



Universitat de Girona

# NOUS MECANISMES DE RESISTÈNCIA PRIMÀRIA AL TRASTUZUMAB (HERCEPTIN): BASES MOLECULARS PER A LA DETERMINACIÓ D'UN NOU SUBTIPUS DE CÀNCER DE MAMA (BASAL/ERBB2+)

**Cristina OLIVERAS FERRARÓS**

**Dipòsit legal: Gi. 992-2013**

<http://hdl.handle.net/10803/117355>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



TESI DOCTORAL

**Nous mecanismes de resistència primària al  
trastuzumab (Herceptin): Bases moleculars  
per a la determinació d'un nou subtipus de  
càncer de mama (Basal/ErbB2+)**

Cristina Oliveras Ferrarós

2013





# Universitat de Girona

TESI DOCTORAL

**Nous mecanismes de resistència primària al  
trastuzumab (Herceptin): Bases moleculars per a  
la determinació d'un nou subtipus de càncer de  
mama (Basal/ErbB2+)**

Cristina Oliveras Ferrarós

2013

Ciències Experimentals i Sostenibilitat

Dirigida per : Dr. Javier A. Menéndez

Tutor: Dr. Rafael de Llorens

Memòria presentada per optar al títol de doctora per la Universitat de Girona

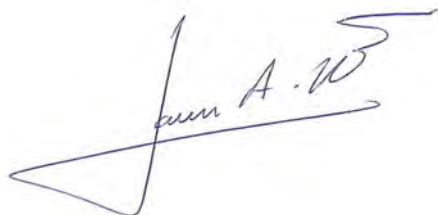


**Javier Abel Menéndez Menéndez**, Doctor en Bioquímica y Biología Molecular, Cap del Laboratori de Recerca translacional del Institut Català d'Oncologia de Girona (ICO-Girona) i Coordinador del Grup d'Oncologia Molecular del Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IDIBGi),

Certifica que,

La **CRISTINA OLIVERAS FERRARÓS** ha realitzat sota direcció i supervisió durant els últims quatre anys el treball de recerca titulat "**Nous mecanismes de resistència primària al trastuzumab (Herceptin): Bases moleculars per a la determinació d'un nou subtipus de càncer de mama (Basal/ErbB2+)**". És la seva intenció presentar-lo com a treball de tesi i així optar al Títol de Doctora per la Universitat de Girona (UdG). Per la dedicació, rigor i serietat del mateix pot àmpliament ser defensat per aquest fi. El sotasignat vol informar que ha dirigit i supervisat personalment els experiments reflectits en el mateix. Considera que aquest treball de recerca té els requisits d'originalitat, qualitat i excel·lència necessaris per ser presentat i defensat com a treball de tesi.

Per a què així consti, firmo el present certificat a Girona, dia 3 de Gener del 2013.



**Dr. Javier A. Menéndez.**

**DNI: 32878534B**



Com es pot agrair, sense quedar curt de paraules, a totes aquelles persones que han posat el seu gra de sorra, petit o gran, en la realització d'aquesta tesi doctoral.

En el terreny personal, agrair als pares l'oportunitat que em van donar ajudant-me sempre en la meva educació i formació. A la parella, germans i amics per totes les estones que et recorden que no tot és la feina, però que t'animen en els moments difícils. I a les meves dues nenes pel somriure que provoquen cada dia.

Per descomptat que en l'àmbit laboral els agraïments són pels integrants del meu grup de recerca que amb ells ens hem frustrat, alegrat, emocionat.... i sense l'ajuda dels quals res no hauria estat possible. Als companys del laboratori que sempre hi són per donar un cop de mà. I finalment, agrair a en Javier, la persona que més m'ha ensenyat, i que sense la seva direcció, comprensió, manera de fer i ajuda, res no hauria estat possible.

A tots ells, mil gràcies.





## Publicacions derivades d'aquesta tesi

El contingut d'aquesta tesi està basat en els següents articles

### ARTICLE 1

Oliveras-Ferraros, C., et al., *Inhibitor of apoptosis (IAP) survivin is indispensable for survival of Her2 gene-amplified breast cancer cells with de novo resistance to Her1/2-targeted therapies*. Biochem Biophys Res Commun. 2011. 407(2): p. 412-9

### ARTICLE 2

Oliveras-Ferraros, C., et al., *Pathway-focused proteomic signatures in HER2-overexpressing breast cancer with a basal-like phenotype: new insights into de novo resistance to trastuzumab (Herceptin)*. Int J Oncol. 2010. 37(3): p. 669-78.

### ARTICLE 3

Oliveras-Ferraros, C., et al., *Dynamic emergence of the mesenchymal CD44(pos)CD24(neg/low) phenotype in HER2-gene amplified breast cancer cells with de novo resistance to trastuzumab (Herceptin)*. Biochem Biophys Res Commun. 2010. 397(1): p. 27-33.

### ARTICLE 4

Oliveras-Ferraros, C., et al., *Eptihelial-to-mesenchymal transition (EMT) confers primary resistance to trastuzumab (Herceptin)*. Cell Cycle. 2012. 11(21): p. 4020-32

### ARTICLE 5

Vazquez-Martin, A., et al., *The anti-diabetic drug metformin suppresses self-renewal and proliferation of trastuzumab-resistant tumor-initiating breast cancer stem cells*. Breast Cancer Res Treat. 2011. 126(2): p. 355-64

### ARTICLE 6

Cufi, S., et al., *Metformin-induced preferential killing of breast cancer initiating CD44+CD24-/low cells is sufficient to overcome primary resistance to trastuzumab in HER2+ human breast cancer xenografts*. Oncotarget. 2012. 3(4): p. 395-8.



## Taula d'abreviacions

Abreviatura	Significat
Acm	Anticòs monoclonal
ADCC	Citotoxicitat cel·lular dependent d'anticossos
ALDH <sub>1</sub>	Aldehyde dehydrogenase 1
AR	Amfiregulina
ATP	Adenosina trifosfada
BTC	Betacellulina
CMT	Cèl·lula mare tumoral
DEC	Domini extracel·lular
EFM	Eficiència en la formació de mamosferes
EGF	De l'anglès <i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	De l'anglès <i>Epidermal growth factor receptor</i>
EPR	Epiregulina
ErbB	Erithroblastic Leukemia Viral Oncogen Homolog
FDA	De l'anglès <i>Federal drug administration</i>
FGFR	De l'anglès <i>Fibroblast growth factor receptor</i>
HB-EGF	De l'anglès <i>Heparin binding EGF</i>
HGF	De l'anglès <i>Hepatocyte Growth factor</i>
HMLE	De l'anglès <i>Human mammary epithelial cells</i>
HMLN	De l'anglès <i>Her2/neu-infected HMLE cells</i>
HMLER	De l'anglès <i>Ras-transformed HMLE cells</i>
HRG	Heregulina
IGF-1R	De l'anglès <i>Insulin growth factor receptor 1</i>
IGF-1R	De l'anglès <i>Insulin growth factor receptor 1</i>
ITC	Inhibidors de tirosina cinasa

---

MACS	De l'anglès <i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MAPK	De l'anglès <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
miRNA	Micro RNA
Muc-4	Mucin-4
NRG	Neuregulina
PDGFR	De l'anglès <i>Platelet derived growth factor receptor</i>
PI3K	De l'anglès <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PIA	Proteïna inhibidora de l'apoptosi
PKC	De l'anglès <i>Protein kinase C</i>
PTEN	De l'anglès <i>Phosphatase and tensin homolog</i>
TEM	Transició epiteli-mesenquima
TGF $\alpha/\beta$	De l'anglès <i>Transforming growth factor <math>\alpha/\beta</math></i>
TME	Transició mesènquima-epiteli
TR	Tomoregulina
VEFG	De l'anglès <i>Vascular endotelial growth factor</i>

---

## Índex de figures

- Figura 1.** Representació esquemàtica del que ha de succeir en una cèl·lula per esdevenir tumoral. **16**
- Figura 2.** Origen del càncer de mama; en la teoria tradicional A) la majoria de cèl·lules del tumor tenen la capacitat de proliferar indefinidament i generar nous tumors, mentre que en la teoria de les cèl·lules mare B), només les CMT poden proliferar indefinidament i generar nous tumors. **17**
- Figura 3.** Etapes de la generació d'un tumor. **17**
- Figura 4.** Evolució de la complexitat de la via de senyalització de la família ErbB. **21**
- Figura 5.** Estructura bàsica d'un receptor transmembrana. El domini extracel·lular està format per 4 subdominis la funció dels quals és reconèixer el factor de creixement i dimeritzar amb un altre receptor ErbB, un domini transmembrana que garanteix la localització del receptor a la membrana i un domini intracel·lular amb activitat tirosina cinasa que és el que inicia la transmissió del senyal. **23**
- Figura 6.** Especificitat d'unió dels factors de creixement. Segons l'afinitat per un o altre receptor, els factors de creixement es divideixen en quatre grups. **27**
- Figura 7.** A) Mecanisme d'activació dels ErbB. La solubilització del lligand per part de les proteases permet que aquest s'uneixi al receptor. La unió causa un canvi conformacional al receptor que permet la formació de dímers i la fosforil·lació del domini intracel·lular. En aquest punt s'inicia una cascada que permet la transmissió del senyal fins al nucli on s'iniciarà

una resposta biològica. B) Reclutament específic de les molècules efectores per part de cada residu de tirosina fosforil·lada del receptor. 29

**Figura 8.** Estructura de la via de transmissió del senyal de la via ErbB. En mamífers, la xarxa té forma de llaç i es pot dividir en 3 etapes: input o reconeixement del senyal; processament del senyal i output o resposta biològica generada. 31

**Figura 9.** Internalització d'un receptor ErbB mediada per la unió d'aquest amb un lligand. 33

**Figura 10.** Representació dels inhibidors de l'activitat cinasa dels receptors ErbB. El cetuximab i el trastuzumab són dos anticossos monoclonals dirigits contra el domini extracel·lular d'ErbB1 i ErbB2 respectivament. El gefitinib i l'erlotinib són dos inhibidors de l'activitat tirosina cinasa del receptor ErbB1. El lapatinib és un altre inhibidor de l'activitat cinasa però que és capaç d'inhibir ErbB1 i ErbB2. 41

**Figura 11.** Resum d'alguns mecanismes implicats en la resistència al trastuzumab. A. alteració del sistema immunològic, B. alteració en el reconeixement del receptor, C. alteració en el procés d'endocitosi, D. aparició d'una forma truncada o E. d'una mutació del receptor que l'activa, F. Producció excessiva de lligands dels receptors de la via ErbB i per tant, G. activació d'altres membres de la família, H. activació d'ErbB2 per part d'altres receptors de membrana independents a la família ErbB, I. disminució de l'activitat de PTEN i J. alteració en el control que té p27 del cicle cel·lular. 48

**Figura 12.** A) Durant la transició epiteli-mesènquima es perden les unions entre les cèl·lules epitelials adjacents, es perd la polaritat apico-basolateral, es degrada la matriu extracel·lular i

es modifica el citoesquelet de les cèl·lules donant com a resultat cèl·lules mesenquimals. B) característiques diferencials entre cèl·lules epitelials i mesenquimals. **53**

**Figura 13.** Implicació de la TEM i la TME en l'evolució del càncer. **55**

**Figura 14.** Implicació de la TEM en la resposta al Trastuzumab. D'entre la proporció de CMT que constitueixen un tumor luminal/ErbB2, només una petita fracció de cèl·lules té el fenotip TEM i això comporta que hi hagi una resposta inicial al tractament amb l'Acm trastuzumab. En canvi, en un tumor basal/ErbB2, la proporció de cèl·lules amb fenotip de TEM i resistents a la teràpia dirigida és molt més important, fet que comporta una resistència intrínseca al trastuzumab. **140**

**Figura 15.** Relació entre la classificació molecular del càncer de mama i de les línies cel·lulars de càncer de mam establertes amb la TEM i la resposta a la teràpia dirigida contra ErbB2, trastuzumab. Les línies cel·lulars que sobreexpressen ErbB2 amb resistència al tractament són aquelles classificades com a tipus basal, mentre que les luminals en són sensibles. Quan relacionem la resistència amb la TEM podem veure que hi ha una correlació positiva entre aquelles línies que són basal/ErbB2+ amb la sobreexpressió de SLUG/SNAI2, però no amb els altres paràmetres de la TEM analitzats. **142**





## Índex de taules

**Taula 1.** Taula representativa de les principals característiques dels diferents tipus de càncer de mama. **19**

**Taula 2.** Anticossos monoclonals aprovats o en revisió a la Unió Europea o als Estats Units d'Amèrica. Dades actualitzades al juny 2012 per la *The Antibody Society* ([http://www.antibodysociety.org/news/approved\\_mabs.php](http://www.antibodysociety.org/news/approved_mabs.php)). **40**

**Taula 3.** Caracterització immunohistoquímica de la línia cel·lular de càncer de mama JIMT-1. **50**

**Taula 4.** Resum dels factors de transcripció implicats en la TEM i que regulen les propietats de les CMT. **54**



## Índex

Agraïments	i
Publicacions derivades d'aquesta tesi	iii
Taula d'abreviacions	v
Índex de figures	vii
Índex de taules	xi
Resum	1
Resumen	5
Summary	9
1. INTRODUCCIÓ	13
1.1 La família ErbB	20
1.1.1 Estructura dels receptors	21
1.1.2 Via de senyalització	25
1.1.3 Eliminació del senyal generat pels ErbBs	32
1.2 ErbB i el càncer	34
1.3 Teràpies	37
1.3.1 Trastuzumab (Herceptin)	41
1.3.2 Mecanismes de resistència coneguts al trastuzumab	43
1.4 Cèl·lules mare tumorals (CMT) i transició epiteli-mesènquima (TEM)	51
2. HIPÒTESI	57
3. OBJECTIUS	61
4. MATERIALS, MÈTODES I RESULTATS	65
4.1 Article 1	67
4.2 Article 2	77
4.3 Article 3	89
4.4 Article 4	99

4.5 Article 5	115
4.6 Article 6	127
5. DISCUSIÓ	133
6. CONCLUSIONS	147
7. BIBLIOGRAFIA	151
8. Annex I. <i>Curriculum Vitae</i>	169

## Resum

La resistència primària del càncer de mama ErbB2+ a les teràpies dirigides contra ErbB (com l'anticòs monoclonal antiErbB2 trastuzumab) es pot explicar bé per la sobreactivació de vies de supervivència independents de la senyalització mediada per ErbB2, o bé per la presència de cèl·lules amb un fenotip de cèl·lules mare tumorals (CMT)  $CD44^+/CD24^{-/low}$ . En conjunt, els nostres resultats suggereixen per primera vegada que la resistència primària al trastuzumab té lloc en el marc d'un nou subtipus intrínsec de càncer de mama. En aquest estudi hem utilitzat una gran varietat de tècniques de biologia cel·lular i molecular i les cèl·lules anomenades JIMT-1, un model únic de resistència intrínseca a les teràpies dirigides contra ErbB2 que es va aïllar del fluid pleural metastàtic d'una pacient el tumor de la qual tenia ampliació de l'oncògen ErbB2 però que va progressar ràpidament tot i el tractament amb trastuzumab. La nostra aproximació experimental sistemàtica *in vitro* i *in vivo* en el model JIMT-1 ha estat capaç de :

1. Confirmar que la sobreexpressió de survivina, una proteïna inhibidora de l'apoptosi (PIA), és indispensable per la supervivència de cèl·lules ErbB2+ amb resistència intrínseca a múltiples inhibidors anti ErbB1/ErbB2. Mitjançant l'ús de tècniques d'ELISA i *immunoblotting* hem observat que les JIMT-1 expressen 4 vegades més survivina que les cèl·lules ErbB2+ sensibles al trastuzumab; en resposta al trastuzumab, els nivells de survivina augmenten fins a 10 vegades més que els observats en les cèl·lules sensibles. Estudis d'ELISA capaços de detectar específicament els fragments de DNA associats a histones (apoptosi) han demostrat que les JIMT-1 estan protegides de l'efecte proapoptòtic induït per varis inhibidors de tirosina cinasa dirigits contra ErbB1 i/o ErbB2. El silenciament de la survivina amb siRNAs ha permès que el trastuzumab inhibeixi significativament la proliferació del es cèl·lules JIMT-1. Els resultats obtinguts podrien ser de gran utilitat per dissenyar noves estratègies de tractament basades en l'ús d'antagonistes de la survivina que podrien impedir la resistència intrínseca a les teràpies antiErbB2.
2. Caracteritzar un nou subtipus de carcinoma de mama amb un fenotip mixt basal/ErbB2+ que, entre altres característiques, presenta un baix grau de diferenciació i resistència intrínseca al trastuzumab tot i la presència d'amplificació gènica en el locus ErbB2. Mitjançant l'ús de tècniques proteòmiques de baixa densitat com matrius d'anticossos, hem analitzat l'ambient extracel·lular de les JIMT-1 (resistents) i l'hem comparat amb el de les SKBR3 (sensibles); de forma significativa, les primeres secreten més factors de creixement. L'anàlisi de l'estat d'activació dels 42 receptors amb activitat tirosina cinasa ha revelat que les cèl·lules JIMT-1 tenen hiperactivat el receptor del factor de creixement tipus I de la insulina (IGF-1R). Estudis amb microscòpia de fluorescència han posat de manifest l'existència d'una relocalització de la forma activa d' IGF-1R en estructures del citoesquelet cel·lular que estan directament relacionades amb un fenotip mesenquimal migratori.
3. Determinar que la resistència intrínseca al trastuzumab es pot relacionar amb la regulació dinàmica del fenotip mesenquimal  $CD44^+/CD24^{-/low}$  en carcinomes

de mama ErbB2+. Els nostres resultats recolzen a les evidències recents que suggereixen que la subpoblació cel·lular  $CD44^+/CD24^{-/low}$ , que sembla estar enriquida amb cèl·lules mare tumorals, pot ser la veritable responsable de la resistència clínica a les teràpies dirigides contra ErbB2. Hem vist que la subpoblació de cèl·lules que formen la línia cel·lular JIMT-1 i que expressen  $CD44^+/CD24^{-/low}$  varia al llarg del temps en cultiu. Concretament, aquesta subpoblació passa de constituir aproximadament el 10% de la població global en etapes inicials, al 80% (proporció similar a la de la línia cel·lular MDA-MB-231, que és purament mesenquimal), en etapes tardanes del cultiu. L'aparició dinàmica de marcadors mesenquimals no es limita només al fenotip  $CD44^+/CD24^{-/low}$ , sinó que també hem observat una reducció significativa dels nivells d'expressió del receptor ErbB2 i una sobreexpressió de quimiocines i metaloproteases proinvasives i metastàtiques. Tots aquests canvis estan acompanyats d'un augment en la capacitat de migració de les cèl·lules ErbB2+ amb resistència intrínseca al trastuzumab.

Servint-nos de les firmes transcriptòmiques i la caracterització molecular de totes les línies cel·lulars de càncer de mama actualment establertes (n=51) realitzada pel Lawrence Berkeley National Laboratory (LBL) l'any 2001, hem estat capaços de relacionar la presència/absència de propietats associades amb el procés de transició epitelial-mesenquima (TEM) amb els nivells d'expressió d'ErbB2 i la resposta primària al trastuzumab. Hem confirmat que la sobreexpressió de SLUG/SNAIL2 (un factor de transcripció directament relacionat amb l'activació de la TEM) es correlaciona positivament amb la resistència primària al trastuzumab en un subgrup de línies cel·lulars d'un subtipus que hem anomenat "basal/ErbB2+". Per confirmar aquesta hipòtesi, i mitjançant l'ús de vectors lentivirals, hem silenciat de manera específica i estable factors de transcripció que regulen la TEM en les cèl·lules JIMT-1. Hem realitzat estudis de proliferació *in vitro* i estudis preclínic amb xenoempelts en ratolins atímics *in vivo* per a determinar la implicació causal dels factors de transcripció que regulen la TEM en la resistència intrínseca al trastuzumab. L'eliminació específica del factor de transcripció SLUG/SNAIL2 causa una supressió quasi total del fenotip  $CD44^+/CD24^{-/low}$  mitjançant l'activació transcripcional del marcador epitelial luminal CD24 en les cèl·lules basal/ErbB2+. De la mateixa manera, un cop silenciat SLUG/SNAIL2, les cèl·lules basal/ErbB2+ recuperen la sensibilitat als efectes inhibidors del creixement tumoral induïts pel trastuzumab. L'aïllament de les cèl·lules  $CD44^+/CD24^{-/low}$  mitjançant la tècnica MACS (de l'anglès *magnetic-activated cell sorting*) ha confirmat la resistència d'aquesta subpoblació cel·lular al trastuzumab. Els estudis *in vivo* han confirmat una reducció del volum tumoral i un augment dràstic de la sensibilitat al trastuzumab en els tumors originats a partir de les cèl·lules basal/ErbB2+ amb silenciament estable del gen SLUG/SNAIL2+. Els factors de transcripció de la TEM semblen induir una elevada plasticitat fenotípica que pot permetre intrínsecament a les cèl·lules basal/ErbB2+ entrar i sortir d'un estat de resistència o sensibilitat al trastuzumab. La determinació sistemàtica de SLUG/SNAIL2 com a proteïna associada al fenotip mesenquimal de la subpoblació  $CD44^+/CD24^{-/low}$  podria incrementar el benefici terapèutic dels tractaments dirigits en el càncer de mama ErbB2+.

Els nostres estudis, finalment han avaluat nous tractaments capaços de restaurar la sensibilitat al trastuzumab mitjançant la supressió del fenotip mesenquimal  $CD44^+/CD24^{-/low}$ . Hem demostrat per primera vegada que la metformina, un fàrmac usat habitualment en el tractament de la diabetis tipus 2, interacciona sinèrgicament amb el trastuzumab al poder eliminar la subpoblació de cèl·lules mare/progenitores  $CD44^+/CD24^{-/low}$  presents en els fenotips basal/ErbB2+. Utilitzant la tècnica de cultiu de mamosferes, el tractament amb metformina ha reduït significativament l'eficiència de formació de mamosferes (EFM) -és a dir, la capacitat d'autorenovació de les CMT i el número total de mamosferes- en cèl·lules ErbB2+ sensibles al trastuzumab o amb resistència primària (intrínseca) o secundària (adquirida). D'altra banda, el tractament amb trastuzumab només pot reduir significativament l'EFM en les cèl·lules sensibles, però no en les resistents. La combinació de metformina i trastuzumab redueix de forma supra-additiva (sinèrgica) l'EFM i la mida de les mamosferes en les cèl·lules resistents. Estudis de citometria de flux han confirmat que la combinació simultània de metformina i trastuzumab redueix significativament el percentatge de cèl·lules  $CD44^+/CD24^{-/low}$ .

Després de l'aïllament de les cèl·lules  $CD44^+/CD24^{-/low}$  mitjançant la tecnologia MACS hem confirmat que l'activitat antitumoral de la metformina depèn de la presència o no del fenotip  $CD44^+/CD24^{-/low}$ . Les cèl·lules  $CD44^+/CD24^{-/low}$  són 10 vegades més sensibles als efectes citotòxics de la metformina que les cèl·lules no- $CD44^+/CD24^{-/low}$ . El tractament amb trastuzumab durant 7 setmanes és incapaç de reduir la mida dels tumors formats per les cèl·lules JIMT-1 en ratolins atímics; el tractament amb metformina causa una reducció de fins a dues vegades la mida del tumor, mentre que la combinació simultània del trastuzumab i la metformina en redueix fins a 4 vegades el volum. Donat que l'acció preferent de la metformina sobre les cèl·lules  $CD44^+/CD24^{-/low}$  permet superar la resistència al trastuzumab en models *in vivo*, la incorporació de la metformina en els règims de tractament basats en el trastuzumab podria constituir una estratègia de tractament eficaç per a combatre el càncer de mama ErbB2+ amb resistència primària al trastuzumab.

La nostra aproximació experimental demostra per primer cop que la resistència primària a teràpies biològiques dirigides específicament contra l'oncoproteïna ErbB2 es pot explicar en termes de l'enriquiment intrínsec del caràcter mesenquimal de subpoblacions cel·lulars suposadament enriquides amb "cèl·lules mare tumorals" del càncer de mama [ $CD44^+/CD24^{-/low}$ ]. La integració del fenotip molecular de resistència primària al trastuzumab amb la classificació molecular del càncer de mama posa de manifest la possible existència d'un nou subtipus molecular intrínsec anomenat "basal/ErbB2+". Des d'una perspectiva clínica, proposem per primer cop que fàrmacs capaços de suprimir específicament el caràcter mesenquimal dels tumors "basal/ErbB2+" (com l'antidiabètic metformina) poden constituir noves estratègies de tractament capaces de prevenir o retardar l'aparició de resistència a l'anticòs monoclonal trastuzumab i/o a altres teràpies antiErbB2.





## Resumen

La resistencia primaria del cáncer de mama ErbB2+ a las terapias dirigidas anti-ErbB (como el anticuerpo monoclonal anti-ErbB2 trastuzumab) puede ser explicada bien por la sobre-activación de vías de supervivencia independientes de la señalización mediada por ErbB2 o bien por la presencia de células con un fenotipo de células madre tumorales (CMT) CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/low</sup>. Tomados en conjunto, nuestros resultados sugieren por primera vez que la resistencia primaria al trastuzumab tiene lugar en el marco de un nuevo subtipo intrínseco de cáncer de mama. En este estudio hemos utilizado una gran variedad de técnicas de biología celular y molecular y las células denominadas JIMT-1, un modelo único de resistencia intrínseca a las terapias dirigidas contra ErbB2 que fue originalmente aislado del fluido pleural metastático de una paciente cuyo tumor presentaba amplificación del oncogén ErbB2 pero que progresó rápidamente en respuesta al tratamiento con trastuzumab. Nuestra aproximación experimental sistemática *in vitro* e *in vivo* en el modelo JIMT-1 ha sido capaz de:

1. Confirmar que la sobreexpresión de la survivina, una proteína inhibidora de la apoptosis (PIA), es indispensable para la supervivencia de células ErbB2+ con resistencia intrínseca a múltiples inhibidores anti-ErbB1/ErbB2. Mediante el empleo de técnicas de ELISA e *immunoblotting* observamos que las JIMT-1 expresan constitutivamente 4 veces más survivina que células ErbB2+ sensibles a trastuzumab; en respuesta al trastuzumab, los niveles de survivina aumentan hasta 10 veces más que los observados en las células sensibles. Estudios de ELISA capaces de detectar específicamente los fragmentos de DNA asociados a histonas (apoptosis) demostraron que las JIMT-1 están protegidas del efecto pro-apoptótico inducido por varios inhibidores de tirosina cinasa dirigidos contra ErbB1 y/o ErbB2. El silenciamiento de la survivina con siRNAs permitió que el trastuzumab inhibiera significativamente la proliferación de las células JIMT-1. Los resultados obtenidos podrían ser de gran utilidad para diseñar nuevas estrategias de tratamiento basadas en el uso de antagonistas de la survivina, los cuales podrían impedir la resistencia intrínseca a las terapias anti-ErbB2.
2. Caracterizar un nuevo subtipo de carcinomas de mama con un fenotipo mixto basal/ErbB2+ que, entre otras características, presenta un bajo grado de diferenciación y resistencia intrínseca al trastuzumab a pesar de la presencia de amplificación génica en el locus ErbB2. Mediante el empleo de técnicas proteómicas de baja densidad como matrices de anticuerpos, analizamos el ambiente extracelular de las JIMT-1 (resistentes) y lo comparamos con el de las SKBR3 (sensibles); las primeras secretaron significativamente más factores de crecimiento. El análisis del estado de activación de los 42 receptores con actividad tirosina cinasa reveló que las células JIMT-1 tienen hiperactivado el receptor del factor crecimiento tipo I de la insulina (IGF-1R). Estudios con microscopía de fluorescencia pusieron de manifiesto la existencia de una re-localización de la forma activa de IGF-1R en estructuras del citoesqueleto celular que están directamente relacionadas con un fenotipo mesenquimal migratorio.

3. Determinar que la resistencia intrínseca al trastuzumab se puede relacionar con la regulación dinámica del fenotipo mesenquimal  $CD44^+CD24^{-/low}$  en carcinomas de mama ErbB2+. Nuestros resultados respaldan las recientes evidencias que sugieren que la sub-población celular  $CD44^+CD24^{-/low}$ , la cual parece estar enriquecida en células madre tumorales, puede ser la verdadera responsable de la resistencia clínica a las terapias dirigidas contra ErbB2. Hemos visto que la subpoblación de células que forman la línea celular JIMT-1 y que expresan  $CD44^+CD24^{-/low}$  varía a lo largo del tiempo en cultivo. Concretamente, esta subpoblación pasa de constituir aproximadamente el 10% de la población global en etapas tempranas, al 80% (proporción similar a la de la línea celular MDA-MB-231, que es puramente mesenquimal), en etapas tardías de cultivo. La aparición dinámica de marcadores mesenquimales no parece limitarse al fenotipo  $CD44^+CD24^{-/low}$  pues también se observaron reducciones significativas en los niveles de expresión del receptor ErbB2 y sobreexpresión de quimiocinas y metaloproteasas pro-invasivas y metastáticas. Todos estos cambios están acompañados de un aumento en la capacidad de migración de las células ErbB2+ con resistencia intrínseca a trastuzumab.

Mediante la utilización de las firmas transcriptómicas y caracterización molecular de todas las líneas celulares de cáncer de mama actualmente establecidas (n=51) realizada por el Lawrence Berkeley National Laboratory (LBL) en el año 2001, hemos sido capaces de relacionar la presencia/ausencia de propiedades asociadas con el proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM) con los niveles de expresión de ErbB2 y la respuesta primaria al trastuzumab. Confirmamos que la sobre-expresión de SLUG/SNAIL2 (un factor de transcripción directamente relacionado con la activación de la TEM) se correlaciona positivamente con la resistencia primaria al trastuzumab en un subgrupo de líneas celulares de un subtipo al que hemos denominado "basal/ErbB2+". Para confirmar esta hipótesis, y mediante el empleo de vectores lentivirales, hemos silenciado de manera específica y estable factores de transcripción que regulan la TEM en las células JIMT-1. Llevamos a cabo estudios de proliferación *in vitro* y estudios pre-clínicos con xenotransplantes en ratones atímicos *in vivo* para determinar la implicación causal de los factores de transcripción que regulan la TEM en la resistencia intrínseca al trastuzumab. La eliminación específica del factor de transcripción SLUG/SNAIL2 causó la casi total supresión del fenotipo  $CD44^+CD24^{-/low}$  a través de la activación transcripcional del marcador epitelial luminal CD24 en las células basal/ErbB2+. Asimismo, una vez silenciado SLUG/SNAIL2, las células basal/ErbB2+ recuperaron la sensibilidad a los efectos inhibidores del crecimiento tumoral inducidos por trastuzumab. El aislamiento de las células  $CD44^+CD24^{-/low}$  mediante la técnica MACS (del inglés *magnetic-activated cell sorting*) confirmó la resistencia de esta sub-población celular al trastuzumab. Los estudios *in vivo* confirmaron una reducción del volumen tumoral y un aumento drástico de la sensibilidad al trastuzumab en los tumores originados a partir de las células basal/ErbB2+ con silenciamiento estable del gen SLUG/SNAIL2. Los factores de transcripción de la TEM parecen inducir una elevada plasticidad fenotípica que puede permitir intrínsecamente a las células basal/ErbB2+ entrar y salir de un estado de resistencia o sensibilidad al trastuzumab. La determinación sistemática de SLUG/SNAIL2 como proteína asociada al fenotipo mesenquimal de la sub-población

$CD44^+CD24^{-/low}$  podría incrementar el beneficio terapéutico de los tratamientos dirigidos contra diana en el del cáncer de mama ErbB2+.

Nuestros estudios evaluaron finalmente nuevos tratamientos capaces de restaurar la sensibilidad a trastuzumab mediante la supresión del fenotipo mesenquimal  $CD44^+CD24^{-/low}$ . Demostramos por primera vez que la metformina, un fármaco habitualmente empleado en el tratamiento de la diabetes tipo 2, interacciona sinérgicamente con el trastuzumab al ser capaz de eliminar la subpoblación de células madre/progenitoras  $CD44^+CD24^{-/low}$  presentes en los fenotipos basal/ErbB2+. Utilizando la técnica de cultivo de mamosferas, el tratamiento con metformina redujo significativamente la eficiencia de formación de mamosferas (EFM) -es decir, la capacidad de autorenovación de las CMTs y el número total de mamosferas- en células ErbB2+ sensibles a trastuzumab o con resistencia primaria (intrínseca) o secundaria (adquirida). Por el contrario, el tratamiento con trastuzumab solo redujo significativamente la EFM en las células sensibles, pero no en las resistentes. La combinación de metformina y trastuzumab redujo de manera supra-aditiva (sinérgica) la EFM y el tamaño de las mamosferas en las células resistentes. Estudios de citometría de flujo confirmaron que la combinación simultánea de metformina y trastuzumab redujo sinérgicamente el porcentaje de células  $CD44^+CD24^{-/low}$ .

Después del aislamiento de las células  $CD44^+CD24^{-/low}$  mediante la tecnología MACS confirmamos que la actividad anti-tumoral de la metformina depende de la presencia o no del fenotipo  $CD44^+CD24^{-/low}$ . Las células  $CD44^+/CD24^{-/low}$  fueron 10 veces más sensibles a los efectos citotóxicos de la metformina que las células no-  $CD44^+/CD24^{-/low}$ . El tratamiento con trastuzumab durante 7 semanas fue incapaz de reducir el tamaño de los tumores formados por las células JIMT-1 en ratones atómicos; el tratamiento con metformina causó una reducción de hasta dos veces del tamaño tumoral. La combinación simultánea de trastuzumab y metformina redujo hasta más de 4 veces el volumen de los tumores JIMT-1. Dado que la acción preferente de la metformina sobre las células  $CD44^+CD24^{-/low}$  permite superar la resistencia al trastuzumab en modelos *in vivo*, la incorporación de la metformina en los regímenes de tratamiento basados en el trastuzumab podría constituir una estrategia de tratamiento eficaz para combatir el cáncer de mama ErbB2+ con resistencia primaria a trastuzumab.

Nuestra aproximación experimental demuestra por primera vez que la resistencia primaria a terapias biológicas dirigidas específicamente contra la oncoproteína ErbB2 puede ser explicada en términos del enriquecimiento intrínseco del carácter mesenquimal de sub-poblaciones celulares supuestamente enriquecidas en "células madre tumorales" del cáncer de mama [ $CD44^+CD24^{-/low}$ ]. La integración del fenotipo molecular de resistencia primaria al trastuzumab con la clasificación molecular del cáncer de mama pone de manifiesto la posible existencia de un nuevo subtipo molecular intrínseco denominado "basal/ErbB2+". Desde una perspectiva clínica, proponemos por primera vez que fármacos capaces de suprimir específicamente el carácter mesenquimal de los tumores "basal/ErbB2+" (como el antidiabético metformina) pueden constituir nuevas estrategias de tratamiento capaces de prevenir o retrasar la aparición de resistencia al anticuerpo monoclonal trastuzumab y/o a otras terapias anti-ErbB2.



