV=3 - [H2B1K_HUMAN]*	HIST1H2BK
O75083	*WD repeat-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=WDR1 PE=1 SV=4 - [WDR1_HUMAN]*	WDR1

O75083-3	*Isoform 2 of WD repeat-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=WDR1 - [WDR1_HUMAN]*	WDR1
O75223	*Gamma-glutamylcyclotransferase OS=Homo sapiens GN=GGCT PE=1 SV=1 - [GGCT_HUMAN]*	GGCT
O75369-5	*Isoform 5 of Filamin-B OS=Homo sapiens GN=FLNB - [FLNB_HUMAN]*	FLNB
O75369-7	*Isoform 7 of Filamin-B OS=Homo sapiens GN=FLNB - [FLNB_HUMAN]*	FLNB
O75787-2	*Isoform 2 of Renin receptor OS=Homo sapiens GN=ATP6AP2 - [RENR_HUMAN]*	ATP6AP2
O75874	*Isocitrate dehydrogenase cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=IDH1 PE=1 SV=2 - [IDHC_HUMAN]*	IDH1
O75874	*Isocitrate dehydrogenase cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=IDH1 PE=1 SV=2 - [IDHC_HUMAN]*	IDH1
O94985-2	*Isoform 2 of Calsyntenin-1 OS=Homo sapiens GN=CLSTN1 - [CSTN1_HUMAN]*	CLSTN1
O95678	*Keratin, type II cytoskeletal 75 OS=Homo sapiens GN=KRT75 PE=1 SV=2 - [K2C75_HUMAN]*	KRT75
O95831-3	*Isoform 3 of Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=AIFM1 - [AIFM1_HUMAN]*	AIFM1
O95861-4	*Isoform 4 of 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1 OS=Homo sapiens GN=BPNT1 - [BPNT1_HUMAN]*	BPNT1
P00338	*L-lactate dehydrogenase A chain OS=Homo sapiens GN=LDHA PE=1 SV=2 - [LDHA_HUMAN]*	LDHA
P00338-4	*Isoform 4 of L-lactate dehydrogenase A chain OS=Homo sapiens GN=LDHA - [LDHA_HUMAN]*	LDHA
P00390-5	*Isoform 4 of Glutathione reductase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=GSR - [GSHR_HUMAN]*	GSR
P00441	*Superoxide dismutase OS=Homo sapiens GN=SOD1 PE=1 SV=2 - [SODC_HUMAN]*	SOD1
P00505	*Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=GOT2 PE=1 SV=3 - [AATM_HUMAN]*	GOT2
P00558	*Phosphoglycerate kinase 1 OS=Homo sapiens GN=PGK1 PE=1 SV=3 - [PGK1_HUMAN]*	PGK1
P00558-2	*Isoform 2 of Phosphoglycerate kinase 1 OS=Homo sapiens GN=PGK1 - [PGK1_HUMAN]*	PGK1
P00749-2	*Isoform 2 of Urokinase-type plasminogen activator OS=Homo sapiens GN=PLAU - [UROK_HUMAN]*	PLAU
P01008	*Antithrombin-III OS=Homo sapiens GN=SERPINC1 PE=1 SV=1 - [ANT3_HUMAN]*	SERPINC1
P01023	*Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens GN=A2M PE=1 SV=3 - [A2MG_HUMAN]*	A2M
P01024	*Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2 - [CO3_HUMAN]*	C3
P01033	*Metalloproteinase inhibitor 1 OS=Homo sapiens GN=TIMP1 PE=1 SV=1 - [TIMP1_HUMAN]*	TIMP1
P01034	*Cystatin-C OS=Homo sapiens GN=CST3 PE=1 SV=1 - [CYTC_HUMAN]*	CST3
P01130-2	*Isoform 2 of Low-density lipoprotein receptor OS=Homo sapiens GN=LDLR - [LDLR_HUMAN]*	LDLR
P01137	*Transforming growth factor beta-1 OS=Homo sapiens GN=TGFB1 PE=1 SV=2 - [TGFB1_HUMAN]*	TGFB1
P01857	*Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1 - [IGHG1_HUMAN]*	IGHG1
P01877	*Ig alpha-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA2 PE=1 SV=3 - [IGHA2_HUMAN]*	IGHA2
P02533	*Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4 - [K1C14_HUMAN]*	KRT14
P02538	*Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens GN=KRT6A PE=1 SV=3 - [K2C6A_HUMAN]*	KRT6A
P02545-2	*Isoform C of Prelamin-A/C OS=Homo sapiens GN=LMNA - [LMNA_HUMAN]*	LMNA
P02751-12	*Isoform 12 of Fibronectin OS=Homo sapiens GN=FN1 - [FINC_HUMAN]*	FN1

P02751-4	*Isoform 4 of Fibronectin OS=Homo sapiens GN=FN1 - [FINC_HUMAN]*	FN1
P02765	*Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AHSG PE=1 SV=1 - [FETUA_HUMAN]*	AHSG
P02768	*Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2 - [ALBU_HUMAN]*	ALB
P02771	*Alpha-fetoprotein OS=Homo sapiens GN=AFP PE=1 SV=1 - [FETA_HUMAN]*	AFP
P02774	*Vitamin D-binding protein OS=Homo sapiens GN=GC PE=1 SV=1 - [VTDB_HUMAN]*	GC
P02786	*Transferrin receptor protein 1 OS=Homo sapiens GN=TFRC PE=1 SV=2 - [TFR1_HUMAN]*	TFRC
P02787	*Serotransferrin OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=3 - [TRFE_HUMAN]*	TF
P02788-2	*Isoform DeltaLf of Lactotransferrin OS=Homo sapiens GN=LTF - [TRFL_HUMAN]*	LTF
P04040	*Catalase OS=Homo sapiens GN=CAT PE=1 SV=3 - [CATA_HUMAN]*	CAT
P04062-4	*Isoform 4 of Glucosylceramidase OS=Homo sapiens GN=GBA - [GLCM_HUMAN]*	GBA
P04066	*Tissue alpha-L-fucosidase OS=Homo sapiens GN=FUCA1 PE=1 SV=4 - [FUCO_HUMAN]*	FUCA1
P04075	*Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Homo sapiens GN=ALDOA PE=1 SV=2 - [ALDOA_HUMAN]*	ALDOA
P04083	*Annexin A1 OS=Homo sapiens GN=ANXA1 PE=1 SV=2 - [ANXA1_HUMAN]*	ANXA1
P04259	*Keratin, type II cytoskeletal 6B OS=Homo sapiens GN=KRT6B PE=1 SV=5 - [K2C6B_HUMAN]*	KRT6B
P04264	*Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 - [K2C1_HUMAN]*	KRT1
P04406	*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=3 - [G3P_HUMAN]*	GAPDH
P04406-2	*Isoform 2 of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH - [G3P_HUMAN]*	GAPDH
P04792	*Heat shock protein beta-1 OS=Homo sapiens GN=HSPB1 PE=1 SV=2 - [HSPB1_HUMAN]*	HSPB1
P05067-10	*Isoform APP639 of Amyloid beta A4 protein OS=Homo sapiens GN=APP - [A4_HUMAN]*	APP
P05067-11	*Isoform 11 of Amyloid beta A4 protein OS=Homo sapiens GN=APP - [A4_HUMAN]*	APP
P05067-7	*Isoform L-APP733 of Amyloid beta A4 protein OS=Homo sapiens GN=APP - [A4_HUMAN]*	APP
