

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Biociències

Departament de Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina

**LES PROTEÏNES REGULADES PER GLUCOSA ACOBLEN LA
REPROGRAMACIÓ METABÒLICA I L'ANÈRGIA TUMORAL EN
LA PROGRESSIÓ METASTÀTICA DEL CÀNCER DE MAMA**

Naiara Santana Codina

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Biociències

Departament de Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

LES PROTEÏNES REGULADES PER GLUCOSA ACOBLEN LA REPROGRAMACIÓ METABÒLICA I L'ANÈRGIA TUMORAL EN LA PROGRESSIÓ METASTÀTICA DEL CÀNCER DE MAMA

Memòria presentada per Naiara Santana Codina per optar al grau de Doctor de la Universitat Autònoma de Barcelona dins del programa de doctorat en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina.

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció de la Dra. Àngels Sierra Jiménez al Laboratori d'Oncologia Molecular de l'IDIBELL.

Tesi adscrita al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona. Tutor: Dr. Carles Arús Caraltó.

Naiara Santana Codina

Dra. Àngels Sierra Jiménez

Dr. Carles Arús Caraltó

Bellaterra, juny de 2013

INDEX

INDEX

INDEX

INDEX.....	5
ABREVIATURES.....	11
INTRODUCCIÓ.....	19
1. BIOLOGIA DE LA METÀSTASI.....	21
1.1. PROGRESSIÓ METASTÀTICA DEL CÀNCER DE MAMA.....	21
1.2. EL PROCÉS METASTÀTIC	24
1.3. PATOGÈNESI DE LA METÀSTASI.....	27
1.3.1. Contribució del microentorn al procés metastàtic.....	27
1.3.2. Models de progressió metastàtica.....	30
1.4. ÒRGAN-ESPECIFICITAT DE LA METÀSTASI.....	34
1.5. LATÈNCIA METASTÀTICA.....	35
2. EL TROPISME DE LA METÀSTASI DE CÀNCER DE MAMA.....	36
2.1. ÒRGAN-ESPECIFICITAT DE LA METÀSTASI ÒSSIA.....	39
2.2. ÒRGAN-ESPECIFICITAT DE LA METÀSTASI CEREBRAL.....	40
2.3. ÒRGAN-ESPECIFICITAT DE LA METÀSTASI A PULMÓ.....	42
2.4. ÒRGAN-ESPECIFICITAT DE LA METÀSTASI A FETGE	43
3. “HALLMARKS” DEL PROCÉS METASTÀTIC	44
3.1. MANTENIMENT DE LA PROLIFERACIÓ	44
3.2. EVASIÓ DELS SUPRESSORS DEL CREIXEMENT	45
3.3. RESISTÈNCIA A LA MORT CEL·LULAR.....	46
3.4. IMMORTALITAT REPLICATIVA	47
3.5. INDUCCIÓ DE L'ANGIOGÈNESI	48
3.6. INVASIÓ I METÀSTASI	49
3.7. INESTABILITAT GENÒMICA I MUTACIONS.....	51
3.8. INFLAMACIÓ.....	52
3.9. EVASIÓ DE LA RESPOSTA IMMUNE.....	53
3.10. REPROGRAMACIÓ DEL METABOLISME ENERGÈTIC	55
3.10.1. PI3K/Akt/mTOR.....	56
3.10.2. HIF1 i el metabolisme glicolític.....	59
3.10.3. Myc i el metabolisme d'Aminoàcids.....	59
3.10.4. Her2 i el metabolisme lipídic	60
ANTECEDENTS.....	63
HIPÒTESI.....	73
OBJECTIUS.....	77
MATERIAL I MÈTODES.....	81
1. CULTIUS CEL·LULARS	83
1.1. LÍNIES CEL·LULARS	83
1.2. CONDICIONS DE CULTIU.....	85
1.2.1. Manteniment cel·lular	85
1.2.2. Comptatge cel·lular.....	85
1.2.3. Criopreservació cel·lular	86
1.2.4. Test de micoplasma	86
1.3. TRACTAMENTS	86
1.4. D. TINCIÓ CRISTALL VIOLETA.....	87
2. TRANSFECCIONS	87
2.1. TRANSFECCIONS TRANSIENTS	87