## Summary

The primary resistance of ErbB2+ breast cancer to anti-ErbB directed therapies, such as the anti-ErbB2 monoclonal antibody trastuzumab, can be explained by either the overactivation of ErbB2-independent survival signaling pathways or the presence of cells with a CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-low</sup> cancer stem cell (CSC) phenotype. Collectively, our results suggest for the first time that primary trastuzumab resistance occurs inside the framework of a new intrinsic breast cancer subtype. We utilized a large variety of cellular and molecular biology techniques in this study. We also used JIMT-1 cells, a unique model for intrinsic resistance to therapies directed against ErbB2, which were originally isolated from the metastatic pleural effusion of a patient whose tumor presented with ErbB2 oncogene amplification but progressed after a few weeks in response to trastuzumab treatment. Our systematic *in vitro* and *in vivo* experimental approach in the JIMT-1 model allowed us to perform the following:

1. Confirm that the overexpression of survivin, an inhibitor of apoptosis (IAP) protein, is indispensable for the survival of ErbB2+ cells with intrinsic resistance to multiple anti-ErbB1/ErbB2 inhibitors. Using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting techniques, we observed that JIMT-1 cells constitutively express four times more survivin than trastuzumab-sensitive ErbB2+ cells, and in response to trastuzumab, survivin levels increased up to ten times more than the levels observed in sensitive cells. ELISA studies capable of specifically detecting histone-associated (apoptosis) DNA fragments demonstrated that JIMT-1 cells are protected from the pro-apoptotic effects induced by various tyrosine kinase inhibitors directed against ErbB1 and/or ErbB2. The silencing of survivin with siRNAs permitted trastuzumab to significantly inhibit the proliferation of JIMT-1 cells. The results obtained may be of great use for designing new treatment strategies based on the use of survivin antagonists that may impede intrinsic anti-ErbB2 therapy resistance.
2. Characterize a new breast carcinoma subtype with a mixed basal/ErbB2+ phenotype that, among others characteristics, has a reduced degree of differentiation and intrinsic trastuzumab resistance despite the presence of gene amplification in the ErbB2 locus. We analyzed the JIMT-1 (resistant) cell extracellular environment using low-density proteomics techniques with matrix-antibody complexes and compared it to that of SKBR3 (sensitive) cells. The former secreted significantly more growth factors. Analysis of the activation state of 42 receptors with tyrosine kinase activity revealed that JIMT-1 cells have a hyperactive type I insulin growth factor receptor (IGF-1R). Studies using fluorescent microscopy demonstrated the existence of a relocated IGF-1R active form in cellular cytoskeletal structures, which is directly related to a migratory mesenchymal phenotype.
3. Determine that intrinsic trastuzumab resistance can be associated with the dynamic regulation of the CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-low</sup> mesenchymal phenotype in ErbB2+ breast carcinomas. Our findings support recent evidence that suggest that the CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-low</sup> cell subgroup, which appears to be enriched with CSCs, may actually be responsible for clinical resistance to therapies directed against

## SUMMARY

---

ErbB2. We have observed that the subgroup of cells comprising the JIMT-1 cell line and expressing  $CD44^+CD24^{-/low}$  varies by time in culture. Specifically, this subgroup comprises approximately 10% of the global population in early phases and up to 80% (a similar proportion to that of the MDA-MB-231 cell line, which is purely mesenchymal) in late culture phases. The dynamic emergence of mesenchymal markers does not appear to be limited to the  $CD44^+CD24^{-/low}$  phenotype because a significant reduction in the level of ErbB2 receptor expression and the overexpression of chemokines and pro-invasive and metastatic metalloproteases was also observed. All of these changes are accompanied by an increase in the migration capacity of ErbB2+ cells, which have intrinsic trastuzumab resistance.

Using the transcriptomic signatures and molecular characterization of all of the established breast cancer cell lines (n=51) that was performed by the Lawrence Berkeley National Laboratory (Berkeley Lab) in 2001, we were able to correlate the presence/absence of properties associated with the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process with the levels of ErbB2 expression and the primary response to trastuzumab. We confirmed that the overexpression of SLUG/SNAIL2, a transcription factor directly related to EMT activation, is positively correlated with primary trastuzumab resistance in a subgroup of a cell line subtype that we have designated "basal/ErbB2+". To confirm this finding, we used lentiviral vectors to silence transcription factors that regulate EMT in JIMT-1 cells in a specific and stable manner. We performed *in vitro* proliferation studies and *in vivo* preclinical studies using xenografts in athymic mice to determine the causal implication of transcription factors that regulate EMT for intrinsic trastuzumab resistance. The specific elimination of the SLUG/SNAIL2 transcription factor caused the almost total suppression of the  $CD44^+CD24^{-/low}$  phenotype via the transcriptional activation of the CD24 luminal epithelial marker in basal/ErbB2+ cells. Similarly, once SLUG/SNAIL2 was silenced, the basal/ErbB2+ cells recovered their sensitivity to the inhibitory effects of tumor growth induced by trastuzumab. The isolation of  $CD44^+CD24^{-/low}$  cells by the magnetic-activated cell sorting (MACS) technique confirmed the resistance of this cell subgroup to trastuzumab. *In vivo* studies confirmed a reduction in tumor volume and a drastic increase in trastuzumab sensitivity in tumors originating from basal/ErbB2+ cells that were stably silenced for SLUG/SNAIL2 gene expression. EMT transcription factors appear to induce a high phenotypic plasticity that can intrinsically permit basal/ErbB2+ cells to enter into and leave a state of trastuzumab resistance or sensitivity. The systematic determination of SLUG/SNAIL2 as a protein associated with the  $CD44^+CD24^{-/low}$  mesenchymal phenotype subgroup could increase the therapeutic benefit of treatments directed against ErbB2+ breast cancer.

Our studies also evaluated new treatments capable of restoring trastuzumab sensitivity by  $CD44^+CD24^{-/low}$  mesenchymal phenotype suppression. We demonstrated for the first time that metformin, a drug normally used for type 2 diabetes treatment, synergistically interacts with the trastuzumab ability to eliminate the  $CD44^+CD24^{-/low}$  stem/progenitor cell subgroup present in basal/ErbB2+ phenotypes. Using the mammosphere culture technique, metformin treatment significantly reduced the mammosphere-forming efficiency (MSFE) i.e., the self-renewing ability of CSCs and the total number of mammospheres, in trastuzumab-

sensitive ErbB2+ cells with primary (intrinsic) or secondary (acquired) resistance. In contrast, trastuzumab treatment alone significantly reduced the MSFE in sensitive but not resistant cells. The combination of metformin and trastuzumab reduced the MSFE and mammosphere size in resistant cells in a synergistic manner. Flow cytometry studies confirmed that the simultaneous combination of metformin and trastuzumab synergistically reduced the percentage of  $CD44^+CD24^{-/low}$  cells.

After the isolation of the  $CD44^+CD24^{-/low}$  cells using magnetic-activated cell sorting (MACS), we confirmed that the anti-tumor activity of metformin changes depending on the presence or absence of the  $CD44^+CD24^{-/low}$  phenotype.  $CD44^+/CD24^{-/low}$  cells were ten times more sensitive to the cytotoxic effects of metformin than non- $CD44^+/CD24^{-/low}$  cells. Treatment with trastuzumab for over seven weeks was unable to reduce the size of the tumors formed by JIMT-1 cells in athymic mice, and treatment with metformin caused a reduction in tumor size of up to two times. The simultaneous combination of trastuzumab and metformin reduced the volume of JIMT-1 tumors up to more than four times. Given that the preferred metformin action on  $CD44^+CD24^{-/low}$  cells enables trastuzumab resistance to be overcome in *in vivo* models, the incorporation of metformin into trastuzumab-based treatment regimens may constitute an efficient treatment strategy for fighting ErbB2+ breast cancers that have primary trastuzumab resistance.

Our experimental approach demonstrates for the first time that primary resistance to biological therapies specifically directed against the ErbB2 oncoprotein can be explained in terms of the intrinsic enrichment of the mesenchymal character of cell subgroups supposedly enriched in [ $CD44^+CD24^{-/low}$ ] breast "CSCs". The incorporation of the molecular phenotype of primary trastuzumab resistance into the currently existing breast cancer molecular classification demonstrates the potential existence of a new intrinsic molecular subtype that we termed "basal/ErbB2+". From a clinical perspective, we propose that drugs capable of specifically suppressing the mesenchymal characteristic of "basal/ErbB2+" tumors (e.g., the anti-diabetic drug metformin) can constitute new treatment strategies capable of preventing or delaying the emergence of resistance to trastuzumab monoclonal antibody and/or other anti-ErbB2 therapies.





# **1. Introducció**



## **1. Introducció**

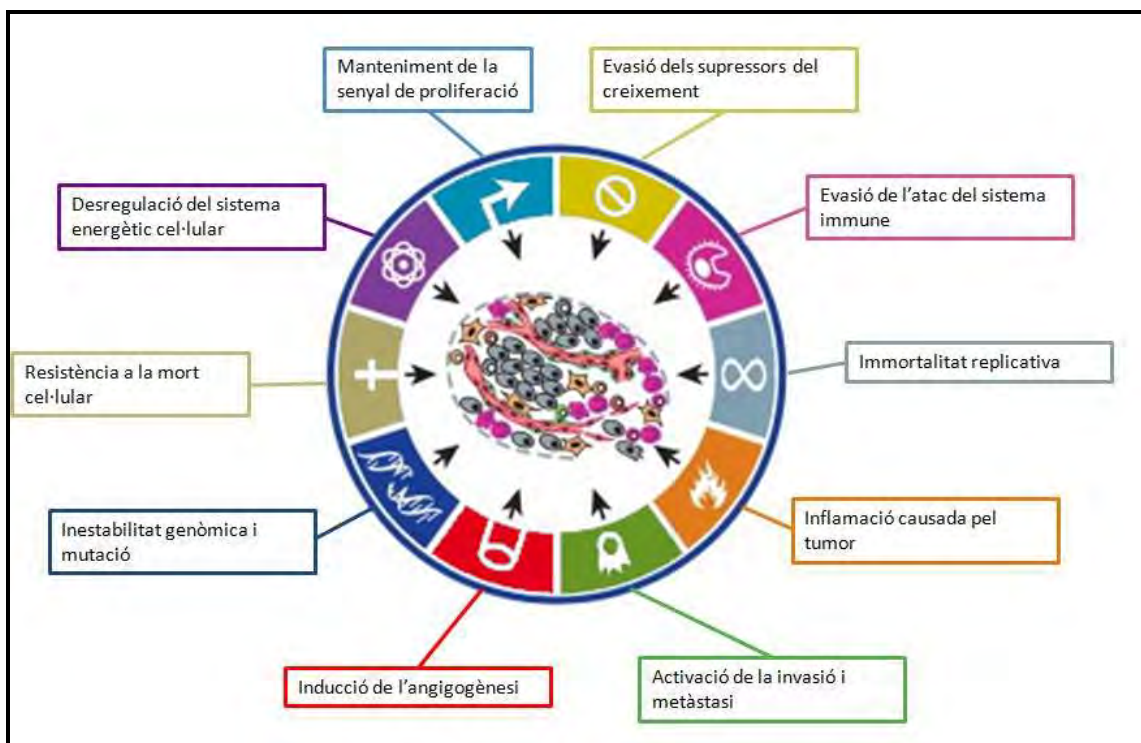
Un organisme pluricel·lular es caracteritza per un estricte control en el creixement i proliferació de les cèl·lules que el formen, anomenat homeòstasi. Quan aquest es trenca, pot aparèixer el càncer, definit com el creixement no controlat i la disseminació de cèl·lules alterades en l'organisme, que formant un tumor li causen invasió i dany en teixits i òrgans i, finalment, la mort. El desenvolupament d'un tumor és un procés lent que ha d'esquivar molts punts de control per part dels mecanismes de defensa de l'organisme (**Figura 1**), entre els que destaquen la pèrdua del control de la proliferació cel·lular, l'evasió dels factors que el controlen, així com l'evasió del sistema immunitari, la resistència a la mort cel·lular, canvis en el metabolisme cel·lular, i l'activació de l'angiogènesi i la capacitat de migració [1-2].

Actualment hi ha molta controvèrsia en l'origen de la cèl·lula que inicia el procés. En la teoria clàssica és una cèl·lula somàtica diferenciada que, per acumulació de mutacions durant la replicació, es transforma i adquireix la capacitat de proliferar indefinidament i generar un tumor; en la teoria de les cèl·lules mare de càncer, és una cèl·lula mare tumoral (CMT, també anomenada cèl·lula iniciadora de tumor o cèl·lula propagadora del càncer, provinent directament d'una cèl·lula mare adulta o d'una cèl·lula tumoral diferenciada que adquireix propietats de cèl·lula mare mitjançant processos dinàmics com la transició epiteli-mesènquima) que, a causa de mutacions o de l'ambient, s'autorenova, es divideix descontroladament i es diferencia per formar un tumor [3-4]. En la teoria clàssica, la majoria de les cèl·lules que formen el tumor tenen la capacitat de proliferar indefinidament i generar-ne de nous, mentre que en la de les cèl·lules mare, només les CMT poden proliferar indefinidament, originar cèl·lules diferenciades i formar nous tumors o metàstasi [5] (**Figura 2**). El primer estudi en el que es van detectar CMT va ser el fet per Dick et al. el 1997 on es van aïllar cèl·lules mare en leucèmia mieloide aguda [6]; no va ser fins al 2003 quan es van detectar aquest tipus de cèl·lules en tumors sòlids, concretament en càncer de mama [7].

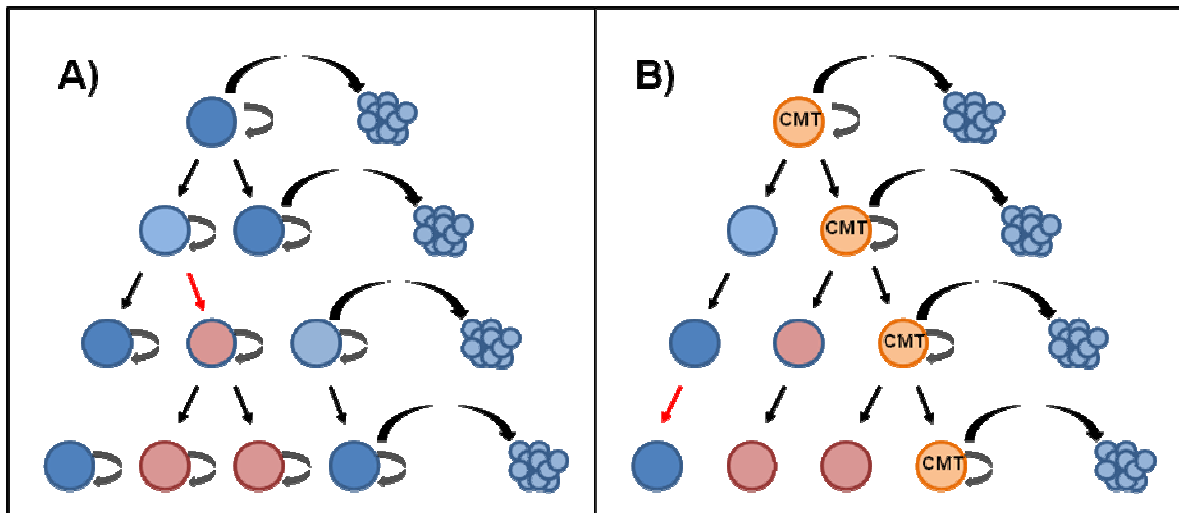
Sigui quin en sigui l'origen, el càncer (**Figura 3**) es sol iniciar per mutacions, és a dir, lesions del material genètic, que desencadenen una desregulació de la proliferació de la cèl·lula que les té permetent-ne el seu creixement descontrolat i la formació del

## INTRODUCCIÓ

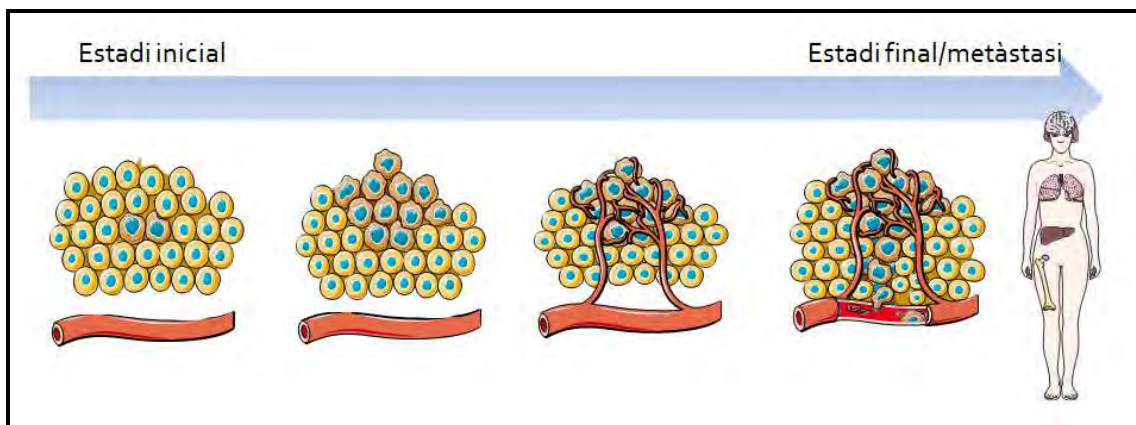
tumor. A mesura que aquest es va fent gran necessita de la creació de nous vasos sanguinis per tal que els nutrients i l'oxigen arribin a les cèl·lules més interiors que el formen (angiogènesi). Finalment, el procés culmina amb la disseminació de la malaltia cap a altres òrgans i teixits (metàstasi). La metàstasi es pot produir per migració col·lectiva de cèl·lules tumorals epitelials [8] o per migració de cèl·lules individuals que han adquirit propietats o són cèl·lules mare o mesenquimals [9]. En el primer cas, la disseminació es produeix mitjançant els vasos limfàtics [10], mentre que en el segon la disseminació utilitza els vasos sanguinis [11-12]. En el cas que les cèl·lules metastàtiques siguin cèl·lules mare o mesenquimals, també hi ha discrepàncies sobre el seu origen: provenen de la petita subpoblació de cèl·lules mare intrínseques al càncer que formen part del grup heterogeni de cèl·lules que formen el tumor, o bé de cèl·lules diferenciades que han adquirit propietats de cèl·lules mare gràcies a mutacions o a processos evolutius com la transició epiteli-mesènquima (TEM)) [13]?



**Figura 1.** Representació esquemàtica del que ha de succeir en una cèl·lula per esdevenir tumoral. Figura modificada de Hanahan D, CELL 144, 2011 [1].



**Figura 2.** Origen del càncer de mama; en la teoria tradicional A) la majoria de cèl·lules del tumor tenen la capacitat de proliferar indefinidament i generar nous tumors, mentre que en la teoria de les cèl·lules mare B), només les CMT poden proliferar indefinidament i generar nous tumors.



**Figura 3.** Etapes de la generació d'un tumor

Actualment, el càncer és la principal causa de mort al món (i la segona en els països desenvolupats) amb 7.6 milions de defuncions l'any 2008, essent el càncer de mama el més freqüent entre les dones, amb una incidència del 22.9% i una ASR (*age-standardized rate*) de 12.5 ([Globocan 2008, IARC, 2010](#)). A més a més, la OMS

## INTRODUCCIÓ

---

(Organització Mundial de la Salut) pronostica que moriran 84 milions de persones a causa d'aquesta malaltia entre els anys 2005-15 si no s'hi posa remei. Tot i el pessimisme d'aquestes dades, la mortalitat s'ha anat reduint amb el pas dels anys, sobretot a causa de millores en el diagnòstic precoç i tractament de la malaltia [14]. Tot i això, encara queda molta feina per fer, doncs no tots els càncers tenen un final feliç.

D'entre els diferents tipus de càncer, el càncer de mama és un dels més freqüents amb 22000 nous casos per any a Espanya, és a dir, prop del 30% dels tumors del sexe femení. El diagnòstic de la malaltia va en augment a causa de l'envelliment de la població i la detecció precoç, de manera que s'ha estimat que la incidència augmenta un 1-2% anual (dades extretes de l'AECC, *Asociación Española Contra el Cáncer*).

El càncer de mama es pot classificar en diferents tipus segons les característiques moleculars del tumor, la seva capacitat proliferativa i el seu estat de diferenciació. Aquesta classificació permet adequar, en certa mesura, el tractament administrat a cada pacient contribuint a la supervivència i millora de la qualitat de vida d'aquests. Així doncs, el càncer de mama es classifica en 4 tipus diferents (**Taula 1**) [15-18]. El càncer de mama ErbB2+, el qual representa entre un 10 i un 30% de tots els càncers de mama [19], és un subtipus biològicament agressiu i de mal pronòstic del pacient [20]. Aquesta característica ha portat a l'estudi de la proteïna ErbB2 per així millorar els tractaments destinats a combatre aquest subtipus de càncer de mama.

Tipus	Característiques moleculars	Capacitat proliferativa	Estat de diferenciació	Pronòstic de la malaltia
<b>Luminal de tipus A</b>	ER+ i/o PR+ i ErbB2-	Baixa	Elevat	Bon pronòstic
<b>Luminal de tipus B</b>	ER +i/o PR+ i ErbB2+	Elevada	Elevat	Mal pronòstic
<b>ErbB2+</b>	ER- i PR- i ErbB2+	Elevada	Intermedi	Mal pronòstic
<b>Triple negatiu de tipus basal</b>	ER- , PR- i ErbB2-, CK5/CK6+ i/o ErbB1+	Elevada	Baix	Mal pronòstic

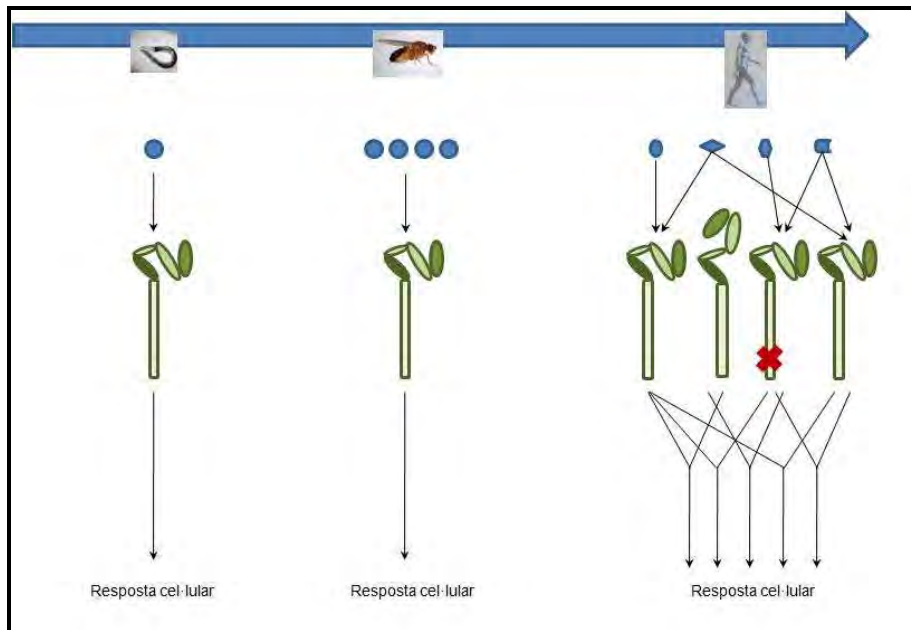
**Taula 1.** Taula representativa de les principals característiques dels diferents tipus de càncer de mama.



### 1.1 La família ErbB

La família de receptors ErbB (de l'anglès *Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog*) forma part del subgrup tipus I de la família de receptors transmembrana amb activitat tirosina cinasa. És una família molt antiga evolutivament parlant, que al llarg de l'evolució ha passat de ser senzilla en nematodes i mosques, a esdevenir cada cop més complexa fins assolir la complexitat dels mamífers (**Figura 4**). Per exemple, en el nematode *C.elegans* només hi ha un receptor ErbB que és activat per un únic lligand [21]. En el cas de la *D.melanogaster*, hi segueix havent un receptor, però que pot ser activat per quatre lligands diferents [22]. En ambdós casos, la transmissió del senyal és senzilla, és a dir, es transmet de forma lineal a través de la via Ras. En organismes més evolucionats, els mamífers, aquesta linealitat s'ha transformat en una xarxa complexa i interconnectada que la fa més forta [23] i li confereix avantatges evolutius en termes d'adaptació, tolerància a mutacions i diversificació del senyal [24]. Aquesta complexitat s'obté amb la combinació de quatre receptors ErbB i varis factors de creixement peptídics o lligands. S'ha postulat que l'augment en el nombre de receptors i lligands s'ha assolit per mitjà de la duplicació i fusió gèniques en diferents etapes, durant el procés evolutiu [25-26]. A diferència d'animals situats més avall en l'escala evolutiva, la gran diversitat observada dins de la família ErbB en els mamífers és necessària a causa del gran nombre de llinatges cel·lulars que tenen els sistemes nerviosos i epitelial d'aquests animals [27].

En mamífers, la família de receptors ErbB està formada per quatre membres (ErbB1/HER1/EGFR, ErbB2/Neu/HER2, ErbB3/HER3 i ErbB4/HER4) presents en les cèl·lules d'origen epitelial, mesenquimal o neuronal. En un organisme adult, no tots els membres de la família s'expressen en la mateixa cèl·lula ni amb la mateixa quantitat, sinó que cada membre té el seu patró d'expressió. Concretament, ErbB1 s'expressa en les cèl·lules parenquimàtiques del fetge, fibroblasts i cèl·lules epitelials de tot tipus, ErbB2 és el membre més àmpliament expressat, ErbB3 s'expressa en diferents tipus de cèl·lules epitelials i l'expressió d'ErbB4 està limitada als nervis, músculs i les cèl·lules glials.



**Figura 4.** Evolució de la complexitat de la via de senyalització de la família ErbB

### 1.1.1 Estructura dels receptors

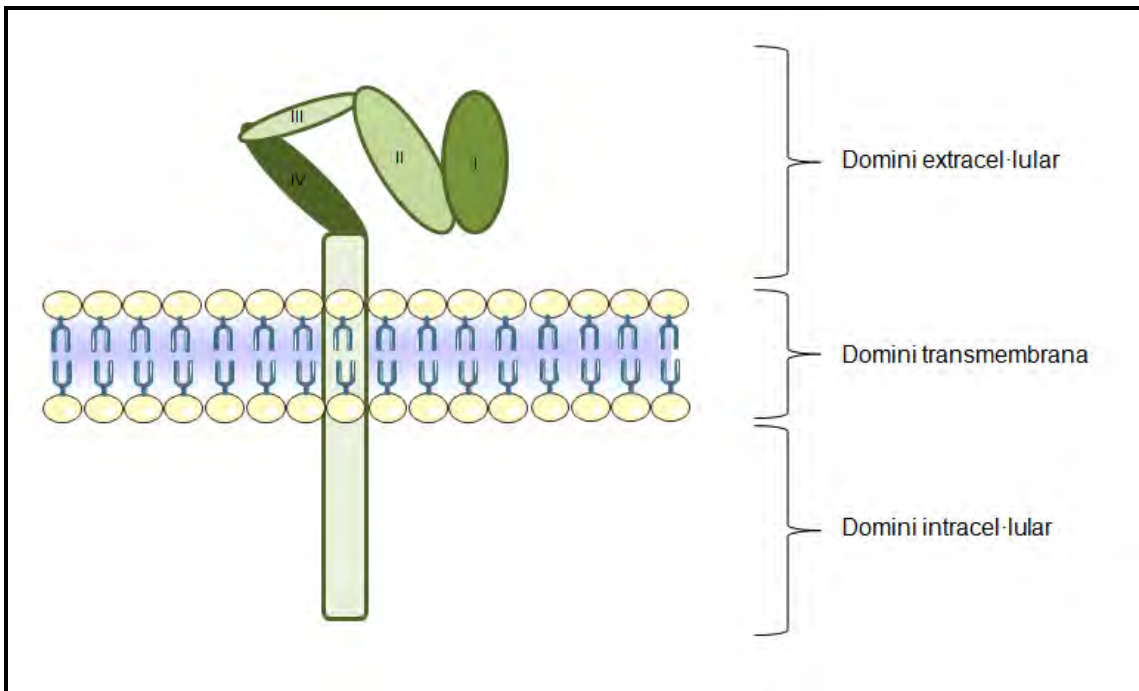
Tots els membres de la família ErbB comparteixen un elevat grau d'homologia en les seqüències primàries (la identitat de la seqüència varia del 37% entre ErbB<sub>1</sub> i ErbB<sub>3</sub> al 49% entre ErbB<sub>1</sub> i ErbB<sub>2</sub> [28]). La seva estructura (**Figura 5**) es divideix en :

- *domini extracel·lular*: El domini extracel·lular es situa a la zona N-terminal de la proteïna i està format per quatre subdominis. Els subdominis I (L<sub>1</sub>) i III (L<sub>2</sub>) estan implicats en la unió del receptor amb el lligand [29-30], mentre que els subdominis II (S<sub>1</sub>) i IV (S<sub>2</sub>), els quals són molt rics en cisteïnes, tenen un paper clau en la dimerització dels receptors [28]. En estat de repòs, els subdominis II i IV estan units i amaguen al braç de dimerització format pel mateix subdomini II. La unió del lligand en els subdominis I i III del receptor, causa un canvi conformacional en la seva estructura que permet que el braç de dimerització quedi exposat i pugui ser reconegut per un altre receptor i formar així el dímer. Per tant, la funció principal del domini extracel·lular del receptor és el reconeixement del lligand i la formació del dímer. Dins de la família de receptors ErbB, aquest és el domini menys conservat, fet que permet les diferents especificitats i afinitats dels factors de creixement per cada receptor.

## INTRODUCCIÓ

---

- *domini transmembrana*: Aquest és un domini lipofílic, la funció del qual és la localització i l'ancoratge del receptor a la membrana cel·lular.
- *domini intracel·lular*: El domini intracel·lular és el domini que té activitat biològica. El canvi conformacional del domini extracel·lular causat per la formació del complex receptor-ligand, es tradueix en una activació del domini intracel·lular i, per tant, de l'activitat cinasa del receptor [31]. Aquesta activació desencadena una sèrie d'accions que transmetran el senyal rebut pel receptor al nucli on es produirà una resposta biològica. A diferència del domini extracel·lular, el citoplasmàtic té una estructura molt més conservada dins la família de receptors. Tot i aquesta conservació, les seqüències d'aminoàcids que flanquegen el lloc d'autofosforil·lació del receptor són diferents entre els diferents membres. Aquestes regions diferencials determinen quines seran les proteïnes efectores amb dominis d'homologia Src2 (SHC2) o dominis d'unió a tirosines fosforil·lades (PTB) que interaccionaran amb el receptor, i per tant, determinarà el senyal que es transmetrà [32], donant a cada receptor un camp d'actuació únic. Els punts de reclutament per aquestes proteïnes efectores estan constituïts pels residus fosforil·lats de tirosina que es localitzen a l'extrem C terminal del domini citoplasmàtic del receptor.  
L'activació del domini citoplasmàtic és només l'inici d'una via de propagació del senyal molt complexa.



**Figura 5.** Estructura bàsica d'un receptor transmembrana. El domini extracel·lular està format per 4 subdominis la funció dels quals és reconèixer el factor de creixement i dimeritzar amb un altre receptor ErbB, un domini transmembrana que garanteix la localització del receptor a la membrana i un domini intracel·lular amb activitat tirosina cinasa que és el que inicia la transmissió del senyal.

Tot i que la majoria de receptors transmembrana tenen aquesta estructura bàsica, dins la família ErbB no tots els receptors la segueixen al peu de la lletra. Dels quatre receptors de la família, només n'hi ha dos d'autònoms amb l'estructura completa. Aquests són ErbB1 i ErbB4 i poden generar un senyal per si sols després que el lligand s'hi uneixi. Els receptors no autònoms són ErbB2 i ErbB3. ErbB2 és un receptor orfe, és a dir, no té un lligand conegut que l'activi [33]. La seva estructura extracel·lular té permanentment exposat el braç de dimerització cel·lular pel que no necessita de cap lligand que li causi cap canvi conformacional per activar-lo [34-35]. ErbB3 tampoc és autònom ja que no té activitat tirosina cinasa a causa de substitucions crítiques en el seu domini catalític [36]. Aquestes deficiències, però, no eviten que aquests dos receptors tinguin la seva funció i importància dins la família dels receptors ErbB ja que ambdós passen a ser funcionals quan formen heterodímers amb altres receptors units a lligand.

## INTRODUCCIÓ

---

Conjuntament, els quatre receptors tenen característiques diferents però alhora redundants que desencadenen activitats biològiques específiques com el creixement, supervivència, proliferació i diferenciació cel·lulars, i inhibició de l'apoptosi.

Les principals característiques de cada receptor de la família són:

ErbB1 (EGFR, de l'anglès *epidermal growth factor receptor*), és el primer membre de la família que es va descriure [37-38], té un pes molecular de 170kDa i està localitzat al cromosoma 7p12.3-p12.1 [39-40]. Es tracta d'un receptor autònom que s'uneix a varis lligands i és capaç de formar homodímers i heterodímers funcionals. Un cop activat, els seus aminoàcids fosforil·lats són punts de reclutament de diferents proteïnes transmissores del senyal com GRB2 i Shc, les quals activen la via Ras-MAPK; una altra via activada per aquest receptor és la del factor de transcripció STAT5 [41]. La regulació negativa d'ErbB1 és realitzada per la proteïna Cbl la qual dirigeix el receptor cap a una ràpida degradació al lisosoma.

ErbB2 va ser el segon membre de la família en ser descrit [42]; es tracta d'una proteïna de 185kDa codificada per un gen localitzat al cromosoma 17q21 [42-43]. Tot i que ErbB2 no és un receptor autònom a causa de l'absència d'un factor de creixement que l'activi [33], és la parella preferida per la resta a l'hora de formar heterodímers [44]. A més a més, és el receptor que més proteïnes d'unió a tirosines fosforil·lades recluta, fet que dona molta potència al senyal que transmet [45]. Els heterodímers que contenen ErbB2, també són els que tenen una taxa de dissociació del complex receptor-ligand més baixa, així com una menor taxa d'endocitosis i una major taxa de reciclatge [46-48]. Aquestes característiques fan que els heterodímers que contenen ErbB2 tinguin una capacitat mitogènica major. Una altra característica important d'ErbB2 és que el receptor pot ser fragmentat per una metaloproteasa de manera que es produeixen dos fragments: un fragment de 110kDa que correspon al domini extracel·lular que s'allibera al sèrum (anomenat DEC) i un fragment de 95kDa que queda unit a la membrana citoplasmàtica (anomenat p95) i que té una elevada activitat cinasa.

El gen que codifica per ErbB3 està localitzat al cromosoma 12q13 i el receptor té un pes molecular de 145kDa [49]. Com s'ha dit anteriorment, ErbB3 tampoc és un receptor autònom ja que no té activitat cinasa, però es pot unir a 4 lligands diferents i

formar heterodímers funcionals. Un cop ErbB3 s'ha unit a un altre receptor de la família, els residus tirosina del domini citoplasmàtic es fosforil·len i esdevenen un punt de reclutament per la proteïna PI3K. Per tant, aquest receptor activa la principal via de supervivència cel·lular.

Finalment, ErbB4 va ser l'últim membre de la família en ser descrit l'any 1993, està localitzat al cromosoma 2q33 i pesa 180kDa [50]. ErbB4 comparteix característiques pel que fa a reconeixement (comparteixen alguns lligands) i senyalització (ErbB4 també activa GRB2, Shc i STAT5) amb ErbB1. La particularitat d'aquest receptor és que pot generar diferents isoformes mitjançant l'*splicing* alternatiu del mRNA, una de les quals activa la via PI3K [51]. Una segona característica important és que el seu domini citoplasmàtic pot ser fragmentat i la part alliberada viatja cap al nucli on té activitat transcripcional [52]. ErbB4 no és l'únic receptor que s'ha trobat a nucli, també s'hi han localitzat ErbB1 i ErbB2 però en aquest cas, els receptors no estan fragmentats sinó que la seva estructura està intacta a nucli [53-54].

### **1.1.2 Via de senyalització**

Els components de la via de senyalització dels receptors ErbB són molt antics evolutivament parlant i constitueixen una via clau al llarg de l'evolució que regula el creixement, supervivència, proliferació i diferenciació cel·lulars.

En mamífers, la xarxa de transmissió del senyal deixa de ser lineal per tenir una forma de llaç format per una fase central anomenada cor on es processen els senyals que la cèl·lula rep a través dels receptors ErbB (fase inicial o input) i genera les respostes cel·lulars (fase final o output). Les respostes obtingudes depenen del tipus cel·lular, la concentració del lligand i la identitat d'aquest, i del dímer format (**Figura 6**). A cadascuna de les etapes de la xarxa de senyalització, la via dels receptors ErbB té redundància, fet que confereix força a la xarxa [26]. És a dir, li confereix la capacitat de mantenir la funció tot i la presència de perturbacions internes o externes a la cèl·lula. Un exemple de redundància, és que un mateix lligand pot unir-se a diferents receptors amb diferent afinitat i especificitat, fet que fa augmentar la força d'aquesta xarxa ja que la falta d'una proteïna es pot compensar amb la presència d'una altra [55].