P05089	*Arginase-1 OS=Homo sapiens GN=ARG1 PE=1 SV=2 - [ARGI1_HUMAN]*	ARG1
P05091-2	*Isoform 2 of Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ALDH2 - [ALDH2_HUMAN]*	ALDH2
P05109	*Protein S100-A8 OS=Homo sapiens GN=S100A8 PE=1 SV=1 - [S10A8_HUMAN]*	S100A8
P05121	*Plasminogen activator inhibitor 1 OS=Homo sapiens GN=SERPINE1 PE=1 SV=1 - [PAI1_HUMAN]*	SERPINE1
P05141	*ADP/ATP translocase 2 OS=Homo sapiens GN=SLC25A5 PE=1 SV=7 - [ADT2_HUMAN]*	SLC25A5
P05388	*60S acidic ribosomal protein P0 OS=Homo sapiens GN=RPLP0 PE=1 SV=1 - [RLA0_HUMAN]*	RPLP0
P05543	*Thyroxine-binding globulin OS=Homo sapiens GN=SERPINA7 PE=1 SV=2 - [THBG_HUMAN]*	SERPINA7
P05556	*Integrin beta-1 OS=Homo sapiens GN=ITGB1 PE=1 SV=2 - [ITB1_HUMAN]*	ITGB1
P05556-2	*Isoform 2 of Integrin beta-1 OS=Homo sapiens GN=ITGB1 - [ITB1_HUMAN]*	ITGB1
P05783	*Keratin, type I cytoskeletal 18 OS=Homo sapiens GN=KRT18 PE=1 SV=2 - [K1C18_HUMAN]*	KRT18
P05787	*Keratin, type II cytoskeletal 8 OS=Homo sapiens GN=KRT8 PE=1 SV=7 - [K2C8_HUMAN]*	KRT8
P06276	*Cholinesterase OS=Homo sapiens GN=BCHE PE=1 SV=1 - [CHLE_HUMAN]*	BCHE
P06396	*Gelsolin OS=Homo sapiens GN=GSN PE=1 SV=1 - [GELS_HUMAN]*	GSN
P06396-2	*Isoform 2 of Gelsolin OS=Homo sapiens GN=GSN - [GELS_HUMAN]*	GSN
P06576	*ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5B PE=1 SV=3 - [ATPB_HUMAN]*	ATP5B
P06702	*Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV=1 - [S10A9_HUMAN]*	S100A9

P06733	*Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2 - [ENOA_HUMAN]*	ENO1
P06737-2	*Isoform 2 of Glycogen phosphorylase, liver form OS=Homo sapiens GN=PYGL - [PYGL_HUMAN]*	PYGL
P06744	*Glucose-6-phosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=GPI PE=1 SV=4 - [G6PI_HUMAN]*	GPI
P06865	*Beta-hexosaminidase subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HEXA PE=1 SV=2 - [HEXA_HUMAN]*	HEXA
P07195	*L-lactate dehydrogenase B chain OS=Homo sapiens GN=LDHB PE=1 SV=2 - [LDHB_HUMAN]*	LDHB
P07225	*Vitamin K-dependent protein S OS=Homo sapiens GN=PROS1 PE=1 SV=1 - [PROS_HUMAN]*	PROS1
P07237	*Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens GN=P4HB PE=1 SV=3 - [PDIA1_HUMAN]*	P4HB
P07339	*Cathepsin D OS=Homo sapiens GN=CTSD PE=1 SV=1 - [CATD_HUMAN]*	CTSD
P07355	*Annexin A2 OS=Homo sapiens GN=ANXA2 PE=1 SV=2 - [ANXA2_HUMAN]*	ANXA2
P07437	*Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV=2 - [TBB5_HUMAN]*	TUBB
P07476	*Involucrin OS=Homo sapiens GN=IVL PE=1 SV=2 - [INVO_HUMAN]*	IVL
P07686	*Beta-hexosaminidase subunit beta OS=Homo sapiens GN=HEXB PE=1 SV=3 - [HEXB_HUMAN]*	HEXB
P07737	*Profilin-1 OS=Homo sapiens GN=PFN1 PE=1 SV=2 - [PROF1_HUMAN]*	PFN1
P07900	*Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Homo sapiens GN=HSP90AA1 PE=1 SV=5 - [HS90A_HUMAN]*	HSP90AA1
P07910-4	*Isoform 4 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS=Homo sapiens GN=HNRNPC - [HNRPC_HUMAN]*	HNRNPC
P07996	*Thrombospondin-1 OS=Homo sapiens GN=THBS1 PE=1 SV=2 - [TSP1_HUMAN]*	THBS1
P07996-2	*Isoform 2 of Thrombospondin-1 OS=Homo sapiens GN=THBS1 - [TSP1_HUMAN]*	THBS1
P08195-2	*Isoform 2 of 4F2 cell-surface antigen heavy chain OS=Homo sapiens GN=SLC3A2 - [4F2_HUMAN]*	SLC3A2
P08238	*Heat shock protein HSP 90-beta OS=Homo sapiens GN=HSP90AB1 PE=1 SV=4 - [HS90B_HUMAN]*	HSP90AB1
P08572	*Collagen alpha-2(IV) chain OS=Homo sapiens GN=COL4A2 PE=1 SV=4 - [CO4A2_HUMAN]*	COL4A2
P08581	*Hepatocyte growth factor receptor OS=Homo sapiens GN=MET PE=1 SV=4 - [MET_HUMAN]*	MET
P08603	*Complement factor H OS=Homo sapiens GN=CFH PE=1 SV=4 - [CFAH_HUMAN]*	CFH
P08670	*Vimentin OS=Homo sapiens GN=VIM PE=1 SV=4 - [VIME_HUMAN]*	VIM
P08697	*Alpha-2-antiplasmin OS=Homo sapiens GN=SERPINF2 PE=1 SV=3 - [A2AP_HUMAN]*	SERPINF2
P08729	*Keratin, type II cytoskeletal 7 OS=Homo sapiens GN=KRT7 PE=1 SV=5 - [K2C7_HUMAN]*	KRT7
P08779	*Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4 - [K1C16_HUMAN]*	KRT16
P08865	*40S ribosomal protein SA OS=Homo sapiens GN=RPSA PE=1 SV=4 - [RSSA_HUMAN]*	RPSA
P09211	*Glutathione S-transferase P OS=Homo sapiens GN=GSTP1 PE=1 SV=2 - [GSTP1_HUMAN]*	GSTP1
P09651-3	*Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA1 - [ROA1_HUMAN]*	HNRNPA1
P09960-2	*Isoform 2 of Leukotriene A-4 hydrolase OS=Homo sapiens GN=LTA4H - [LKHA4_HUMAN]*	LTA4H
P09960-3	*Isoform 3 of Leukotriene A-4 hydrolase OS=Homo sapiens GN=LTA4H - [LKHA4_HUMAN]*	LTA4H
P0C0L4-2	*Isoform 2 of Complement C4-A OS=Homo sapiens GN=C4A - [CO4A_HUMAN]*	C4A
P0CG48	*Polyubiquitin-C OS=Homo sapiens GN=UBC PE=1 SV=3 - [UBC_HUMAN]*	UBC
P0DMV8	*Heat shock 70 kDa protein 1A OS=Homo sapiens GN=HSPA1A PE=1 SV=1 - [HS71A_HUMAN]*	HSPA1A
P0DMV8 -2	*Isoform 2 of Heat shock 70 kDa protein 1A OS=Homo sapiens GN=HSPA1A - [HS71A_HUMAN]*	HSPA1A

P10586-2	*Isoform 2 of Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F OS=Homo sapiens GN=PTPRF - [PTPRF_HUMAN]*	PTPRF
P10599	*Thioredoxin OS=Homo sapiens GN=TXN PE=1 SV=3 - [THIO_HUMAN]*	TXN
P10599-2	*Isoform 2 of Thioredoxin OS=Homo sapiens GN=TXN - [THIO_HUMAN]*	TXN
P10619-2	*Isoform 2 of Lysosomal protective protein OS=Homo sapiens GN=CTSA - [PPGB_HUMAN]*	CTSA
P10646	*Tissue factor pathway inhibitor OS=Homo sapiens GN=TFPI PE=1 SV=1 - [TFPI1_HUMAN]*	TFPI