INDEX

2.2. TRANSFECCIONS ESTABLES	88
3. ANÀLISI D'EXPRESSION GÈNICA	91
3.1. EXTRACCIÓ DE RNA i RT-PCR	91
3.2. PCR SEMI-QUANTITATIVA I REAL TIME	91
4. ANÀLISI D'EXPRESSION PROTEICA.....	93
4.1. OBTENCIÓ D'EXTRACTES PROTEICS	93
4.2. ANÀLISI DE LA CONCENTRACIÓ PROTEICA.....	94
4.3. ANÀLISI D'EXPRESSION PER WESTERN BLOT	94
5. TINCIONS.....	96
5.1. TINCIONS LIPÍDIQUES	96
5.2. IMMUNOTINCIONS.....	97
5.2.1. Microscòpia de fluorescència i confocal	97
5.2.2. Immunocitoquímica	99
5.2.3. Citometria de flux	99
6. ANÀLISIS METABÒLICS.....	100
6.1. ESPECTROSCÒPIA RAMAN	100
6.2. MESURES D'OXIDACIÓ D'ÀCIDS GRASSOS.....	102
7. EXPERIMENTACIÓ <i>IN VIVO</i>	105
7.1. MANTENIMENT ANIMAL.....	105
7.2. INDUCCIÓ DE METÀSTASIS ÒSSIES	105
7.3. SEGUIMENT DE METÀSTASIS ÒSSIES.....	105
7.3.1. Obtenció d'imatges de bioluminescència.....	106
7.3.2. Anàlisi i quantificació de la bioluminescència	106
7.3.3. Radiografia de metàstasi òssies	107
8. HISTOLOGIA	107
8.1. PRESERVACIÓ DE TEIXITS.....	107
8.2. HEMATOXILINA-EOSINA	108
8.3. IMMUNOHISTOQUÍMICA	108
9. ANÀLISI ESTADÍSTICA.....	109
RESULTATS.....	111
1. Causa-efecte de la proteïna regulada per glucosa ERp57 com a txaperona multifuncional en la metàstasi òssia.....	113
1.1. Identificar el paper d'ERp57 com a regulador principal d'una xarxa d'interacció proteica integrant la funció de sistema immune i citoesquelet.....	113
1.2. Demostrar la importància d'ERp57 en el procés de metàstasi òssia	124
2. Caracteritzar els components metabòlics associats al procés òrgan-específic de la metàstasi del càncer de mama.....	129
2.1. Analitzar els gens reguladors del fenotip lipídic metastàtic.....	131
2.2. Estudiar el perfil metabòlic característic de les cèl·lules metastàtiques.	135
2.3. Analitzar el fenomen del catabolisme lipídic en relació a la disponibilitat de glucosa	143
2.4. Analitzar el paper de l'autofàgia en la patogènesi de la metàstasi	149
2.5. Analitzar la contribució de la funció i dinàmica mitocondrial a la versatilitat metabòlica de les cèl·lules metastàtiques.	153
DISCUSSIÓ	159
1. Relació causal entre l'expressió d'ERp57 i la metàstasi òssia.....	161
2. Reprogramació del metabolisme energètic i òrgan-especificitat de la metàstasi	169

INDEX

3. Contribució de l'autofàgia en l'adaptació metabòlica òrgan-específica	174
4. La funció i dinàmica mitocondrial en el manteniment del metabolisme energètic.....	177
5. Paper de les eines bioinformàtiques en l'obtenció de dades biològiques ..	180
6. Expectatives de futur	182
CONCLUSIONS	185
ANNEX	189
REFERÈNCIES	249

INDEX

ABREVIATURES

ABREVIATURES

ABREVIATURES

ABREVIATURES

Línies cel·lulars:

435-P	MDA-MB-435-Parental
435-L3	MDA-MB-435-Lung, metastàtica a pulmó
435-B1	MDA-MB-435-Bone, metastàtica a os
435-Lv1	MDA-MB-435-Liver, metastàtica a fetge
435-Br1	MDA-MB-435-Brain, metastàtica a cervell
V5	MDA-MB-435-Br/V5, metastàtica a cervell més específica
231-P	MDA-MB-231-Parental
231-BO2	MDA-MB-231-BO2, metastàtica a os
sh21	shERp57BO2C21, clon 21 de la línia BO2 que infraexpressa ERp57
sh32	shERp57BO2C32, clon 32 de la línia BO2 que infraexpressa ERp57
ct4	shBO2/GFPCT4, control de la infraexpressió d'ERp57 en la línia BO2

β2m	beta-2-microglobulina o cadena lleugera
2-DG	2-desoxi-glucosa
2-HG	2-Hidroxioglutarat
2DE-DIGE	<i>Two Dimensional Difference Gel Electrophoresis</i>
AAALAC	<i>Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International</i>
ACAT1	Acil-CoA:colesterol acil transferasa
ACC	Acetil-CoA Carboxilasa
ACL	ATP Citrat Liasa
ACOT7	Acil Coenzim A Tioéster hidrolasa
APM	Maquinària de Processament Antigènic
ATP	Trifosfat d'adenosina
BCA	Àcid bicinconínic
BHE	Barrera Hematoencefàlica
BIANA	<i>Biologic Interactions and Network Analysis</i>
BLI	Bioluminescència
Bp	parell de bases

ABREVIATURES

BRMS1	Breast metastasis suppressor 1
BSA	Àlbumina Sèrica Bovina
CAF	<i>Cancer-Associated Fibroblast</i> /Fibroblasts associats al tumor
CAT	Translocasa de carnitina
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i>
CDI	Carcinoma Ductal Infiltrant
CDIS	Carcinoma Ductal In Situ
CDH1	E-Cadherina
CLI	Carcinoma Lobular Infiltrant
CLIS	Carcinoma Lobular In Situ
CMV	Citomegalovirus
CNX	Calnexina
CO₂	Diòxid de carboni
CPT	Carnitin Palmitoïl-Transferasa
CRT	Calreticulina
CSC	<i>Cancer Stem Cells</i> / Cèl·lules mare tumorals
CTC	Cèl·lula Tumoral Circulant
CTP	Transportador de citrat malat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetil Sulfòxid
DNA	Àcid Desoxiribonucleic
dNTPs	Nucleòtids fosfatats
Drp1	<i>Dynamin-related protein 1</i>
DTCs	Cèl·lules Tumorals Disseminades
DTT	DL-TioTreitol
ECT	<i>Ethanolamine-Phosphate Cytidyltransferase</i>
EDTA	Àcid Etilendiaminotetraacètic
eGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
ER	Receptor d'estrogen
FACS	<i>Fatty Acyl-CoA Synthase</i>
FAO	<i>Fatty Acid Oxidation</i>

ABREVIATURES

FASN	<i>Fatty Acid Sintasa/Sintasa d'àcid gras</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDG-PET	<i>Fluorodeoxyglucose-Positron emission tomography</i>
FN	Fibronectina
g	Grams
GC-TOFMS	<i>Gas Cromatography-Time Of Flight Mass Spectrometry</i>
Gln	Glutamina
GPCRs	<i>G protein coupled receptors</i>
GRP	Proteïnes regulades per glucosa
h	hores
H₂O₂	peròxid d'hidrogen
HBMX	Xenografts de Metàstasi Cerebral Humana
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> sense vermell fenol, ni CaCl ₂ ni MgCl ₂
HC	Cadena Pesada
HEPES	àcid 4-(2-hidroxietil)-1-piperazonaetanosulfònic
HER2	Receptor Humà del factor de creixement Epidèrmic
HLA I	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HNO₃	Àcid Nítric
hsps	<i>Heat Shock Proteins</i>
i.m.f.p.	<i>Intramammary Fat Pad</i>
IDH	Isocitrat Deshidrogenases
IF	Immunofluorescència
IHC	Immunohistoquímica
IHW	Seminari Internacional sobre Histocompatibilitat
Int Dens	Densitat Integrada
IVC	rack individual ventilat tipus IIL
kDa	Kilodalton
KRBH	tampó Krebs-Ringer Bicarbonat HEPES
L	Litre
LC3	<i>microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>
Luc	Luciferasa