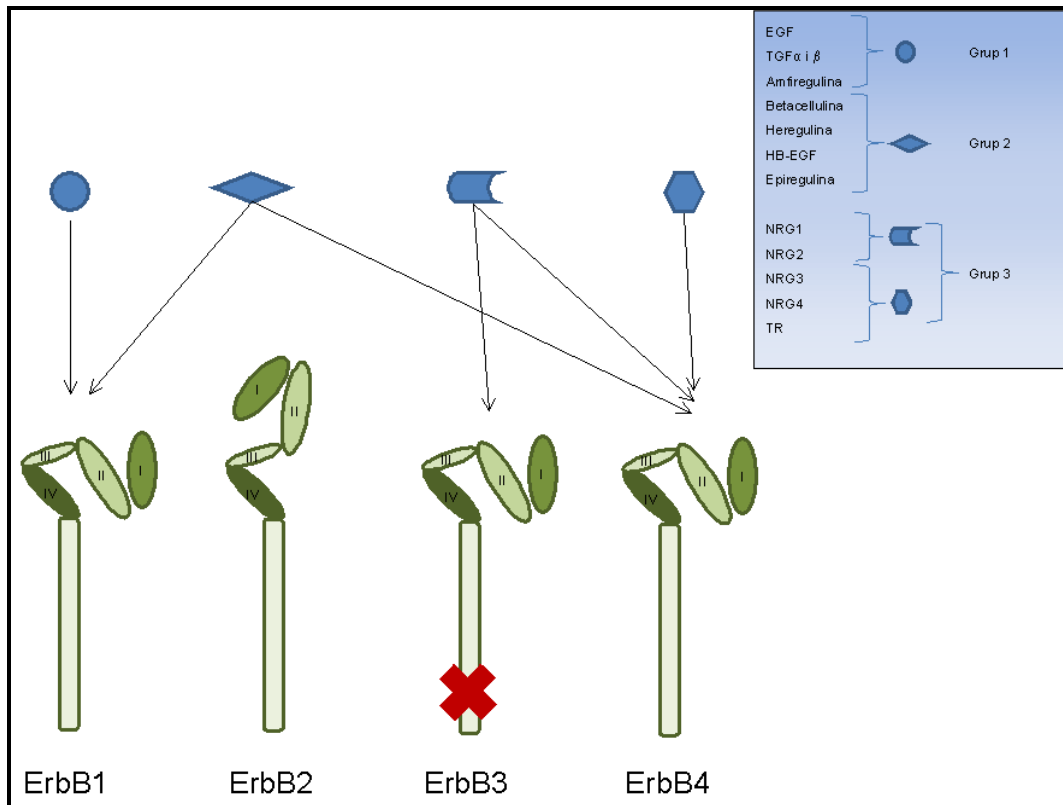
## INTRODUCCIÓ

---

En situacions fisiològiques normals, l'activació dels receptors ErbB està regulada tant espacial com temporalment per l'expressió dels seus lligands [56-57]. Tant els receptors com els seus lligands són sintetitzats en forma de precursors per la cèl·lula. Els factors de creixement s'activen quan proteases presents a la superfície cel·lular els fragmenten i solubilitzen [58-59]. Aquest procés s'anomena alliberament de l'ectodomini i les proteases que hi estan implicades pertanyen a les famílies ADAM i MMP. Els receptors, en canvi, s'activen gràcies a un canvi conformacional causat per la unió amb el lligand. Tots els lligands de la família ErbB contenen una seqüència conservada anomenada tipus EGF, formada per sis residus de cisteïna. Hi ha fins a 13 factors de creixement dins d'aquesta família que es classifiquen en tres grups segons el receptor pel qual tenen afinitat (figura 5):

- grup 1; format per EGF, factor de creixement transformant  $\alpha$  i  $\beta$  (TGF $\alpha$  i  $\beta$ ) i amfiregulina (AR). Aquests factors de creixement s'uneixen al receptor ErbB1
- grup 2; format per betacellulina (BTC), *heparin-binding EGF* (HB-EGF), heregulina (HRG) i epiregulina (EPR), els quals s'uneixen tant a ErbB1 com a ErbB4
- grup 3; format per les neuregulines (NRGs) i tomoregulines (TR) les quals es divideixen en:
  - o NRGs amb afinitat per ErbB3 i ErbB4. És el cas de NRG1 i 2
  - o NRGs que només s'uneixen a ErbB4. És el cas de NRG 3 i 4 i les tomoregulines

Tot i que diferents factors de creixement comparteixen especificitat per un determinat receptor, l'afinitat amb la que es produeix la unió varia. L'avantatge d'aquest tret és que l'absència d'un lligand es pot compensar per la presència d'un altre. Tot i això, cada lligand té el seu paper i és específic d'un determinat teixit.



**Figura 6.** Especificitat d'unió dels factors de creixement. Segons l'afinitat per un o altre receptor, els factors de creixement es divideixen en quatre grups.

Figura modificada de Olayioye MA, The EMBO Journal 2000, 19(13)

La **figura 7** mostra el mecanisme d'activació proposat de la via de transmissió del senyal mitjançant els receptors ErbB. En primer, lloc un factor de creixement s'uneix al seu receptor diana, i provoca un canvi conformacional del domini extracel·lular del receptor. Aquest canvi desemmascara el braç de dimerització i permet una ràpida dimerització del receptor. Un cop format el dímer, els dos receptors es fosforil·len l'un a l'altre als residus tirosina del seu domini citoplasmàtic [60]. Aquests residus fosforil·lats són els punts de reclutament de les proteïnes efectores que contenen dominis amb homologia Src 2 (SH-2) o dominis d'unió a tirosines fosforil·lades (PTB). Les proteïnes efectores es poden subdividir en dues classes. La classe I la formen aquelles proteïnes efectores amb activitat enzimàtica com són c-Src, la fosfolipasa C (PLC $\gamma$ ), la Shp1 i la cinasa homòloga a Csk (chK). La classe II està formada per les proteïnes efectores sense activitat enzimàtica, és a dir, per Grb2, Grb7, p85, Cbl, CrkII i Shc. Les de la classe II actuen de proteïnes adaptadores entre el receptor i cinases de



## INTRODUCCIÓ

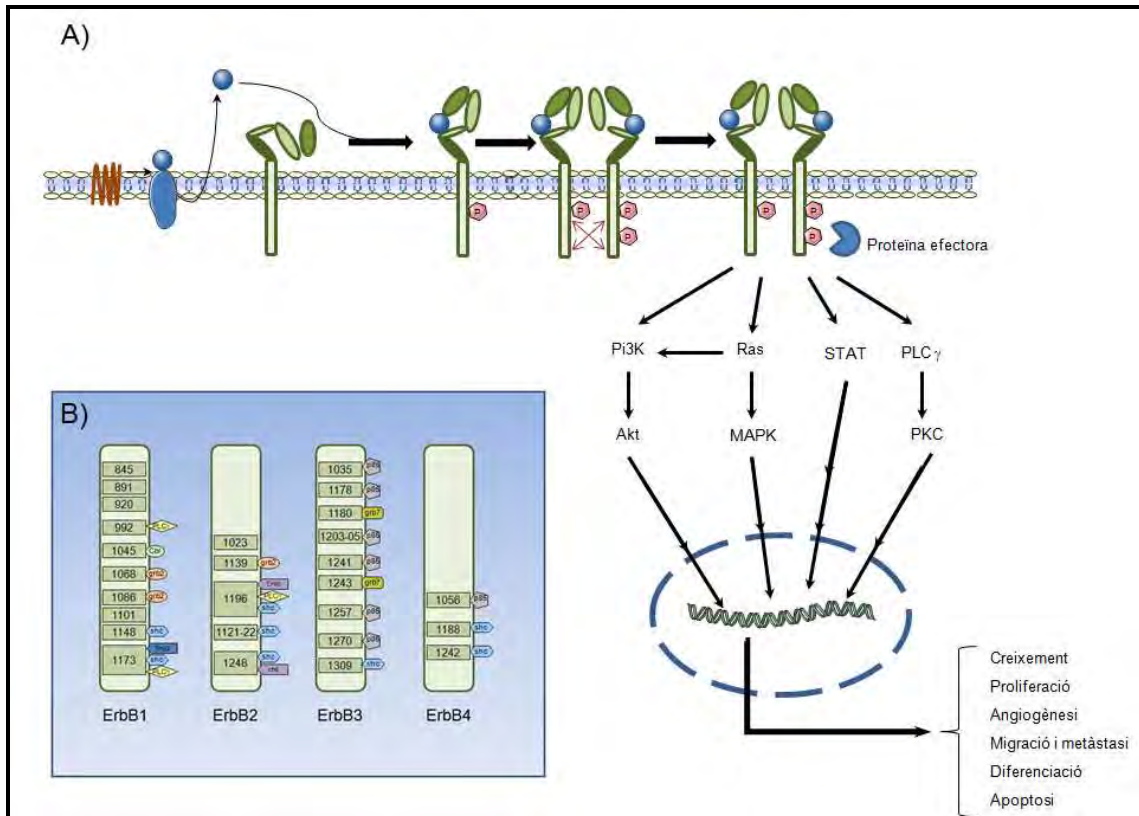
---

tirosina citoplasmàtiques [61]. La identitat de les proteïnes efectores que s'acoblen al receptor depèn de la seqüència d'aminoàcids que flanqueja els residus tirosina fosforil·lats d'aquest, per tant, cada receptor reclutarà unes proteïnes diferents que desencadenaran una resposta determinada (Figura 7B). Aquestes proteïnes efectores activen una sèrie de cascades de transmissió del senyal governades per:

- Ras-raf-MAPK, aquesta via regula la proliferació, migració, adhesió i supervivència cel·lulars [27, 62],
- Pi3K/Akt, via que modula el creixement i la proliferació cel·lulars, i l'apoptosi [63],
- PKC i Jak/Stat, aquestes modulen la divisió, la motilitat, la invasió, l'adhesió i la supervivència cel·lulars [64].

Un segon mecanisme que determinarà el tipus de resposta és la identitat del lligand. Aquest és un mecanisme compartit per tots els receptors amb activitat tirosina cinasa. Els receptors ErbB, però, tenen un tercer mecanisme que s'ha anomenat formació d'heterodímers dependents del lligand. És a dir, cada factor de creixement té preferència per formar un dímer determinat. El senyal que genera l'heterodímer no és simplement la suma del generat pels homodímers de cada receptor que el formen, sinó que cada heterodímer té unes propietats pròpies que determinaran el tipus de senyal i la resposta cel·lular. Només amb els quatre receptors es poden formar fins a 10 dímers diferents, però no tots tenen importància biològica. Un exemple de dímer sense activitat biològica seria el format per dos receptors ErbB3, ja que aquest no té activitat cinasa i no pot generar senyal. A l'hora de formar heterodímers, ErbB2 esdevé la parella preferida dels tres receptors restants un cop aquests últims s'han unit al seu lligand. A més a més, els heterodímers que contenen ErbB2 són extremadament actius ja que aquest receptor té la capacitat de perllongar l'estímul que produeixen tots els lligands [65-66]. De totes les combinacions possibles, l'heterodímer ErbB2-ErbB3 és el que genera un senyal mitogènic més potent per diferents motius: és el dímer amb una taxa de dissociació més baixa pel que pot està activat més temps que la resta, la presència d'ErbB2 no només augmenta l'afinitat pel lligand sinó que n'augmenta el tipus que s'hi poden unir [67-68], també tenen una taxa endocítica menor i una taxa de reciclatge del receptor major [47-48, 69].

La complexitat de la via de transmissió del senyal ErbB no acaba aquí ja que els membres d'aquesta família, com ErbB1, també poden dimeritzar amb altres receptors amb activitat tirosina cinasa com el receptor de la insulina (IGF-1R) [70] o el receptor del factor de creixement derivat de plaquetes (PDGFR) [71].



**Figura 7.** A) Mecanisme d'activació dels ErbB. La solubilització del lligand per part de les proteases permet que aquest s'uneixi al receptor. La unió causa un canvi conformacional al receptor que permet la formació de dímers i la fosforil·lació del domini intracel·lular. En aquest punt s'inicia una cascada que permet la transmissió del senyal fins al nucli on s'iniciarà una resposta biològica. B) Reclutament específic de les molècules efectoras per part de cada residu de tirosina fosforil·lada del receptor [72-73].  
 Figura modificada de Olayioye MA, The EMBO Journal 2000, 19(13), i Rocha-lima CM, Cancer control 2007 14(3)

## INTRODUCCIÓ

---

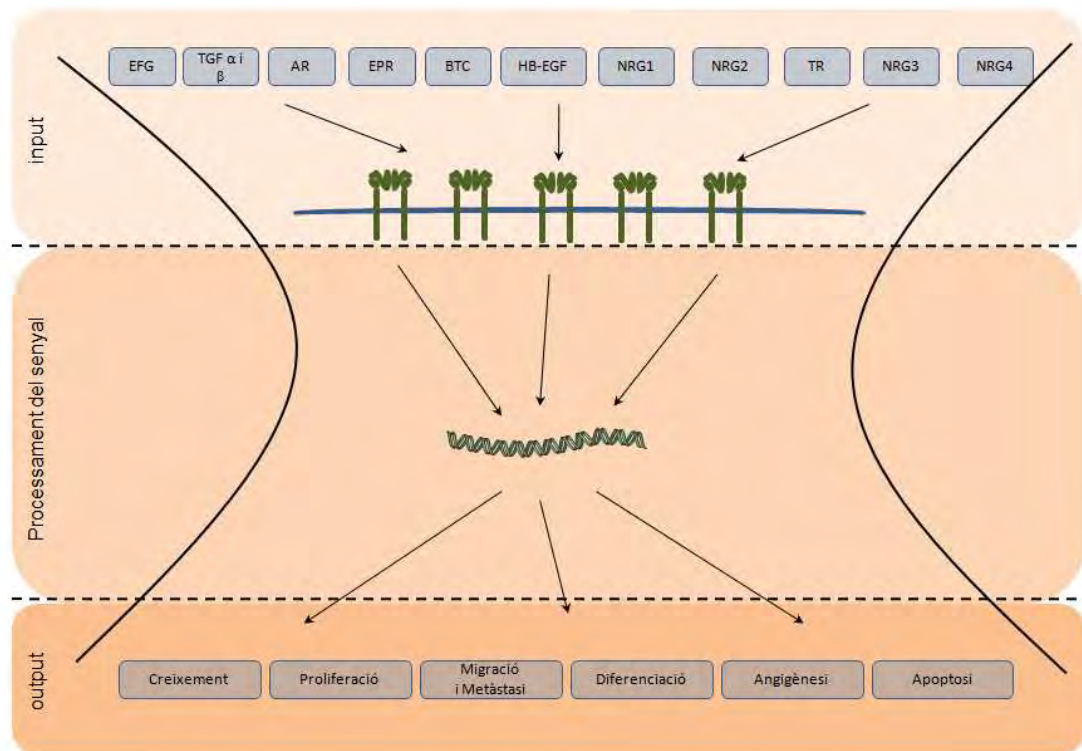
Com s'ha indicat anteriorment, la via del senyal propagada pels receptors ErbB és modular, és a dir, es pot dividir en tres fases diferents (**Figura 8**):

1. *input*: Aquesta etapa inclou els receptors i els seus lligands, i està altament regulada mitjançant l'expressió de les diferents parts que hi intervenen.

La xarxa ErbB no només integra els seus propis senyals, sinó que també en pot integrar d'altres com els produïts per hormones, neurotransmissors, limfocines i inductors d'estrès. La majoria d'aquestes interaccions estan regulades per cinases que fosforil·len ErbB directament afectant-ne la seva activitat o la seva endocitosi [74].

2. *processament del senyal (cor)*: El cor és l'encarregat de processar els senyals detectats a la superfície cel·lular i enviar-los al nucli on es converteixen en diferents programes transcripcionals. Per aquest motiu es serveix de diferents proteïnes del tipus SH-2 i factors de transcripció. L'especificitat d'aquestes proteïnes senyalitzadores ve determinada per efectors positius i negatius dels ErbBs, així com per la identitat del lligand, la composició de l'oligòmer i de característiques estructurals específiques de cada receptor [75].

3. *output*: És la fase final on es produeix la resposta biològica a l'estímul inicial. Les respostes varien segons l'estímul i engloben la divisió, la migració, l'adhesió, la diferenciació cel·lulars i l'apoptosi. El resultat final depèn del context cel·lular, del lligand i del dímer format.



**Figura 8.** Estructura de la via de transmissió del senyal de la via ErbB. En mamífers, la xarxa té forma de llaç i es pot dividir en 3 etapes: input o reconeixement del senyal; processament del senyal i output o resposta biològica generada.

Figura modificada de Citri A, Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. 7(7)

La via de senyalització dels receptors ErbB està altament regulada per mecanismes de control que es poden classificar en dos grups segons si són components preexistents de la via de senyalització o si són components sintetitzats *de novo*. Els primers s'activen mitjançant modificacions post-traduccionals mentre que els últims controlen el temps de resposta [76-77]. Al mateix temps, aquests mecanismes de regulació poden ser retroalimentacions positives (activadores) o negatives (desactivadores). En les primeres hi trobem un mecanisme per la generació de lligand disponible causada per l'activació de Pyk2/c-Src [78-80] i un altre causat per l'activació de PLC $\beta$ / $\gamma$  [81-83]. Entre els mecanismes de retroalimentació negativa n'hi trobem de desencadenats per fosfatases (SHP-1 i SHP-2), altres són causats per la inhibició de SOS [84-85], i també un últim mecanisme que consisteix en la degradació del receptor per endocitosi [86-88]. Aquest últim és el principal mecanisme d'eliminació del senyal. En aquests

controls negatius hi estan implicats tant mecanismes moleculars, com modificacions post-traduccionals, compartimentalització, inactivació catalítica i impediments estèrics.

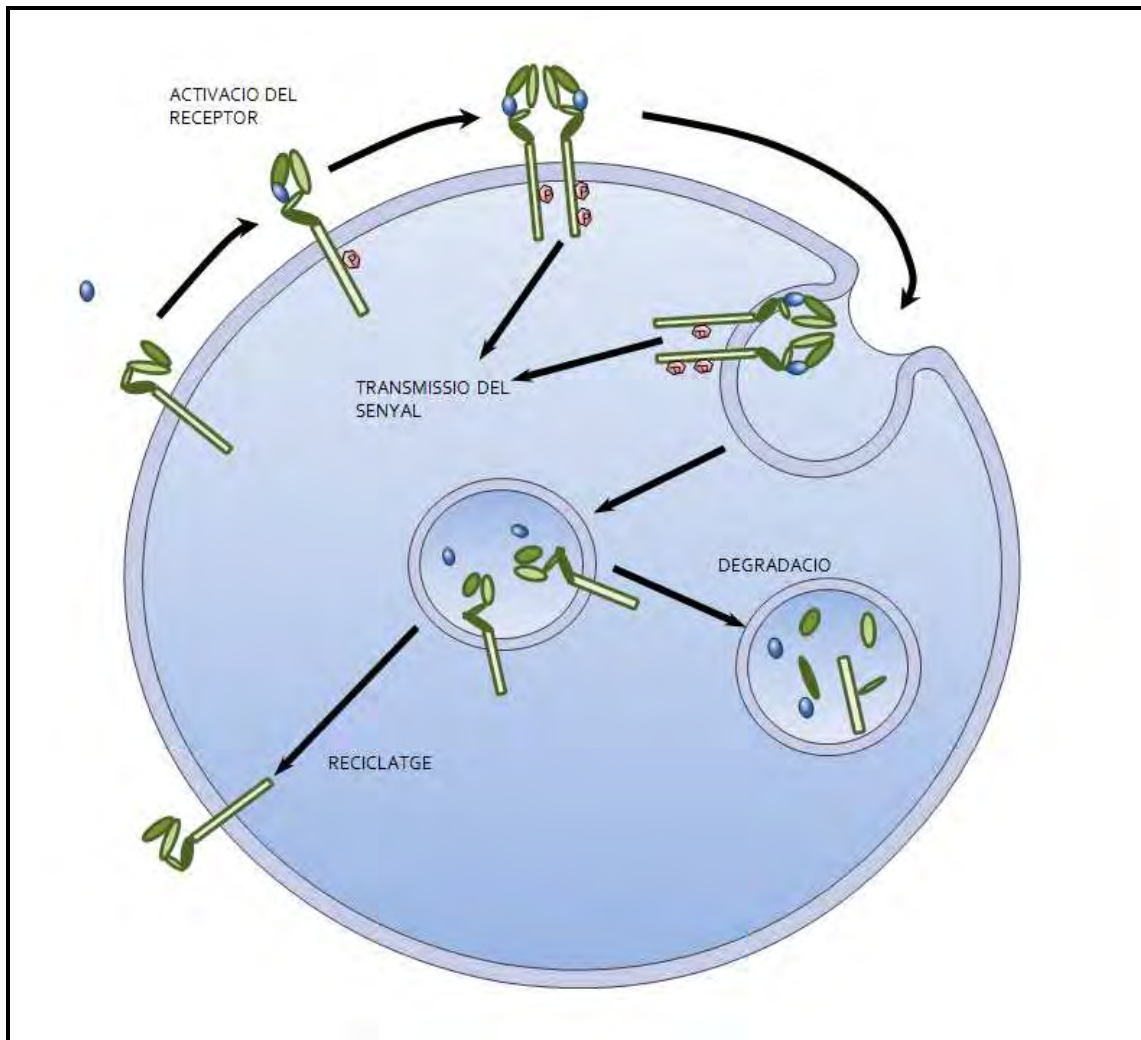
### 1.1.3 Eliminació del senyal generat pels ErbBs

Tot i la seva importància, els mecanismes de regulació negatius dels receptors ErbB no són tant coneguts com els mecanismes d'activació i de distribució del senyal fins el nucli. El principal, però no l'únic, mecanisme que permet una reducció en la senyalització de la via ErbB és la internalització i posterior degradació del receptor. Però existeixen altres mecanismes com són les fosfatases de tirosines que defosforil·len els receptors, i per tant, els desactiven.

No tots els dímers es degraden per igual, el tipus de degradació que segueix el receptor ve determinat per la composició del dímer: les homo ErbB<sub>1</sub> són conduïts al lisosoma mentre que les molècules ErbB<sub>3</sub> es reciclen [46, 89], els heterodímers que contenen ErbB<sub>2</sub> tenen una baixa taxa d'endocitosi i fan que la seva parella tingui una major taxa de reciclatge [48, 90]. Aquesta especificitat en la degradació fa que els diferents dímers tinguin una capacitat mitogènica variable.

El mecanisme d'inactivació del senyal més conegut és el cas del receptor ErbB<sub>1</sub>. Aquests receptors es localitzen als *caveolae* (microdominis de la membrana plasmàtica enriquits amb colesterol, glicoesfingolípid i rafts que formen petites invaginacions de la membrana) gràcies a la informació que contenen en els dominis transmembrana i jxtamembrana del receptor [91]. La unió de l'EGF amb el receptor fa que aquest abandoni els *caveolae* i que la zona de la membrana a la que es troben s'invagini per formar vesícules endocítiques. Per altra banda, també causa la fosforil·lació de c-Cbl: proteïna que s'uneix al receptor activat i en facilita la seva ubiquitinació. Per tant, n'accelera la seva endocitosi [92]. Les vesícules endocítiques maduren i formen els desmosomes primerencs i posteriorment els tardans. Durant el procés de maduració del desmosoma, el seu pH intern va disminuint i es van acumulant enzims hidrolítics que causen la degradació del receptor. L'acidificació del desmosoma pot causar la dissociació del complex lligand-receptor, o no. En el primer cas, el receptor és reciclat i retorna a la membrana plasmàtica on podrà tornar a iniciar

el procés; en el segon, el complex és enviat al lisosoma on és degradat (Figura 9) [89, 93].



**Figura 9.** Internalització d'un receptor ErbB mediada per la unió d'aquest amb un lligand.

Figura modificada de Waterman H, FEBS letters 490 (2001)142-152

Durant el procés d'endocitosi, el receptor pot mantenir la seva activitat gràcies a l'orientació citosòlica de la cua fosforil·lada del receptor dins els desmosomes, que permet que pugui seguir enviant senyals després que s'hagi internalitzat. La resposta cel·lular generada per les proteïnes efectores que s'uneixen al receptor present als desmosoma és diferent que la generada per les proteïnes efectores que s'uneixen al receptor actiu a la membrana cel·lular [94].

Altres mecanismes que causen la disminució del senyal de la via ErbB són:

- Fosfatases com PTEN ("phosphatase and tensin homolog"): PTEN és una fosfatasa que desactiva la proteïna Pi3K, per tant, redueix el senyal que produeix aquesta via.
- Síntesi de proteïnes com LRIG1 que potencia la ubiquitinació del receptor, Sef que segresta Erk al citoplasma, Spred que evita l'activació de Raf, i Ack1, Achinoid, Sprouty i Ralt/Mig6 que són reguladors negatius de la via però dels que se'n desconeix el mecanisme d'acció [95].

### 1.2 ErbB i càncer

Tot i que la via de senyalització ErbB és molt estable i robusta, pot patir una sèrie d'alteracions que la desestabilitzi, i en aquests casos pot desencadenar greus malalties. Una activació insuficient de la via pot desencadenar malalties neurodegeneratives mentre que una sobreactivació pot generar diferents tipus de càncer. En aquest estudi ens centrem en la implicació de la via ErbB en el càncer.

En un tumor, les cèl·lules han de créixer i dividir-se constantment, alterar el seu metabolisme, evitar els mecanismes de mort cel·lular, millorar la seva aportació de nutrients generant nous vasos sanguinis i, finalment, han de poder marxar del tumor primari, viatjar pels vasos sanguinis i limfàtics i establir-se en un nou teixit. La via ErbB està implicada en cadascun d'aquests passos, fet que explica el perquè de l'alteració d'aquesta via en les cèl·lules tumorals [96]. La sobreexpressió de la via ErbB és molt freqüent en diferents tipus de tumors i normalment s'associa amb una fase avançada del càncer i un pitjor pronòstic [97].

Els principals mecanismes pels quals les cèl·lules tumorals sobreactiven la via ErbB (sobretot ErbB1 i ErbB2) són la sobreproducció de factors de creixement i/o dels seus receptors per estimulació autocrina, endocrina o paracrina, l'activació constitutiva dels receptors causada per mutacions, i la inhibició dels processos de retroalimentació negativa. El coneixement de com un determinat tumor hiperactiva un receptor ErbB (si és a causa d'una mutació, una sobreexpressió o una amplificació del receptor) és de vital importància ja que pot ajudar a una millor tria de la teràpia que ha de seguir el pacient, donant-li així una oportunitat de sobreviure.

- *ErbB1 i el càncer:* La desregulació d'ErbB1 en el càncer pot està causada per diferents motius. És molt freqüent trobar mutacions del receptor ErbB1 en diferents tipus de càncer [98-101]. La mutació més freqüent és la deleció d'una part del domini extracel·lular que provoca una activació del receptor de forma constitutiva [31]. En altres casos, l'activació del receptor no està causada per mutacions, sinó per una sobreexpressió dels factors de creixement com TGF $\alpha$  o EGF de forma autocrina [102-104]. Un tercer mecanisme és l'augment dels nivells del receptor, que s'ha detectat en càncers de pulmó, pàncrees i mama entre altres [97, 105-106], i s'associa a una proliferació més ràpida del tumor (ja que es poden formar homodímers espontàniament i en absència de lligand), a un augment de la possibilitat de recaiguda i a una disminució de la supervivència [107].

La relació que hi ha entre la sobreexpressió d'ErbB1 i un mal pronòstic del càncer és elevada en càncers com el de cap i coll, el d'ovari, el de cèrvix, el de bufeta i el d'esòfag; moderada en els càncers gàstric, de mama, d'endometri i colorectal; i baixa en càncer de pulmó de tipus nsclc (de l'anglès *non small cell lung cancer*; càncer de pulmó de cèl·lules no petites) [105].

- *ErbB2 i el càncer:* Aquesta associació és la més estudiada en el càncer de mama, on el receptor és sobreexpressat en un 20-30% de càncers de mama ductals i invasius [19]. També se n'ha detectat sobreexpressió en càncers de pulmó, pàncrees, colon, endometri i ovari [20, 108-111]. En els casos de càncer de mama i d'ovari, aquesta sobreexpressió s'ha correlacionat amb un pitjor pronòstic dels pacients [20], així com amb un augment de la mida del tumor i amb una baixa diferenciació d'aquest, un augment de la capacitat invasora cap als nòduls limfàtics i de la capacitat angiogènica del tumor, aneuploidia i pèrdua dels receptors d'esteroides. En resum, ErbB2 confereix un gran avantatge proliferatiu als tumors que el sobreexpressen [112-113]. A més a més, l'expressió elevada d'ErbB2 també s'ha relacionat positivament amb un augment en el nombre i proliferació de cèl·lules iniciadores de tumor en el tumor primari, fet que podria explicar el perquè els càncers positius per ErbB2 tenen un pitjor pronòstic [114-116], ja que segons la hipòtesis de les cèl·lules



mare en l'origen del càncer, aquestes cèl·lules podrien ser les responsables de la progressió del tumor tot i una inicial resposta del pacient a la teràpia [117].

L'amplificació del gen que codifica per ErbB2 és el causant de l'augment dels nivells del receptor en el 92% dels casos de mama que el sobreexpressen [118].

Com a conseqüència del gran nombre de receptors, es poden produir dimeritzacions espontànies d'ErbB2 i la senyalització a través d'aquests homodímers. Una altra causa que genera homodímers de forma espontània és la presència d'una mutació a l'aminoàcid 655 que causa l'activació del receptor [119], a més a més, aquesta mutació ha estat associada a un augment en el risc de patir càncer de mama [120]. Tot i que de forma més esporàdica, també s'han trobat mutacions en el domini cinasa d'ErbB2 en alguns tumors de pulmó de cèl·lula no petita [121], però se'n desconeix el seu impacte biològic.

- *ErbB3 i el càncer:* ErbB3 s'expressa en diferents tipus de càncer com són els càncers de mama, còlon, gàstric i de pàncrees, però aquesta expressió no s'ha relacionat amb un pitjor pronòstic [27]. Tampoc hi ha evidències que l'expressió d'ErbB3 estigui causada per una amplificació gènica del receptor [64].

La importància d'ErbB3 en el desenvolupament d'un càncer no s'explica pel receptor en si mateix, sinó per la seva capacitat de formar heterodímers amb ErbB2 (cooperació entre receptors).

- *ErbB4 i el càncer:* S'han detectat mutacions en el domini cinasa del receptor ErbB4 en un 2% dels tumors analitzats, però se'n desconeixen les seves implicacions biològiques [122]. També se n'ha detectat una sobreexpressió en càncer de mama, però hi ha evidències que indiquen que aquesta, a diferència de la sobreexpressió dels altres receptors ErbB, s'associa a un pronòstic favorable del pacient que la mostra [123].

- *Cooperació entre receptors:* En molts tumors, no només hi ha alterat un receptor ErbB sinó que n'hi ha més d'un, fet que fa augmentar el potencial oncogènic d'aquestes cèl·lules tumorals. Per exemple, molts tumors que tenen

nivells elevats del receptor ErbB2, també tenen una elevada estimulació autocrina d'ErbB1 [97]. Els receptors ErbB2 i ErbB4 també es coexpressen en més del 50% de medul·loblastomes infantils [124]. També s'ha detectat la coexpressió i col·laboració d'ErbB2 i ErbB3 en càncer de mama, de bufeta i melanomes [125-129].

### 1.3 Teràpies

La teràpia dirigida es defineix com a una nova generació de fàrmacs antitumorals que actuen sobre molècules específiques (anomenades molècules diana) que són expressades o bé per les cèl·lules tumorals, o bé en el microambient del tumor, i que tenen un paper crític en el creixement, progressió i supervivència d'aquest. Un cop seleccionada la diana i analitzada l'eficàcia i seguretat del fàrmac generat, cal buscar marcadors per a poder determinar quins pacients seran més susceptibles de beneficiar-se del tractament.

A diferència de les estratègies citotòxiques, la teràpia dirigida actua d'una forma més selectiva i homogènia sobre el tumor i és efectiva a dosis inferiors a la màxima dosi tolerada (que en alguns casos no s'ha pogut determinar), aconseguint així una teràpia més específica i amb menys efectes secundaris.

Una característica de molts tumors sòlids és la desregulació de la via ErbB, per tant, aquesta via ha resultat ser molt atractiva per a la intervenció farmacològica. Altres motius que fan que aquesta via sigui tan atractiva per la teràpia dirigida són que els nivells elevats dels receptors es correlacionen amb un pitjor pronòstic del pacient, que les cèl·lules tumorals tenen uns nivells de receptor molt superiors a les no tumorals pel que es generen menys efectes secundaris i que les cèl·lules tumorals tenen una expressió homogènia del receptor pel que el fàrmac actua de forma homogènia dins del tumor.

La majoria d'esforços s'han concentrat en l'elaboració de fàrmacs dirigits contra els receptors ErbB1 i ErbB2 per varis motius:

- 1- Aquests són els que més sovint es sobreexpressen en les cèl·lules tumorals i aquesta sobreexpressió es correlaciona amb un pitjor pronòstic.
- 2- És fàcil determinar els nivells d'aquests receptors en teixit de pacients.

## INTRODUCCIÓ

---

Hi ha diferents estratègies encaminades a inactivar el senyal transmès pels receptors ErbB en el càncer com: l'ús d'inhibidors de l'activitat tirosina cinasa (ITC), l'ús d'anticossos monoclonals (Acm) dirigits contra el domini extracel·lular del receptor, el bloqueig de la traducció del mRNA del receptor [130-131], o l'ús de immunotoxines (anticossos conjugats amb fàrmacs o toxines) [132]. Tots aquests mecanismes tenen com a finalitat la degradació del receptor i/o el bloqueig de la via de transmissió del senyal.

Les estratègies que estan en un grau de desenvolupament més avançat (**Figura 10**) són:

- *estratègies immunològiques* (ús d'Acm dirigits contra el domini extracel·lular del receptor): aquestes teràpies tenen una baixa taxa de toxicitat i es caracteritzen per l'ús d'Acm que ataquen i inhibeixen, d'una forma altament específica, una proteïna determinada. La localització a la superfície cel·lular dels receptors ErbB i la seva importància en el desenvolupament del càncer, han fet que siguin grans candidats per la generació d'anticossos dirigits en contra seva. El problema de l'ús d'anticossos és la seva mida ja que en limita la seva penetració dins del tumor. Per tant, la seva acció no és homogènia i es concentra en la perifèria del tumor.

El mecanisme d'acció dels anticossos pot ser de dos tipus segons si està relacionat o no amb el sistema immunitari. En el primer cas, l'anticòs unit al receptor serveix de punt de reclutament dels limfòcits citotòxics en el tumor, procés anomenat citotoxicitat cel·lular dependent d' anticossos (CCDA) [133]. Els mecanismes independents del sistema immunitari inclouen un augment de l'apoptosi mediada per la via mitocondrial, el bloqueig de l'angiogènesi, la inhibició de la progressió del cicle cel·lular, la disrupció de la via de senyalització i una disminució del receptor en la superfície cel·lular a causa d'un augment de la seva taxa endocítica [134].

Els primers anticossos dels que la FDA en va aprovar el seu ús com a teràpia contra el càncer van ser el Rituximab i el trastuzumab els anys 1997 i 1998 respectivament. Actualment la llista d'Acm usats en la teràpia contra el càncer ha augmentat fins assolir 11 anticossos aprovats i un en revisió (**Taula 2**).