P10809	*60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2 - [CH60_HUMAN]*	HSPD1
P10909-3	*Isoform 3 of Clusterin OS=Homo sapiens GN=CLU - [CLUS_HUMAN]*	CLU
P10909-4	*Isoform 4 of Clusterin OS=Homo sapiens GN=CLU - [CLUS_HUMAN]*	CLU
P10915	*Hyaluronan and proteoglycan link protein 1 OS=Homo sapiens GN=HAPLN1 PE=2 SV=2 - [HPLN1_HUMAN]*	HAPLN1
P11021	*78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2 - [GRP78_HUMAN]*	HSPA5
P11047	*Laminin subunit gamma-1 OS=Homo sapiens GN=LAMC1 PE=1 SV=3 - [LAMC1_HUMAN]*	LAMC1
P11142	*Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=1 - [HSP7C_HUMAN]*	HSPA8
P11142-2	*Isoform 2 of Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 - [HSP7C_HUMAN]*	HSPA8
P11413	*Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=G6PD PE=1 SV=4 - [G6PD_HUMAN]*	G6PD
P12004	*Proliferating cell nuclear antigen OS=Homo sapiens GN=PCNA PE=1 SV=1 - [PCNA_HUMAN]*	PCNA
P12081-3	*Isoform 3 of Histidine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=HARS - [SYHC_HUMAN]*	HARS
P12109	*Collagen alpha-1(VI) chain OS=Homo sapiens GN=COL6A1 PE=1 SV=3 - [CO6A1_HUMAN]*	COL6A1
P12814-2	*Isoform 2 of Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens GN=ACTN1 - [ACTN1_HUMAN]*	ACTN1
P12955-3	*Isoform 3 of Xaa-Pro dipeptidase OS=Homo sapiens GN=PEPD - [PEPD_HUMAN]*	PEPD
P12956	*X-ray repair cross-complementing protein 6 OS=Homo sapiens GN=XRCC6 PE=1 SV=2 - [XRCC6_HUMAN]*	XRCC6
P13489	*Ribonuclease inhibitor OS=Homo sapiens GN=RNH1 PE=1 SV=2 - [RINI_HUMAN]*	RNH1
P13611-4	*Isoform V3 of Versican core protein OS=Homo sapiens GN=VCAN - [CSPG2_HUMAN]*	VCAN
P13639	*Elongation factor 2 OS=Homo sapiens GN=EEF2 PE=1 SV=4 - [EF2_HUMAN]*	EEF2
P13645	*Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 - [K1C10_HUMAN]*	KRT10
P13646	*Keratin, type I cytoskeletal 13 OS=Homo sapiens GN=KRT13 PE=1 SV=4 - [K1C13_HUMAN]*	KRT13
P13646-3	*Isoform 3 of Keratin, type I cytoskeletal 13 OS=Homo sapiens GN=KRT13 - [K1C13_HUMAN]*	KRT13
P13647	*Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3 - [K2C5_HUMAN]*	KRT5
P13667	*Protein disulfide-isomerase A4 OS=Homo sapiens GN=PDIA4 PE=1 SV=2 - [PDIA4_HUMAN]*	PDIA4
P13797-3	*Isoform 3 of Plastin-3 OS=Homo sapiens GN=PLS3 - [PLST_HUMAN]*	PLS3
P13798	*Acylamino-acid-releasing enzyme OS=Homo sapiens GN=APEH PE=1 SV=4 - [ACPH_HUMAN]*	APEH
P13929-2	*Isoform 2 of Beta-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO3 - [ENOB_HUMAN]*	ENO3
P14543-2	*Isoform 2 of Nidogen-1 OS=Homo sapiens GN=NID1 - [NID1_HUMAN]*	NID1
P14550	*Alcohol dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=AKR1A1 PE=1 SV=3 - [AK1A1_HUMAN]*	AKR1A1
P14618	*Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens GN=PKM PE=1 SV=4 - [KPYM_HUMAN]*	PKM
P14625	*Endoplasmin OS=Homo sapiens GN=HSP90B1 PE=1 SV=1 - [ENPL_HUMAN]*	HSP90B1

P14735	*Insulin-degrading enzyme OS=Homo sapiens GN=IDE PE=1 SV=4 - [IDE_HUMAN]*	IDE
P14923	*Junction plakoglobin OS=Homo sapiens GN=JUP PE=1 SV=3 - [PLAK_HUMAN]*	JUP
P15151-3	*Isoform Gamma of Poliovirus receptor OS=Homo sapiens GN=PVR - [PVR_HUMAN]*	PVR
P15259	*Phosphoglycerate mutase 2 OS=Homo sapiens GN=PGAM2 PE=1 SV=3 - [PGAM2_HUMAN]*	PGAM2
P15291-2	*Isoform Short of Beta-1,4-galactosyltransferase 1 OS=Homo sapiens GN=B4GALT1 - [B4GT1_HUMAN]*	B4GALT1
P15311	*Ezrin OS=Homo sapiens GN=EZR PE=1 SV=4 - [EZRI_HUMAN]*	EZR
P15531	*Nucleoside diphosphate kinase A OS=Homo sapiens GN=NME1 PE=1 SV=1 - [NDKA_HUMAN]*	NME1
P15559-3	*Isoform 3 of NAD(P)H dehydrogenase 1 OS=Homo sapiens GN=NQO1 - [NQO1_HUMAN]*	NQO1
P15880	*40S ribosomal protein S2 OS=Homo sapiens GN=RPS2 PE=1 SV=2 - [RS2_HUMAN]*	RPS2
P15924	*Desmoplakin OS=Homo sapiens GN=DSP PE=1 SV=3 - [DESP_HUMAN]*	DSP
P15924-2	*Isoform DPII of Desmoplakin OS=Homo sapiens GN=DSP - [DESP_HUMAN]*	DSP
P16070-15	*Isoform 15 of CD44 antigen OS=Homo sapiens GN=CD44 - [CD44_HUMAN]*	CD44
P16401	*Histone H1.5 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1B PE=1 SV=3 - [H15_HUMAN]*	HIST1H1B
P16403	*Histone H1.2 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1C PE=1 SV=2 - [H12_HUMAN]*	HIST1H1C
P17174	*Aspartate aminotransferase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=GOT1 PE=1 SV=3 - [AATC_HUMAN]*	GOT1
P17174-2	*Isoform 2 of Aspartate aminotransferase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=GOT1 - [AATC_HUMAN]*	GOT1
P17987	*T-complex protein 1 subunit alpha OS=Homo sapiens GN=TCP1 PE=1 SV=1 - [TCPA_HUMAN]*	TCP1
P18206-2	*Isoform 1 of Vinculin OS=Homo sapiens GN=VCL - [VINC_HUMAN]*	VCL
P19012	*Keratin, type I cytoskeletal 15 OS=Homo sapiens GN=KRT15 PE=1 SV=3 - [K1C15_HUMAN]*	KRT15
P19013	*Keratin, type II cytoskeletal 4 OS=Homo sapiens GN=KRT4 PE=1 SV=4 - [K2C4_HUMAN]*	KRT4
P19021-2	*Isoform 2 of Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase OS=Homo sapiens GN=PAM - [AMD_HUMAN]*	PAM
P19022-2	*Isoform 2 of Cadherin-2 OS=Homo sapiens GN=CDH2 - [CADH2_HUMAN]*	CDH2
P19338	*Nucleolin OS=Homo sapiens GN=NCL PE=1 SV=3 - [NUCL_HUMAN]*	NCL
P19823	*Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 OS=Homo sapiens GN=ITIH2 PE=1 SV=2 - [ITIH2_HUMAN]*	ITIH2