ABREVIATURES

LXR	<i>Liver X Receptor</i>
M	Molar
MAGL	Mono-Acil Glicerol Lipasa
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight</i>
MC	Medi complet
MCSS	Medi Complet Sense Sèrum
MEC	Matriu Extracel·lular
Min	Minut
MMLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MMP9	Metal·loproteasa de la Matriu 9
MSC	Cè·l·lules mare mesenquimals
mtDNA	DNA mitocondrial
mTORC1	<i>Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1</i>
MVD	Difosfomevalonat decarboxilasa
N₂	Nitrogen
NaCl	Clorur sòdic
NADH	Forma reduïda de la Nicotinamida adenina dinucleòtid,
NADPH	forma reduïda de Nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat
NAFLD	fetge greixós no-alcohòlic
NK	<i>Natural Killers</i>
Nm	Nanòmetres
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PC	Component Principal
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCR	Reacció en cadena de la Polimerasa
PDH	Piruvat Deshidrogenasa
PDI	<i>Protein Disulfide Isomerase</i>
PFA	Paraformaldehid
Ph/s	Fotons per Segon
PHGDH	Fosfoglicerat dehidrogenasa
PIANA	<i>Protein Interactions and Network Analysis</i>

ABREVIATURES

PLC	<i>Peptide Loading Complex</i> o Complex de Càrrega de Pèptid
PMSF	<i>Phenyl Methane Sulfonyl Fluoride</i>
PPARγ	<i>nuclear hormone receptor peroxisome-proliferator-activated receptor-γ</i>
PPIN	xarxes d'interacció proteïna-proteïna
PR	Receptor de progesterona
PVDF	Fluorur de Polivinilidè
RE	Reticle Endoplàsmic
RNA	Àcid Ribonucleic
ROI	Regió d'interés
ROS	Espècies Reactives d'Oxigen
RP	Receptor de Progesterona
Rpm	Revolucions per minut
RS	<i>Raman Spectroscopy</i> /Espectroscòpia Raman
RT-PCR	Transcripció inversa-PCR
RT-QPCR	<i>Real Time-Quantitative PCR</i>
RXRα	<i>Retinoic Acid Receptor</i>
s	segon
SBF	Sèrum Boví Fetal
SDS	Dodecil Sulfat Sòdic
SDS-PAGE	Electroforesi de proteïnes en gel de poliacrilamida i SDS
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small Interfering RNA</i>
SPF	animals lliures de patògens
SRE	Estrès de Reticle Endoplàsmic
SREBP-1	<i>Sterol Regulatory Element Binding Protein 1</i>
T	Temperatura
TAM	<i>Tumor-Associated Macrophages</i>
TEM	Transició Epiteli-Mesènquima
TFA	Àcids grassos totals
TME	Transició Mesènquima-Epiteli
TN	Triple Negatiu

ABREVIATURES

TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
ttA	<i>Tetracycline-regulated Transactivator</i>
TUFA	Àcids grassos insaturats totals
UICC	Unió Internacional Contra el Càncer
uPAR	Receptor d'uroquinasa
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
UV	Ultra Violeta
V	Volts
VDAC	<i>Voltage-dependent Anion Channel</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WB	<i>Western Blot</i>

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1. BIOLOGIA DE LA METÀSTASI

1.1. PROGRESSIÓ METASTÀTICA DEL CÀNCER DE MAMA

El càncer de mama és el tipus més comú de càncer i la primera causa de mortalitat en dones (Jemal et al., 2011), registrant-se 230.000 casos nous de càncer de mama invasiu al 2011 només als Estats Units (Eckhardt et al., 2012). La incidència és més elevada en països desenvolupats (Key et al., 2001).