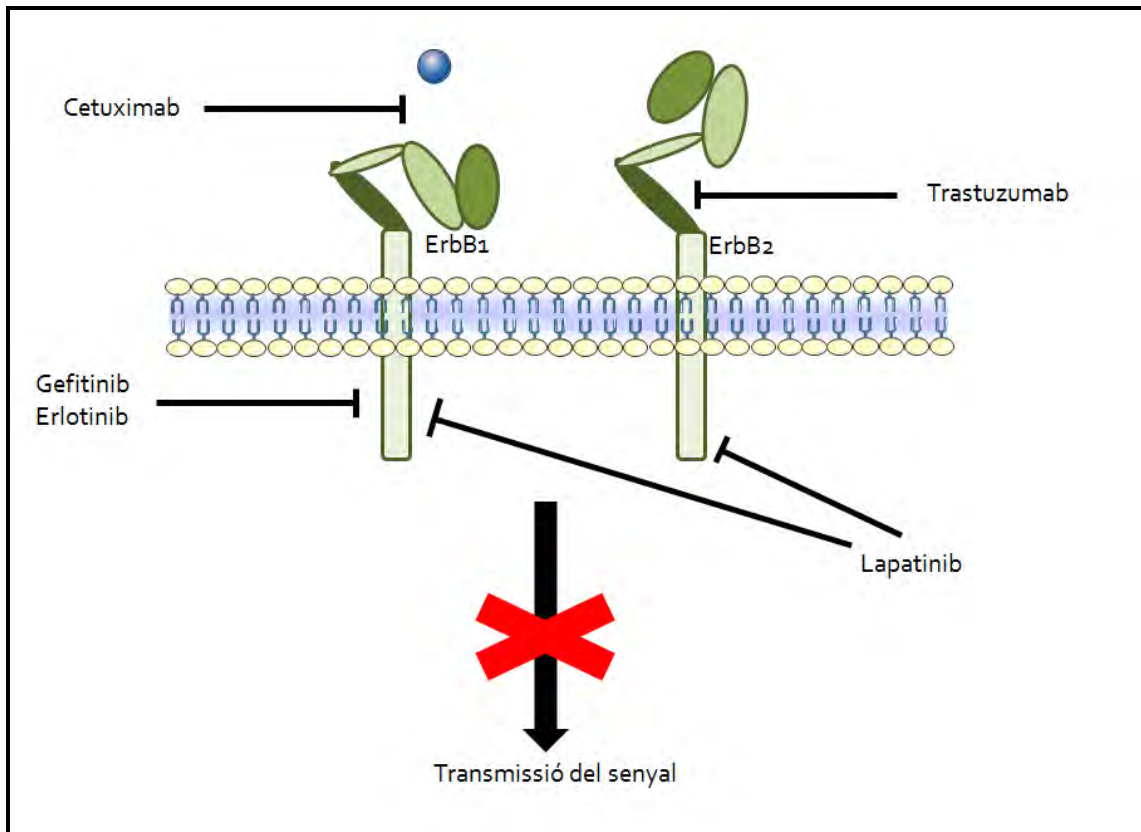
- *inhibidors de l'activitat tirosina cinasa de baix pes molecular (ITC)*: Són molècules de baix pes molecular que es poden administrar oralment i que actuen a nivell intracel·lular on competeixen amb el lloc d'unió del receptor a l'adenosina trifosfada (ATP), fet que provoca la disminució en la fosforil·lació d'aquest i el bloqueig de l'activitat cinasa, i per tant, de la transmissió del senyal. Aquests inhibidors poden ser reversibles o irreversibles i són capaços de disminuir la senyalització mediada pels receptors ErbB de forma selectiva. Tot i la seva especificitat, aquesta és menor que la dels Acm, fet que comporta que tinguin més efectes secundaris i que el seu efecte sigui menys constant que l'obtingut amb els Acm entre els diferents pacients (tot i que aquests tinguin característiques similars). D'altra banda, són molècules molt més petites que els Acm pel que la seva distribució pel tumor és molt més homogènia. Exemples de ITC són l'erlotinib i el gefitinib dirigits contra el receptor ErbB1 i el lapatinib dirigit contra els receptors ErbB1 i ErbB2 simultàniament.

## INTRODUCCIÓ

Nom no comercial	Nom comercial	tipus	Primera aplicació aprovada	Any d'aprovació a Europa (EUA)
Rituximab	MabThera, Rituxan	Anti-CD20; quimera d'IgG1	Limfoma de no- Hodgkin	1998 (1997)
Trastuzumab	Herceptin	Anti-ErbB2; IgG1 humanitzada	Càncer de mama	2000 (1998)
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	Anti-CD33; IgG4 humanitzada	Leucèmia mieloide aguda	NA (2000#)
Alemtuzumab	MabCampath, Campath-1H	Anti-CD52; IgG1 humanitzada	Leucèmia mieloide crònica	2001 (2001)
Tositumomab-I131	Bexxar	Anti-CD20; IgG2a murina	Limfoma de no- Hodgkin	NA (2003)
Cetuximab	Erbix	Anti-ErbB1; quimera d'IgG1	Càncer colorectal	2004 (2004)
Ibritumomab tiuxetan	Zebalin	Anti-CD20; IgG1 murina	Limfoma de no- Hodgkin	2004 (2002)
Bevacizumab	Avastin	Anti-VEGF; IgG1 humanitzada	Càncer colorectal	2005 (2004)
Panitumumab	Vectibix	Anti-ErbB1; IgG2 humana	Càncer colorectal	2007 (2006)
Ofatumumab	Arzerra	Anti-CD20; IgG1 humana	Leucèmia limfocítica crònica	2010 (2009)
Ipilimumab	Yervoy	Anti-CTLA-4; IgG1 humana	Melanoma metastàtic	2011 (2011)
Pertuzumab	Perjeta	Anti-ErbB2; IgG1 humanitzada	Càncer de mama	En revisió (2012)

# eliminat del mercat voluntàriament; **NA**, no aprovat

**Taula 2.** Anticossos monoclonals aprovats o en revisió a la Unió Europea o als Estats Units d'Amèrica. Dades actualitzades al juny 2012 per la *The Antibody Society* ([http://www.antibodysociety.org/news/approved\\_mabs.php](http://www.antibodysociety.org/news/approved_mabs.php)).



**Figura 10.** Representació dels inhibidors de l'activitat cinasa dels receptors ErbB. El cetuximab i el trastuzumab són dos anticossos monoclonals dirigits contra el domini extracel·lular d'ErbB1 i ErbB2 respectivament. El gefitinib i l'erlotinib són dos inhibidors de l'activitat tirosina cinasa del receptor ErbB1. El lapatinib és un altre inhibidor de l'activitat cinasa però que és capaç d'inhibir ErbB1 i ErbB2.

### 1.3.1 Trastuzumab (Herceptin)

El trastuzumab és un Acm que actua sobre el subdomini IV de la regió extracel·lular del receptor ErbB2. Aquest anticòs es va desenvolupar a partir d'un Acm de rata (4D5) del qual se'n va eliminar la regió constant de rata i es va humanitzar per així evitar un possible xoc anafilàctic dels pacients en tractament [135].

Tot i el gran nombre d'estudis existents, el mecanisme d'acció del trastuzumab no és del tot conegut. Fins fa poc, es pensava que l'anticòs provocava la internalització del receptor, i que aquest era el principal motiu de la disminució en la transmissió del senyal per part d'aquest. Però un estudi recent indica que la internalització observada no era causada pel trastuzumab, sinó que era un efecte causat per la tècnica d'anàlisi usada [136-137]. Altres autors també han indicat que els nivells del receptor ErbB2 no varien quan es tracten les cèl·lules amb el trastuzumab [138]. Actualment, el

## INTRODUCCIÓ

---

mecanisme d'acció proposat és el següent: la unió de l'anticòs amb el receptor causa una disminució en el senyal transmès per ErbB2, produeix un augment de la localització de PTEN a la membrana causant la inhibició de la via PI3K i desencadenant un augment de p27, fet que desemboca en una aturada del cicle cel·lular a la fase G<sub>1</sub>, la inhibició del mecanisme de reparació del dany a DNA mediat per p21 i la inducció de l'apoptosi. El trastuzumab també bloqueja l'alliberament del domini extracel·lular i per tant l'activació constitutiva del receptor; causa la resposta immunològica CCDA i potencia els efectes de la quimioteràpia [133, 138-140]. Estudis *in vivo* indiquen que el tractament amb trastuzumab també causa una inhibició de l'angiogènesi en el tumor com a conseqüència de la inhibició de la producció de factors proangiogènics (VEGF, TGF- $\alpha$ , Ang-1 o PAI-1) i de la reducció de la densitat i permeabilitat microvasculars i de la migració endotelial [113, 141-142].

Tots aquests mecanismes causen una reducció en la proliferació i un augment en la mort de les cèl·lules tumorals, fet que el va convertir, l'any 1998, en el primer anticòs aprovat per la FDA amb un ús terapèutic contra el càncer de mama; concretament s'administra el trastuzumab en el tractament de pacients amb càncer de mama metastàtic que sobreexpressen ErbB2, i que com a mínim han rebut un tractament amb quimioteràpia; també s'utilitza en combinació amb el Paclitaxel en primera línia de tractament en pacients amb càncer de mama metastàtic que també sobreexpressen ErbB2.

L'ampli ventall de mecanismes d'acció del trastuzumab s'ha traduït en un benefici clínic per pacients amb càncer de mama que sobreexpressen ErbB2, tant en estadi inicial com avançat. Els beneficis del tractament amb aquest Acm han quedat demostrats tant en estudis clínics en primera i segona línia de tractament on s'administra en monoteràpia, com en els que s'administra en combinació amb altres fàrmacs, així com en la seva administració durant el tractament adjuvant o neoadjuvant. Els estudis clínics mostren una taxa de resposta de l'11 al 15% en pacients amb càncer de mama positiu per ErbB2 i metastàtic en els que el tumor havia progressat després de la quimioteràpia [143-145]. En primera línia de tractament, les taxes de resposta al trastuzumab són del 19 al 34% en el mateix tipus de pacients [143, 146]. També s'han observat beneficis (entenent com a tals un augment de la taxa i/o durada de la resposta, i en la supervivència) en el tractament combinat del

trastuzumab amb altres fàrmacs com el docetaxol [147-148], el paclitaxel [149], la vinorelbina [150-151], les salts de platí [152], la capacitabina [153], la gemcitabina [154] i inhibidors d'aromatases [155-156]. La resposta al tractament observada en els diferents estudis varia a causa de variacions en la selecció dels pacients sota estudi, a causa del mètode usat per a la detecció dels nivells de la proteïna ErbB2 i/o a causa de l'esquema de tractament utilitzat.

A més a més dels seus efectes beneficiosos en la salut del pacient, un avantatge que fa augmentar la qualitat de vida d'aquest és que l'anticòs té una vida mitja en el torrent sanguini suficientment llarga com perquè l'administració del tractament sigui setmanal [157]. Però no tot són beneficis; tot i l'eficàcia observada, el tractament amb el trastuzumab té limitacions. En primer lloc, només el 15-35% de pacients amb càncer de mama que sobreexpressen ErbB2 responen al trastuzumab, per tant, hi ha una elevada taxa de resistència primària al tractament. A més a més, aproximadament el 70% dels pacients que responen a la teràpia esdevenen resistents després d'un any de tractament. Per tant, el desenvolupament de resistències al fàrmac és un problema clínic important [138, 158-162]. En segon lloc, al ser una molècula d'elevat pes molecular, no pot travessar la barrera hematoencefàlica i no pot actuar en tumors del sistema nerviós central. Per tant, quan un pacient progressa al tractament amb l'anticòs, ho fa, relativament sovint, en forma de metàstasi cerebral [163-164]. Tot i tenir pocs efectes secundaris, una tercera limitació és que el tractament amb el trastuzumab pot produir una cardiotoxicitat elevada, sobretot si es combina amb antraciclins, tot i que en la majoria de casos és reversible [165].

### **1.3.2 Mecanismes de resistència coneguts al trastuzumab**

A causa de la gran heterogeneïtat quant a l'expressió dels receptors ErbB i dels seus lligands en una malaltia com el càncer, la redundància i complexitat de la via de transmissió del senyal que generen, i la inestabilitat genètica de les cèl·lules tumorals, és fàcil l'aparició de resistències a les teràpies dirigides contra aquesta via de transmissió del senyal. Les resistències poden ser *de novo* o intrínseques (el tumor no respon a la teràpia des d'un inici) o adquirides (després d'un període de resposta, el tumor troba un mecanisme per reiniciar el seu creixement).



Centrant-nos en el trastuzumab, com hem dit anteriorment, la baixa taxa de resposta que presenta en monoteràpia (de l'ordre del 15% [143-146]) demostra que la majoria dels tumors tenen resistència intrínseca a l'anticòs. A més a més, la majoria dels pacients que responen al tractament deixen de fer-ho en menys d'un any. Per tant, la majoria de pacients n'adquireixen resistència si és que no la tenien d'inici. És per aquest motiu que és de vital importància el coneixement dels mecanismes que desencadenen la resistència al trastuzumab (**Figura 11**) per així obrir la porta a noves estratègies per a seguir combatent el tumor.

Tant els estudis *in vitro* com *in vivo* han donat molta informació sobre els possibles mecanismes de resistència al trastuzumab. Aquests mecanismes es poden classificar en dos grans grups segons si depenen o no d'un receptor amb activitat tirosina cinasa. En el primer cas es poden subdividir en mecanismes de resistència dependents d'un receptor de la família ErbB i mecanismes independents d'aquesta família.

El grup de mecanismes de resistència independents de receptor està format per aquells en els que hi estan implicats PTEN, CCDA, p27 i expressions elevades de survivina o MCL-1. En primer lloc, s'ha demostrat la importància de PTEN, un regulador negatiu de PI3K, en l'aparició de la resistència a la teràpia basada en trastuzumab [166]. Aquest estudi demostra que en 47 pacients amb càncer de mama metastàtic que sobreexpressen ErbB2, la resposta al tractament amb trastuzumab en combinació amb taxans és molt més efectiva en pacients amb tumors positius per PTEN que en els que no expressen la proteïna. Experiments *in vitro* suggereixen que el trastuzumab evita la unió del receptor ErbB2 amb Src, fet que permet que PTEN inhibeixi Akt desencadenant així, una aturada en el creixement cel·lular. Per tant, la pèrdua de PTEN (observada en el 40% dels càncers de mama [167]) es podria utilitzar com un marcador de la resistència al trastuzumab. Un segon mecanisme de resistència és el generat per una alteració en la resposta del sistema immunitari, la CCDA [168-169]. El trastuzumab és un anticòs, i com a tal, la unió amb la seva diana fa que quedi exposada la regió comuna de l'anticòs la qual serà reconeguda per les cèl·lules efectores NK (de l'anglès *natural killer*) del sistema immunitari. Si aquest reconeixement no es produeix correctament, l'eficàcia de trastuzumab es redueix fet que afavoreix l'aparició de resistència al tractament. Aquest mecanisme, però no és suficient per a l'aparició de la resistència al trastuzumab, doncs hi ha estudis que

mostren que cèl·lules resistents al tractament mantenen íntegra la CCDA [170-171]. En aquest grup també s'hi pot incloure el mecanisme de resistència generat per una disminució dels nivells de p27 (un inhibidor de cinases dependents de ciclina o cdk) [172] o per un canvi de la localització cel·lular d'aquesta proteïna [173]. Aquestes alteracions produeixen que p27 no s'uneixi i inactivi cdk2 i, per tant, no es produeix una aturada en el cicle cel·lular. L'últim mecanisme de resistència que es pot incloure en aquest grup és la sobreexpressió de la survivina i Mcl-1, dues proteïnes que formen part de la família PIA (proteïnes inhibidores de l'apoptosi). S'ha descrit que la viabilitat de cèl·lules tant amb resistència primària com secundària, és dependent de l'expressió d'aquestes proteïnes [174].

El grup de mecanismes de resistència al trastuzumab format per tots aquells mecanismes en els que hi estan implicats algun dels receptors de la via ErbB és el més ampli. En aquest grup hi trobem sistemes de resistència diversos com són alteracions en el reconeixement del receptor, sobreproducció de lligands d'algun dels receptors i/o activació de receptors alternatius, alteracions en el reciclatge d'ErbB2, generació d'isoformes del receptor per *splicing* alternatiu del mRNA, presència de mutacions i la TEM. Pel que fa a alteracions en la dinàmica del receptor ErbB2 a la membrana cel·lular que causen l'aparició de resistència al trastuzumab, s'han identificat proteïnes que emmascaren el receptor ErbB2 de manera que dificulten que l'anticòs en reconegui l'epítop. Un exemple de proteïna és MUC4 (mucin-4), l'expressió de la qual està inversament correlacionada amb la capacitat d'unió del trastuzumab a ErbB2 [175-177]; a més a més, s'ha demostrat que l'eliminació de MUC4 restaura la sensibilitat de les cèl·lules al tractament [176]. Una altra proteïna capaç d'emascarar el receptor és l'àcid hialurònic [178-179]. També s'ha detectat una forma truncada del receptor (p95ErbB2) en la que no existeix la zona de l'epítop de reconeixement de l'anticòs causant que aquestes cèl·lules no responguin al trastuzumab [180]. Aquest p95ErbB2 es pot formar tant per trencament proteolític i alliberament del DEC, com per traducció alternativa del mRNA que codifica per la proteïna [181]. Un altre mecanisme de resistència proposat, és l'acumulació d'ErbB2 a la membrana plasmàtica que pot ser causada per alteracions en l'activitat de Rac1 o Ras-like GTPase que dificulten l'endocitosi i eliminació del receptor [182-183] o per la TEM, la qual confereix propietats de cèl·lules mare a les cèl·lules que la pateixen, i en el cas que es

## INTRODUCCIÓ

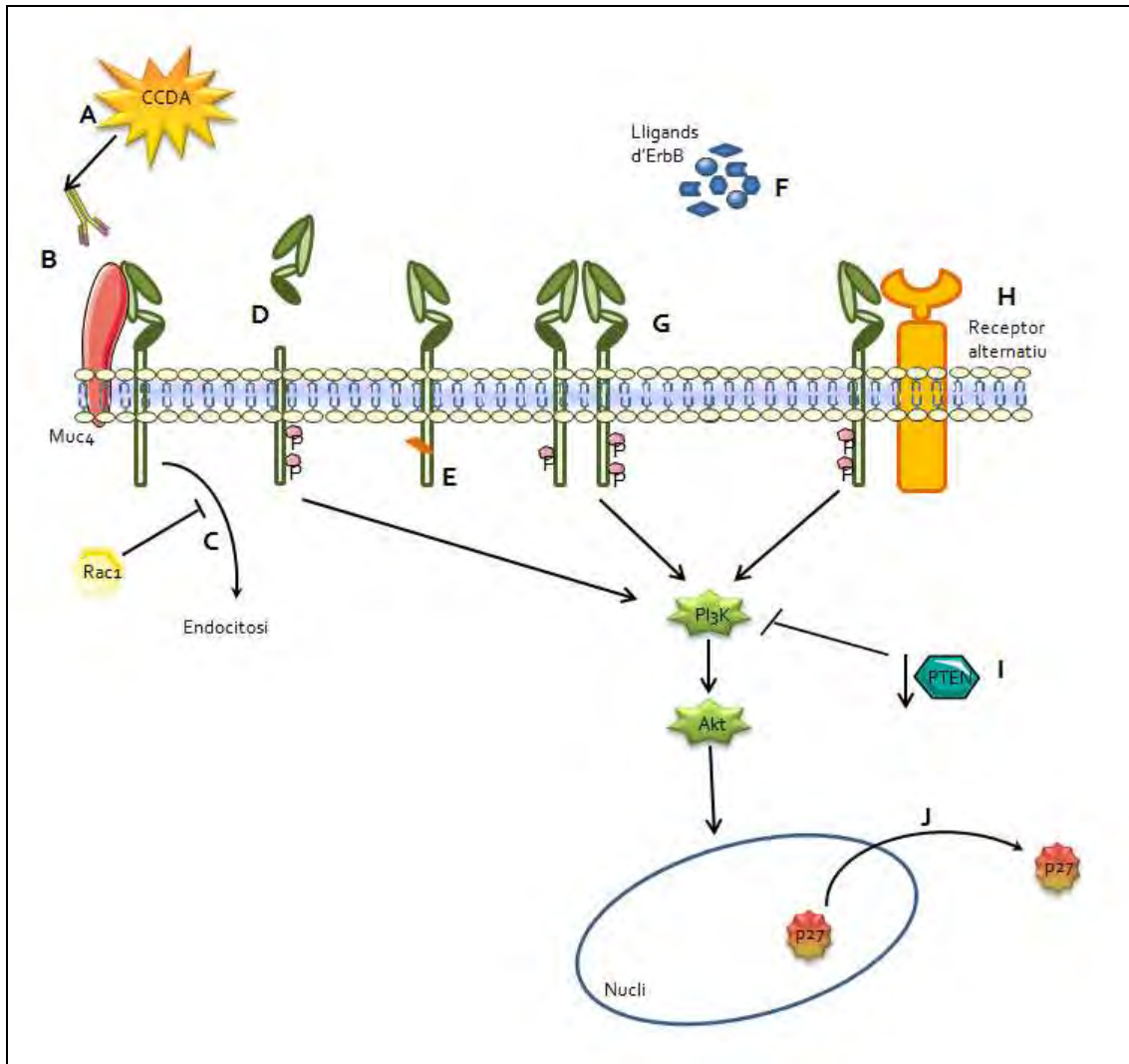
---

produeixi en cèl·lules que sobreexpressen ErbB2, s'ha descrit que causa una disminució en l'expressió del receptor en la membrana cel·lular, fet que podria estar implicat en la resistència d'aquest tipus cel·lular al trastuzumab [184]. A més a més, existeixen evidències que determinen que subpoblacions cel·lulars amb el fenotip  $CD44^+CD24^{-/low}$  (les quals estan enriquides en cèl·lules mare tumorals) podrien explicar la resistència clínica al trastuzumab [185-186]. Finalment, alteracions al gen (mutacions) o la generació d' isoformes (*splicing* alternatiu del mRNA) també poden causar resistència al trastuzumab. En el primer cas trobem de mutacions al domini tirosina cinasa del receptor (concretament a l'exó 21) [187]. Tot i que aquesta mutació no afecta a la unió del receptor amb el trastuzumab, sí que està relacionada amb l'aparició de resistència al tractament. En el segon cas trobem que la deleció de l'exó 16 durant el *splicing* alternatiu genera una isoforma del receptor (HER2 $\Delta$ 16) que fa que estigui permanentment actiu i dimeritzat, i per tant, insensible a la presència del trastuzumab [188].

A part d'alteracions en el receptor diana del trastuzumab, els altres membres de la família ErbB també juguen un paper molt important en l'aparició de resistència. Aquest anticòs no evita la formació d'heterodímers, per tant ErbB1 i ErbB3 poden heterodimeritzar entre ells o amb ErbB2 i activar les vies de senyalització PI3K i MAPK independentment de la inhibició en la senyalització que causa el trastuzumab, mantenint així la via de supervivència activa en presència del tractament [182, 189-190]. En aquest aspecte és tant important l'expressió dels receptors ErbB1 i ErbB3 com la dels seus lligands (EGF, TGF- $\alpha$ , heregulina o heparin-binding EGF). Una sobreproducció de lligands de forma autocrina o paracrina permet la sobreestimulació de la via de transmissió del senyal i la supervivència de les cèl·lules en presència del trastuzumab [182, 190-191]. En un estudi clínic s'ha suggerit que un excés de TGF- $\alpha$ , lligand d'ErbB1, pot causar una disminució de l'eficàcia del trastuzumab [192]. En aquest estudi s'han analitzat els nivells d'aquest lligand abans i després de l'aparició de la resistència a l'anticòs, i s'ha observat que inicialment els tumors eren negatius per TGF- $\alpha$  però que un cop esdevenen resistents passen a ser-ne positius. Estudis *in vitro* confirmen que les cèl·lules dissenyades genèticament per sobreexpressar TGF- $\alpha$  esdevenen resistents al tractament amb trastuzumab. Altres estudis mostren que TGF- $\beta$ 1 promou l'alliberament de lligands d'ErbB1 a través de les proteïnes TACE i

ADAM17, fet que causa l'aparició de resistència al trastuzumab [193]. Per tant, d'aquests estudis es pot concloure que, tant els receptors ErbB com els seus lligands estan implicats en la resistència al trastuzumab.

A més a més, l'aparició de resistència al trastuzumab no és exclusiva de la presència o no d'altres receptors de la família ErbB i/o dels seus lligands, sinó que s'ha demostrat que altres receptors tirosina cinasa hi poden estar implicats. Aquests mecanismes constitueixen el tercer grup. El cas més ben estudiat és el del receptor tipus 1 del factor de creixement de la insulina (IGF-1R); s'ha demostrat que la senyalització via IGF-1R antagonitza l'arrest cel·lular a G1 causat pel trastuzumab via la degradació de p27 [194]. D'altra banda, també s'ha vist que ErbB2 i IGF-1R poden interaccionar i que això només succeeix a les cèl·lules resistents al trastuzumab però no a les sensibles [195]. Altres receptors tirosina cinasa relacionats amb l'aparició de resistència al trastuzumab són EphA2, AXL, c-Met i FGFR, els quals mantenen l'estat d'activació d'Akt, i per tant, la supervivència cel·lular [159, 196-200].



**Figura 11.** Resum d'alguns mecanismes implicats en la resistència al trastuzumab. A. alteració del sistema immunitària, B. alteració en el reconeixement del receptor, C. alteració en el procés d'endocitosis, D. aparició d'una forma truncada o E. d'una mutació del receptor que l'activa, F. Producció excessiva de lligands dels receptors de la via ErbB i per tant, G. activació d'altres membres de la família, H. activació d'ErbB2 per part d'altres receptors de membrana independents a la família ErbB, I. disminució de l'activitat de PTEN i J. alteració en el control que té p27 del cicle cel·lular.

Figura modificada de kruser et al [201].

En aquest estudi ens centrarem en els mecanismes de resistència que afecten a l'eficàcia del trastuzumab. Concretament en la resistència *de novo*, per aquest motiu usarem la línia cel·lular JIMT-1 com a model ja que és la primera línia cel·lular amb resistència intrínseca al trastuzumab que s'ha descrit. A més a més, aquesta línia cel·lular constitueix un model d'estudi únic al presentar simultàniament, i en diferents graus, varis mecanismes de resistència al trastuzumab que altres línies cel·lular només

presenten per separat, com són nivells elevats i amplificació gènica d'ErbB2, baixa expressió de PTEN, una mutació activadora del gen PI3CA i elevada expressió de NRG1 [202-203].

Les cèl·lules JIMT-1 es van obtenir d'una pacient de 62 anys amb càncer de mama ductal de grau 3 el qual sobreexpressava la proteïna ErbB2 i també en tenia amplificació gènica. Per aquest motiu, després de practicar-li una mastectomia i extirpació dels ganglis limfàtics es va tractar amb trastuzumab combinat amb quimioteràpia (concretament el pacient va entrar en l'estudi FinHER) i es va finalitzar amb radioteràpia. Dues setmanes després de finalitzar el tractament es van detectar cèl·lules canceroses a la pleura que no es van poder eliminar amb trastuzumab en monoteràpia. La pacient que en cap moment va respondre al tractament amb trastuzumab, va morir 12 setmanes després de la detecció de la metàstasi pleural [204].

Les cèl·lules denominades JIMT-1 són cèl·lules d'origen epitelial obtingudes a partir del fluid pleural extret a la pacient. Entre altres característiques (**Taula 3**), la línia cel·lular té amplificació gènica del receptor ErbB2, que tot i no tenir cap mutació, sí que presenta un polimorfisme (Prolina -> Alanina en el codó 1170, exó 27). Pel que fa a la resta de receptors de la família ErbB, els nivells d'expressió són similars als d'altres línies cel·lulars com les SKBR3 [176, 204]. Un altre tret de les JIMT-1 és que el tipus de citoqueratines que expressa, juntament amb nivells elevats de CD44, indiquen que tot i ser ErbB2<sup>+</sup>, són cèl·lules de tipus basal. A més a més, és la línia cel·lular amb l'expressió gènica més semblant a l'expressió del càncer de mama ErbB2<sup>+</sup> [205-206].

A part de la seva resistència intrínseca al trastuzumab, les JIMT-1 també han mostrat resistència a altres teràpies dirigides contra els receptors ErbB com són el pertuzumab, el carnetinib (CI1033), el gefitinib i el lapatinib [203, 206].

Expressió proteica	Resultat
Receptor d'estrogen	Negatiu
Receptor de progesterona	Negatiu
ErbB-2	Sobre expressió (3+) i amplificació
p53	Sobre expressió
p63	Positiu
PTEN	Expressió elevada
Ki-67	Expressió elevada
Citoqueratina 5/14 (basal)	Positiu
Citoqueratina (luminal)	8/18 Positiu
Vimentina	Positiu
Actina de múscul llis ( <i>Smooth muscle actin</i> )	negatiu
CD44	positiu

**Taula 3.** Caracterització immunohistoquímica de la línia cel·lular de càncer de mama JIMT-1 [202, 204].

#### 1.4 Cèl·lules mare tumorals (CMT) i transició epiteli-mesènquima (TEM)

La TEM és un procés complex implicat en el desenvolupament embrionari i regeneració de teixits, i altament conservat durant l'evolució. Es caracteritza per una dissolució de les unions entre cèl·lules epitelials adjacents i pèrdua de la polaritat apico-basolateral, un augment en la capacitat de degradació de la matriu extracel·lular i modificació del citoesquelet de les cèl·lules epitelials, donant com a resultat cèl·lules mesenquimals amb capacitats migratòria i invasiva (**Figura 12**) [207-208]. Durant l'embriogènesi la TEM es produeix durant la gastrulació, la formació de la cresta neuronal i la formació d'òrgans com les vàlvules cardíques, musculatura esquelètica i paladar [209]. En aquests processos, les cèl·lules que pateixen la transició són reclutades a llocs específics de l'embrió en desenvolupament on es diferencien mitjançant el procés invers (transició mesenquima-epiteli, TME) per a formar teixits epitelials en llocs distants. En situacions fisiològiques normals, aquest procés també es produeix durant la regeneració de teixits; després d'un dany o ferida, les cèl·lules epitelials pròximes es desdiferencien mitjançant la TEM per així poder regenerar els tipus cel·lulars malmesos [210]. Recentment també s'ha descrit que aquest procés es dona en certes malalties com és el cas de la fibrosis i del càncer [9], però essent un fenomen transitori i reversible, fet que fa que el seu estudi sigui difícil.

Actualment es considera que hi ha tres subtipus diferents de TEM segons les conseqüències funcionals que genera i el seu context biològic. Aquests són: TEM de desenvolupament (o Tipus I), TEM de fibrosi o de regeneració de ferides (o Tipus II) i TEM de càncer (o tipus III) [208]. A més a més, s'han descrit marcadors específics per cada tipus, així com altres de generals [211]. En aquest estudi ens centrarem en la implicació de la TEM en el càncer, on li confereix propietats d'agressivitat (facilita la migració, la invasió i la metàstasi, **Figura 13**). S'han detectat característiques de la TEM en diversos tipus de càncer com per exemple, càncer de mama [212], d'ovari [213], de colon [214] i d'esòfag [215]. Concretament, els càncers de mama agressius mostren característiques fenotípiques pròpies del procés, com per exemple, una reducció de marcadors epitelials (E-cadherina, ocludina, claudines, desmoplaquines i citoqueratines epitelials) i un augment de marcadors mesenquimals (com vimentina, *Smooth muscle actin*, fibronectina i n-cadherina) [210].



## INTRODUCCIÓ

---

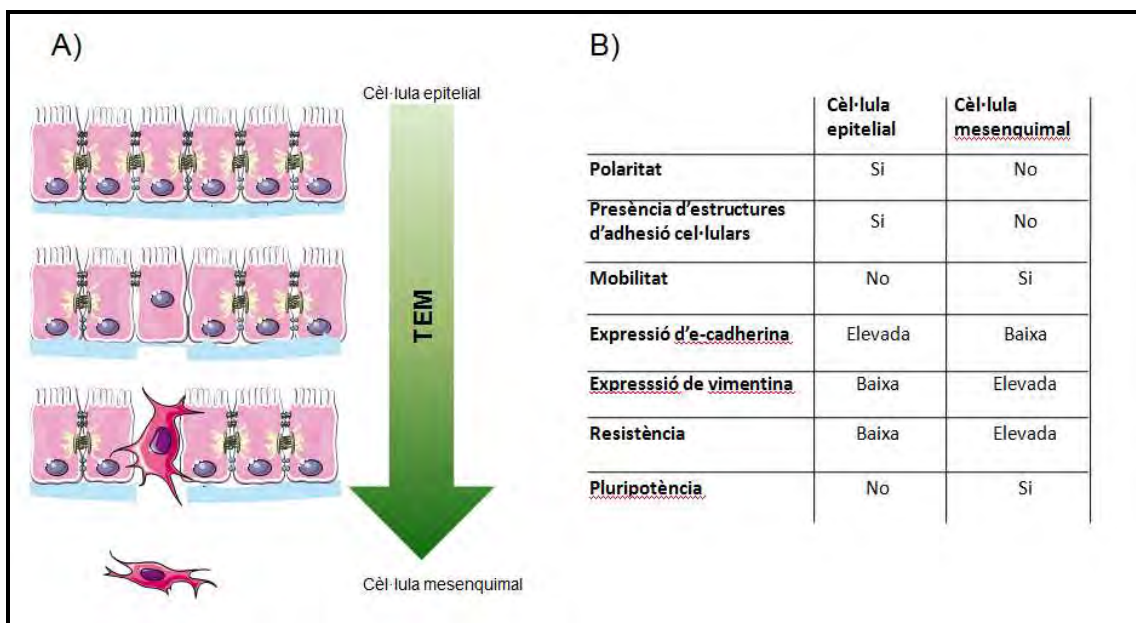
A nivell cel·lular, els mecanismes que regulen la TEM en situacions fisiològica i patològica són molt similars. Entre els senyals que poden induir la TEM hi trobem els generats per un estat d'hipòxia, per factors inductors secretats per la matriu extracel·lular o per les pròpies cèl·lules com TGF- $\beta$ , i per lligands de receptors amb activitat tirosina cinasa i els propis receptors (entre els que hi trobem ErbB2) [216-218]. Concretament, l'activació d'aquestes vies de senyalització pot causar un augment de l'activitat de repressors transcripcionals com SNAIL, ZEB i TWIST que al seu torn reprimeixen l'expressió de les molècules d'adhesió cel·lular com l'e-cadherina i per tant, causen TEM [219]. Cal tenir en consideració que no tots els receptors de la via ni en tots els contextos són capaços d'induir la TEM, sinó que la consecució d'aquest procés depèn dels dímers formats, de les vies de senyalització efectores que s'activen i de com el senyal generat afecta a les unions cel·lulars [220]. La TEM i la formació cèl·lules mesenquimals amb característiques de CMT també estan regulades per alguns miRNA, entre els que destaquen la família dels miR200, que regulen factors de transcripció com Twist1, Snai1 ZEB1 i ZEB2 [221].

D'entre els principals factors de transcripció que regulen la TEM (**Taula 4**), hi trobem membres de la família SNAIL i ZEB amb estructura de dits de zinc, i membres de la família de basic-hèlix-gir-hèlix com TWIST. Tots ells s'uneixen a les caixes E dels promotors dels gens diana que regulen, reprimint-ne la seva expressió. Entre altres, s'uneixen al promotor del gen CDH1 fet que comporta la inhibició de l'expressió d'e-cadherina i desencadena la TEM [222-223]. Actualment, hi ha estudis que demostren que a més d'induir la TEM, aquests factors de transcripció també estan implicats en la proliferació i supervivència cel·lulars i en la progressió del tumor [224].

En un tumor epitelial, per tant, format per cèl·lules diferenciades, i sota determinats estímuls que poden ser externs al tumor o generats per les pròpies cèl·lules que el formen, es pot dur a terme la TEM. Les cèl·lules del tumor que han sofert TEM es desdiferencien donant lloc a cèl·lules mesenquimals amb propietats de CMT [225]. Aquestes cèl·lules permeten la progressió de la malaltia, doncs són cèl·lules multipotents que es poden rediferenciar en un tipus cel·lular diferent permetent així la creació de vasos dins del tumor (angiogènesi) o, a causa del seu augment en la mobilitat i resistència, poden migrar i viatjar pel torrent sanguini fins que s'implanten en un nou teixit on poden rediferenciar-se generant així un tumor epitelial secundari o

metàstasi (per aquest motiu, també se les anomenen cèl·lules iniciadores de tumor). La TEM no només confereix agressivitat al càncer, sinó que, a més a més, li dona resistència al tractament. Concretament, s'ha vist que tumors que han sofert TEM són més resistents a la teràpia convencional com a l'oxaliplatí, paclitaxel i radiació entre altres [226-231]. A més a més, amb l'eliminació de l'expressió de Twist o l'expressió forçada de miR-200c (fets que regulen negativament la TEM) s'aconsegueix una resensibilització de les cèl·lules resistents [232-233]. L'adquisició d'un fenotip mesenquimal també pot prevenir la senescència induïda per oncogèns [234]. Finalment, la TEM pot facilitar l'evasió del sistema immunitari regulant-lo directament, fet que contribueix a l'agressivitat del tumor [235].

En resum, la TEM contribueix a l'adquisició del fenotip de cèl·lules mare tumorals, resistència a la quimioteràpia i senescència, evasió del sistema immunitari, propagació local de les cèl·lules tumorals i inducció de l'expressió del perfil gènic de tipus basal. Per tant, afavoreix a la progressió de la malaltia cap a un estadi més invasiu i metastàtic [209].



**Figura 12.** A) Durant la transició epiteli-mesènquima es perden les unions entre les cèl·lules epitelials adjacents, es perd la polaritat apico-basolateral, es degrada la matriu extracel·lular i es modifica el citoesquelet de les cèl·lules donant com a resultat cèl·lules mesenquimals. B) Característiques diferencials entre cèl·lules epitelials i mesenquimals.