P20742	*Pregnancy zone protein OS=Homo sapiens GN=PZP PE=1 SV=4 - [PZP_HUMAN]*	PZP
P20930	*Filaggrin OS=Homo sapiens GN=FLG PE=1 SV=3 - [FILA_HUMAN]*	FLG
P21333-2	*Isoform 2 of Filamin-A OS=Homo sapiens GN=FLNA - [FLNA_HUMAN]*	FLNA
P22314-2	*Isoform 2 of Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 OS=Homo sapiens GN=UBA1 - [UBA1_HUMAN]*	UBA1
P22626-2	*Isoform A2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA2B1 - [ROA2_HUMAN]*	HNRNPA2B1
P22735	*Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K OS=Homo sapiens GN=TGM1 PE=1 SV=4 - [TGM1_HUMAN]*	TGM1
P23142	*Fibulin-1 OS=Homo sapiens GN=FBLN1 PE=1 SV=4 - [FBLN1_HUMAN]*	FBLN1
P23142-4	*Isoform C of Fibulin-1 OS=Homo sapiens GN=FBLN1 - [FBLN1_HUMAN]*	FBLN1
P23246	*Splicing factor, proline- and glutamine-rich OS=Homo sapiens GN=SFPQ PE=1 SV=2 - [SFPQ_HUMAN]*	SFPQ
P23284	*Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B OS=Homo sapiens GN=PPIB PE=1 SV=2 - [PPIB_HUMAN]*	PPIB

P23396	*40S ribosomal protein S3 OS=Homo sapiens GN=RPS3 PE=1 SV=2 - [RS3_HUMAN]*	RPS3
P23526	*Adenosylhomocysteinase OS=Homo sapiens GN=AHCY PE=1 SV=4 - [SAHH_HUMAN]*	AHCY
P23526-2	*Isoform 2 of Adenosylhomocysteinase OS=Homo sapiens GN=AHCY - [SAHH_HUMAN]*	AHCY
P23528	*Cofilin-1 OS=Homo sapiens GN=CFL1 PE=1 SV=3 - [COF1_HUMAN]*	CFL1
P24821-6	*Isoform 6 of Tenascin OS=Homo sapiens GN=TNC - [TENA_HUMAN]*	TNC
P25311	*Zinc-alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AZGP1 PE=1 SV=2 - [ZA2G_HUMAN]*	AZGP1
P25705-2	*Isoform 2 of ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5A1 - [ATPA_HUMAN]*	ATP5A1
P25789	*Proteasome subunit alpha type-4 OS=Homo sapiens GN=PSMA4 PE=1 SV=1 - [PSA4_HUMAN]*	PSMA4
P26006	*Integrin alpha-3 OS=Homo sapiens GN=ITGA3 PE=1 SV=5 - [ITA3_HUMAN]*	ITGA3
P26038	*Moesin OS=Homo sapiens GN=MSN PE=1 SV=3 - [MOES_HUMAN]*	MSN
P26639	*Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=TARS PE=1 SV=3 - [SYTC_HUMAN]*	TARS
P26641	*Elongation factor 1-gamma OS=Homo sapiens GN=EEF1G PE=1 SV=3 - [EF1G_HUMAN]*	EEF1G
P27348	*14-3-3 protein theta OS=Homo sapiens GN=YWHAQ PE=1 SV=1 - [1433T_HUMAN]*	YWHAQ
P27482	*Calmodulin-like protein 3 OS=Homo sapiens GN=CALML3 PE=1 SV=2 - [CALL3_HUMAN]*	CALML3
P27797	*Calreticulin OS=Homo sapiens GN=CALR PE=1 SV=1 - [CALR_HUMAN]*	CALR
P28066	*Proteasome subunit alpha type-5 OS=Homo sapiens GN=PSMA5 PE=1 SV=3 - [PSA5_HUMAN]*	PSMA5
P28070	*Proteasome subunit beta type-4 OS=Homo sapiens GN=PSMB4 PE=1 SV=4 - [PSB4_HUMAN]*	PSMB4
P28072	*Proteasome subunit beta type-6 OS=Homo sapiens GN=PSMB6 PE=1 SV=4 - [PSB6_HUMAN]*	PSMB6
P28074	*Proteasome subunit beta type-5 OS=Homo sapiens GN=PSMB5 PE=1 SV=3 - [PSB5_HUMAN]*	PSMB5
P28799	*Granulins OS=Homo sapiens GN=GRN PE=1 SV=2 - [GRN_HUMAN]*	GRN
P28838-2	*Isoform 2 of Cytosol aminopeptidase OS=Homo sapiens GN=LAP3 - [AMPL_HUMAN]*	LAP3
P29401	*Transketolase OS=Homo sapiens GN=TKT PE=1 SV=3 - [TKT_HUMAN]*	TKT
P30041	*Peroxiredoxin-6 OS=Homo sapiens GN=PRDX6 PE=1 SV=3 - [PRDX6_HUMAN]*	PRDX6
P30050	*60S ribosomal protein L12 OS=Homo sapiens GN=RPL12 PE=1 SV=1 - [RL12_HUMAN]*	RPL12
P30086	*Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=PEBP1 PE=1 SV=3 - [PEBP1_HUMAN]*	PEBP1
P30101	*Protein disulfide-isomerase A3 OS=Homo sapiens GN=PDIA3 PE=1 SV=4 - [PDIA3_HUMAN]*	PDIA3
P30153	*Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform OS=Homo sapiens GN=PPP2R1A PE=1 SV=4 - [2AAA_HUMAN]*	PPP2R1A
P30530-2	*Isoform Short of Tyrosine-protein kinase receptor UFO OS=Homo sapiens GN=AXL - [UFO_HUMAN]*	AXL
P31150	*Rab GDP dissociation inhibitor alpha OS=Homo sapiens GN=GDI1 PE=1 SV=2 - [GDIA_HUMAN]*	GDI1
P31153-2	*Isoform 2 of S-adenosylmethionine synthase isoform type-2 OS=Homo sapiens GN=MAT2A - [METK2_HUMAN]*	MAT2A
P31431-2	*Isoform 2 of Syndecan-4 OS=Homo sapiens GN=SDC4 - [SDC4_HUMAN]*	SDC4
P31939-2	*Isoform 2 of Bifunctional purine biosynthesis protein PURH OS=Homo sapiens GN=ATIC - [PUR9_HUMAN]*	ATIC
P31944	*Caspase-14 OS=Homo sapiens GN=CASP14 PE=1 SV=2 - [CASPE_HUMAN]*	CASP14

P31946-2	*Isoform Short of 14-3-3 protein beta/alpha OS=Homo sapiens GN=YWHAB - [1433B_HUMAN]*	YWHAB
P31947-2	*Isoform 2 of 14-3-3 protein sigma OS=Homo sapiens GN=SFN - [1433S_HUMAN]*	SFN
P31948-3	*Isoform 3 of Stress-induced-phosphoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=STIP1 - [STIP1_HUMAN]*	STIP1
P31949	*Protein S100-A11 OS=Homo sapiens GN=S100A11 PE=1 SV=2 - [S10AB_HUMAN]*	S100A11
P32119	*Peroxiredoxin-2 OS=Homo sapiens GN=PRDX2 PE=1 SV=5 - [PRDX2_HUMAN]*	PRDX2
P34059	*N-acetylgalactosamine-6-sulfatase OS=Homo sapiens GN=GALNS PE=1 SV=1 - [GALNS_HUMAN]*	GALNS
P34932	*Heat shock 70 kDa protein 4 OS=Homo sapiens GN=HSPA4 PE=1 SV=4 - [HSP74_HUMAN]*	HSPA4
P35237	*Serpin B6 OS=Homo sapiens GN=SERPINB6 PE=1 SV=3 - [SPB6_HUMAN]*	SERPINB6
P35268	*60S ribosomal protein L22 OS=Homo sapiens GN=RPL22 PE=1 SV=2 - [RL22_HUMAN]*	RPL22
P35527	*Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 - [K1C9_HUMAN]*	KRT9
P35579-2	*Isoform 2 of Myosin-9 OS=Homo sapiens GN=MYH9 - [MYH9_HUMAN]*	MYH9
P35637-2	*Isoform Short of RNA-binding protein FUS OS=Homo sapiens GN=FUS - [FUS_HUMAN]*	FUS
P35900	*Keratin, type I cytoskeletal 20 OS=Homo sapiens GN=KRT20 PE=1 SV=1 - [K1C20_HUMAN]*	KRT20