## INTRODUCCIÓ

---

### Factor de transcripció Funcions

#### inductor de TEM

<b>TWIST</b>	<p>Indueix el perfil d'expressió gènica mesenquimal i inicia el procés d'invasió.</p> <p>Indueix les cèl·lules HMLE cap un estat mesenquimal i desdiferencia les cèl·lules HMLEN a CMT via TEM. L'expressió constitutiva de Twist<sub>1</sub> en les cèl·lules HMLER augmenta la proporció de cèl·lules mare, la formació de mamosferes i la propietat tumorigènica in vivo. Twist<sub>1</sub> també indueix el fenotip CMT en mama ja que causa la disminució de l'expressió de CD24.</p>
<b>SNAIL1</b>	<p>Regula l'estabilitat de les unions estretes, l'expressió de les proteïnes d'unió tipus gap i la desestabilització dels desmosomes. També activa l'expressió de proteases.</p> <p>L'expressió constitutiva de Snai<sub>1</sub> en les cèl·lules HMLER augmenta la proporció de cèl·lules mare, la formació de mamosferes i la propietat tumorigènica in vivo. Snai<sub>1</sub> promou que les cèl·lules de càncer d'ovari adquireixin característiques de CMT.</p>
<b>SLUG/SNAIL2</b>	<p>Regula l'estabilitat de les unions estretes, l'expressió de les proteïnes d'unió tipus gap i la desestabilització dels desmosomes. També activa l'expressió de proteases.</p> <p>Protegeix a les cèl·lules hematopoiètiques progenitores de l'apoptosi induïda per la radiació. També promou que les cèl·lules de càncer d'ovari adquireixin característiques de CMT.</p>
<b>ZEB1</b>	<p>LBX<sub>1</sub> indueix l'expressió de ZEB<sub>1</sub> en CMT causant-ne una sobreexpressió. ZEB<sub>1</sub> promou la tumorigènesi i fa d'unió entre l'activació de TEM i el manteniment de les CMT ja que inhibeix l'expressió de miRNA implicats en la inhibició de les característiques de les CMT.</p>
<b>ZEB2</b>	<p>Es sobreexpressa en CMT ja que Twist<sub>1</sub>, TGF-β i LBX<sub>1</sub> n'indueixen l'expressió</p>
<b>FOXC2</b>	<p>Està altament expressat en càncer de mama de tipus basal i confereix propietats de cèl·lules mare a cèl·lules epitelials.</p>
<b>LBX1</b>	<p>Promou la migració cel·lular i causa l'augment de la subpoblació CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>, també contribueix a la progressió del càncer de mama via TEM.</p>

**Taula 4.** Resum dels factors de transcripció implicats en la TEM i que regulen les propietats de les CMT [209, 236].

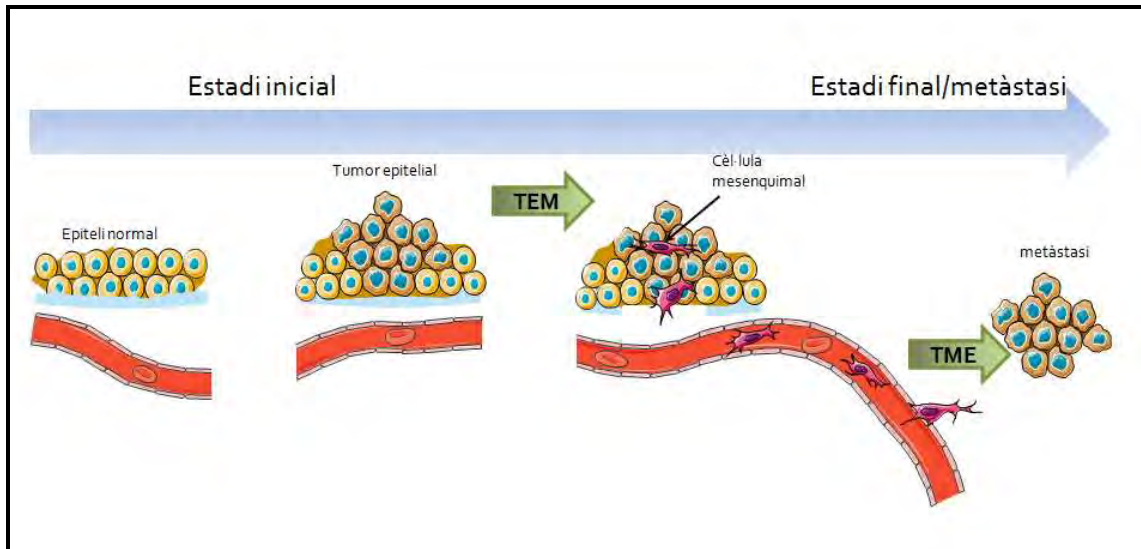


Figura 13. Implicació de la TEM i la TME en l'evolució del càncer.



## **2. Hipòtesi**



## 2. Hipòtesi

- 2.1** La resistència intrínseca del càncer de mama a teràpies moleculars dirigides específicament contra l'oncoproteïna ErbB2 pot ser explicada mitjançant el fenotip mesenquimal associat a les denominades CMT, ja relacionades amb l'aparició de resistències als tractaments clàssics (radioteràpia, hormonoteràpia i quimioteràpia).
- 2.2** La integració de marcadors moleculars relacionats amb el fenotip mesenquimal, com la classificació molecular del càncer de mama, mostrarà l'existència de nous subtipus moleculars intrínsecs de càncer de mama amb capacitat predictiva de la resposta primària a teràpies dirigides contra ErbB.
- 2.3** Fàrmacs amb capacitat de suprimir específicament el fenotip mesenquimal de la població de CMT obren una porta a noves estratègies capaces de prevenir o retardar la resistència a teràpies dirigides contra ErbB2, que poden tenir un gran impacte en la pràctica clínica.





# 3. Objectius



### 3. Objectius

- 3.1** Caracteritzar la relació entre l'existència i/o aparició del fenotip mesenquimal atribuït a la subpoblació de CMT amb la resistència primària a teràpies moleculars dirigides contra ErbB2 (com són l'anticòs monoclonal trastuzumab o inhibidors de l'activitat tirosina cinasa com el lapatinib).
- 3.2** Validar funcionalment marcadors moleculars específicament relacionats amb la generació i/o manteniment del fenotip mesenquimal com a mecanismes causals de la resistència primària a teràpies moleculars antiErbB2. Integrar el fenotip mesenquimal en la classificació molecular del càncer de mama per a posar de manifest nous subtipus intrínsecs capaços de predir la resposta primària al trastuzumab.
- 3.3** Descobrir i caracteritzar, *in vitro* i *in vivo*, nous fàrmacs dirigits contra el fenotip mesenquimal de la població de CMT com a noves teràpies moleculars capaces de prevenir o retardar la resistència primària a teràpies dirigides contra ErbB2.



# **4. Materials, mètodes i resultats**



**Inhibitor of Apoptosis (IAP) survivin is indispensable for survival of HER2 gene-amplified breast cancer cells with primary resistance to HER2/1-targeted therapies**



C. Oliveras-Ferraros, A. Vazquez-Martin, S. Cufí, V.Z. Torres-Garcia, T. Sauri-Nadal, S. Del Barco, E. Lopez-Bonet, J. Brunet, B. Martin-Castillo, J. A. Menendez. "Inhibitor of Apoptosis (IAP) survivin is indispensable for survival of HER2 gene-amplified breast cancer cells with primary resistance to HER1/2-targeted therapies". *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 407, Issue 2 (8 April 2011) : 412–419. DOI 10.1016/j.bbrc.2011.03.039

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.03.039>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X11004232>

Received 7 March 2011

Available online 12 March 2011

### **Abstract**

Primary resistance of HER2 gene-amplified breast carcinomas (BC) to HER-targeted therapies can be explained in terms of overactive HER2-independent downstream pro-survival pathways. We here confirm that constitutive overexpression of Inhibitor of Apoptosis (IAP) survivin is indispensable for survival of HER2-positive BC cells with intrinsic cross-resistance to multiple HER1/2 inhibitors. The IC<sub>50</sub> values for the HER1/2 Tyrosine Kinase Inhibitors (TKIs) gefitinib, erlotinib and lapatinib were up to 40-fold higher in trastuzumab-unresponsive JIMT-1 cells than in trastuzumab-naïve SKBR3 cells. ELISA-based and immunoblotting assays demonstrated that trastuzumab-refractory JIMT-1 cells constitutively expressed ~4 times more survivin protein than trastuzumab-responsive SKBR3 cells. In response to trastuzumab, JIMT-1 cells accumulated ~10 times more survivin than SKBR3 cells. HER1/2 TKIs failed to down-regulate survivin expression in JIMT-1 cells whereas equimolar doses of HER1/HER2 TKIs drastically depleted survivin protein in SKBR3 cells. ELISA-based detection of histone-associated DNA fragments confirmed that trastuzumab-refractory JIMT-1 cells were intrinsically protected against the apoptotic effects of HER1/2 TKIs. Of note, when we knocked-down survivin expression using siRNA and then added trastuzumab, cell proliferation and colony formation were completely suppressed in JIMT-1 cells. Our current findings may be extremely helpful to design successful combinatorial strategies aimed to circumvent the occurrence of de novo resistance to HER2-directed drugs using survivin antagonists.

### **Keywords**

Survivin; HER2; Trastuzumab; Lapatinib; Breast cancer



**Pathway focused proteomic signatures in HER2-overexpressing breast cancer with a basal-like phenotype: New insights into *de novo* resistance to trastuzumab (Herceptin)**

C. Oliveras-Ferraros, A. Vazquez-Martin, B.Martin-Castillo, M.C. Pérez-Martínez, S. Cufí, S. Del Barco, L. Bernado, J. Brunet, E. López-Bonet, J.A. Menendez. *International Journal of Oncology*. Vol. 37, issue 3 (September 2010) : 669-678. DOI 10.3892/ijo\_00000716

[http://dx.doi.org/10.3892/ijo\\_00000716](http://dx.doi.org/10.3892/ijo_00000716)

<http://www.spandidos-publications.com/ijo/37/3/669>

Received May 3, 2010; Accepted June 2, 2010

## Abstract

Pioneering clinical studies in de novo refractoriness to the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab have suggested that HER2 gene-amplification can take place also in a basal-like molecular background to generate basal/HER2+ tumors intrinsically resistant to trastuzumab. Here, we first investigated the unique histogenesis of the basal/HER2+ phenotype in breast carcinomas. The presence of basal CK5/CK6 cytokeratin expression in HER2+ tumors revealed a significant overlap in the histological features of HER2+/CK5/6+ and basal-like breast carcinomas. Basal/HER2+ tumors were typically poorly differentiated, high-grade invasive ductal carcinomas with large geographic necrosis, pushing margins of invasion, syncytial arrangement of tumor cells, ribbon- or festoon-like architecture, squamous metaplasia, stromal lymphocytic infiltrates, high mitotic index and strong p53 positivity. Secondly, we performed low-scale proteomic approaches in JIMT-1 cells, a unique model of HER2-gene amplified trastuzumab-resistant breast carcinoma with a basal-like phenotype, to develop biomarker signatures that may differentiate trastuzumab-responsive from non-responsive tumors. When applying antibody-based array technology to the extracellular milieu of trastuzumab-refractory JIMT-1 and trastuzumab-sensitive SKBR3 cell cultures, JIMT-1 cells were found to secrete higher amounts of several growth factors including amphiregulin, EGF, IGFBP-6, PDGF-AA, neurotrophins, TGF $\beta$  and VEGF. Semi-quantitative signaling node multi-target sandwich ELISAs revealed that JIMT-1 cells drastically overactivate RelA, the prosurvival subunit of NF- $\kappa$ B as compared to trastuzumab-sensitive luminal/HER2+ SKBR3 cells. When simultaneously assessing the activation status of 42 receptor tyrosine kinases (RTK) using a human phospho-RTK array, JIMT-1 cells were found to constitutively display hyperactivation of the insulin-like growth factor-I receptor (IGF-1R). High-content immunofluorescence imaging revealed that activated IGF-1R mainly localized at focal adhesion-like structures in JIMT-1 cells. In vitro wound healing assays suggested that this functional reorganization of the JIMT-1 cytoskeletal reorganization may account for an exacerbated trastuzumab-refractory 'migratogenic' phenotype. Forthcoming studies should validate the notion that identification of basal-like immunophenotypes and/or basal-like molecular signatures within HER2+ breast carcinomas may provide rapid means to define subgroups of breast cancer patients likely to display resistance to trastuzumab ab initio

## Keywords

HER2, basal-like, trastuzumab, insulin-like growth factor, proteomics



Dynamic emergence of the mesenchymal  
 $CD44^{pos} D24^{neg/low}$  phenotype in HER2-gene amplified  
breast cancer cells with *de novo* resistance to  
trastuzumab (Herceptin)

C. Oliveras-Ferrarosa, A. Vazquez-Martin, B. Martin-Castillo, S. Cufi, S. Del Barco, E. Lopez-Bonet, J. Brunet, Javier A. Menendez "Dynamic emergence of the mesenchymal CD44posCD24neg/low phenotype in HER2-gene amplified breast cancer cells with de novo resistance to trastuzumab (Herceptin)". *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 397, Issue 1 (18 June 2010) : 27–33. DOI 10.1016/j.bbrc.2010.05.041

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.05.041>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X10009320>

Received 6 May 2010

Available online 12 May 2010

### **Abstract**

Evidence is mounting that the occurrence of the CD44pos/CD24neg/low cell population, which contains potential breast cancer (BC) stem cells, could explain BC clinical resistance to HER2-targeted therapies. We investigated whether de novo refractoriness to the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab (Tzb; Herceptin) may relate to the dynamic regulation of the mesenchymal CD44pos/CD24neg/low phenotype in HER2-positive BC. We observed that the subpopulation of Tzb-refractory JIMT-1 BC cells exhibiting CD44pos/CD24neg/low-surface markers switched with time. Low-passage JIMT-1 cell cultures were found to spontaneously contain ~10% of cells bearing the CD44pos/CD24neg/low immunophenotype. Late-passage (>60) JIMT-1 cultures accumulated ~80% of CD44pos/CD24neg/low cells and closely resembled the CD44pos/CD24neg/low-enriched (~85%) cell population constitutively occurring in HER2-negative MDA-MB-231 mesenchymal BC cells. Dynamic expression of mesenchymal markers was not limited to CD44/CD24 because high-passages of JIMT-1 cells exhibited also reduced expression of the HER2 protein and over-secretion of pro-invasive/metastatic chemokines and metalloproteases. Accordingly, late-passage JIMT-1 cells displayed an exacerbated migratogenic phenotype in plastic, collagen, and fibronectin substrates. Intrinsic genetic plasticity to efficiently drive the emergence of the CD44pos/CD24neg/low mesenchymal phenotype may account for de novo resistance to HER2 targeting therapies in basal-like BC carrying HER2 gene amplification.

### **Keywords**

HER2; Trastuzumab; Stem cells; Basal-like; Breast cancer





## 4.4 Article 4

---

**Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) confers primary resistance to trastuzumab (Herceptin)**

C. Oliveras-Ferraro, B. Corominas-Faja, S. Cufí, A. Vazquez-Martin, B. Martin-Castillo, J.M. Iglesias, E. López-Bonet, Á.G. Martín, J. A. Menéndez. “ Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) confers primary resistance to trastuzumab (Herceptin)”. *Cell Cycle*. Vol. 11, issue 21 (November 1, 2012) : 4020-4032. DOI 10.4161/cc.22225

<http://dx.doi.org/10.4161/cc.22225>

<http://www.landesbioscience.com/journals/cc/article/22225/>

Submitted: August 30, 2012/ Revised: September 13, 2012/ Accepted: September 13, 2012

Published Online: September 19, 2012

## Abstract

The rate of inherent resistance to single-agent trastuzumab in HER2-overexpressing metastatic breast carcinomas is impressive at above 70%. Unfortunately, little is known regarding the distinctive genetic signatures that could predict trastuzumab refractoriness ab initio. The epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) molecular features, HER2 expression status and primary responses to trastuzumab were explored in the public Lawrence Berkeley Laboratory (LBL) Breast Cancer Collection. Lentivirus-delivered small hairpin RNAs were employed to reduce specifically and stably the expression of EMT transcription factors in trastuzumab-refractory basal/HER2<sup>+</sup> cells. Cell proliferation assays and pre-clinical nude mice xenograft-based studies were performed to assess the contribution of specific EMT transcription factors to inherent trastuzumab resistance. Primary sensitivity to trastuzumab was restricted to the SLUG/SNAIL2-negative subset of luminal/HER2<sup>+</sup> cell lines, whereas all of the SLUG/SNAIL2-positive basal/HER2<sup>+</sup> cell lines exhibited an inherent resistance to trastuzumab. The specific knockdown of SLUG/SNAIL2 suppressed the stem-related CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> mesenchymal immunophenotype by transcriptionally upregulating the luminal epithelial marker CD24 in basal/HER2<sup>+</sup> cells. Basal/HER2<sup>+</sup> cells gained sensitivity to the growth-inhibitory effects of trastuzumab following SLUG/SNAIL2 gene depletion, which induced the expression of the mesenchymal-to-epithelial transition (MET) genes involved in promoting an epithelial phenotype. The isolation of CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> mesenchymal cells by magnetic-activated cell sorting (MACS) confirmed their intrinsic unresponsiveness to trastuzumab. A reduction in tumor growth and dramatic gain in sensitivity to trastuzumab in vivo were confirmed when the SLUG/SNAIL2 knockdown basal/HER2<sup>+</sup> cells were injected into nude mice. HER2 overexpression in a basal, rather than in a luminal molecular background, results in a basal/HER2<sup>+</sup> breast cancer subtype that is intrinsically resistant to trastuzumab. EMT transcription factors might induce an enhanced phenotypic plasticity that would allow basal/HER2<sup>+</sup> breast cancer cells to “enter” into and “exit” dynamically from trastuzumab-responsive stem cell-like states. The systematic determination of SLUG/SNAIL2 as a stem/CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> cell-associated protein may improve the therapeutic management of HER2<sup>+</sup> breast carcinomas

**Keywords:** trastuzumab, EMT, SLUG, SNAIL2, breast cancer, cancer stem cells



**The anti-diabetic drug metformin suppresses self-renewal and proliferation of trastuzumab-resistant tumor-initiating breast cancer stem cells**

A. Vazquez-Martin, C. Oliveras-Ferraros, S. Del Barco, B. Martin-Castillo, J.A. Menendez. "The anti-diabetic drug metformin suppresses self-renewal and proliferation of trastuzumab-resistant tumor-initiating breast cancer stem cells". *Breast Cancer Research and Treatment*. Vol. 126, issue 2 (April 2011) : 355-364. DOI 10.1007/s10549-010-0924-x

<http://dx.doi.org/10.1007/s10549-010-0924-x>

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10549-010-0924-x>

Received: 22 March 2010 / Accepted: 16 April 2010

## Abstract

We here demonstrate that the anti-diabetic drug metformin interacts synergistically with the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab (Tzb; Herceptin™) to eliminate stem/progenitor cell populations in HER2-gene-amplified breast carcinoma cells. When using the mammosphere culture technique, graded concentrations of single-agent metformin (range 50–1,000 μmol/l) were found to dose-dependently reduce the number of mammospheres formed by SKBR3 (a Tzb-naïve model), SKBR3 TzbR (a model of acquired auto-resistance to Tzb) and JIMT-1 (a model of refractoriness to Tzb and other HER2-targeted therapies ab initio) HER2-overexpressing breast cancer cells. Single-agent Tzb likewise reduced mammosphere-forming efficiency (MSFE) in Tzb-naïve SKBR3 cells, but it failed to significantly decrease MSFE in Tzb-resistant SKBR3 TzbR and JIMT-1 cells. Of note, CD44-overexpressing Tzb-refractory SKBR3 TzbR and JIMT-1 cells retained an exquisite sensitivity to single-agent metformin. Concurrent combination of metformin with Tzb synergistically reduced MSFE as well as the size of mammospheres in Tzb-refractory SKBR3 TzbR and JIMT-1 cells. Flow cytometry analyses confirmed that metformin and Tzb functioned synergistically to down-regulate the percentage of Tzb-refractory JIMT-1 cells displaying the CD44<sup>pos</sup>/CD24<sup>neg/low</sup> stem/progenitor immunophenotype. Given that MSFE and mammosphere size are indicators of stem self-renewal and progenitor cell proliferation, respectively, our current findings reveal for the first time that: (a) Tzb refractoriness in HER2 overexpressors can be explained in terms of Tzb-resistant/CD44-overexpressing/tumor-initiating stem cells; (b) metformin synergistically interacts with Tzb to suppress self-renewal and proliferation of cancer stem/progenitor cells in HER2-positive carcinomas.

## Keywords

Metformin; Trastuzumab; HER2; Stem cells; Tumor-initiating cells



## 4.6 Article 6

---

**Metformin-induced preferential killing of breast cancer initiating CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/low</sup> cells is sufficient to overcome primary resistance to trastuzumab in HER2+ human breast cancer xenografts**





## Metformin-induced preferential killing of breast cancer initiating CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> cells is sufficient to overcome primary resistance to trastuzumab in HER2<sup>+</sup> human breast cancer xenografts

Sílvia Cufí<sup>1,2</sup>, Bruna Corominas-Faja<sup>1,2</sup>, Alejandro Vazquez-Martin<sup>1,2</sup>, Cristina Oliveras-Ferraros<sup>1,2</sup>, Joan Dorca<sup>2,3</sup>, Joaquim Bosch-Barrera<sup>2,3</sup>, Begoña Martin-Castillo<sup>2,4</sup>, Javier A. Menendez<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Translational Research Laboratory, Catalan Institute of Oncology (ICO), Girona, Spain

<sup>2</sup> Girona Biomedical Research Institute (IDIBGI), Girona, Spain

<sup>3</sup> Medical Oncology, Catalan Institute of Oncology (ICO), Girona, Spain

<sup>4</sup> Clinical Research Unit, Catalan Institute of Oncology (ICO), Girona, Spain

Correspondence to: Javier A. Menendez, email: jmenendez@iconcologia.net; jmenendez@idibgi.org

Keywords: Metformin, trastuzumab, HER2, cancer stem cells, breast cancer

Received: April 27, 2012,

Accepted: April 28, 2012,

Published: May 4, 2012

Copyright: © Cufí et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

### ABSTRACT:

**Trastuzumab-refractory breast cancer stem cells (CSCs) could explain the high rate of primary resistance to single-agent trastuzumab in HER2 gene-amplified breast cancer patients. The identification of agents with strong selective toxicity for trastuzumab-resistant breast CSCs may have tremendous relevance for how HER2<sup>+</sup> breast cancer patients should be treated. Using the human breast cancer cell line JIMT-1, which was established from the pleural metastasis of a patient who was clinically resistant to trastuzumab *ab initio*, we examined whether preferential killing of the putative CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> breast CSC population might be sufficient to overcome primary resistance to trastuzumab *in vivo*. Because recent studies have shown that the anti-diabetic biguanide metformin can exert antitumor effects by targeted killing of CSC-like cells, we explored whether metformin's ability to preferentially kill breast cancer initiating CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> cells may have the potential to sensitize JIMT-1 xenograft mouse models to trastuzumab. Upon isolation for breast cancer initiating CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> cells by employing magnetic activated cell sorting, we observed the kinetics of metformin-induced killing drastically varied among CSC and non-CSC subpopulations. Metformin's cell killing effect increased dramatically by more than 10-fold in CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> breast CSC cells compared to non-CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> immunophenotypes. While seven-weeks treatment length with trastuzumab likewise failed to reduce tumor growth of JIMT-1 xenografts, systemic treatment with metformin as single agent resulted in a significant two-fold reduction in tumor volume. When trastuzumab was combined with concurrent metformin, tumor volume decreased sharply by more than four-fold. Given that metformin-induced preferential killing of breast cancer initiating CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> subpopulations is sufficient to overcome *in vivo* primary resistance to trastuzumab, the incorporation of metformin into trastuzumab-based regimens may provide a valuable strategy for treatment of HER2<sup>+</sup> breast cancer patients.**

### INTRODUCTION

*De novo* (*i. e.* primary) resistance to the monoclonal antibody trastuzumab (Herceptin) remains a prevalent challenge in the treatment of breast cancer patients whose

tumors overexpress the human epidermal growth factor 2 (HER2) [1]. Evidence is mounting that the CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> cell subpopulation, which is enriched with potential breast cancer stem cells (CSCs), could explain clinical resistance to HER2-targeted therapies [1-3]. Therefore,

future clinical trials should involve the integration of novel anti-breast cancer stem cells approaches to prevent and overcome the inherent unresponsiveness to trastuzumab across clinically important subgroups of HER2-positive breast cancer patients. Although *in vitro* studies have recently suggested that the anti-diabetic drug metformin can efficiently eliminate treatment-resistant stem/progenitor cell populations in heterogeneous breast cancer populations [4-6], it remained to be evaluated whether systemic metformin might overcome primary resistance to trastuzumab in *HER2*-gene amplified human breast cancer xenografts. Here we explored for the first time the *in vivo* sensitizing efficacy of metformin on trastuzumab therapy by using xenografts of the human breast cancer cell line JIMT-1, which was established from the pleural metastasis of a patient who was clinically resistant to trastuzumab *ab initio* [7]. The JIMT-1 model is unique because of displaying at the same time several co-existing mechanisms of resistance to trastuzumab present at variable levels in other breast cancer cell lines, including moderate expression levels of *HER2* (despite *HER2* gene amplification), low expression of *PTEN* (phosphatase and tensin homolog), an activating mutation of the *PIK3CA* gene, high expression of *NRG1* (neuregulin-1), and enhanced expression of mesenchymal markers, including a naturally enriched subpopulation of breast cancer initiating  $CD44^+CD24^{-/low}$  CSC-like cells [2, 8-10].

## RESULTS AND DISCUSSION

### Metformin preferentially kills breast cancer initiating $CD44^+CD24^{-/low}$ cells

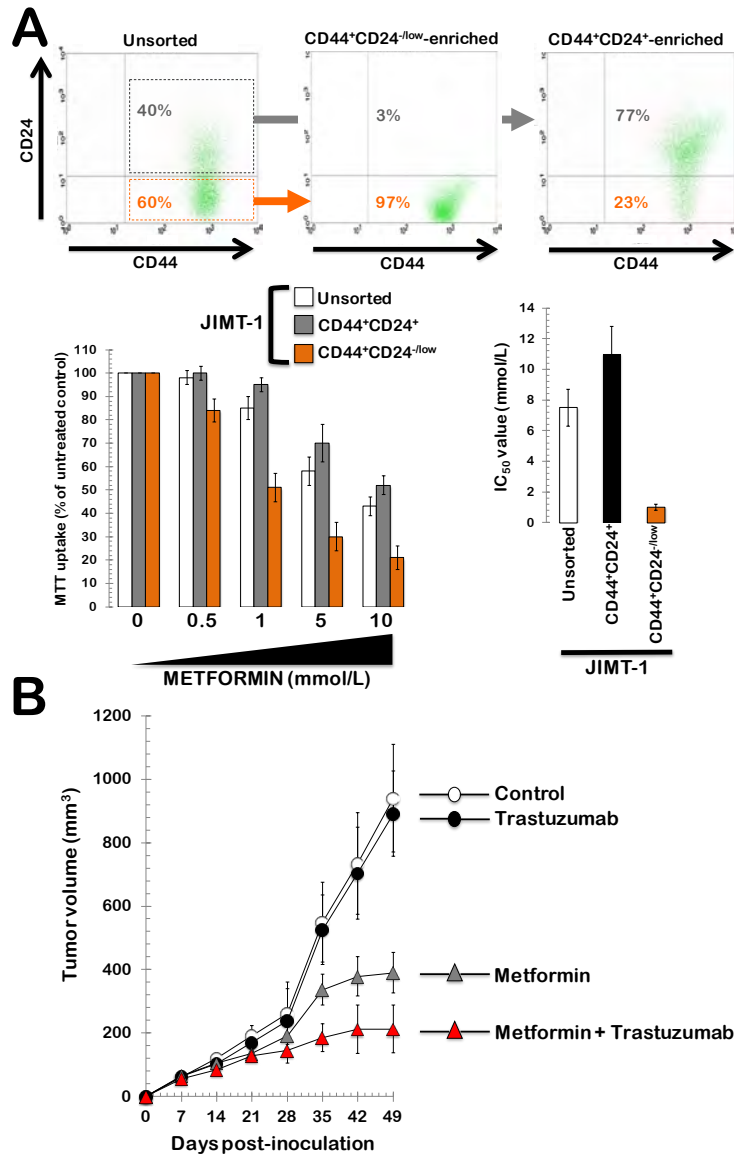
We first examined whether breast cancer initiating  $CD44^+CD24^{-/low}$  and non- $CD44^+CD24^{-/low}$  cell subpopulations from the trastuzumab-refractory JIMT-1 cell line exhibited differential sensitivities to the growth inhibitory effects of metformin. We employed MTT-based cell viability assays to compare the degree of sensitivity to metformin of parental JIMT-1 cells and that of JIMT-1 cell subpopulations isolated and purified for breast cancer initiating  $CD44^+CD24^{-/low}$  and non- $CD44^+CD24^{-/low}$  immunophenotypes by employing magnetic activated cell sorting (MACS; Fig. 1A, *top panels*). Cells were treated side-by-side on the following sorting day with graded concentrations of metformin for five days. While unsorted JIMT-1,  $CD44^+CD24^{-/low}$ , and  $CD44^+CD24^+$  populations all showed an inhibitory response to metformin that augmented with the increase in metformin concentration (Fig. 1A, *bottom left*), each separate cell population differed in their extend of cytotoxic response to metformin. The breast cancer initiating  $CD44^+CD24^{-/low}$  subpopulation was significantly more sensitive than was the parental or  $CD44^+CD24^+$  populations.  $CD44^+CD24^{-/low}$  cells had an

estimated  $IC_{50}$  value of  $1\pm 0.2$  mmol/L metformin whereas that in the corresponding non- $CD44^+CD24^{-/low}$  population was  $11\pm 2$  mmol/L metformin (Fig. 1A, *bottom right*). The  $IC_{50}$  of metformin in the unsorted JIMT-1 parental population was  $8\pm 2$  mmol/L (Fig. 1A, *bottom right*). These findings, altogether, confirmed that the breast cancer initiating subpopulation within a heterogeneous population of trastuzumab-refractory, HER2-positive breast cancer cells notably exhibit greater sensitivity to the growth-inhibitory effects of metformin. Indeed, the growth of the breast cancer initiating  $CD44^+CD24^{-/low}$  population was more significantly affected by metformin at all tested concentrations. Because it has been shown that gradual loss of stem cell markers takes place in cells growing as a monolayer, these data may further underestimate hypersensitivity of the breast cancer initiating  $CD44^+CD24^{-/low}$  cells to metformin. Indeed, JIMT-1 cells sorted for the  $CD44^+CD24^{-/low}$  immunophenotype repopulated all the parental cell fractions after few days in monolayer culture (data not shown).

### Systemic metformin inhibits tumor growth in trastuzumab-refractory breast cancer xenografts

The effects of metformin and trastuzumab alone and in combination on tumor growth were next studied *in vivo* using a JIMT-1 xenograft animal model (Fig. 1B). Compared to the control group after seven weeks of treatment ( $940\pm 170$  mm<sup>3</sup>), the trastuzumab-treated group likewise failed to exhibit significant reductions in mean tumor size ( $891\pm 135$  mm<sup>3</sup>). Compared to the mean xenograft tumor size in both the control and the trastuzumab group, the mean tumor size in the metformin group was significantly smaller ( $390\pm 64$  mm<sup>3</sup>), which confirmed that the inhibitory effect of metformin at the tested concentration (250 mg/kg/day) was notably stronger than that of trastuzumab (5 mg/kg/week) on JIMT-1 tumor growth. When the two drugs were combined, the xenograft tumor size ( $213\pm 75$  mm<sup>3</sup>) was smaller than those of the groups treated with trastuzumab or metformin alone, indicating that the combination of the drugs was much more effective at reducing tumor volume. Consequently, the days required for four-fold increase in tumor volume was  $27\pm 5$  after treatment with trastuzumab whereas more than 50 days were required after the combined treatment with trastuzumab and metformin (Fig. 1B). No significant difference in body weight was observed in xenograft tumor-bearing mice between the treatment groups (data not shown).

Our current findings reveal that: a.) Metformin as single agent is active against JIMT-1-derived tumor xenografts with primary resistance to trastuzumab; b.) metformin's ability to distinctively kill breast cancer initiating  $CD44^+CD24^{-/low}$  mesenchymal subpopulations is sufficient to overcome *in vivo* primary resistance to



**Figure 1: A. Top.** CD44 and CD24 expression patterns in CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-low</sup> and CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> subpopulations of JIMT-1 sorted by sequential sorting (depletion followed by positive selection) using MACS MicroBeads (MACS<sup>®</sup> Technology). Enrichment of target cells by magnetic MicroBeads was carried out according to the manufacturer's (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) protocol. CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-low</sup> were isolated from the parental JIMT-1 cell line by firstly depleting CD24<sup>+</sup> cells using the CD24 MicroBead Kit and then positively selected for CD44 using the CD44 MicroBeads. Cells were fluorescently stained with combinations of fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies obtained from BD Biosciences (San Diego, CA, USA) against human CD44 (FITC; cat.#555478) and CD24 (PE; cat.#555428) or their respective isotype controls. Representative expression (n=5) in pre-sorted and post-sorted JIMT-1 cells is shown. **Bottom.** Parental JIMT-1 cells and cells sorted for BCSC<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-low</sup> and non-BCSC<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> markers were treated simultaneously with increasing concentrations of metformin for 5 days. Cell viability was determined using a standard colorimetric MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide) reduction assay. For each treatment, cell viability was evaluated as a percentage using the following equation: (OD<sub>570</sub> of treated sample/OD<sub>570</sub> of untreated sample) × 100. Cell sensitivity to metformin was expressed in terms of the concentration of drug required to decrease by 50% cell viability (IC<sub>50</sub> value). Since the percentage of control absorbance was considered to be the surviving fraction of cells, the IC<sub>50</sub> values were defined as the concentration of agents that produced 50% reduction in control absorbance. **B.** Tumor xenografts were established by subcutaneous injection of 5 × 10<sup>6</sup> JIMT-1 cells suspended in 100 μl of culture medium into the flank of female athymic nude mice (four to five weeks old, 23 to 25 g; Harlan Laboratories –France-). Animals were randomized into four groups with five mice in each group: control (vehicles), trastuzumab, metformin, and trastuzumab + Metformin. Trastuzumab (5 mg/kg) was given intraperitoneally (i.p.) once per week. Both the “metformin group” and the “trastuzumab + metformin group” received daily a single i.p. injection of metformin (250 mg/kg). Mice were weighed once per week after dosing, tumors were measured daily with electronic callipers, and tumor volumes were calculated using the following formula: volume (mm<sup>3</sup>) = length × width<sup>2</sup> × 0.5. Figure shows mean tumor volumes (±SD) of JIMT-1 xenograft-bearing nude mice following injection with trastuzumab, metformin, and trastuzumab + metformin until seven weeks.

trastuzumab in HER2-gene amplified breast tumors. A combination of trastuzumab and metformin may provide a valuable strategy for treatment of HER2-overexpressing breast cancer, and a phase II trial recently has opened in Spain to evaluate the efficacy of trastuzumab plus metformin as neo-adjuvant therapy for patients with HER2-positive breast cancer [11].

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported through funding from the Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Sanidad y Consumo, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Spain, Grants CP05-00090 and PI06-0778 and RD06-0020-0028), the Fundación Científica de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC, Spain), and the Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2009-11579, Plan Nacional de I+D+ I, MICINN, Spain). Alejandro Vazquez-Martin received the Sara Borrell post-doctoral contract (CD08/00283, Ministerio de Sanidad y Consumo, Fondo de Investigación Sanitaria –FIS–, Spain). Sílvia Cufí received a Research Fellowship (Formación de Personal Investigador, FPI) from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, Spain).

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCE

1. Bedard PL, Cardoso F, Piccart-Gebhart MJ. Stemming resistance to HER-2 targeted therapy. *J Mammary Gland Biol.* 2009; 14:55-66.
2. Oliveras-Ferraro C, Vazquez-Martin A, Martin-Castillo B, Cufí S, Del Barco S, Lopez-Bonet E, Brunet J, Menendez JA. Dynamic emergence of the mesenchymal CD44(pos) CD24(neg/low) phenotype in HER2-gene amplified breast cancer cells with de novo resistance to trastuzumab (Herceptin). *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 397:27-33.
3. Fumagalli D, Michiels S, Sotiriou C. CD44+ CD24-/low phenotype and resistance to trastuzumab in HER2-positive breast cancer cell lines. *Pharmacogenomics.* 2011; 12:12-13.
4. Hirsch HA, Iliopoulos D, Tsihchlis PN, Struhl K. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer Res.* 2009; 69:7507-7511.
5. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraro C, Del Barco S, Martin-Castillo B, Menendez JA. The anti-diabetic drug metformin suppresses self-renewal and proliferation of trastuzumab-resistant tumor-initiating breast cancer stem cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2011; 126:355-364.
6. Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. Metformin decreases the dose of chemotherapy for prolonging tumor remission in mouse xenografts involving multiple cancer cell types. *Cancer Res.* 2011; 71:3196-3201.
7. Tanner M, Kapanen AI, Junttila T, Raheem O, Grenman S, Elo J, Elenius K, Isola J. Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 2004; 3:1585-1592.
8. Rennstam K, Jönsson G, Tanner M, Bendahl PO, Staaf J, Kapanen AI, Karhu R, Baldetorp B, Borg A, Isola J. Cytogenetic characterization and gene expression profiling of the trastuzumab-resistant breast cancer cell line JIMT-1. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007; 172:95-106.
9. Köninki K, Barok M, Tanner M, Staff S, Pitkänen J, Hemmilä P, Ilvesaro J, Isola J. Multiple molecular mechanisms underlying trastuzumab and lapatinib resistance in JIMT-1 breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2010; 294:211-219.
10. Oliveras-Ferraro C, Vazquez-Martin A, Martin-Castillo B, Pérez-Martínez MC, Cufí S, Del Barco S, Bernado L, Brunet J, López-Bonet E, Menendez JA. Pathway-focused proteomic signatures in HER2-overexpressing breast cancer with a basal-like phenotype: new insights into de novo resistance to trastuzumab (Herceptin). *Int J Oncol.* 2010; 37:669-678.
11. Martin-Castillo B, Dorca J, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraro C, Lopez-Bonet E, Garcia M, Del Barco S, Menendez JA. Incorporating the antidiabetic drug metformin in HER2-positive breast cancer treated with neo-adjuvant chemotherapy and trastuzumab: an ongoing clinical-translational research experience at the Catalan Institute of Oncology. *Ann Oncol.* 2010; 21:187-189.

# 5. Discussió



## 5. Discussió

El càncer de mama és una malaltia molt heterogènia que tradicionalment s'ha classificat en 4 tipus diferents, cadascun d'ells amb una estratègia de tractament (**Taula 1**). Així doncs, segons la classificació molecular del càncer de mama basada en l'expressió de determinats receptors, trobem que pot ser luminal de tipus A (ER+ i/o PR+ i ErbB2-), luminal de tipus B (ER +i/o PR+ i ErbB2+), ErbB2+ (ER- i PR- i ErbB2+), i tipus basal (ER- , PR- i ErbB2-, CK5/CK6+ i/o ErbB1+) [15-16]. Aquesta classificació, però, comença a estar en entredit. D'una banda, s'ha afegit el grup anomenat *claudin-low* (també triple negatiu: ER- , PR- i ErbB2-, que a més a més té una baixa expressió dels gens relacionats amb les unions cel·lulars com les claudines) [17-18]. D'altra banda, el càncer de mama també es pot classificar en base a les citoqueratines que expressen els tumors. Seguint aquest sistema els tumors es diferencien formant dos grans grups: tumors de tipus basal i tumors de tipus luminal. Fins ara, s'acceptava que la sobreexpressió d'ErbB2 s'originava en cèl·lules luminals essent un fenomen tardà en la tumorigènesi, però s'ha detectat que també hi ha sobreexpressió d'ErbB2 en lesions premalignes i que aquesta es correlaciona amb una elevada expressió d'ALDH-1 [185], fet que situa la sobreexpressió d'ErbB2 en cèl·lules de tipus basal. A més a més, el nostre grup ha confirmat la presència de citoqueratines basals (concretament CK5/CK6) en carcinomes de mama ErbB2+, indicant la presència d'un nou subtipus, el càncer de mama basal/ErbB2+, el qual té un comportament diferent que el càncer ErbB2+ o que el càncer basal i que es correlaciona amb una pitjor supervivència en comparació amb el fenotip basal en carcinomes de mama negatius pels receptors hormonaals [237]. A més a més, s'ha vist que aquest subtipus està format per pacients que no responen a la teràpia amb trastuzumab d'inici [238]. És per aquest motiu que cal analitzar el comportament dels càncers descrits com a basal/ErbB2+ per així definir una millor estratègia pel seu tractament. Per tant, en aquest estudi s'ha intentat caracteritzar els possibles mecanismes de resistència al trastuzumab de la línia cel·lular JIMT-1: model únic de càncer de mama amb resistència intrínseca a la teràpia dirigida contra la via ErbB, que sobreexpressa ErbB2 i que, a més a més, expressa citoqueratines marcadores del tipus basal [205-206].

Les JIMT-1 són cèl·lules que a part de tenir resistència primària al trastuzumab, també en tenen a altres teràpies dirigides contra la via ErbB com són resistència al lapatinib, gefitinib i erlotinib [203, 206, 239], per tant tenen una gran capacitat per escapar de l'apoptosi que causen aquests tractaments. Donat que un mecanisme general de resistència a tractaments antitumorals és l'evasió de l'apoptosi per part de les cèl·lules de càncer, hem analitzat si les JIMT-1 tenen alterada l'expressió de proteïnes inhibidores de l'apoptosi (PIA). Concretament hem analitzat el paper de la survivina (membre de la família de PIA) ja que de la mateixa manera que aquesta proteïna contribueix a escapar de l'apoptosi causada per la quimioteràpia [240-241], també podria permetre escapar de la causada per la teràpia dirigida com el trastuzumab. De fet, el grup de Ryan et al. han demostrat la importància de la quantificació per ELISA de la survivina en extractes de teixits mamaris [242] ja que un augment dels nivells de survivina s'associa significativament no només a un pitjor pronòstic, sinó també a la sobreexpressió d'ErbB2. Aquest fet recolza la importància clínica de la survivina com a una diana per sota de la via de transmissió del senyal iniciada per ErbB2 i que té com a funció evitar l'apoptosi.

Els resultats obtinguts en el nostre estudi mostren com, en comparació amb les SK-Br3 (una línia cel·lular de càncer de mama luminal que sobreexpressa ErbB2 i que és molt sensible a les teràpies dirigides contra ErbB2, incloent el trastuzumab) les cèl·lules JIMT-1 (resistents) tenen una expressió basal de survivina superior, els nivells de la qual no es veuen afectats pel tractament amb l'anticòs. Per a poder determinar si la survivina té un paper clau en la resistència al trastuzumab, hem analitzat l'efecte que té la seva supressió en la resposta al tractament i hem comprovat com després d'eliminar-ne l'expressió, les JIMT-1 es sensibilitzen a la teràpia. Per tant, el nostre estudi confirma i amplia els resultats obtinguts per altres sobre el paper de la survivina en l'eficàcia dels fàrmacs antiErbB; concretament mostra que un augment dels nivells de survivina ajuda a un augment de la supervivència de les cèl·lules JIMT-1 i que l'eficàcia del tractament rau en la capacitat de l'anticòs en reduir els nivells de survivina [239].

Però, tot i els resultats obtinguts, la importància de la survivina en la resposta a la teràpia dirigida no és conclouent, ni universal. Tot i la presència d'estudis com el nostre que demostren que el tractament amb trastuzumab causa una reducció dels nivells de



survivina [243-244], fet que comporta un augment dels nivells d'apoptosi, n'hi ha d'altres que demostren que els nivells de survivina no es veuen afectats pel tractament [245-246].

Les alteracions en l'expressió de proteïnes directament implicades en l'apoptosi no són els únics mecanismes de resistència a les teràpies dirigides. Tot i que quasi no es coneixen les accions paracrines/autocrines/intracrines dels factors de creixement en l'eficàcia dels fàrmacs antiErbB, hi ha evidències que mostren que l'eficàcia d'aquests fàrmacs està en part determinada per la presència de lligands relacionats amb EGF [247-250]. Harris et al. van veure que tumors ErbB2+ amb resistència intrínseca al trastuzumab expressen nivells més elevats de factors de creixement com IFG-1, HGF, PDGF i pleiotrofina [238]. Motoyama et al. van descriure que l'addició exògena de lligands com l'heregulina i el EGF, aquest últim en menor grau, prevenen de l'efecte antitumoral de les teràpies dirigides contra els receptors ErbB com el trastuzumab [191]. A més a més, Ritter et al. van demostrar que cèl·lules resistents al trastuzumab expressaven nivells més alts d'EGF, TGF $\alpha$ , HB-EGF i heregulina [190].

Com que cal un millor coneixement dels gens i les vies de senyalització presents a les cèl·lules de càncer de mama basal/ErbB2+ per assolir millors beneficis clínics pels pacients, en aquest estudi hem volgut analitzar la signatura proteòmica de les cèl·lules JIMT-1, (que com s'ha dit anteriorment constitueixen un model basal/ErbB2+ únic en l'estudi de resistència primària al trastuzumab). Per aquest motiu hem analitzat els nivells d'expressió de factors de creixement, citocines i metaloproteases presents al secretoma de les cèl·lules JIMT-1, en comparació amb el de les SK-Br3 (sensibles al tractament). D'aquesta manera, hem demostrat que els efectes inhibidors dels fàrmacs antiErbB es correlacionen amb els nivells d'expressió de determinats lligands d'aquests receptors; concretament, les JIMT-1 tenen nivells clarament més elevats de factors de creixement com EGF (freqüentment expressat en tumors basals) i amfiregulina, i de factors angiogènics com TGF $\beta$  i VEGF [251]. La majoria d'aquests factors són components importants del microambient de l'estroma del tumor, i, *in vivo*, el seu paper mitogènic i quimiotàctic podria explicar la resistència d'aquestes cèl·lules al trastuzumab. Pel que fa a l'anàlisi del secretoma enfocat a l'expressió de citocines i metaloproteases, hem demostrat que en comparació amb cèl·lules sensibles, les JIMT-1 secreten nivells més elevats de varies MPP, TIMPS i interleucines

(concretament de MMP-1, MMP-3, TIMP-1, TIMP-2, IL-6 i IL-8) [252], essent aquest el secretoma esperat en cèl·lules mesenquimals amb una elevada capacitat migratòria i metastàtica [253].

No només hem analitzat el secretoma de les JIMT-1 sinó que també hem analitzat part del fosfoproteoma (conjunt de proteïnes fosforil·lades d'una cèl·lula). Concretament hem estudiat el format pel conjunt de receptors de membrana tirosina cinasa l'expressió dels quals també s'ha relacionat amb la resistència a les teràpies dirigides contra ErbB, per així comprovar si l'augment d'expressió dels lligands observats en l'anàlisi del secretoma es correlaciona amb l'activació d'altres receptors de la via com ErbB1 o ErbB3, i l'efecte que té el tractament sobre el receptor ErbB2. Els resultats obtinguts demostren que el tractament amb trastuzumab causa una disminució en l'activació d'ErbB2 en les cèl·lules sensibles SKBR3 (mecanisme d'acció descrit anteriorment [138-139]). Cal destacar les JIMT-1 tenen els nivells i un estat d'activació d'ErbB2 molt inferiors en comparació amb les SKBR3. Per tant, el mecanisme de supervivència activat en les JIMT-1 quan són tractades amb el trastuzumab és independent de la via de senyalització iniciada per ErbB2. A més a més, no es detecten variacions en l'estat d'activació dels altres membres de la família ErbB, per tant, l'augment de lligands observada en el secretoma no es correlaciona amb un augment de l'estat d'activació d'ErbB1 ni d'ErbB3 que pugui explicar la resistència al trastuzumab en les JIMT-1. En canvi, si que es veu clarament que les cèl·lules resistents tenen molta més activació del IGF-1R que les cèl·lules sensibles [251]. Aquesta sobreactivació, però, no va acompanyada d'un augment en l'activació de les vies de MAPK i AKT (dues vies crítiques per la transmissió del senyal generat per ErbB2 i que IGF-1R podria activar). IGF-1R és un receptor de membrana amb activitat tirosina cinasa que està implicat en la proliferació cel·lular i formació de metàstasi, i que a més a més, se n'ha relacionat la seva activació amb l'aparició de resistència al trastuzumab. Altres autors han proposat per quins mecanismes d'acció IGF-1R contribueix a la resistència primària al trastuzumab. Concretament, Lu et al. van proposar que en presència de trastuzumab, IGF-1R degrada el p27 que ErbB2 no pot a través de la via Pi3K i que això evita l'augment de p27 causat pel trastuzumab. Per tant, IGF-1R evita l'arrest cel·lular a la fase G1 del cicle i redueix l'eficàcia del tractament amb trastuzumab [194]. A més a més, Nahta et al. també van demostrar

que en cèl·lules resistents al trastuzumab, ErbB2 i IGF-1R dimeritzen i que això comporta l'activació d'ErbB2 [172].

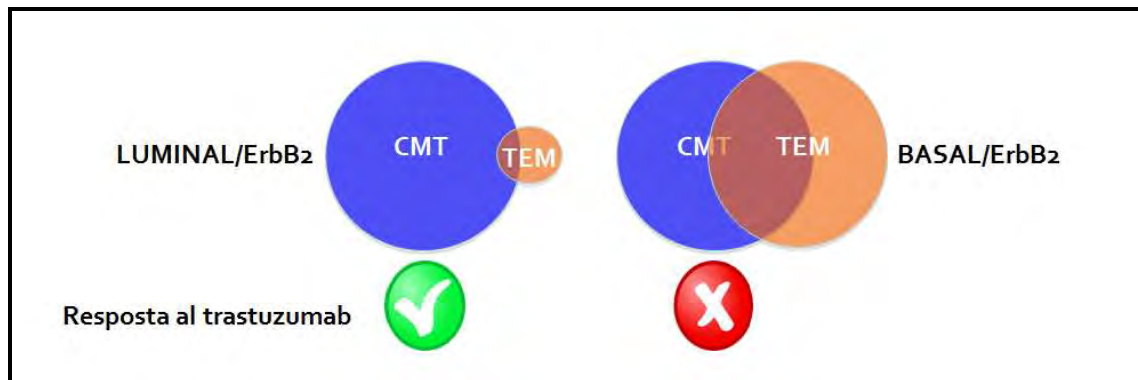
Nosaltres no només hem observat canvis en l'estat d'activació d'aquest receptor, sinó també en la seva localització cel·lular. IGF-1R que normalment es distribueix més o menys uniformement en les cèl·lules sensibles, adquireix una distribució localitzada en les adhesions focals en les cèl·lules resistents al trastuzumab [251]. Metalli et al. demostren en el seu estudi que IGF-1R és un modulador de la *paxillin* (component important de les adhesions focals) i un important regulador de la mobilitat cel·lular [254]. Per tant, el canvi en la localització cel·lular que nosaltres observem en les JIMT-1 podria estar relacionat amb l'elevada capacitat de migració que tenen aquestes cèl·lules en comparació amb les SKBR3, però calen més estudis per confirmar-ho.

En conjunt, els resultats que hem obtingut fins ara, concorden amb els obtinguts per altres autors, i indiquen que l'expressió de determinats factors de creixement podria estar implicada en la resistència de les cèl·lules tumorals ErbB2+ al trastuzumab [238, 247], tot i no tenir un impacte en la via de transmissió del senyal d'aquesta família de receptors. A més a més, recolzen la idea que la via IGF/IGF-1R no només té un paper mitogènic, sinó que també promou la mobilitat cel·lular [255-257].

Tant el patró de citocines i metaloproteases expressades per les cèl·lules JIMT-1, com la seva elevada mobilitat, concorden amb un fenotip de cèl·lula mesenquimal. Per aquest motiu hem analitzat quines característiques mesenquimals i/o de CMT tenen aquestes cèl·lules i quina capacitat tenen de generar cèl·lules amb aquest fenotip mitjançant la TEM. En aquest punt, ens hem servit de l'expressió diferencial de les proteïnes CD24 i CD44 entre cèl·lules epitelials i CMT/mesenquimals (concretament, CMT de càncer de mama, es diferencien de la resta per expressar CD44 i ALDH1 i la falta d'expressió de CD24, entre altres) i de la tècnica de citometria de flux per definir el fenotip de les JIMT-1 i així analitzar la proporció les CMT/mesenquimals presents en aquesta línia cel·lular. Està descrit que les cèl·lules amb propietats de cèl·lules mare es caracteritzen per ser  $CD44^+/CD24^{-/low}$ , mentre que les epitelials/luminals són  $CD44^-/CD24^+$  i les basals són  $CD44^+/CD24^+$  [7]. Com a línia catalogada dins del tipus basal, una elevada proporció de les cèl·lules que constitueixen la línia cel·lular JIMT-1 són  $CD44^+/CD24^+$ , però hem detectat que al llarg del temps i del seu cultiu, aquesta proporció disminueix en favor del fenotip  $CD44^+/CD24^-$  (fins assolir proporcions

## DISCUSSIÓ

similars a les cèl·lules MDA-MB-231 classificades com a mesenquimals). Paral·lelament a aquests canvis fenotípics, també observem una reducció dels nivells del receptor ErbB2 en les JIMT-1 [252]. Donat que la TEM és un programa cel·lular altament conservat que permet la transformació de cèl·lules epitelials diferenciades a cèl·lules mesenquimals amb propietats de cèl·lules mare com el fenotip  $CD44^+/CD24^-/low$ , i que també s'ha associat amb la pèrdua progressiva de l'expressió d'ErbB2 a la membrana cel·lular [184], el nostre estudi ens porta a analitzar si realment es produeix aquest fenomen en aquesta línia cel·lular i si, d'alguna manera, està implicat en la resistència al trastuzumab.



**Figura 14.** Implicació de la TEM en la resposta al Trastuzumab. D'entre la proporció de CMT que constitueixen un tumor luminal/ErbB2, només una petita fracció de cèl·lules té el fenotip TEM i això comporta que hi hagi una resposta inicial al tractament amb l'Acn trastuzumab. En canvi, en un tumor basal/ErbB2, la proporció de cèl·lules amb fenotip de TEM i resistents a la teràpia dirigida és molt més important, fet que comporta una resistència intrínseca al trastuzumab.

A més a més, la presència d'estudis que d'una banda relacionen el fenomen TEM i la presència de CMT amb un augment a la resistència a les teràpies administrades [258-260], i que de l'altra relacionen els tumors tipus basal, el fenotip de cèl·lula mare, la TEM, i l'adquisició d'un fenotip tumorigènic, invasiu i metastàtic [261], i donat que les CMT han demostrat tenir un fenotip tipus basal/mesenquimal amb una expressió elevada de gens relacionats amb la TEM (per exemple SLUG/SNAIL2, VIM i N-cadherina) [261-267], ens ha portat a hipotetitzar que la resistència primària al trastuzumab en els tumors basals/ErbB2+ pot ser explicada per un enriquiment de les cèl·lules mesenquimals amb propietats de CMT originades per la TEM (**Figura 14**). De

fet, un cop classificades les línies cel·lulars de càncer de mama molecularment i segons tipus i sensibilitat al trastuzumab, hem vist que les línies cel·lulars ErbB2+ amb resistència primària al trastuzumab són aquelles que pertanyen al grup basal/ErbB2+ i que a més a més expressen SLUG/SNAIL2 (un factor de transcripció que activa directament la TEM), mentre que les sensibles són luminals i no expressen aquest factor [268] (**Figura 15**).

D'una banda, ja hem dit anteriorment que les cèl·lules basals/ErbB2+ tenen una elevada plasticitat fenotípica pel que fa a l'expressió de marcadors de CMT [252]. Per altra banda, membres de la família SNAIL i TWIST poden originar fenotips tipus TEM a cèl·lules epitelials i basals que els expressen, fet que es correlaciona amb canvis fenotípics en l'expressió de  $CD44^-CD24^+$  (en cèl·lules epitelials) i  $CD44^+CD24^+$  (en cèl·lules basals) cap a  $CD44^+CD24^{-/low}$  (cèl·lules mesenquimals) [209, 269-272]. Per tant, és raonable suggerir que factors inductors de la TEM poden tenir importància en la resposta al trastuzumab ja que regulen l'adquisició de propietats invasives i/o l'estat de diferenciació en càncer de mama basal/ErbB2+. A més a més, l'anàlisi de l'expressió de gens relacionats amb la TEM realitzat en el nostre laboratori ha mostrat que les cèl·lules basal/ErbB2+ i resistents al trastuzumab, tenen uns nivells d'expressió de SLUG/SNAIL2 i TWIST molt superiors als observats en cèl·lules luminals i sensibles [268]. D'altra banda, hi ha estudis que mostren que l'expressió d'aquests factors de transcripció està desregulada en diferents tipus de càncer (entre els que hi ha el de mama) relacionant-ne l'expressió amb un pitjor pronòstic dels pacients que els sobreexpressen [224, 273-275]. És per aquest motiu que una possible estratègia per combatre la resistència primària al trastuzumab en cèl·lules basals/ErbB2+ podria ser la inhibició de l'expressió de factors inductors de la TEM, fet que podria sensibilitzar les cèl·lules basals/ErbB2+ resistents a l'anticòs. Concretament hem analitzat la importància de SLUG/SNAIL2, TWIST i ZEB1 en la generació de cèl·lules mesenquimals en les cèl·lules JIMT-1 i en la resistència al trastuzumab. Es tracta de tres factors de transcripció que s'uneixen als les caixes E dels seus promotors diana, entre els que hi ha el promotor d'E-Cadherina [222-223], produint una inhibició de l'expressió d'E-cadherina, fet que desencadena l'inici del procés de la TEM.



Els resultats obtinguts en el nostre estudi mostren que l'eliminació de l'expressió de SLUG/SNAIL2 principalment, però també de TWIST, i en menor grau de ZEB1, en les JIMT-1, causa un canvi fenotípic de les cèl·lules; concretament, la subpoblació mesenquimal definida com a  $CD44^+CD24^{-/low}$  es redueix dràsticament a favor d'una població més basal/epitelial  $CD44^+CD24^+$  a causa d'una regulació a nivell transcripcional de CD24 per part d'aquests factors inductors de la TEM [268]. El dinamisme de CD24 observat en les JIMT-1, també s'ha estat descrit anteriorment en altres línies cel·lulars [276]. A més a més, la inhibició de l'expressió de SLUG/SNAIL2 sensibilitza les cèl·lules al trastuzumab tant *in vitro* com *in vivo* [268].

Tot i que els resultats obtinguts en el nostre estudi senyalen a SLUG/SNAIL2 com un ferm responsable de la resistència al trastuzumab en cèl·lules amb el fenotip mesenquimal  $CD44^+CD24^{-/low}$ , encara calen més estudis per determinar si la subpoblació  $CD44^+/CD24^{-/low}$  originada per SLUG/SNAIL2 reflecteix un enriquiment de cèl·lules mesenquimals amb propietats de CMT resistents a l'anticòs presents des d'un inici (intrínseques al tumor), o reflecteix una via d'escapament de les cèl·lules epitelials més sensibles al fàrmac que gràcies a la TEM generen un fenotip mesenquimal resistent al tractament.

Els resultats d'aquest estudi donen una idea de la importància que podria tenir determinar els nivells de SLUG/SNAIL2 com a proteïna associada a cèl·lules mare/ $CD44^+/CD24^{-/low}$  per així poder realitzar una millor estratègia de tractament en pacients amb càncer de mama ErbB2+. A més a més, ens dóna una base per l'estudi de noves estratègies de tractament encaminades a combatre la resistència al trastuzumab tot actuant sobre el procés de la TEM [13, 277-285].

Un cop definit i caracteritzat el model de càncer de mama basal/ErbB2+ resistent al trastuzumab, hem passat a buscar possibles nous tractaments per combatre aquest subtipus de càncer de mama tan agressiu. En aquest punt ens hem servit de la hipòtesi en què "les similituds moleculars existents entre diferents malalties prediuen que fàrmacs dissenyats o usats pel tractament d'una malaltia també poden ajudar en el tractament d'una altra, en aquest cas el càncer" [286], i hem analitzat l'efecte de la metformina (usat en diabetis) com agent antitumoral en càncers de mama basal/ErbB2+ resistents al trastuzumab.

L'ús de la metformina en la teràpia contra el càncer està recolzat pel fet que en pacients diabètics, el tractament amb metformina redueix la incidència del càncer i augmenta la supervivència en malalts de càncer amb diabetis tipus 2 [287-288]. També hi ha estudis que demostren la seva eficàcia en el tractament del càncer de mama metastàtic del tipus basal [289-291]. A més a més, d'una banda Liu et al. han demostrat l'eficàcia de la metformina en cèl·lules resistents al trastuzumab [278], i de l'altra, Hirsch et al. i Iliopoulos et al. han demostrat que les CMT tenen una elevada sensibilitat a la metformina [292-293]. Per aquest motiu, en aquesta tesi doctoral hem analitzat si les JIMT-1, resistents al trastuzumab i amb una població enriquida amb CMT, juntament amb les SKBR3 i SKBR3 TzbR (cèl·lules de càncer de mama luminals sensibles i amb resistència adquirida al trastuzumab, respectivament) són sensibles al tractament amb metformina; i si aquest tractament resensibilitza les cèl·lules resistents (JIMT-1 i SKBR3 TzbR) al trastuzumab. Entre la població heterogènia que constitueix una línia cel·lular hi trobem CMT que, en condicions de cultiu determinades, són capaces d'autoreplicar-se i generar colònies en suspensió (mamosferes) les quals es podrien considerar microtumors. Aquest sistema de cultiu permet enriquir la proporció de CMT i, per tant, estudiar-les [294] ja que l'eficiència en la formació de mamosferes i la mida són indicadors de l'autorenovació de les cèl·lules mare i la proliferació de les progenitores, respectivament [295-296]. Per aquest motiu, hem estudiat l'efecte que té el tractament amb metformina i/o el trastuzumab en l'eficiència de la formació de mamosferes en els tres models cel·lulars descrits anteriorment i per primer cop demostrem l'eficàcia de la metformina en un àmbit preclínic en la lluita contra cèl·lules mare iniciadores de tumor resistents al trastuzumab i amb sobreexpressió d'ErbB2 [297]. Els resultats que hem obtingut sobre la capacitat de la metformina en la inhibició del creixement de les CMT (o dit d'altra manera, en la inhibició de la formació de mamosferes) confirmen els d'altres grups [114, 292, 298]. Concretament, en primer lloc, hem confirmat l'efecte diferencial de la metformina per atacar les cèl·lules iniciadores de tumor d'entre tota la població heterogènia que constitueixen la línia SKBR3, per tant, es pot suggerir que durant la formació de microtumors, la metformina podria interferir en els processos de diferenciació i/o apoptosi de la població de cèl·lules mare/progenitores en cèl·lules ErbB2+ i sensibles al trastuzumab. En segon lloc, l'adquisició de resistència per



exposició crònica al trastuzumab en la línia SKBR<sub>3</sub> TzbR es pot explicar per un augment de la subpoblació CD44<sup>+</sup>, per tant, per una transició cap a un fenotip més basal. Dels resultats obtinguts també podem destacar que les JIMT-1 no formen les mamosferes típiques sinó que formen unes agrupacions més irregulars com les que formen les cèl·lules MDA-MB-231 (cèl·lules de càncer de mama mesenquimals ErbB2-) [299]. En tercer lloc, les cèl·lules formadores de mamosferes procedents tant de les SKBR<sub>3</sub> TzbR amb resistència adquirida al trastuzumab com de les JIMT-1 amb resistència primària, mantenen una elevada sensibilitat als efectes inhibidors de la metformina. Els nostres resultats indiquen que el tractament amb trastuzumab en les cèl·lules resistents afecta a la proliferació de les cèl·lules progenitores, ja que causa una reducció en la mida de les mamosferes, però no pot reduir el nombre de mamosferes. Aquests fets suggereixen que l'eficàcia del tractament resideix en la capacitat de bloquejar l'autorenovació de les CMT. Cal destacar que el tractament amb trastuzumab i metformina conjuntament redueix de forma sinèrgica l'autorenovació i proliferació de les cèl·lules iniciadores de tumor resistents a l'anticòs. Per aquest motiu es pot suggerir que la metformina actua sobre mecanismes de supervivència importants els quals també podrien estar implicats en la resistència al trastuzumab, ja que la combinació d'ambdós fàrmacs redueix de forma sinèrgica tant el nombre com la mida de mamosferes en les cèl·lules SKBR<sub>3</sub> TzbR i JIMT-1.

En resum, podem concloure que la metformina interacciona de forma sinèrgica amb el trastuzumab per eliminar l'autorenovació (analitzada com eficiència en la formació de mamosferes) i proliferació (analitzada com a mida de les mamosferes) de les cèl·lules iniciadores de tumor (cèl·lules mare) que formen part d'una població de cèl·lules de càncer ErbB2+ amb resistència adquirida o intrínseca al trastuzumab [300]. Aquests resultats, juntament amb els obtinguts per altres grups, ens han portat a l'estudi de l'ús del cotractament amb metformina en la pràctica clínica [287, 301].

Tot i els resultats que hem obtingut tant nosaltres com altres grups sobre la importància de la subpoblació cel·lular CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> potencialment enriquida amb CMT de càncer de mama en la resistència a la teràpia dirigida contra ErbB2 [185-186, 252], i sobre l'eficàcia de la metformina en l'eliminació de cèl·lules progenitores tipus cèl·lula mare resistents al trastuzumab presents en una població heterogènia del càncer de mama [292-293, 297], no hi ha dades sobre l'eficàcia de la metformina *in*

*vivo*. És per aquest motiu que el nostre grup ha avaluat el tractament amb metformina *in vivo*, és a dir, hem analitzat l'eficàcia de la metformina en combinació o no amb el trastuzumab usant xenoempelts originats a partir de la línia cel·lular JIMT-1 [277]. És per aquest motiu, que un cop implantada la línia cel·lular en ratolins femella atímics, i un cop instaurat el tumor, hem comprovat l'eficàcia de diferents tractaments. Com esperàvem, no hem observat diferències significatives en la mida dels tumors formats en aquells ratolins tractats o no amb trastuzumab, però sí que s'ha produït una reducció dràstica en la mida dels tumors d'aquells ratolins tractats amb metformina. Aquesta reducció és encara major quan els ratolins han estat tractats amb la combinació de trastuzumab i metformina. Els resultats obtinguts ens porten a pensar que mentre la metformina ataca a les cèl·lules  $CD44^+CD24^{-/low}$ /mesenquimals, el trastuzumab ataca a les cèl·lules basals causant un sinergisme en el tractament del tumor format per les JIMT-1, que com hem dit són de tipus basal però que amb el temps guanya propietats mesenquimals.

Tots els resultats obtinguts al llarg d'aquests estudis, i el fet que la metformina sigui un fàrmac ja conegut amb dosis i efectes secundaris perfectament descrits, han fet que en el nostre centre s'hagi obert un estudi clínic de fase II per avaluar l'eficàcia de la metformina en combinació amb el trastuzumab en pacients amb càncer de mama ErbB2+ [302].

# 6. Conclusions



## 6. Conclusions

**6.1** La resistència primària a l'anticòs monoclonal antiErbB2 trastuzumab es relaciona amb la presència d'un fenotip mesenquimal associat a les denominades CMT del càncer de mama. Per tant, els nostres resultats suggereixen per primer cop que les CMT del càncer de mama són responsables de la resistència no només als tractaments clàssics (radioteràpia, hormonoteràpia i quimioteràpia), sinó també als tractaments moleculars específics dirigits contra diana.

**6.2** La redefinició de la classificació molecular actual del càncer de mama mitjançant la integració de marcadors moleculars propis del fenotip mesenquimal associat a les CMT, suggereix la possible existència d'un nou subtipus molecular intrínsec del càncer de mama denominat "basal/ErbB2+". L'ús d'aquesta nova subclassificació dels tumors amb amplificació gènica d'ErbB2 podria augmentar la nostra capacitat predictiva de la resposta a les teràpies dirigides contra aquesta oncoproteïna.

**6.3** L'eliminació del fenotip mesenquimal relacionat amb les CMT mitjançant estratègies genètiques o farmacològiques restaura la sensibilitat de les cèl·lules "basal/ErbB2+" a les teràpies moleculars dirigides contra ErbB2. Els nostres resultats preclínics obren la porta a noves estratègies de tractament, que actuant sobre el fenotip mesenquimal, podran prevenir o retardar la resistència dels tumors ErbB2+ a aquestes teràpies biològiques.



# 7. Bibliografia





## 7. Bibliografia

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. 144(5): p. 646-74.
2. Bertram, J.S., *The molecular biology of cancer*. Mol Aspects Med, 2000. 21(6): p. 167-223.
3. Rosen, J.M. and C.T. Jordan, *The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm*. Science, 2009. 324(5935): p. 1670-3.
4. Jordan, C.T., *Cancer stem cells: controversial or just misunderstood?* Cell Stem Cell, 2009. 4(3): p. 203-5.
5. Fillmore, C.M. and C. Kuperwasser, *Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy*. Breast Cancer Res, 2008. 10(2): p. R25.
6. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med, 1997. 3(7): p. 730-7.
7. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(7): p. 3983-8.
8. Rorth, P., *Collective cell migration*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2009. 25: p. 407-29.
9. Lopez-Novoa, J.M. and M.A. Nieto, *Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression*. EMBO Mol Med, 2009. 1(6-7): p. 303-14.
10. Giampieri, S., et al., *Localized and reversible TGFbeta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility*. Nat Cell Biol, 2009. 11(11): p. 1287-96.
11. Condeelis, J. and J.E. Segall, *Intravital imaging of cell movement in tumours*. Nat Rev Cancer, 2003. 3(12): p. 921-30.
12. Wyckoff, J., et al., *A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors*. Cancer Res, 2004. 64(19): p. 7022-9.
13. Singh, A. and J. Settleman, *EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer*. Oncogene, 2010. 29(34): p. 4741-51.
14. Bosetti, C., et al., *The decline in breast cancer mortality in Europe: An update (to 2009)*. Breast, 2011.
15. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. 406(6797): p. 747-52.
16. Sorlie, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(19): p. 10869-74.
17. Herschkowitz, J.I., et al., *Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors*. Genome Biol, 2007. 8(5): p. R76.
18. Prat, A., et al., *Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer*. Breast Cancer Res, 2010. 12(5): p. R68.
19. Slamon, D.J., et al., *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science, 1987. 235(4785): p. 177-82.
20. Slamon, D.J., et al., *Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer*. Science, 1989. 244(4905): p. 707-12.
21. Aroian, R.V., et al., *The let-23 gene necessary for Caenorhabditis elegans vulval induction encodes a tyrosine kinase of the EGF receptor subfamily*. Nature, 1990. 348(6303): p. 693-9.

## BIBLIOGRAFIA

---

22. Wasserman, J.D. and M. Freeman, *Control of EGF receptor activation in Drosophila*. Trends Cell Biol, 1997. 7(11): p. 431-6.
23. Stelling, J., et al., *Robustness of cellular functions*. Cell, 2004. 118(6): p. 675-85.
24. Bray, D. and S. Lay, *Computer simulated evolution of a network of cell-signaling molecules*. Biophys J, 1994. 66(4): p. 972-7.
25. Citri, A. and Y. Yarden, *EGF-ERBB signalling: towards the systems level*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. 7(7): p. 505-16.
26. Amit, I., R. Wides, and Y. Yarden, *Evolvability of signaling networks of receptor tyrosine kinases: relevance of robustness to malignancy and to cancer therapy*. Mol Syst Biol, 2007. 3: p. 151.
27. Pinkas-Kramarski, R., I. Alroy, and Y. Yarden, *ErbB receptors and EGF-like ligands: cell lineage determination and oncogenesis through combinatorial signaling*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 1997. 2(2): p. 97-107.
28. Jorissen, R.N., et al., *Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling*. Exp Cell Res, 2003. 284(1): p. 31-53.
29. Lax, I., et al., *Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules*. Embo J, 1989. 8(2): p. 421-7.
30. Summerfield, A.E., et al., *Identification of residues of the epidermal growth factor receptor proximal to residue 45 of bound epidermal growth factor*. J Biol Chem, 1996. 271(33): p. 19656-9.
31. Zhang, X., et al., *An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor*. Cell, 2006. 125(6): p. 1137-49.
32. Carraway, K.L., 3rd and L.C. Cantley, *A new acquaintance for erbB3 and erbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signaling*. Cell, 1994. 78(1): p. 5-8.
33. Klapper, L.N., et al., *The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(9): p. 4995-5000.
34. Garrett, T.P., et al., *Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha*. Cell, 2002. 110(6): p. 763-73.
35. Cho, H.S., et al., *Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab*. Nature, 2003. 421(6924): p. 756-60.
36. Guy, P.M., et al., *Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(17): p. 8132-6.
37. Carpenter, G., L. King, Jr., and S. Cohen, *Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro*. Nature, 1978. 276(5686): p. 409-10.
38. Carpenter, G., et al., *Characterization of the binding of 125-I-labeled epidermal growth factor to human fibroblasts*. J Biol Chem, 1975. 250(11): p. 4297-304.
39. Boonstra, J., et al., *The epidermal growth factor*. Cell Biol Int, 1995. 19(5): p. 413-30.
40. Udart, M., et al., *Chromosome 7 aneusomy. A marker for metastatic melanoma? Expression of the epidermal growth factor receptor gene and chromosome 7 aneusomy in nevi, primary malignant melanomas and metastases*. Neoplasia, 2001. 3(3): p. 245-54.
41. Schulze, W.X., L. Deng, and M. Mann, *Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family*. Mol Syst Biol, 2005. 1: p. 2005 0008.