P35908	*Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2 - [K22E_HUMAN]*	KRT2
P36952	*Serpin B5 OS=Homo sapiens GN=SERPINB5 PE=1 SV=2 - [SPB5_HUMAN]*	SERPINB5
P36955	*Pigment epithelium-derived factor OS=Homo sapiens GN=SERPINF1 PE=1 SV=4 - [PEDF_HUMAN]*	SERPINF1
P37802	*Transgelin-2 OS=Homo sapiens GN=TAGLN2 PE=1 SV=3 - [TAGL2_HUMAN]*	TAGLN2
P39023	*60S ribosomal protein L3 OS=Homo sapiens GN=RPL3 PE=1 SV=2 - [RL3_HUMAN]*	RPL3
P39060-2	*Isoform 3 of Collagen alpha-1(XVIII) chain OS=Homo sapiens GN=COL18A1 - [COIA1_HUMAN]*	COL18A1
P40121-2	*Isoform 2 of Macrophage-capping protein OS=Homo sapiens GN=CAPG - [CAPG_HUMAN]*	CAPG
P40227	*T-complex protein 1 subunit zeta OS=Homo sapiens GN=CCT6A PE=1 SV=3 - [TCPZ_HUMAN]*	CCT6A
P40227-2	*Isoform 2 of T-complex protein 1 subunit zeta OS=Homo sapiens GN=CCT6A - [TCPZ_HUMAN]*	CCT6A
P40925	*Malate dehydrogenase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=MDH1 PE=1 SV=4 - [MDHC_HUMAN]*	MDH1
P40925-2	*Isoform 2 of Malate dehydrogenase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=MDH1 - [MDHC_HUMAN]*	MDH1
P40926	*Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MDH2 PE=1 SV=3 - [MDHM_HUMAN]*	MDH2
P41250	*Glycine--tRNA ligase OS=Homo sapiens GN=GARS PE=1 SV=3 - [SYG_HUMAN]*	GARS
P42785	*Lysosomal Pro-X carboxypeptidase OS=Homo sapiens GN=PRCP PE=1 SV=1 - [PCP_HUMAN]*	PRCP
P43121	*Cell surface glycoprotein MUC18 OS=Homo sapiens GN=MCAM PE=1 SV=2 - [MUC18_HUMAN]*	MCAM
P43251-4	*Isoform 4 of Biotinidase OS=Homo sapiens GN=BTD - [BTD_HUMAN]*	BTD
P46940	*Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 OS=Homo sapiens GN=IQGAP1 PE=1 SV=1 - [IQGA1_HUMAN]*	IQGAP1
P47929	*Galectin-7 OS=Homo sapiens GN=LGALS7 PE=1 SV=2 - [LEG7_HUMAN]*	LGALS7
P48637	*Glutathione synthetase OS=Homo sapiens GN=GSS PE=1 SV=1 - [GSHB_HUMAN]*	GSS

P48637-2	*Isoform 2 of Glutathione synthetase OS=Homo sapiens GN=GSS - [GSHB_HUMAN]*	GSS
P48643-2	*Isoform 2 of T-complex protein 1 subunit epsilon OS=Homo sapiens GN=CCT5 - [TCPE_HUMAN]*	CCT5
P48668	*Keratin, type II cytoskeletal 6C OS=Homo sapiens GN=KRT6C PE=1 SV=3 - [K2C6C_HUMAN]*	KRT6C
P49327	*Fatty acid synthase OS=Homo sapiens GN=FASN PE=1 SV=3 - [FAS_HUMAN]*	FASN
P49368-2	*Isoform 2 of T-complex protein 1 subunit gamma OS=Homo sapiens GN=CCT3 - [TCPG_HUMAN]*	CCT3
P50395	*Rab GDP dissociation inhibitor beta OS=Homo sapiens GN=GDI2 PE=1 SV=2 - [GDIB_HUMAN]*	GDI2
P50895	*Basal cell adhesion molecule OS=Homo sapiens GN=BCAM PE=1 SV=2 - [BCAM_HUMAN]*	BCAM
P50990-2	*Isoform 2 of T-complex protein 1 subunit theta OS=Homo sapiens GN=CCT8 - [TCPQ_HUMAN]*	CCT8
P50990-3	*Isoform 3 of T-complex protein 1 subunit theta OS=Homo sapiens GN=CCT8 - [TCPQ_HUMAN]*	CCT8
P50991-2	*Isoform 2 of T-complex protein 1 subunit delta OS=Homo sapiens GN=CCT4 - [TCPD_HUMAN]*	CCT4
P51884	*Lumican OS=Homo sapiens GN=LUM PE=1 SV=2 - [LUM_HUMAN]*	LUM
P52209-2	*Isoform 2 of 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating OS=Homo sapiens GN=PGD - [6PGD_HUMAN]*	PGD
P52565	*Rho GDP-dissociation inhibitor 1 OS=Homo sapiens GN=ARHGDIA PE=1 SV=3 - [GDIR1_HUMAN]*	ARHGDIA
P52597	*Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F OS=Homo sapiens GN=HNRNPF PE=1 SV=3 - [HNRPF_HUMAN]*	HNRNPF
P52907	*F-actin-capping protein subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=CAPZA1 PE=1 SV=3 - [CAZA1_HUMAN]*	CAPZA1
P53396-2	*Isoform 2 of ATP-citrate synthase OS=Homo sapiens GN=ACLY - [ACLY_HUMAN]*	ACLY
P53634	*Dipeptidyl peptidase 1 OS=Homo sapiens GN=CTSC PE=1 SV=2 - [CATC_HUMAN]*	CTSC
P54136	*Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=RARS PE=1 SV=2 - [SYRC_HUMAN]*	RARS
P54136-2	*Isoform Monomeric of Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=RARS - [SYRC_HUMAN]*	RARS
P54578-2	*Isoform 2 of Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14 OS=Homo sapiens GN=USP14 - [UBP14_HUMAN]*	USP14
P55072	*Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Homo sapiens GN=VCP PE=1 SV=4 - [TERA_HUMAN]*	VCP
P55268	*Laminin subunit beta-2 OS=Homo sapiens GN=LAMB2 PE=1 SV=2 - [LAMB2_HUMAN]*	LAMB2
P55786	*Puromycin-sensitive aminopeptidase OS=Homo sapiens GN=NPEPPS PE=1 SV=2 - [PSA_HUMAN]*	NPEPPS
P55786-2	*Isoform 2 of Puromycin-sensitive aminopeptidase OS=Homo sapiens GN=NPEPPS - [PSA_HUMAN]*	NPEPPS
P58107	*Epiplakin OS=Homo sapiens GN=EPPK1 PE=1 SV=2 - [EPIPL_HUMAN]*	EPPK1
P60174-1	*Isoform 2 of Triosephosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=TPI1 - [TPIS_HUMAN]*	TPI1
P60174-4	*Isoform 4 of Triosephosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=TPI1 - [TPIS_HUMAN]*	TPI1
P60660	*Myosin light polypeptide 6 OS=Homo sapiens GN=MYL6 PE=1 SV=2 - [MYL6_HUMAN]*	MYL6
P60709	*Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1 - [ACTB_HUMAN]*	ACTB

P60842	*Eukaryotic initiation factor 4A-I OS=Homo sapiens GN=EIF4A1 PE=1 SV=1 - [IF4A1_HUMAN]*	EIF4A1
P60900-2	*Isoform 2 of Proteasome subunit alpha type-6 OS=Homo sapiens GN=PSMA6 - [PSA6_HUMAN]*	PSMA6
P61026	*Ras-related protein Rab-10 OS=Homo sapiens GN=RAB10 PE=1 SV=1 - [RAB10_HUMAN]*	RAB10
P61158	*Actin-related protein 3 OS=Homo sapiens GN=ACTR3 PE=1 SV=3 - [ARP3_HUMAN]*	ACTR3