42. Schechter, A.L., et al., *The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen*. Nature, 1984. **312**(5994): p. 513-6.
43. Yamamoto, T., et al., *Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor*. Nature, 1986. **319**(6050): p. 230-4.
44. Tzahar, E., et al., *A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(10): p. 5276-87.
45. Jones, R.B., et al., *A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays*. Nature, 2006. **439**(7073): p. 168-74.
46. Baulida, J., et al., *All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired*. J Biol Chem, 1996. **271**(9): p. 5251-7.
47. Worthylake, R., L.K. Opresko, and H.S. Wiley, *ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors*. J Biol Chem, 1999. **274**(13): p. 8865-74.
48. Lenferink, A.E., et al., *Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers*. Embo J, 1998. **17**(12): p. 3385-97.
49. Kraus, M.H., et al., *Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(23): p. 9193-7.
50. Plowman, G.D., et al., *Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(5): p. 1746-50.
51. Elenius, K., et al., *Characterization of a naturally occurring ErbB4 isoform that does not bind or activate phosphatidylinositol 3-kinase*. Oncogene, 1999. **18**(16): p. 2607-15.
52. Ni, C.Y., et al., *gamma-Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase*. Science, 2001. **294**(5549): p. 2179-81.
53. Wang, S.C., et al., *Binding at and transactivation of the COX-2 promoter by nuclear tyrosine kinase receptor ErbB-2*. Cancer Cell, 2004. **6**(3): p. 251-61.
54. Brand, T.M., et al., *The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer*. Discov Med, 2011. **12**(66): p. 419-32.
55. Oda, K., et al., *A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling*. Mol Syst Biol, 2005. **1**: p. 2005 0010.
56. Peles, E. and Y. Yarden, *Neu and its ligands: from an oncogene to neural factors*. Bioessays, 1993. **15**(12): p. 815-24.
57. Riese, D.J., 2nd and D.F. Stern, *Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network*. Bioessays, 1998. **20**(1): p. 41-8.
58. Harris, R.C., E. Chung, and R.J. Coffey, *EGF receptor ligands*. Exp Cell Res, 2003. **284**(1): p. 2-13.
59. Falls, D.L., *Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies*. Exp Cell Res, 2003. **284**(1): p. 14-30.
60. Ogiso, H., et al., *Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains*. Cell, 2002. **110**(6): p. 775-87.
61. Kairouz, R. and R.J. Daly, *Tyrosine kinase signalling in breast cancer: modulation of tyrosine kinase signalling in human breast cancer through altered expression of signalling intermediates*. Breast Cancer Res, 2000. **2**(3): p. 197-202.

## BIBLIOGRAFIA

---

62. Lewis, T.S., P.S. Shapiro, and N.G. Ahn, *Signal transduction through MAP kinase cascades*. *Adv Cancer Res*, 1998. **74**: p. 49-139.
63. Vivanco, I. and C.L. Sawyers, *The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(7): p. 489-501.
64. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(2): p. 127-37.
65. Graus-Porta, D., R.R. Beerli, and N.E. Hynes, *Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling*. *Mol Cell Biol*, 1995. **15**(3): p. 1182-91.
66. Karunagaran, D., et al., *ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer*. *Embo J*, 1996. **15**(2): p. 254-64.
67. Alimandi, M., et al., *Epidermal growth factor and betacellulin mediate signal transduction through co-expressed ErbB2 and ErbB3 receptors*. *Embo J*, 1997. **16**(18): p. 5608-17.
68. Pinkas-Kramarski, R., et al., *The oncogenic ErbB-2/ErbB-3 heterodimer is a surrogate receptor of the epidermal growth factor and betacellulin*. *Oncogene*, 1998. **16**(10): p. 1249-58.
69. Sorkin, A., P.P. Di Fiore, and G. Carpenter, *The carboxyl terminus of epidermal growth factor receptor/erbB-2 chimerae is internalization impaired*. *Oncogene*, 1993. **8**(11): p. 3021-8.
70. Morgillo, F., et al., *Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib*. *Cancer Res*, 2006. **66**(20): p. 10100-11.
71. Saito, Y., et al., *Receptor heterodimerization: essential mechanism for platelet-derived growth factor-induced epidermal growth factor receptor transactivation*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(19): p. 6387-94.
72. Hynes, N.E. and H.A. Lane, *ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(5): p. 341-54.
73. Olayioye, M.A., et al., *The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer*. *Embo J*, 2000. **19**(13): p. 3159-67.
74. Carpenter, G., *Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways*. *J Cell Biol*, 1999. **146**(4): p. 697-702.
75. Olayioye, M.A., et al., *ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner*. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(9): p. 5042-51.
76. Dikic, I. and S. Giordano, *Negative receptor signalling*. *Curr Opin Cell Biol*, 2003. **15**(2): p. 128-35.
77. Santos, S.D., P.J. Verveer, and P.I. Bastiaens, *Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate*. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(3): p. 324-30.
78. Dikic, I., et al., *A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation*. *Nature*, 1996. **383**(6600): p. 547-50.
79. Li, J., et al., *Characterization of RAFTK, a novel focal adhesion kinase, and its integrin-dependent phosphorylation and activation in megakaryocytes*. *Blood*, 1996. **88**(2): p. 417-28.
80. Poghosyan, Z., et al., *Phosphorylation-dependent interactions between ADAM15 cytoplasmic domain and Src family protein-tyrosine kinases*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(7): p. 4999-5007.
81. Mellor, H. and P.J. Parker, *The extended protein kinase C superfamily*. *Biochem J*, 1998. **332** ( Pt 2): p. 281-92.
82. Exton, J.H., *Regulation of phospholipase D*. *FEBS Lett*, 2002. **531**(1): p. 58-61.

83. Moritz, A., et al., *Phosphatidic acid is a specific activator of phosphatidylinositol-4-phosphate kinase*. J Biol Chem, 1992. **267**(11): p. 7207-10.
84. Rozakis-Adcock, M., et al., *MAP kinase phosphorylation of mSos1 promotes dissociation of mSos1-Shc and mSos1-EGF receptor complexes*. Oncogene, 1995. **11**(7): p. 1417-26.
85. Douville, E. and J. Downward, *EGF induced SOS phosphorylation in PC12 cells involves P90 RSK-2*. Oncogene, 1997. **15**(4): p. 373-83.
86. Levkowitz, G., et al., *Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1*. Mol Cell, 1999. **4**(6): p. 1029-40.
87. Yokouchi, M., et al., *Ligand-induced ubiquitination of the epidermal growth factor receptor involves the interaction of the c-Cbl RING finger and Ubch7*. J Biol Chem, 1999. **274**(44): p. 31707-12.
88. Ravid, T., et al., *c-Cbl-mediated ubiquitinylation is required for epidermal growth factor receptor exit from the early endosomes*. J Biol Chem, 2004. **279**(35): p. 37153-62.
89. Waterman, H., et al., *Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency*. J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13819-27.
90. Worthylake, R. and H.S. Wiley, *Structural aspects of the epidermal growth factor receptor required for transmodulation of erbB-2/neu*. J Biol Chem, 1997. **272**(13): p. 8594-601.
91. Couet, J., M. Sargiacomo, and M.P. Lisanti, *Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities*. J Biol Chem, 1997. **272**(48): p. 30429-38.
92. Levkowitz, G., et al., *c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor*. Genes Dev, 1998. **12**(23): p. 3663-74.
93. French, A.R., et al., *Intracellular trafficking of epidermal growth factor family ligands is directly influenced by the pH sensitivity of the receptor/ligand interaction*. J Biol Chem, 1995. **270**(9): p. 4334-40.
94. Wiley, H.S., *Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling*. Exp Cell Res, 2003. **284**(1): p. 78-88.
95. Rubin, C., G. Gur, and Y. Yarden, *Negative regulation of receptor tyrosine kinases: unexpected links to c-Cbl and receptor ubiquitylation*. Cell Res, 2005. **15**(1): p. 66-71.
96. Holbro, T., G. Civenni, and N.E. Hynes, *The ErbB receptors and their role in cancer progression*. Exp Cell Res, 2003. **284**(1): p. 99-110.
97. Salomon, D.S., et al., *Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies*. Crit Rev Oncol Hematol, 1995. **19**(3): p. 183-232.
98. Voldborg, B.R., et al., *Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials*. Ann Oncol, 1997. **8**(12): p. 1197-206.
99. Ekstrand, A.J., et al., *Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(10): p. 4309-13.
100. Garcia de Palazzo, I.E., et al., *Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas*. Cancer Res, 1993. **53**(14): p. 3217-20.
101. Moscatello, D.K., et al., *Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors*. Cancer Res, 1995. **55**(23): p. 5536-9.
102. Hsieh, E.T., F.A. Shepherd, and M.S. Tsao, *Co-expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-alpha is*

- independent of ras mutations in lung adenocarcinoma.* Lung Cancer, 2000. **29**(2): p. 151-7.
103. Seth, D., et al., *Complex post-transcriptional regulation of EGF-receptor expression by EGF and TGF- $\alpha$  in human prostate cancer cells.* Br J Cancer, 1999. **80**(5-6): p. 657-69.
104. Cai, Y.C., et al., *Expression of transforming growth factor- $\alpha$  and epidermal growth factor receptor in gastrointestinal stromal tumours.* Virchows Arch, 1999. **435**(2): p. 112-5.
105. Nicholson, R.I., J.M. Gee, and M.E. Harper, *EGFR and cancer prognosis.* Eur J Cancer, 2001. **37** Suppl 4: p. S9-15.
106. Mendelsohn, J., *The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy.* Endocr Relat Cancer, 2001. **8**(1): p. 3-9.
107. Scaltriti, M. and J. Baselga, *The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy.* Clin Cancer Res, 2006. **12**(18): p. 5268-72.
108. Lemoine, N.R., et al., *Amplification and overexpression of the EGF receptor and c-erbB-2 proto-oncogenes in human stomach cancer.* Br J Cancer, 1991. **64**(1): p. 79-83.
109. Ross, J.S., et al., *The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy.* Oncologist, 2003. **8**(4): p. 307-25.
110. Hynes, N.E. and D.F. Stern, *The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer.* Biochim Biophys Acta, 1994. **1198**(2-3): p. 165-84.
111. Sauter, G., et al., *Heterogeneity of erbB-2 gene amplification in bladder cancer.* Cancer Res, 1993. **53**(10 Suppl): p. 2199-203.
112. Ferretti, G., et al., *HER2/neu role in breast cancer: from a prognostic foe to a predictive friend.* Curr Opin Obstet Gynecol, 2007. **19**(1): p. 56-62.
113. Wen, X.F., et al., *HER2 signaling modulates the equilibrium between pro- and antiangiogenic factors via distinct pathways: implications for HER2-targeted antibody therapy.* Oncogene, 2006. **25**(52): p. 6986-96.
114. Magnifico, A., et al., *Tumor-initiating cells of HER2-positive carcinoma cell lines express the highest oncoprotein levels and are sensitive to trastuzumab.* Clin Cancer Res, 2009. **15**(6): p. 2010-21.
115. Kakarala, M. and M.S. Wicha, *Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy.* J Clin Oncol, 2008. **26**(17): p. 2813-20.
116. Korkaya, H., et al., *HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion.* Oncogene, 2008. **27**(47): p. 6120-30.
117. Eyler, C.E. and J.N. Rich, *Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis.* J Clin Oncol, 2008. **26**(17): p. 2839-45.
118. Pauletti, G., et al., *Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization.* Oncogene, 1996. **13**(1): p. 63-72.
119. Papewalis, J., A. Nikitin, and M.F. Rajewsky, *G to A polymorphism at amino acid codon 655 of the human erbB-2/HER2 gene.* Nucleic Acids Res, 1991. **19**(19): p. 5452.
120. Xie, D., et al., *Population-based, case-control study of HER2 genetic polymorphism and breast cancer risk.* J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(5): p. 412-7.
121. Stephens, P., et al., *Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours.* Nature, 2004. **431**(7008): p. 525-6.
122. Soung, Y.H., et al., *Somatic mutations of the ERBB4 kinase domain in human cancers.* Int J Cancer, 2006. **118**(6): p. 1426-9.

123. Knowlden, J.M., et al., *c-erbB3 and c-erbB4 expression is a feature of the endocrine responsive phenotype in clinical breast cancer*. *Oncogene*, 1998. **17**(15): p. 1949-57.
124. Gilbertson, R.J., et al., *Prognostic significance of HER2 and HER4 coexpression in childhood medulloblastoma*. *Cancer Res*, 1997. **57**(15): p. 3272-80.
125. Lemoine, N.R., et al., *Expression of the ERBB3 gene product in breast cancer*. *Br J Cancer*, 1992. **66**(6): p. 1116-21.
126. Rajkumar, T., et al., *Expression of the type 1 tyrosine kinase growth factor receptors EGF receptor, c-erbB2 and c-erbB3 in bladder cancer*. *J Pathol*, 1996. **179**(4): p. 381-5.
127. Bodey, B., et al., *Clinical and prognostic significance of the expression of the c-erbB-2 and c-erbB-3 oncoproteins in primary and metastatic malignant melanomas and breast carcinomas*. *Anticancer Res*, 1997. **17**(2B): p. 1319-30.
128. Siegel, P.M., et al., *Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenic mice: implications for human breast cancer*. *Embo J*, 1999. **18**(8): p. 2149-64.
129. Holbro, T., et al., *The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(15): p. 8933-8.
130. Yamazaki, H., et al., *Inhibition of tumor growth by ribozyme-mediated suppression of aberrant epidermal growth factor receptor gene expression*. *J Natl Cancer Inst*, 1998. **90**(8): p. 581-7.
131. Ciardiello, F., et al., *Antisense oligonucleotides targeting the epidermal growth factor receptor inhibit proliferation, induce apoptosis, and cooperate with cytotoxic drugs in human cancer cell lines*. *Int J Cancer*, 2001. **93**(2): p. 172-8.
132. Azemar, M., et al., *Recombinant antibody toxins specific for ErbB2 and EGF receptor inhibit the in vitro growth of human head and neck cancer cells and cause rapid tumor regression in vivo*. *Int J Cancer*, 2000. **86**(2): p. 269-75.
133. Clynes, R.A., et al., *Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets*. *Nat Med*, 2000. **6**(4): p. 443-6.
134. Ben-kasus, T., et al., *Cancer therapeutic antibodies come of age: targeting minimal residual disease*. *Molecular Oncology*, 2007. **1**(1): p. 42-54.
135. Carter, P., et al., *Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(10): p. 4285-9.
136. Hommelgaard, A.M., M. Lerdrup, and B. van Deurs, *Association with membrane protrusions makes ErbB2 an internalization-resistant receptor*. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(4): p. 1557-67.
137. Press, M.F. and H.J. Lenz, *EGFR, HER2 and VEGF pathways: validated targets for cancer treatment*. *Drugs*, 2007. **67**(14): p. 2045-75.
138. Nahta, R. and F.J. Esteva, *Herceptin: mechanisms of action and resistance*. *Cancer Lett*, 2006. **232**(2): p. 123-38.
139. Dean-Colomb, W. and F.J. Esteva, *Her2-positive breast cancer: herceptin and beyond*. *Eur J Cancer*, 2008. **44**(18): p. 2806-12.
140. Molina, M.A., et al., *Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells*. *Cancer Res*, 2001. **61**(12): p. 4744-9.
141. Klos, K.S., et al., *Combined trastuzumab and paclitaxel treatment better inhibits ErbB-2-mediated angiogenesis in breast carcinoma through a more effective inhibition of Akt than either treatment alone*. *Cancer*, 2003. **98**(7): p. 1377-85.

## BIBLIOGRAFIA

---

142. Izumi, Y., et al., *Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail*. *Nature*, 2002. **416**(6878): p. 279-80.
143. Vogel, C.L., et al., *Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(3): p. 719-26.
144. Baselga, J., et al., *Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer*. *J Clin Oncol*, 1996. **14**(3): p. 737-44.
145. Cobleigh, M.A., et al., *Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease*. *J Clin Oncol*, 1999. **17**(9): p. 2639-48.
146. Baselga, J., et al., *Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(10): p. 2162-71.
147. Esteva, F.J., et al., *Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(7): p. 1800-8.
148. Marty, M., et al., *Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(19): p. 4265-74.
149. Gasparini, G., et al., *Randomized Phase II Trial of weekly paclitaxel alone versus trastuzumab plus weekly paclitaxel as first-line therapy of patients with Her-2 positive advanced breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2007. **101**(3): p. 355-65.
150. Burstein, H.J., et al., *Trastuzumab and vinorelbine as first-line therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer: multicenter phase II trial with clinical outcomes, analysis of serum tumor markers as predictive factors, and cardiac surveillance algorithm*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(15): p. 2889-95.
151. Burstein, H.J., et al., *Clinical activity of trastuzumab and vinorelbine in women with HER2-overexpressing metastatic breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2001. **19**(10): p. 2722-30.
152. Pegram, M.D., et al., *Results of two open-label, multicenter phase II studies of docetaxel, platinum salts, and trastuzumab in HER2-positive advanced breast cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2004. **96**(10): p. 759-69.
153. Bartsch, R., et al., *Capecitabine and trastuzumab in heavily pretreated metastatic breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(25): p. 3853-8.
154. O'Shaughnessy, J.A., et al., *Phase II study of trastuzumab plus gemcitabine in chemotherapy-pretreated patients with metastatic breast cancer*. *Clin Breast Cancer*, 2004. **5**(2): p. 142-7.
155. Mackey, J.R., et al., *Trastuzumab prolongs progression-free survival in hormone-dependent and HER2-positive metastatic breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2006. **100**.
156. Marcom, P.K., et al., *The combination of letrozole and trastuzumab as first or second-line biological therapy produces durable responses in a subset of HER2 positive and ER positive advanced breast cancers*. *Breast Cancer Res Treat*, 2007. **102**(1): p. 43-9.
157. Leyland-Jones, B., et al., *Pharmacokinetics, safety, and efficacy of trastuzumab administered every three weeks in combination with paclitaxel*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(21): p. 3965-71.
158. Nahta, R. and F.J. Esteva, *HER-2-targeted therapy: lessons learned and future directions*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(14): p. 5078-84.



159. Nahta, R. and F.J. Esteva, *HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance*. Breast Cancer Res, 2006. 8(6): p. 215.
160. Nahta, R., et al., *Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer*. Nat Clin Pract Oncol, 2006. 3(5): p. 269-80.
161. Bianco, R., et al., *Intrinsic and acquired resistance to EGFR inhibitors in human cancer therapy*. Endocr Relat Cancer, 2005. 12 Suppl 1: p. S159-71.
162. Vazquez-Martin, A., C. Oliveras-Ferraros, and J.A. Menendez, *Autophagy facilitates the development of breast cancer resistance to the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab*. PLoS One, 2009. 4(7): p. e6251.
163. Bria, E., et al., *Cardiotoxicity and incidence of brain metastases after adjuvant trastuzumab for early breast cancer: the dark side of the moon? A meta-analysis of the randomized trials*. Breast Cancer Res Treat, 2008. 109(2): p. 231-9.
164. Duchnowska, R. and C. Szczylik, *Central nervous system metastases in breast cancer patients administered trastuzumab*. Cancer Treat Rev, 2005. 31(4): p. 312-8.
165. Guarneri, V., et al., *Long-term cardiac tolerability of trastuzumab in metastatic breast cancer: the M.D. Anderson Cancer Center experience*. J Clin Oncol, 2006. 24(25): p. 4107-15.
166. Nagata, Y., et al., *PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients*. Cancer Cell, 2004. 6(2): p. 117-27.
167. Depowski, P.L., S.I. Rosenthal, and J.S. Ross, *Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer*. Mod Pathol, 2001. 14(7): p. 672-6.
168. Mimura, K., et al., *Trastuzumab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity against esophageal squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2005. 11(13): p. 4898-904.
169. Kono, K., et al., *Impaired antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by herceptin in patients with gastric cancer*. Cancer Res, 2002. 62(20): p. 5813-7.
170. Kute, T.E., et al., *Breast tumor cells isolated from in vitro resistance to trastuzumab remain sensitive to trastuzumab anti-tumor effects in vivo and to ADCC killing*. Cancer Immunol Immunother, 2009. 58(11): p. 1887-96.
171. Barok, M., et al., *Trastuzumab causes antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated growth inhibition of submacroscopic JIMT-1 breast cancer xenografts despite intrinsic drug resistance*. Mol Cancer Ther, 2007. 6(7): p. 2065-72.
172. Nahta, R., et al., *P27(kip1) down-regulation is associated with trastuzumab resistance in breast cancer cells*. Cancer Res, 2004. 64(11): p. 3981-6.
173. Kute, T., et al., *Development of Herceptin resistance in breast cancer cells*. Cytometry A, 2004. 57(2): p. 86-93.
174. Valabrega, G., et al., *HER2-positive breast cancer cells resistant to trastuzumab and lapatinib lose reliance upon HER2 and are sensitive to the multitargeted kinase inhibitor sorafenib*. Breast Cancer Res Treat, 2010.
175. Price-Schiavi, S.A., et al., *Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance*. Int J Cancer, 2002. 99(6): p. 783-91.
176. Nagy, P., et al., *Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line*. Cancer Res, 2005. 65(2): p. 473-82.

177. Chen, A.C., et al., *Upregulation of mucin4 in ER-positive/HER2-overexpressing breast cancer xenografts with acquired resistance to endocrine and HER2-targeted therapies*. *Breast Cancer Res Treat*, 2012. **134**(2): p. 583-93.
178. Palyi-Krekk, Z., et al., *Hyaluronan-induced masking of ErbB2 and CD44-enhanced trastuzumab internalisation in trastuzumab resistant breast cancer*. *Eur J Cancer*, 2007. **43**(16): p. 2423-33.
179. Varadi, T., et al., *Binding of trastuzumab to ErbB2 is inhibited by a high pericellular density of hyaluronan*. *J Histochem Cytochem*, 2012. **60**(8): p. 567-75.
180. Anido, J., et al., *Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation*. *EMBO J*, 2006. **25**(13): p. 3234-44.
181. Arribas, J., et al., *p95HER2 and breast cancer*. *Cancer Res*, 2011. **71**(5): p. 1515-9.
182. Diermeier, S., et al., *Epidermal growth factor receptor coexpression modulates susceptibility to Herceptin in HER2/neu overexpressing breast cancer cells via specific erbB-receptor interaction and activation*. *Exp Cell Res*, 2005. **304**(2): p. 604-19.
183. Dokmanovic, M., et al., *Rac1 contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells: Rac1 as a potential therapeutic target for the treatment of trastuzumab-resistant breast cancer*. *Mol Cancer Ther*, 2009. **8**(6): p. 1557-69.
184. Ostler, J., et al. *Resistance to Her-2/neu targeting in human breast cancer may be mediated by epithelial-mesenchymal transition*. in *Prox Amer Assoc Cancer Res*. 2008.
185. Bedard, P.L., F. Cardoso, and M.J. Piccart-Gebhart, *Stemming resistance to HER-2 targeted therapy*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2009. **14**(1): p. 55-66.
186. Fumagalli, D., S. Michiels, and C. Sotiriou, *CD44+ CD24-/low phenotype and resistance to trastuzumab in HER2-positive breast cancer cell lines*. *Pharmacogenomics*, 2011. **12**(1): p. 12-3.
187. Prempre, C. and T. Wongpaksa, *Mutations of HER2 gene in HER2-positive metastatic breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2006. **24** (suppl 18).
188. Mitra, D., et al., *An oncogenic isoform of HER2 associated with locally disseminated breast cancer and trastuzumab resistance*. *Mol Cancer Ther*, 2009. **8**(8): p. 2152-62.
189. Arteaga, C.L., *ErbB-targeted therapeutic approaches in human cancer*. *Exp Cell Res*, 2003. **284**(1): p. 122-30.
190. Ritter, C.A., et al., *Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab in vivo overexpress epidermal growth factor receptor and ErbB ligands and remain dependent on the ErbB receptor network*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(16): p. 4909-19.
191. Motoyama, A.B., N.E. Hynes, and H.A. Lane, *The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides*. *Cancer Res*, 2002. **62**(11): p. 3151-8.
192. Valabrega, G., et al., *TGFalpha expression impairs Trastuzumab-induced HER2 downregulation*. *Oncogene*, 2005. **24**(18): p. 3002-10.
193. Wang, S.E., et al., *Transforming growth factor beta engages TACE and ErbB3 to activate phosphatidylinositol-3 kinase/Akt in ErbB2-overexpressing breast cancer and desensitizes cells to trastuzumab*. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(18): p. 5605-20.
194. Lu, Y., X. Zi, and M. Pollak, *Molecular mechanisms underlying IGF-I-induced attenuation of the growth-inhibitory activity of trastuzumab (Herceptin) on SKBR3 breast cancer cells*. *Int J Cancer*, 2004. **108**(3): p. 334-41.

195. Nahta, R., et al., *Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells*. *Cancer Res*, 2005. **65**(23): p. 11118-28.
196. Zhuang, G., et al., *Elevation of receptor tyrosine kinase EphA2 mediates resistance to trastuzumab therapy*. *Cancer Res*, 2010. **70**(1): p. 299-308.
197. Lu, Y., et al., *Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin)*. *J Natl Cancer Inst*, 2001. **93**(24): p. 1852-7.
198. Jones, H.E., et al., *Growth factor receptor interplay and resistance in cancer*. *Endocr Relat Cancer*, 2006. **13 Suppl 1**: p. S45-51.
199. Shattuck, D.L., et al., *Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast cancer cells*. *Cancer Res*, 2008. **68**(5): p. 1471-7.
200. Liu, L., et al., *Novel mechanism of lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL*. *Cancer Res*, 2009. **69**(17): p. 6871-8.
201. Kruser, T.J. and D.L. Wheeler, *Mechanisms of resistance to HER family targeting antibodies*. *Exp Cell Res*. **316**(7): p. 1083-100.
202. Rennstam, K., et al., *Cytogenetic characterization and gene expression profiling of the trastuzumab-resistant breast cancer cell line JIMT-1*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2007. **172**(2): p. 95-106.
203. Koninki, K., et al., *Multiple molecular mechanisms underlying trastuzumab and lapatinib resistance in JIMT-1 breast cancer cells*. *Cancer Lett*, 2010. **294**(2): p. 211-9.
204. Tanner, M., et al., *Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer*. *Mol Cancer Ther*, 2004. **3**(12).
205. Jonsson, G., et al., *High-resolution genomic profiles of breast cancer cell lines assessed by tiling BAC array comparative genomic hybridization*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2007. **46**(6): p. 543-58.
206. Tanner, M., et al., *Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer*. *Mol Cancer Ther*, 2004. **3**(12): p. 1585-92.
207. Acloque, H., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(6): p. 1438-49.
208. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
209. Micalizzi, D.S., S.M. Farabaugh, and H.L. Ford, *Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2010. **15**(2): p. 117-34.
210. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. *Cell*, 2009. **139**(5): p. 871-90.
211. Zeisberg, M. and E.G. Neilson, *Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(6): p. 1429-37.
212. Trimboli, A.J., et al., *Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer*. *Cancer Res*, 2008. **68**(3): p. 937-45.
213. Vergara, D., et al., *Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer*. *Cancer Lett*, 2010. **291**(1): p. 59-66.
214. Brabletz, T., et al., *Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin*. *Cells Tissues Organs*, 2005. **179**(1-2): p. 56-65.
215. Usami, Y., et al., *Snail-associated epithelial-mesenchymal transition promotes oesophageal squamous cell carcinoma motility and progression*. *J Pathol*, 2008. **215**(3): p. 330-9.

216. Jenndahl, L.E., P. Isakson, and D. Baeckstrom, *c-erbB2-induced epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells is suppressed by cell-cell contact and initiated prior to E-cadherin downregulation*. *Int J Oncol*, 2005. **27**(2): p. 439-48.
217. Said, N.A. and E.D. Williams, *Growth factors in induction of epithelial-mesenchymal transition and metastasis*. *Cells Tissues Organs*, 2011. **193**(1-2): p. 85-97.
218. Hardy, K.M., et al., *ErbB/EGF signaling and EMT in mammary development and breast cancer*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2010. **15**(2): p. 191-9.
219. Mimeault, M. and S.K. Batra, *Interplay of distinct growth factors during epithelial mesenchymal transition of cancer progenitor cells and molecular targeting as novel cancer therapies*. *Ann Oncol*, 2007. **18**(10): p. 1605-19.
220. Feigin, M.E. and S.K. Muthuswamy, *ErbB receptors and cell polarity: new pathways and paradigms for understanding cell migration and invasion*. *Exp Cell Res*, 2009. **315**(4): p. 707-16.
221. Gregory, P.A., et al., *The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1*. *Nat Cell Biol*, 2008. **10**(5): p. 593-601.
222. Nieto, M.A., *The snail superfamily of zinc-finger transcription factors*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. **3**(3): p. 155-66.
223. Yang, J., et al., *Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis*. *Cell*, 2004. **117**(7): p. 927-39.
224. Peinado, H., D. Olmeda, and A. Cano, *Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?* *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(6): p. 415-28.
225. Mani, S.A., et al., *The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells*. *Cell*, 2008. **133**(4): p. 704-15.
226. Yang, A.D., et al., *Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(14 Pt 1): p. 4147-53.
227. Kajita, M., K.N. McClinic, and P.A. Wade, *Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(17): p. 7559-66.
228. Kajiyama, H., et al., *Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells*. *Int J Oncol*, 2007. **31**(2): p. 277-83.
229. Kurrey, N.K., et al., *Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells*. *Stem Cells*, 2009. **27**(9): p. 2059-68.
230. Hiscox, S., et al., *Tamoxifen resistance in MCF7 cells promotes EMT-like behaviour and involves modulation of beta-catenin phosphorylation*. *Int J Cancer*, 2006. **118**(2): p. 290-301.
231. Hiscox, S., et al., *Tamoxifen resistance in breast cancer cells is accompanied by an enhanced motile and invasive phenotype: inhibition by gefitinib ('Iressa', ZD1839)*. *Clin Exp Metastasis*, 2004. **21**(3): p. 201-12.
232. Li, Q.Q., et al., *Twist1-mediated adriamycin-induced epithelial-mesenchymal transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast cancer cells*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(8): p. 2657-65.
233. Cochrane, D.R., et al., *MicroRNA-200c mitigates invasiveness and restores sensitivity to microtubule-targeting chemotherapeutic agents*. *Mol Cancer Ther*, 2009. **8**(5): p. 1055-66.

234. Ansieau, S., et al., *Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence*. *Cancer Cell*, 2008. **14**(1): p. 79-89.
235. Kudo-Saito, C., et al., *Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells*. *Cancer Cell*, 2009. **15**(3): p. 195-206.
236. Ouyang, G., et al., *Molecular signaling of the epithelial to mesenchymal transition in generating and maintaining cancer stem cells*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010. **67**: p. 2605-2618.
237. Liu, H., et al., *Basal-HER2 phenotype shows poorer survival than basal-like phenotype in hormone receptor-negative invasive breast cancers*. *Hum Pathol*, 2008. **39**(2): p. 167-74.
238. Harris, L.N., et al., *Predictors of resistance to preoperative trastuzumab and vinorelbine for HER2-positive early breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(4): p. 1198-207.
239. Oliveras-Ferraros, C., et al., *Inhibitor of Apoptosis (IAP) survivin is indispensable for survival of HER2 gene-amplified breast cancer cells with primary resistance to HER1/2-targeted therapies*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **407**(2): p. 412-9.
240. Altieri, D.C., *Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(1): p. 61-70.
241. Chen, K.F., et al., *Sorafenib overcomes TRAIL resistance of hepatocellular carcinoma cells through the inhibition of STAT3*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(21): p. 5189-99.
242. Ryan, B.M., et al., *Survivin expression in breast cancer predicts clinical outcome and is associated with HER2, VEGF, urokinase plasminogen activator and PAI-1*. *Ann Oncol*, 2006. **17**(4): p. 597-604.
243. Zhu, H., et al., *Inhibition of ErbB2 by Herceptin reduces survivin expression via the ErbB2-beta-catenin/TCF4-survivin pathway in ErbB2-overexpressed breast cancer cells*. *Cancer Sci*, 2010. **101**(5): p. 1156-62.
244. Asanuma, H., et al., *Survivin expression is regulated by coexpression of human epidermal growth factor receptor 2 and epidermal growth factor receptor via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer cells*. *Cancer Res*, 2005. **65**(23): p. 11018-25.
245. Xia, W., et al., *Regulation of survivin by ErbB2 signaling: therapeutic implications for ErbB2-overexpressing breast cancers*. *Cancer Res*, 2006. **66**(3): p. 1640-7.
246. Xia, W., et al., *Combining lapatinib (GW572016), a small molecule inhibitor of ErbB1 and ErbB2 tyrosine kinases, with therapeutic anti-ErbB2 antibodies enhances apoptosis of ErbB2-overexpressing breast cancer cells*. *Oncogene*, 2005. **24**(41): p. 6213-21.
247. Smith, B.L., et al., *The efficacy of Herceptin therapies is influenced by the expression of other erbB receptors, their ligands and the activation of downstream signalling proteins*. *Br J Cancer*, 2004. **91**(6): p. 1190-4.
248. Menendez, J.A. and R. Lupu, *Transphosphorylation of kinase-dead HER3 and breast cancer progression: a new standpoint or an old concept revisited?* *Breast Cancer Res*, 2007. **9**(5): p. 111.
249. Ferrer-Soler, L., et al., *An update of the mechanisms of resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in breast cancer: Gefitinib (Iressa) - induced changes in the expression and nucleo-cytoplasmic trafficking of HER-ligands (Review)*. *Int J Mol Med*, 2007. **20**(1): p. 3-10.
250. Oliveras-Ferraros, C., et al., *Cross-suppression of EGFR ligands amphiregulin and epiregulin and de-repression of FGFR3 signalling contribute to cetuximab resistance in wild-type KRAS tumour cells*. *Br J Cancer*, 2012. **106**(8): p. 1406-14.

251. Oliveras-Ferraros, C., et al., *Pathway-focused proteomic signatures in HER2-overexpressing breast cancer with a basal-like phenotype: new insights into de novo resistance to trastuzumab (Herceptin)*. *Int J Oncol*, 2010. **37**(3): p. 669-78.
252. Oliveras-Ferraros, C., et al., *Dynamic emergence of the mesenchymal CD44(pos)CD24(neg/low) phenotype in HER2-gene amplified breast cancer cells with de novo resistance to trastuzumab (Herceptin)*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **397**(1): p. 27-33.
253. Sheridan, C., et al., *CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis*. *Breast Cancer Res*, 2006. **8**(5): p. R59.
254. Metalli, D., et al., *The insulin-like growth factor receptor I promotes motility and invasion of bladder cancer cells through Akt- and mitogen-activated protein kinase-dependent activation of paxillin*. *Am J Pathol*, 2010. **176**(6): p. 2997-3006.
255. Manes, S., et al., *Concerted activity of tyrosine phosphatase SHP-2 and focal adhesion kinase in regulation of cell motility*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(4): p. 3125-35.
256. Zhang, X., et al., *Multiple signaling pathways are activated during insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulated breast cancer cell migration*. *Breast Cancer Res Treat*, 2005. **93**(2): p. 159-68.
257. Guvakova, M.A., *Insulin-like growth factors control cell migration in health and disease*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007. **39**(5): p. 890-909.
258. Li, X., et al., *Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy*. *J Natl Cancer Inst*, 2008. **100**(9): p. 672-9.
259. Witte, S.E., et al., *Restoring E-cadherin expression increases sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cell lines*. *Cancer Res*, 2006. **66**(2): p. 944-50.
260. Thomson, S., et al., *Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity of non-small-cell lung carcinoma cell lines and xenografts to epidermal growth factor receptor inhibition*. *Cancer Res*, 2005. **65**(20): p. 9455-62.
261. Hugo, H., et al., *Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression*. *J Cell Physiol*, 2007. **213**(2): p. 374-83.
262. Gasparotto, D., et al., *Overexpression of TWIST2 correlates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas*. *Oncotarget*, 2011. **2**(12): p. 1165-75.
263. Liao, M.J., et al., *Enrichment of a population of mammary gland cells that form mammospheres and have in vivo repopulating activity*. *Cancer Res*, 2007. **67**(17): p. 8131-8.
264. Sarrio, D., et al., *Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype*. *Cancer Res*, 2008. **68**(4): p. 989-97.
265. Shipitsin, M., et al., *Molecular definition of breast tumor heterogeneity*. *Cancer Cell*, 2007. **11**(3): p. 259-73.
266. Stingl, J. and C. Caldas, *Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis*. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(10): p. 791-9.
267. Storci, G., et al., *The basal-like breast carcinoma phenotype is regulated by SLUG gene expression*. *J Pathol*, 2008. **214**(1): p. 25-37.
268. Oliveras-Ferraros, C., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) confers primary resistance to trastuzumab (Herceptin)*. *Cell Cycle*, 2012. **11**(21): p. 4020-32.
269. Alves, C.C., et al., *Role of the epithelial-mesenchymal transition regulator Slug in primary human cancers*. *Front Biosci*, 2009. **14**: p. 3035-50.