P61160	*Actin-related protein 2 OS=Homo sapiens GN=ACTR2 PE=1 SV=1 - [ARP2_HUMAN]*	ACTR2
P61247	*40S ribosomal protein S3a OS=Homo sapiens GN=RPS3A PE=1 SV=2 - [RS3A_HUMAN]*	RPS3A
P61812	*Transforming growth factor beta-2 OS=Homo sapiens GN=TGFB2 PE=1 SV=1 - [TGFB2_HUMAN]*	TGFB2
P61978-3	*Isoform 3 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens GN=HNRNPK - [HNRPK_HUMAN]*	HNRNPK
P61981	*14-3-3 protein gamma OS=Homo sapiens GN=YWHAG PE=1 SV=2 - [1433G_HUMAN]*	YWHAG
P62241	*40S ribosomal protein S8 OS=Homo sapiens GN=RPS8 PE=1 SV=2 - [RS8_HUMAN]*	RPS8
P62249	*40S ribosomal protein S16 OS=Homo sapiens GN=RPS16 PE=1 SV=2 - [RS16_HUMAN]*	RPS16
P62258	*14-3-3 protein epsilon OS=Homo sapiens GN=YWHAE PE=1 SV=1 - [1433E_HUMAN]*	YWHAE
P62258-2	*Isoform SV of 14-3-3 protein epsilon OS=Homo sapiens GN=YWHAE - [1433E_HUMAN]*	YWHAE
P62491-2	*Isoform 2 of Ras-related protein Rab-11A OS=Homo sapiens GN=RAB11A - [RB11A_HUMAN]*	RAB11A
P62805	*Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2 - [H4_HUMAN]*	HIST1H4A
P62851	*40S ribosomal protein S25 OS=Homo sapiens GN=RPS25 PE=1 SV=1 - [RS25_HUMAN]*	RPS25
P62873-2	*Isoform 2 of Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1 OS=Homo sapiens GN=GNB1 - [GBB1_HUMAN]*	GNB1
P62913-2	*Isoform 2 of 60S ribosomal protein L11 OS=Homo sapiens GN=RPL11 - [RL11_HUMAN]*	RPL11
P62937	*Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Homo sapiens GN=PPIA PE=1 SV=2 - [PPIA_HUMAN]*	PPIA
P63104	*14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens GN=YWHAZ PE=1 SV=1 - [1433Z_HUMAN]*	YWHAZ
P63244	*Receptor of activated protein C kinase 1 OS=Homo sapiens GN=RACK1 PE=1 SV=3 - [RACK1_HUMAN]*	RACK1
P63267	*Actin, gamma-enteric smooth muscle OS=Homo sapiens GN=ACTG2 PE=1 SV=1 - [ACTH_HUMAN]*	ACTG2
P68032	*Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Homo sapiens GN=ACTC1 PE=1 SV=1 - [ACTC_HUMAN]*	ACTC1
P68104	*Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EEF1A1 PE=1 SV=1 - [EF1A1_HUMAN]*	EEF1A1
P68104-2	*Isoform 2 of Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EEF1A1 - [EF1A1_HUMAN]*	EEF1A1
P68363	*Tubulin alpha-1B chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1B PE=1 SV=1 - [TBA1B_HUMAN]*	TUBA1B
P68363-2	*Isoform 2 of Tubulin alpha-1B chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1B - [TBA1B_HUMAN]*	TUBA1B
P68366-2	*Isoform 2 of Tubulin alpha-4A chain OS=Homo sapiens GN=TUBA4A - [TBA4A_HUMAN]*	TUBA4A
P68371	*Tubulin beta-4B chain OS=Homo sapiens GN=TUBB4B PE=1 SV=1 - [TBB4B_HUMAN]*	TUBB4B
P68871	*Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2 - [HBB_HUMAN]*	HBB
P69905	*Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2 - [HBA_HUMAN]*	HBA1
P78324	*Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type substrate 1 OS=Homo sapiens GN=SIRPA PE=1 SV=2 - [SHPS1_HUMAN]*	SIRPA
P78324-4	*Isoform 4 of Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type substrate 1 OS=Homo sapiens GN=SIRPA - [SHPS1_HUMAN]*	SIRPA
P78371	*T-complex protein 1 subunit beta OS=Homo sapiens GN=CCT2 PE=1 SV=4 - [TCPB_HUMAN]*	CCT2
P78371-2	*Isoform 2 of T-complex protein 1 subunit beta OS=Homo sapiens GN=CCT2 - [TCPB_HUMAN]*	CCT2

P78539-4	*Isoform 4 of Sushi repeat-containing protein SRPX OS=Homo sapiens GN=SRPX - [SRPX_HUMAN]*	SRPX
P81605	*Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2 - [DCD_HUMAN]*	DCD
Q00610-2	*Isoform 2 of Clathrin heavy chain 1 OS=Homo sapiens GN=CLTC - [CLH1_HUMAN]*	CLTC
Q01469	*Fatty acid-binding protein, epidermal OS=Homo sapiens GN=FABP5 PE=1 SV=3 - [FABP5_HUMAN]*	FABP5
Q01546	*Keratin, type II cytoskeletal 2 oral OS=Homo sapiens GN=KRT76 PE=1 SV=2 - [K22O_HUMAN]*	KRT76
Q02413	*Desmoglein-1 OS=Homo sapiens GN=DSG1 PE=1 SV=2 - [DSG1_HUMAN]*	DSG1
Q02487-2	*Isoform 2B of Desmocollin-2 OS=Homo sapiens GN=DSC2 - [DSC2_HUMAN]*	DSC2
Q02790	*Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4 OS=Homo sapiens GN=FKBP4 PE=1 SV=3 - [FKBP4_HUMAN]*	FKBP4
Q02809	*Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1 OS=Homo sapiens GN=PLOD1 PE=1 SV=2 - [PLOD1_HUMAN]*	PLOD1
Q02818	*Nucleobindin-1 OS=Homo sapiens GN=NUCB1 PE=1 SV=4 - [NUCB1_HUMAN]*	NUCB1
Q04695	*Keratin, type I cytoskeletal 17 OS=Homo sapiens GN=KRT17 PE=1 SV=2 - [K1C17_HUMAN]*	KRT17
Q04760-2	*Isoform 2 of Lactoylglutathione lyase OS=Homo sapiens GN=GLO1 - [LGUL_HUMAN]*	GLO1
Q04917	*14-3-3 protein eta OS=Homo sapiens GN=YWHAH PE=1 SV=4 - [1433F_HUMAN]*	YWHAH
Q06033-2	*Isoform 2 of Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 OS=Homo sapiens GN=ITIH3 - [ITIH3_HUMAN]*	ITIH3
Q06481-5	*Isoform 5 of Amyloid-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=APLP2 - [APLP2_HUMAN]*	APLP2
Q06830	*Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens GN=PRDX1 PE=1 SV=1 - [PRDX1_HUMAN]*	PRDX1
Q07020-2	*Isoform 2 of 60S ribosomal protein L18 OS=Homo sapiens GN=RPL18 - [RL18_HUMAN]*	RPL18
Q08188	*Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E OS=Homo sapiens GN=TGM3 PE=1 SV=4 - [TGM3_HUMAN]*	TGM3
Q08257-2	*Isoform 2 of Quinone oxidoreductase OS=Homo sapiens GN=CRYZ - [QOR_HUMAN]*	CRYZ
Q08380	*Galectin-3-binding protein OS=Homo sapiens GN=LGALS3BP PE=1 SV=1 - [LG3BP_HUMAN]*	LGALS3BP
Q08431-2	*Isoform 2 of Lactadherin OS=Homo sapiens GN=MFGE8 - [MFGM_HUMAN]*	MFGE8
Q08554-2	*Isoform 1B of Desmocollin-1 OS=Homo sapiens GN=DSC1 - [DSC1_HUMAN]*	DSC1
Q09666	*Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK OS=Homo sapiens GN=AHNAK PE=1 SV=2 - [AHNK_HUMAN]*	AHNAK
Q12905	*Interleukin enhancer-binding factor 2 OS=Homo sapiens GN=ILF2 PE=1 SV=2 - [ILF2_HUMAN]*	ILF2
Q13162	*Peroxiredoxin-4 OS=Homo sapiens GN=PRDX4 PE=1 SV=1 - [PRDX4_HUMAN]*	PRDX4
Q13308-5	*Isoform 5 of Inactive tyrosine-protein kinase 7 OS=Homo sapiens GN=PTK7 - [PTK7_HUMAN]*	PTK7
Q13509	*Tubulin beta-3 chain OS=Homo sapiens GN=TUBB3 PE=1 SV=2 - [TBB3_HUMAN]*	TUBB3
Q13740-2	*Isoform 2 of CD166 antigen OS=Homo sapiens GN=ALCAM - [CD166_HUMAN]*	ALCAM
Q13835-2	*Isoform 1 of Plakophilin-1 OS=Homo sapiens GN=PKP1 - [PKP1_HUMAN]*	PKP1
Q13885	*Tubulin beta-2A chain OS=Homo sapiens GN=TUBB2A PE=1 SV=1 - [TBB2A_HUMAN]*	TUBB2A
Q14103-4	*Isoform 4 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Do OS=Homo sapiens GN=HNRNPD - [HNRPD_HUMAN]*	HNRNPD
Q14118	*Dystroglycan OS=Homo sapiens GN=DAG1 PE=1 SV=2 - [DAG1_HUMAN]*	DAG1
Q14126	*Desmoglein-2 OS=Homo sapiens GN=DSG2 PE=1 SV=2 - [DSG2_HUMAN]*	DSG2
Q14134-2	*Isoform Beta of Tripartite motif-containing protein 29 OS=Homo sapiens GN=TRIM29 - [TRI29_HUMAN]*	TRIM29

Q14240	*Eukaryotic initiation factor 4A-II OS=Homo sapiens GN=EIF4A2 PE=1 SV=2 - [IF4A2_HUMAN]*	EIF4A2
Q14563	*Semaphorin-3A OS=Homo sapiens GN=SEMA3A PE=1 SV=1 - [SEM3A_HUMAN]*	SEMA3A
Q14574-2	*Isoform 3B of Desmocollin-3 OS=Homo sapiens GN=DSC3 - [DSC3_HUMAN]*	DSC3
Q14697	*Neutral alpha-glucosidase AB OS=Homo sapiens GN=GANAB PE=1 SV=3 - [GANAB_HUMAN]*	GANAB
Q14974	*Importin subunit beta-1 OS=Homo sapiens GN=KPNB1 PE=1 SV=2 - [IMB1_HUMAN]*	KPNB1
Q15019	*Septin-2 OS=Homo sapiens GN=SEPT2 PE=1 SV=1 - [SEPT2_HUMAN]*	SEPT2
Q15046	*Lysine--tRNA ligase OS=Homo sapiens GN=KARS PE=1 SV=3 - [SYK_HUMAN]*	KARS
Q15084-3	*Isoform 3 of Protein disulfide-isomerase A6 OS=Homo sapiens GN=PDIA6 - [PDIA6_HUMAN]*	PDIA6
Q15149-7	*Isoform 7 of Plectin OS=Homo sapiens GN=PLEC - [PLEC_HUMAN]*	PLEC
Q15262	*Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa OS=Homo sapiens GN=PTPRK PE=1 SV=2 - [PTPRK_HUMAN]*	PTPRK
Q15365	*Poly(rC)-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=PCBP1 PE=1 SV=2 - [PCBP1_HUMAN]*	PCBP1
Q15828	*Cystatin-M OS=Homo sapiens GN=CST6 PE=1 SV=1 - [CYTM_HUMAN]*	CST6
Q16181-2	*Isoform 2 of Septin-7 OS=Homo sapiens GN=SEPT7 - [SEPT7_HUMAN]*	SEPT7
Q16270-2	*Isoform 2 of Insulin-like growth factor-binding protein 7 OS=Homo sapiens GN=IGFBP7 - [IBP7_HUMAN]*	IGFBP7
Q16555-2	*Isoform 2 of Dihydropyrimidinase-related protein 2 OS=Homo sapiens GN=DPYSL2 - [DPYL2_HUMAN]*	DPYSL2
Q16658	*Fascin OS=Homo sapiens GN=FSCN1 PE=1 SV=3 - [FSCN1_HUMAN]*	FSCN1
Q16769	*Glutaminyl-peptide cyclotransferase OS=Homo sapiens GN=QPCT PE=1 SV=1 - [QPCT_HUMAN]*	QPCT
Q16851-2	*Isoform 2 of UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase OS=Homo sapiens GN=UGP2 - [UGPA_HUMAN]*	UGP2
Q3SY84	*Keratin, type II cytoskeletal 71 OS=Homo sapiens GN=KRT71 PE=1 SV=3 - [K2C71_HUMAN]*	KRT71
Q4VXU2-2	*Isoform 2 of Polyadenylate-binding protein 1-like OS=Homo sapiens GN=PABPC1L - [PAP1L_HUMAN]*	PABPC1L
Q562R1	*Beta-actin-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=ACTBL2 PE=1 SV=2 - [ACTBL_HUMAN]*	ACTBL2
Q5D862	*Filaggrin-2 OS=Homo sapiens GN=FLG2 PE=1 SV=1 - [FILA2_HUMAN]*	FLG2
Q5T749	*Keratinocyte proline-rich protein OS=Homo sapiens GN=KPRP PE=1 SV=1 - [KPRP_HUMAN]*	KPRP
Q5TFQ8	*Signal-regulatory protein beta-1 isoform 3 OS=Homo sapiens GN=SIRPB1 PE=1 SV=1 - [SIRBL_HUMAN]*	SIRPB1
Q6E0U4-7	*Isoform 7 of Dermokine OS=Homo sapiens GN=DMKN - [DMKN_HUMAN]*	DMKN
Q6KB66-2	*Isoform 2 of Keratin, type II cytoskeletal 80 OS=Homo sapiens GN=KRT80 - [K2C80_HUMAN]*	KRT80
Q6S8J3	*POTE ankyrin domain family member E OS=Homo sapiens GN=POTEE PE=2 SV=3 - [POTEE_HUMAN]*	POTEE
Q6UWP8	*Suprabasin OS=Homo sapiens GN=SBSN PE=1 SV=2 - [SBSN_HUMAN]*	SBSN
Q6YHK3	*CD109 antigen OS=Homo sapiens GN=CD109 PE=1 SV=2 - [CD109_HUMAN]*	CD109
Q6YHK3-2	*Isoform 2 of CD109 antigen OS=Homo sapiens GN=CD109 - [CD109_HUMAN]*	CD109
Q6ZVX7	*F-box only protein 50 OS=Homo sapiens GN=NCCRP1 PE=1 SV=1 - [FBX50_HUMAN]*	NCCRP1

Q71U36-2	*Isoform 2 of Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1A - [TBA1A_HUMAN]*	TUBA1A
Q7RTS7	*Keratin, type II cytoskeletal 74 OS=Homo sapiens GN=KRT74 PE=1 SV=2 - [K2C74_HUMAN]*	KRT74
Q7Z3Y8	*Keratin, type I cytoskeletal 27 OS=Homo sapiens GN=KRT27 PE=1 SV=2 - [K1C27_HUMAN]*	KRT27
Q7Z406-4	*Isoform 4 of Myosin-14 OS=Homo sapiens GN=MYH14 - [MYH14_HUMAN]*	MYH14
Q7Z794	*Keratin, type II cytoskeletal 1b OS=Homo sapiens GN=KRT77 PE=2 SV=3 - [K2C1B_HUMAN]*	KRT77
Q86SQ4	*Adhesion G-protein coupled receptor G6 OS=Homo sapiens GN=ADGRG6 PE=1 SV=3 - [AGRG6_HUMAN]*	ADGRG6
Q86SQ4-2	*Isoform 2 of Adhesion G-protein coupled receptor G6 OS=Homo sapiens GN=ADGRG6 - [AGRG6_HUMAN]*	ADGRG6
Q86X29-6	*Isoform 6 of Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor OS=Homo sapiens GN=LSR - [LSR_HUMAN]*	LSR