270. Foubert, E., B. De Craene, and G. Berx, *Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. The Snail1-Twist1 conspiracy in malignant breast cancer progression*. *Breast Cancer Res*, 2010. 12(3): p. 206.
271. Hugo, H.J., et al., *Defining the E-cadherin repressor interactome in epithelial-mesenchymal transition: the PMC42 model as a case study*. *Cells Tissues Organs*, 2011. 193(1-2): p. 23-40.
272. Kang, Y. and J. Massague, *Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis*. *Cell*, 2004. 118(3): p. 277-9.
273. Blanco, M.J., et al., *Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas*. *Oncogene*, 2002. 21(20): p. 3241-6.
274. Martin, T.A., et al., *Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer*. *Ann Surg Oncol*, 2005. 12(6): p. 488-96.
275. Moody, S.E., et al., *The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence*. *Cancer Cell*, 2005. 8(3): p. 197-209.
276. Meyer, M.J., et al., *Dynamic regulation of CD24 and the invasive, CD44posCD24neg phenotype in breast cancer cell lines*. *Breast Cancer Res*, 2009. 11(6): p. R82.
277. Cufi, S., et al., *Metformin-induced preferential killing of breast cancer initiating CD44+CD24-/low cells is sufficient to overcome primary resistance to trastuzumab in HER2+ human breast cancer xenografts*. *Oncotarget*, 2012. 3(4): p. 395-8.
278. Liu, B., et al., *Potent anti-proliferative effects of metformin on trastuzumab-resistant breast cancer cells via inhibition of erbB2/IGF-1 receptor interactions*. *Cell Cycle*, 2011. 10(17): p. 2959-66.
279. Vazquez-Martin, A., et al., *Metformin regulates breast cancer stem cell ontogeny by transcriptional regulation of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) status*. *Cell Cycle*, 2010. 9(18): p. 3807-14.
280. Wang, Z., et al., *Targeting miRNAs involved in cancer stem cell and EMT regulation: An emerging concept in overcoming drug resistance*. *Drug Resist Updat*, 2010. 13(4-5): p. 109-18.
281. Cufi, S., et al., *Metformin against TGFbeta-induced epithelial-to-mesenchymal transition (EMT): from cancer stem cells to aging-associated fibrosis*. *Cell Cycle*, 2010. 9(22): p. 4461-8.
282. Takebe, N., R.Q. Warren, and S.P. Ivy, *Breast cancer growth and metastasis: interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition*. *Breast Cancer Res*, 2011. 13(3): p. 211.
283. Del Barco, S., et al., *Metformin: multi-faceted protection against cancer*. *Oncotarget*, 2011. 2(12): p. 896-917.
284. Rattan, R., R. Ali Fehmi, and A. Munkarah, *Metformin: an emerging new therapeutic option for targeting cancer stem cells and metastasis*. *J Oncol*, 2012. 2012: p. 928127.
285. Barriere, G., M. Tartary, and M. Rigaud, *Metformin: A Rising Star to Fight The Epithelial Mesenchymal Transition in Oncology*. *Anticancer Agents Med Chem*, 2012.
286. Hirsch, H.A., et al., *A transcriptional signature and common gene networks link cancer with lipid metabolism and diverse human diseases*. *Cancer Cell*, 2010. 17(4): p. 348-61.
287. Martin-Castillo, B., et al., *Metformin and cancer: doses, mechanisms and the dandelion and hormetic phenomena*. *Cell Cycle*, 2010. 9(6): p. 1057-64.
288. Vazquez-Martin, A., et al., *Metformin and energy metabolism in breast cancer: from insulin physiology to tumour-initiating stem cells*. *Curr Mol Med*, 2010. 10(7): p. 674-91.

## BIBLIOGRAFIA

---

289. Liu, B., et al., *Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells*. Cell Cycle, 2009. **8**(13): p. 2031-40.
290. Jiralerspong, S., A.M. Gonzalez-Angulo, and M.C. Hung, *Expanding the arsenal: metformin for the treatment of triple-negative breast cancer?* Cell Cycle, 2009. **8**(17): p. 2681.
291. Rakha, E.A., J.S. Reis-Filho, and I.O. Ellis, *Basal-like breast cancer: a critical review*. J Clin Oncol, 2008. **26**(15): p. 2568-81.
292. Hirsch, H.A., et al., *Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission*. Cancer Res, 2009. **69**(19): p. 7507-11.
293. Iliopoulos, D., H.A. Hirsch, and K. Struhl, *Metformin decreases the dose of chemotherapy for prolonging tumor remission in mouse xenografts involving multiple cancer cell types*. Cancer Res, 2011. **71**(9): p. 3196-201.
294. Moraes, R.C., et al., *Constitutive activation of smoothed (SMO) in mammary glands of transgenic mice leads to increased proliferation, altered differentiation and ductal dysplasia*. Development, 2007. **134**(6): p. 1231-42.
295. Dontu, G., et al., *In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells*. Genes Dev, 2003. **17**(10): p. 1253-70.
296. Dontu, G., et al., *Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells*. Breast Cancer Res, 2004. **6**(6): p. R605-15.
297. Vazquez-Martin, A., et al., *The anti-diabetic drug metformin suppresses self-renewal and proliferation of trastuzumab-resistant tumor-initiating breast cancer stem cells*. Breast Cancer Res Treat, 2011. **126**(2): p. 355-64.
298. Bao, B., et al., *Metformin inhibits cell proliferation, migration and invasion by attenuating CSC function mediated by deregulating miRNAs in pancreatic cancer cells*. Cancer Prev Res (Phila), 2011.
299. Grimshaw, M.J., et al., *Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells*. Breast Cancer Res, 2008. **10**(3): p. R52.
300. Vazquez-Martin, A., et al., *The anti-diabetic drug metformin suppresses self-renewal and proliferation of trastuzumab-resistant tumor-initiating breast cancer stem cells*. Breast Cancer Res Treat, 2010.
301. Gonzalez-Angulo, A.M. and F. Meric-Bernstam, *Metformin: a therapeutic opportunity in breast cancer*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(6): p. 1695-700.
302. Martin-Castillo, B., et al., *Incorporating the antidiabetic drug metformin in HER2-positive breast cancer treated with neo-adjuvant chemotherapy and trastuzumab: an ongoing clinical-translational research experience at the Catalan Institute of Oncology*. Ann Oncol, 2010. **21**(1): p. 187-9.



# 8. Annex I



**Curriculum Vitae**

Nom i cognoms : CRISTINA OLIVERAS FERRARÓS  
 DNI.: 77913388-Z Data naixement: 03-10-1980 Sexe: D  
 Institució: INSTITUT DE RECERCA BIOMÈDIA DE GIRONA  
 Dept./Secc./unitat.: Unitat de recerca Translacional, Laboratori d'Oncologia Molecular  
 Adreça postal: Parc Científic i Tecnològic de la Universitat de Girona, Edifici Giroemprèn. C/Pic de Peguera nº11, Lab A-018  
 Telèfon: 972183374  
 Adreça electrònica: coliveras@idibgi.org

**FORMACIÓ ACADÈMICA**

TITULACIÓ SUPERIOR	CENTRE	DATA
Lda. en <b>BIOLOGIA</b>	Facultat de Biologia, Universitat de Girona	2003
Diploma d'Estudis Avançats (DEA)	Facultat de Biologia, Universitat de Girona	2006
Curs de formació de personal investigador Usuari d'animals en experimentació	Universitat de Barcelona	2012

**PUBLICACIONS INDEXADES 2008-2012: PERIODE DE FORMACIÓ DOCTORAL**

1. **Cristina Oliveras-Ferraros**, Alejandro Vazquez-Martin, Joan Brunet, Rafael de Llorens, Ramon Colomer, Javier A. Menendez. Sequence-dependent synergism and antagonism between paclitaxel and gemcitabine in breast cancer cells: The importance of scheduling. **INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY** 32 (1): 113-120, 2008.
2. Alejandro Vazquez-Martin, **Cristina Oliveras-Ferraros**, Ramon Colomer, Joan Brunet, Javier A. Menendez. Low-scale phosphoproteome analyses identify the mTOR effector p70 S6 Kinase 1 as a specific biomarker of the dual-HER1/HER2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib (Tykerb<sup>®</sup>) in human breast carcinoma cells. **ANNALS of ONCOLOGY** 19(6): 1097-1109, 2008.
3. Javier A. Menendez, Alejandro Vazquez-Martin, Rocio Garcia-Villalba, Alegria Carrasco-Pancorbo, **Cristina Oliveras-Ferraros**, Alberto Fernandez-Gutierrez, Antonio Segura-Carretero. Anti-HER2 (erbB-2) oncogene effects of phenolic compounds directly isolated from commercial Extra-Virgin Olive Oil (EVOO). **BMC CANCER** 8(1): 377, 2008
4. **Cristina Oliveras-Ferraros**, Alejandro Vazquez-Martin, Eugeni López-Bonet, Begoña Martín-Castillo, Sonia del Barco, Joan Brunet, Javier A. Menendez. Growth and molecular interactions of the anti-EGFR antibody Cetuximab (Erbix<sup>®</sup>) and the DNA cross-linking agent cisplatin in Gefitinib (Iressa<sup>®</sup>)-resistant MDA-MB-468 cells: New prospects in the treatment of triple-negative/basal-like breast cancer. **INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY** 33(6): 1165-1176, 2008.
5. Javier A. Menendez, Alejandro Vazquez-Martin, **Cristina Oliveras-Ferraros**, Rocio Garcia-Villalba, Alegria Carrasco-Pancorbo, Alberto Fernandez-Gutierrez, Antonio Segura-Carretero. Analyzing effects of Extra-Virgin Olive Oil (EVOO) polyphenols on breast cancer-associated Fatty Acid Synthase (FASN) protein expression using reverse-phase protein microarrays. **INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE**. 22(4): 433-440, 2008.
6. Javier A. Menendez, Alejandro Vazquez-Martin, **Cristina Oliveras-Ferraros**, Rocio Garcia-Villalba, Alegria Carrasco-Pancorbo, Alberto Fernandez-Gutierrez, Antonio Segura-Carretero. Extra-virgin olive oil polyphenols inhibit HER2 (erbB-2)-induced malignant transformation in human breast epithelial cells: Relationship between the chemical structures of extra-virgin olive oil secoiridoids and lignans and their inhibitory activities on the tyrosine kinase activity of HER2. **INTERNATIONAL JOURNAL of ONCOLOGY** 34(1): 43-52, 2009.
7. **Cristina Oliveras-Ferraros**, Alejandro Vazquez-Martin, Jose Manuel Fernandez-Real, Javier A. Menendez. AMPK-sensed cellular energy state regulates the release of extracellular Fatty Acid Synthase. **BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS** 378(3):488-493, 2009.
8. Alejandro Vazquez-Martin, **Cristina Oliveras-Ferraros**, Sonia del Barco, Begoña Martin-Castillo, Javier A. Menendez. The antidiabetic drug metformin: A pharmaceutical AMPK activator to overcome breast cancer resistance to HER2 inhibitors while decreasing risk of cardiomyopathy. **ANNALS of ONCOLOGY** 20(3): 592-595, 2009.
9. Alejandro Vazquez-Martin, **Cristina Oliveras-Ferraros**, Javier A. Menendez. The antidiabetic drug metformin suppresses HER2 (erbB-2) oncoprotein overexpression via inhibition of the mTOR effector p70S6K1 in human breast carcinoma cells. **CELL CYCLE** 8(1): 88-96, 2009.
10. Alejandro Vazquez-Martin, Eugeni Lopez-Bonet, **Cristina Oliveras-Ferraros**, Maria Carmen Perez-Martinez, Luis Bernadó, Javier A. Menendez. Mitotic kinase dynamics of the active form of AMPK (phospho-AMPK<sup>Thr272</sup>) in human cancer cells. **CELL CYCLE** 8(5): 788-791, 2009.
11. Alejandro Vazquez-Martin, **Cristina Oliveras-Ferraros**, Luis Bernadó, Eugeni López-Bonet, Javier A. Menendez. The serine 2481-autophosphorylated form of mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) is localized to midzone and midbody in dividing cancer cells. **BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS** 380 (3): 638-643, 2009.

12. Rocío García-Villalba, Alegría Carrasco-Pancorbo, Alejandro Vázquez-Martín, **Cristina Oliveras-Ferraros**, Javier A. Menéndez, Antonio Segura-Carretero, Alberto Fernández-Gutiérrez. 2D-HPLC-CE platform coupled to ESI-TOF-MS to face the characterization of phenolic fraction from olive oil. **ELECTROPHORESIS** 30(15): 2688-2701, 2009.
13. Alejandro Vazquez-Martín, **Cristina Oliveras-Ferraros**, Sonia del Barco, Begoña Martín-Castillo, Javier A. Menendez. mTOR inhibitors and the anti-diabetic biguanide metformin: New insights into the molecular management of breast cancer resistance to the HER2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib (Tykerb®). **CLINICAL AND TRANSLATIONAL ONCOLOGY** 11(7):455-459, 2009.
14. **Cristina Oliveras-Ferraros**, Alejandro Vazquez-Martín, Javier A. Menendez. Genome-wide Inhibitory Impact of the AMPK Activator Metformin on [Kinesins, Tubulins, Histones, Auroras and Polo-like kinases] M-phase Cell Cycle Genes in Human Breast Cancer Cells. **CELL CYCLE** 8(10): 1633-1636, 2009.
15. Alejandro Vazquez-Martín, **Cristina Oliveras-Ferraros**, Javier A. Menendez. The active form of the metabolic sensor AMP-activated protein kinase  $\alpha$  (AMPK $\alpha$ ) directly binds the mitotic apparatus and travels from centrosomes to the spindle midzone during mitosis and cytokinesis. **CELL CYCLE** 8(15): 2385-2398, 2009.
16. Judit Marsillach, **Cristina Oliveras-Ferraros**, Raúl Beltrán, Anna Rull, Gerard Aragonès, Carlos Alonso-Villaverde, Alejandro Vázquez-Martín, Jorge Joven, Javier A. Menéndez, Jordi Camps. Circulating levels of extracellular fatty acid synthase in patients with steatohepatitis. **CLINICAL CHEMISTRY and LABORATORY MEDICINE** 47(9): 1097-1099, 2009.
17. Alejandro Vazquez-Martín, **Cristina Oliveras-Ferraros**, Javier A. Menendez. Autophagy facilitates the development of Breast cancer resistance to the Anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab. **PLoS ONE** 4(7):e6251, 2009.
18. Alejandro Vazquez-Martín, **Cristina Oliveras-Ferraros**, Sonia Del Barco, Begoña Martín-Castillo, Javier A. Menendez. If mammalian "Target Of Metformin" (mTOM) indirectly is mammalian Target Of Rapamycin (mTOR), then the Insulin-like Growth Factor-1 Receptor (IGF-1R) axis will audit the efficacy of metformin in cancer clinical trials" **JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY** 27(33): e207-9, 2009.
19. Alejandro Vazquez-Martín, **Cristina Oliveras-Ferraros**, Eugeni Lopez-Bonet, Javier A. Menendez. AMPK: Evidence for an energy-sensing cytokinetic tumor suppressor. **CELL CYCLE** 8(22): 3679-3683, 2009.
20. Alejandro Vazquez-Martín, Jose Manuel Fernandez-Real, **Cristina Oliveras-Ferraros**, Jose Maria Navarrete, Begoña Martín-Castillo, Sonia Del Barco, Joan Brunet, Javier A. Menendez. Fatty Acid Synthase (FASN) activity regulates HER2 Extracellular Domain (HER2 ECD) shedding into the circulation of HER2-positive metastatic breast cancer (HER2+MBC) patients. **INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY** 35(6): 1369-1377, 2009.
21. Rocío García-Villalba, Alegría Carrasco-Pancorbo, **Cristina Oliveras-Ferraros**, Alejandro Vazquez-Martín, Javier A. Menendez, Antonio Segura-Carretero, Alberto Fernández-Gutiérrez. Rapid and resolutive RRLC-ESI-TOF method for the characterization and quantification of olive oils with anticancer properties. **JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS** 51(2): 416-429, 2010.
22. Begoña Martín-Castillo, Joan Dorca, Alejandro Vazquez-Martín, **Cristina Oliveras-Ferraros**, Eugeni Lopez-Bonet, Margarita García, Sonia del Barco, Javier A. Menendez. Incorporating the anti-diabetic drug metformin in HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy and trastuzumab: An on-going clinical-translational research experience at the Catalan Institute of Oncology. **ANNALS OF ONCOLOGY** 21(1): 187-189, 2010.
23. Eugeni Lopez-Bonet, Alejandro Vazquez-Martín, María Carmen Pérez-Martínez, **Cristina Oliveras-Ferraros**, Ferran Pérez-Bueno, Luis Bernadó, Javier A. Menendez. Serine 2481-autophosphorylation of mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) couples with chromosome condensation and segregation during mitosis: Confocal microscopy characterization and immunohistochemical validation of PP-mTOR<sup>Ser2481</sup> as a novel high-contrast mitosis marker in breast cancer core biopsies. **INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY** 36(1): 107-115, 2010.
24. Begoña Martín-Castillo, Alejandro Vazquez-Martín, **Cristina Oliveras-Ferraros**, Javier A. Menendez. Metformin and cancer: Doses, mechanisms and the dandelion & hormetic phenomena. **CELL CYCLE** 9(6):1057-1064, 2010.
25. Vazquez-Martín A, **Oliveras-Ferraros C**, Del Barco S, Martín-Castillo B, Menendez JA. The anti-diabetic drug metformin suppresses self-renewal and proliferation of trastuzumab-resistant tumor-initiating breast cancer stem cells. **BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT** 2010 (*In press*).
26. **Oliveras-Ferraros C**, Vazquez-Martín A, Martín-Castillo B, Cufí S, Del Barco S, Lopez-Bonet E, Brunet J, Menendez JA. Dynamic emergence of the mesenchymal CD44<sup>pos</sup>CD24<sup>neg/low</sup> phenotype in HER2-gene amplified breast cancer cells with de novo resistance to trastuzumab (Herceptin). **BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS** 397(1): 27-33, 2010.
27. **Oliveras-Ferraros C**, Vazquez-Martín A, Martín-Castillo B, Pérez-Martínez MC, Cufí S, Del Barco S, Bernadó L, Brunet J, López-Bonet E, Menendez JA. Pathway-focused proteomic signatures in HER2-overexpressing breast cancer with a basal-like phenotype: New insights into *de novo* resistance to Trastuzumab (Herceptin). **INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY** 37(3):669-678, 2010.
28. Vazquez-Martín A, **Oliveras-Ferraros C**, Cufí S, Martín-Castillo B, Menendez JA. Metformin and Energy Metabolism in Breast Cancer: From Insulin Physiology to Tumour-initiating Stem Cells. **CURRENT MOLECULAR MEDICINE** 10(7):674-691, 2010.
29. Vazquez-Martín A, **Oliveras-Ferraros C**, Cufí S, Martín-Castillo B, Menendez JA. Lapatinib, a dual HER1/HER2 tyrosine kinase inhibitor, augments basal cleavage of HER2 Extracellular Domain (ECD) to inhibit HER2-driven cancer cell growth. **JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY** 226(1):52-7, 2011
30. Vazquez-Martín A, **Oliveras-Ferraros C**, Cufí S, Del Barco S, Martín-Castillo B, Menendez JA. Metformin regulates breast cancer stem cell ontogeny by transcriptional regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) status. **CELL CYCLE** 9(18): 3807-3814, 2010.
31. Lozano-Sánchez J, Segura-Carretero A, Menendez JA, **Oliveras-Ferraros C**, Cerretani L, Fernández-Gutiérrez A. Prediction of Extra Virgin Olive Oil varieties through their phenolic profile: Potential cytotoxic activity against human breast cancer cells. **JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY** 58(18):9942-9955, 2010.
32. Aragonès G, Alonso-Villaverde C, **Oliveras-Ferraros C**, Beltrán-Debón R, Rull A, Rodríguez-Sanabria F, Camps J, Martín AV, Menéndez JA, Joven J. Infection with HIV and HCV enhances the release of fatty acid synthase into circulation: evidence for a novel indicator of viral infection **BMC GASTROENTEROLOGY** 10:92, 2010.
33. Vazquez-Martín A, **Oliveras-Ferraros C**, Cufí S, Del Barco S, Martín-Castillo B, Lopez-Bonet E, **Menendez JA**. The antidiabetic drug metformin suppresses the metastasis-associated protein CD24 in MDA-MB-468 triple-negative breast cancer cells. **ONCOLOGY REPORTS** 2010 25(1):135-40.

34. **Cristina Oliveras-Ferraros**, Alejandro Vazquez-Martin, Javier A. Menendez. Pharmacological mimicking of caloric restriction elicits epigenetic reprogramming of differentiated cells to stem-like self-renewal states. **REJUVENATION RESEARCH** 2010 13(5):519-26.
35. Eugeni Lopez-Bonet, Maria Carmen Pérez-Martínez, Begoña Martín-Castillo, Miguel Alonso-Ruano, Francesc Tuca, **Cristina Oliveras-Ferraros**, Sílvia Cufí, Alejandro Vázquez-Martín, Miquel Beltrán, Luis Bernadó, Javier A. Menendez. Diagnostic utility of mammaglobin and GCDFP-15 in the identification of primary neuroendocrine carcinomas of the breast. **BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT**. 2011 Feb;126(1):241-5.
36. Sílvia Cufí, Alejandro Vazquez-Martin, **Cristina Oliveras-Ferraros**, Begoña Martin-Castillo, Jorge Joven, Javier A. Menendez. Metformin against TGFβ-induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT): From cancer stem cells to aging-associated fibrosis. **CELL CYCLE** 9(22):4461-8.
37. **Cristina Oliveras-Ferraros**, Alejandro Vazquez-Martin, Sílvia Cufí, Bernardo Queralt, Luciana Báez, Raquel Guardado, Xavier Hernández-Yagüe, Begoña Martin-Castillo, Joan Brunet, Javier A. Menendez. The stem cell property Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) is a core transcriptional network for predicting Cetuximab (Erbix™) efficacy in KRAS wild-type tumor cells. **JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY**. 2011 (1):10-29.
38. **Cristina Oliveras-Ferraros**, Sílvia Cufí, Tamara Sauri-Nadal, Sonia Del Barco, Begoña Martin-Castillo, Alejandro Vazquez-Martin, Javier A. Menendez. Extracellular fatty acid synthase: a novel biomarker to predict efficacy of the dual HER1/HER2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib. **BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT**. 24;13(1):401, 2011.
39. Alejandro Vazquez-Martin, Silvia Cufí, **Cristina Oliveras-Ferraros**, Begoña Martin-Castillo, Sonia Del Barco, Eugeni López-Bonet, Javier A. Menendez. Expression status of the autophagy-regulatory gene ATG6/BECN1 in ERBB2-positive breast carcinomas: Bypassing ERBB2-induced oncogenic senescence to regulate the efficacy of ERBB2-targeted therapies. **GENES, CHROMOSOMES & CANCER**.;50(4):284-90, 2011.
40. Manuel Puig-Costa, **Cristina Oliveras-Ferraros**, Silvia Flaquer, Francesca Llopis-Puigmartí, Eulalia Pujol-Amado, Begoña Martin-Castillo, Alejandro Vazquez-Martin, Silvia Cufí, Rosa Ortiz, Josep Roig, Antonio Codina-Cazador, Javier A. Menendez. Antibody microarray-based technology to rapidly define matrix metalloproteinase (MMP) signatures in patients undergo resection for primary gastric carcinoma. **JOURNAL OF SURGICAL ONCOLOGY**. 104(1):106-9, 2011.
41. **Oliveras-Ferraros C**, Vall-Llovera AM, Salip DC, Vazquez-Martin A, Cufí S, Queralt B, Martin-Castillo B, Brunet J, de Llorens R, Menendez JA. Evolution of the predictive markers amphiregulin and epiregulin mRNAs during long-term cetuximab treatment of KRAS wild-type tumor cells. **INVEST NEW DRUGS** 30(2):846-52, 2012.
42. **Cristina Oliveras-Ferraros**, Alejandro Vazquez-Martin, Sílvia Cufí, Tamara Sauri-Nadal, Sonia Del Barco, Begoña Martin-Castillo, Javier A. Menendez. Circulating Fatty Acid Synthase: An exploratory biomarker to predict efficacy of the dual HER1/HER2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib. **BREAST CANCER RESEARCH** 24;13(1), 2011.
43. **Oliveras-Ferraros C**, Cufí S, Vazquez-Martin A, Torres-Garcia VZ, Del Barco S, Martin-Castillo B, Menendez JA. Micro(mi)RNA expression profile of breast cancer epithelial cells treated with the anti-diabetic drug metformin: Induction of the tumor suppressor miRNA let-7a and suppression of the TGFβ-induced oncomiR miRNA-181a. **CELL CYCLE** 1;10(7):1144-51, 2011.
44. **Cristina Oliveras-Ferraros**, Alejandro Vazquez-Martin, Sílvia Cufí, Violeta Zenobia Torres-Garcia, Tamara Sauri-Nadal, Sonia Del Barco, Eugeni Lopez-Bonet, Joan Brunet, Begoña Martin-Castillo, Javier A. Menendez. Inhibitor of apoptosis (IAP) survivin is indispensable for survival of HER2 gene-amplified breast cancer cells with primary resistance to HER1/2-targeted therapies. **BIOCHEMICAL & BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS**, 407(2):412-9, 2011.
45. **Oliveras-Ferraros C**, Fernández-Arroyo S, Vazquez-Martin A, Lozano-Sánchez J, Cufí S, Joven J, Micol V, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretera A, Menendez JA. Crude phenolic extracts from extra virgin olive oil circumvent de novo resistance to HER1/HER2-targeting drugs by inducing GADD45-sensed cellular stress, G2/M arrest and hyperacetylation of Histone H3. **INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY** 38(6):1533-47, 2011.
46. Vazquez-Martin A, **Oliveras-Ferraros C**, Cufí S, Menendez JA. Polo-like kinase 1 regulates activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) at the mitotic apparatus. **CELL CYCLE** 10(8):1295-302, 2011.
47. Menendez JA, Cufí S, **Oliveras-Ferraros C**, Vellon L, Joven J, Vazquez-Martin A. Gerosuppressant metformin: less is more. **AGING (Albany NY)** 3(4):348-62, 2011.
48. Vazquez-Martin A, **Oliveras-Ferraros C**, Cufí S, Martin-Castillo B, Menendez JA. Metformin activates an Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM)/Chk2-regulated DNA damage-like response. **CELL CYCLE** 10(9):1499-501, 2011.
49. Vazquez-Martin A, Lopez-Bonet E, Cufí S, **Oliveras-Ferraros C**, Del Barco S, Martin-Castillo B, Menendez JA. Repositioning chloroquine and metformin to eliminate cancer stem cell traits in pre-malignant lesions. **DRUG RESIST UPDAT** 14(4-5):212-23, 2011.
50. **Oliveras-Ferraros C**, Vazquez-Martin A, Queralt B, Adrados M, Ortiz R, Cufí S, Hernández-Yagüe X, Guardado R, Báez L, Martin-Castillo B, Pérez-Martínez MC, Lopez-Bonet E, De Llorens R, Bernadó L, Brunet J, Menendez JA. Interferon/STAT1 and neuregulin signaling pathways are exploratory biomarkers of cetuximab (Erbix™) efficacy in KRAS wild-type squamous carcinomas: A pathway-based analysis of whole human-genome microarray data from cetuximab-adapted tumor cell models. **INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY** 39(6):1455-79, 2011.
51. Vazquez-Martin A, Cufí S, **Oliveras-Ferraros C**, Menendez JA. Raptor, a positive regulatory subunit of mTOR complex 1, is a novel phosphoprotein of the rDNA transcription machinery in nucleoli and chromosomal nucleolus organizer regions (NORs). **CELL CYCLE**. 15;10(18):3140-52, 2011.
52. Menendez JA, Vellon L, **Oliveras-Ferraros C**, Cufí S, Vazquez-Martin A. mTOR-regulated senescence and autophagy during reprogramming of somatic cells to pluripotency: a roadmap from energy metabolism to stem cell renewal and aging. **CELL CYCLE**. 10(21):3658-77, 2011.
53. Cufí S, Vazquez-Martin A, **Oliveras-Ferraros C**, Martin-Castillo B, Vellon L, Menendez JA. Autophagy positively regulates the CD44(+) CD24(-/low) breast cancer stem-like phenotype. **CELL CYCLE**. 10(22):3871-85, 2011.
54. Menendez JA, Cufí S, **Oliveras-Ferraros C**, Martin-Castillo B, Joven J, Vellon L, Vazquez-Martin A. Metformin and the ATM DNA damage response (DDR): accelerating the onset of stress-induced senescence to boost protection against cancer. **AGING (Albany NY)**. 3(11):1063-77, 2011.
55. Del Barco S, Vazquez-Martin A, Cufí S, **Oliveras-Ferraros C**, Bosch-Barrera J, Joven J, Martin-Castillo B, Menendez JA. Metformin: multi-faceted protection against cancer. **ONCOTARGET**.2(12):896-917, 2011.
56. Vazquez-Martin A, Fernández-Arroyo S, Cufí S, **Oliveras-Ferraros C**, Lozano-Sánchez J, Vellón L, Micol V, Joven J, Segura-Carretero A, Menendez JA. Phenolic secoiridoids in extra virgin olive oil impede fibrogenic and oncogenic epithelial-to-

- mesenchymal transition: extra virgin olive oil as a source of novel antiaging phytochemicals. **REJUVENATION RES.** 15(1):3-21, 2012.
57. Vazquez-Martin A, Vellon L, Quirós PM, Cufí S, Ruiz de Galarreta E, **Oliveras-Ferraros C**, Martin AG, Martin-Castillo B, López-Otin C, Menendez JA. Activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) provides a metabolic barrier to reprogramming somatic cells into stem cells. **CELL CYCLE.** 11(5):974-89, 2012.
  58. **Oliveras-Ferraros C**, Cufí S, Vazquez-Martin A, Menendez OJ, Bosch-Barrera J, Martin-Castillo B, Joven J, Menendez JA. Metformin rescues cell surface major histocompatibility complex class I (MHC-I) deficiency caused by oncogenic transformation. **CELL CYCLE.** 11(5):865-70, 2012.
  59. Cufí S, Vazquez-Martin A, **Oliveras-Ferraros C**, Quirantes R, Segura-Carretero A, Micol V, Joven J, Bosch-Barrera J, Del Barco S, Martin-Castillo B, Vellon L, Menendez JA. Metformin lowers the threshold for stress-induced senescence: a role for the microRNA-200 family and miR-205. **CELL CYCLE.** 11(6):1235-46, 2012.
  60. **Oliveras-Ferraros C**, Massaguer Vall-Llovera A, Vazquez-Martin A, Salip DC, Queralt B, Cufí S, Martin-Castillo B, Bosch-Barrera J, Brunet J, De Llorens R, Menendez JA. Transcriptional upregulation of HER2 expression in the absence of HER2 gene amplification results in cetuximab resistance that is reversed by trastuzumab treatment. **ONCOL REP.** 27(6):1887-92, 2012.
  61. **Oliveras-Ferraros C**, Cufí S, Queralt B, Vazquez-Martin A, Martin-Castillo B, de Llorens R, Bosch-Barrera J, Brunet J, Menendez JA. Cross-suppression of EGFR ligands amphiregulin and epiregulin and de-repression of FGFR3 signalling contribute to cetuximab resistance in wild-type KRAS tumour cells. **BR J CANCER.** 106(8):1406-14, 2012.
  62. Cufí S, Corominas-Faja B, Vazquez-Martin A, **Oliveras-Ferraros C**, Dorca J, Bosch-Barrera J, Martin-Castillo B, Menendez JA. Metformin-induced preferential killing of breast cancer initiating CD44+CD24-/low cells is sufficient to overcome primary resistance to trastuzumab in HER2+ human breast cancer xenografts. **ONCOTARGET.** 3(4):395-8, 2012.
  63. García-Villalba R, Carrasco-Pancorbo A, **Oliveras-Ferraros C**, Menéndez JA, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Uptake and metabolism of olive oil polyphenols in human breast cancer cells using nano-liquid chromatography coupled to electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry. **J CHROMATOGR B ANALYT TECHNOL BIOMED LIFE SCI.** 898:69-77, 2012.
  64. Vazquez-Martin A, Cufí S, **Oliveras-Ferraros C**, Menendez JA. Polo-like kinase 1 directs the AMPK-mediated activation of myosin regulatory light chain at the cytokinetic cleavage furrow independently of energy balance. **CELL CYCLE.** 11(13):2422-6, 2012.
  65. Vazquez-Martin A, Cufí S, Corominas-Faja B, **Oliveras-Ferraros C**, Vellon L, Menendez JA. Mitochondrial fusion by pharmacological manipulation impedes somatic cell reprogramming to pluripotency: new insight into the role of mitophagy in cell stemness. **AGING (Albany NY).** 4(6):393-401, 2012.
  65. Menendez JA, **Oliveras-Ferraros C**, Cufí S, Corominas-Faja B, Joven J, Martin-Castillo B, Vazquez-Martin A. Metformin is synthetically lethal with glucose withdrawal in cancer cells. **CELL CYCLE.** 11(15):2782-92, 2012.
  66. Corominas-Faja B, Quirantes-Piné R, **Oliveras-Ferraros C**, Vazquez-Martin A, Cufí S, Martin-Castillo B, Micol V, Joven J, Segura-Carretero A, Menendez JA. Metabolomic fingerprint reveals that metformin impairs one-carbon metabolism in a manner similar to the antifolate class of chemotherapy drugs. **AGING (Albany NY).** 4(7):480-98, 2012.
  67. **Oliveras-Ferraros C**, Corominas-Faja B, Cufí S, Vazquez-Martin A, Martin-Castillo B, Iglesias JM, López-Bonet E, Martin AG, Menendez JA. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) confers primary resistance to trastuzumab (Herceptin). **Cell Cycle.** 11(21):4020-32, 2012.
  68. Vazquez-Martin A, Sauri-Nadal T, Menendez OJ, **Oliveras-Ferraros C**, Cufí S, Corominas-Faja B, López-Bonet E, Menendez JA. Ser2481-autophosphorylated mTOR colocalizes with chromosomal passenger proteins during mammalian cell cytokinesis. **CELL CYCLE.** 11(22):4211-21, 2012.
  69. Martin-Castillo B, **Oliveras-Ferraros C**, Vazquez-Martin A, Cufí S, Moreno JM, Corominas-Faja B, Urritocoechea A, Martin AG, López-Bonet E, Menendez JA. Basal/HER2 breast carcinomas: Integrating molecular taxonomy with cancer stem cell dynamics to predict primary resistance to trastuzumab (Herceptin). **CELL CYCLE** 12(2) [Epub ahead of print], 2012
  70. Vazquez-Martin A, Corominas-Faja B, Cufí S, Vellón L, **Oliveras-Ferraros C**, Menendez O, Joven J, Lupu R, Menendez JA. The mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase and the lipogenic switch: new core components of metabolic reprogramming in induced pluripotent stem (iPS) cells. **CELL CYCLE** [Epub ahead of print], 2012