Q86Y46	*Keratin, type II cytoskeletal 73 OS=Homo sapiens GN=KRT73 PE=1 SV=1 - [K2C73_HUMAN]*	KRT73
Q86Y46-2	*Isoform 2 of Keratin, type II cytoskeletal 73 OS=Homo sapiens GN=KRT73 - [K2C73_HUMAN]*	KRT73
Q86YZ3	*Hornerin OS=Homo sapiens GN=HRNR PE=1 SV=2 - [HORN_HUMAN]*	HRNR
Q8IZP2	*Putative protein FAM10A4 OS=Homo sapiens GN=ST13P4 PE=5 SV=1 - [ST134_HUMAN]*	ST13P4
Q8N1N4	*Keratin, type II cytoskeletal 78 OS=Homo sapiens GN=KRT78 PE=2 SV=2 - [K2C78_HUMAN]*	KRT78
Q8N1N4-2	*Isoform 2 of Keratin, type II cytoskeletal 78 OS=Homo sapiens GN=KRT78 - [K2C78_HUMAN]*	KRT78
Q8N2S1-2	*Isoform 2 of Latent-transforming growth factor beta-binding protein 4 OS=Homo sapiens GN=LTBP4 - [LTBP4_HUMAN]*	LTBP4
Q8NBJ4-2	*Isoform 2 of Golgi membrane protein 1 OS=Homo sapiens GN=GOLM1 - [GOLM1_HUMAN]*	GOLM1
Q8NC51-4	*Isoform 4 of Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein OS=Homo sapiens GN=SERBP1 - [PAIRB_HUMAN]*	SERBP1
Q8NES3-3	*Isoform 3 of Beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase lunatic fringe OS=Homo sapiens GN=LFNG - [LFNG_HUMAN]*	LFNG
Q8WUM4	*Programmed cell death 6-interacting protein OS=Homo sapiens GN=PDCD6IP PE=1 SV=1 - [PDC6I_HUMAN]*	PDCD6IP
Q8WUT4	*Leucine-rich repeat neuronal protein 4 OS=Homo sapiens GN=LRRN4 PE=2 SV=3 - [LRRN4_HUMAN]*	LRRN4
Q8WVQ1-3	*Isoform 3 of Soluble calcium-activated nucleotidase 1 OS=Homo sapiens GN=CANT1 - [CANT1_HUMAN]*	CANT1
Q8WVV4	*Protein POF1B OS=Homo sapiens GN=POF1B PE=1 SV=3 - [POF1B_HUMAN]*	POF1B
Q92598-2	*Isoform Beta of Heat shock protein 105 kDa OS=Homo sapiens GN=HSPH1 - [HS105_HUMAN]*	HSPH1
Q92692-2	*Isoform Alpha of Nectin-2 OS=Homo sapiens GN=NECTIN2 - [NECT2_HUMAN]*	NECTIN2
Q92817	*Envoplakin OS=Homo sapiens GN=EVPL PE=1 SV=3 - [EVPL_HUMAN]*	EVPL
Q92820	*Gamma-glutamyl hydrolase OS=Homo sapiens GN=GGH PE=1 SV=2 - [GGH_HUMAN]*	GGH
Q92841-1	*Isoform 2 of Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 OS=Homo sapiens GN=DDX17 - [DDX17_HUMAN]*	DDX17
Q96AE4	*Far upstream element-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=FUBP1 PE=1 SV=3 - [FUBP1_HUMAN]*	FUBP1
Q96KK5	*Histone H2A type 1-H OS=Homo sapiens GN=HIST1H2AH PE=1 SV=3 - [H2A1H_HUMAN]*	HIST1H2AH

Q96KP4	*Cytosolic non-specific dipeptidase OS=Homo sapiens GN=CNDP2 PE=1 SV=2 - [CNDP2_HUMAN]*	CNDP2
Q96KP4-2	*Isoform 2 of Cytosolic non-specific dipeptidase OS=Homo sapiens GN=CNDP2 - [CNDP2_HUMAN]*	CNDP2
Q96P63	*Serpin B12 OS=Homo sapiens GN=SERPINB12 PE=1 SV=1 - [SPB12_HUMAN]*	SERPINB12
Q96PD2	*Discoidin, CUB and LCCL domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=DCBLD2 PE=1 SV=1 - [DCBD2_HUMAN]*	DCBLD2
Q96TA1-2	*Isoform 2 of Niban-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=FAM129B - [NIBL1_HUMAN]*	FAM129B
Q99536	*Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog OS=Homo sapiens GN=VAT1 PE=1 SV=2 - [VAT1_HUMAN]*	VAT1
Q99536-2	*Isoform 2 of Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog OS=Homo sapiens GN=VAT1 - [VAT1_HUMAN]*	VAT1
Q99832-3	*Isoform 3 of T-complex protein 1 subunit eta OS=Homo sapiens GN=CCT7 - [TCPH_HUMAN]*	CCT7
Q99832-4	*Isoform 4 of T-complex protein 1 subunit eta OS=Homo sapiens GN=CCT7 - [TCPH_HUMAN]*	CCT7
Q99985	*Semaphorin-3C OS=Homo sapiens GN=SEMA3C PE=2 SV=2 - [SEM3C_HUMAN]*	SEMA3C
Q99988	*Growth/differentiation factor 15 OS=Homo sapiens GN=GDF15 PE=1 SV=3 - [GDF15_HUMAN]*	GDF15
Q9BQE3	*Tubulin alpha-1C chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1C PE=1 SV=1 - [TBA1C_HUMAN]*	TUBA1C
Q9BQT9	*Calsyntenin-3 OS=Homo sapiens GN=CLSTN3 PE=1 SV=1 - [CSTN3_HUMAN]*	CLSTN3
Q9NPH2-2	*Isoform 2 of Inositol-3-phosphate synthase 1 OS=Homo sapiens GN=ISYNA1 - [INO1_HUMAN]*	ISYNA1
Q9NRN5	*Olfactomedin-like protein 3 OS=Homo sapiens GN=OLFML3 PE=2 SV=1 - [OLFL3_HUMAN]*	OLFML3
Q9NRN5-2	*Isoform 2 of Olfactomedin-like protein 3 OS=Homo sapiens GN=OLFML3 - [OLFL3_HUMAN]*	OLFML3
Q9NRN5-3	*Isoform 3 of Olfactomedin-like protein 3 OS=Homo sapiens GN=OLFML3 - [OLFL3_HUMAN]*	OLFML3
Q9NZT1	*Calmodulin-like protein 5 OS=Homo sapiens GN=CALML5 PE=1 SV=2 - [CALL5_HUMAN]*	CALML5
Q9UBP4	*Dickkopf-related protein 3 OS=Homo sapiens GN=DKK3 PE=1 SV=2 - [DKK3_HUMAN]*	DKK3
Q9UBR2	*Cathepsin Z OS=Homo sapiens GN=CTSZ PE=1 SV=1 - [CATZ_HUMAN]*	CTSZ
Q9UNN8	*Endothelial protein C receptor OS=Homo sapiens GN=PROCR PE=1 SV=1 - [EPCR_HUMAN]*	PROCR
Q9UNW1	*Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1 OS=Homo sapiens GN=MINPP1 PE=1 SV=1 - [MINP1_HUMAN]*	MINPP1
Q9UQ80-2	*Isoform 2 of Proliferation-associated protein 2G4 OS=Homo sapiens GN=PA2G4 - [PA2G4_HUMAN]*	PA2G4
Q9Y230	*RuvB-like 2 OS=Homo sapiens GN=RUVBL2 PE=1 SV=3 - [RUVB2_HUMAN]*	RUVBL2
Q9Y265	*RuvB-like 1 OS=Homo sapiens GN=RUVBL1 PE=1 SV=1 - [RUVB1_HUMAN]*	RUVBL1
Q9Y2J8	*Protein-arginine deiminase type-2 OS=Homo sapiens GN=PADI2 PE=1 SV=2 - [PADI2_HUMAN]*	PADI2
Q9Y446	*Plakophilin-3 OS=Homo sapiens GN=PKP3 PE=1 SV=1 - [PKP3_HUMAN]*	PKP3
Q9Y4K0	*Lysyl oxidase homolog 2 OS=Homo sapiens GN=LOXL2 PE=1 SV=1 - [LOXL2_HUMAN]*	LOXL2
Q9Y617	*Phosphoserine aminotransferase OS=Homo sapiens GN=PSAT1 PE=1 SV=2 - [SERC_HUMAN]*	PSAT1

Q9Y617-2	*Isoform 2 of Phosphoserine aminotransferase OS=Homo sapiens GN=PSAT1 [SERC_HUMAN]*	PSAT1