El carcinoma de mama més freqüent és d'origen epitelial i sol aparèixer en els conductes que porten la llet al mugró o bé en els lòbuls (glàndules productores de llet). Segons el seu origen histològic, caràcter invasiu i patró estructural, els tumors malignes es poden classificar en diferents subtipus (Mallon et al., 2000). Aquesta classificació inclou fins a 18 tipus de càncer de mama (Tavassoli and Devilee, 2003) però principalment, els tumors malignes poden ser no invasius, com el carcinoma ductal in situ (CDIS) o el carcinoma lobular in situ (CLIS), o invasius com el carcinoma ductal infiltrant (CDI) o el carcinoma lobular infiltrant (CLI).

El pronòstic de les pacients de càncer de mama es tabula amb el sistema TNM proposat per la Unió Internacional Contra el Càncer (UICC) al 1954. Es basa en el fet que el tipus de tractament i les probabilitats de supervivència es relacionen amb l'extensió del tumor primari (T), la presència o absència de tumor en els nodes limfàtics regionals (N) i la presència o absència de metàstasis (M) més enllà dels nodes limfàtics (Sobin, 2003)

Cada un dels paràmetres es pot classificar al seu torn en diversos graus. Existeixen 4 estadis per al paràmetre T, de millor a pitjor pronòstic: estadi 0 (carcinoma *in situ*), estadi 1 (tumors localitzats en la mama de tamany inferior a 2 cm), estadi 2 (tumors majors de 2 cm), estadi 3 (tumors més gran de 5 cm), estadi 4 (tumors disseminat a altres òrgans). El paràmetre N es subdivideix en 4 estadis (Escobar et al., 2007): N0 (absència de cèl·lules tumorals als ganglis propers), N1 (1–3 nodes positius), N2 (4–9 nodes positius), o N3 (més de 9 nodes positius). Finalment, el paràmetre M es pot classificar en M0, si no hi ha signes d'expansió tumoral, o M1, si s'observa presència de metàstasi.

La supervivència de les pacients amb càncer de mama depèn d'altres factors pronòstics a més del tamany del tumor. El grau histològic representa l'agressivitat tumoral i s'obté a partir de tres característiques patològiques del teixit: formació de túbuls, morfologia

INTRODUCCIÓ

nuclear i índex de mitosi. Segons aquests paràmetres, el tumor es pot classificar en tres categories (grau I, II i III) que permeten l'estratificació del risc de progressió (Tsuda, 2008).

Un altre factor pronòstic és la presència de receptors hormonals, com el d'estrogen, ER o el de progesterona, PR (Althuis et al., 2004). Els tumors negatius per a l'ER s'associen amb ràpides recaigudes mentre que els tumors ER+ s'associen amb risc persistent més enllà dels 10 anys (Ahmad, 2013).

La genòmica ha permès l'anàlisi de l'expressió diferencial de milers de gens, útils per la definició de les característiques moleculars del sistema. Aquests estudis han propiciat el descobriment de marcadors pronòstics/diagnòstics i de noves dianes terapèutiques (Driouch et al., 2007).

Sorlie i col. (2001) van aplicar aquesta tecnologia per classificar carcinomes de mama basant-se en variacions en els perfils d'expressió gènica. Això els va permetre ampliar la classificació existent de Perou i col. (2000), que definia 5 subtipus de tumors primaris: luminal A, luminal B, basal-like, normal-type i ERBB2+. El nou perfil d'expressió gènica de Sorlie proposava una classificació en funció de la presència del Receptor d'Estrogen: tres subtipus ER+ incloent el luminal A, B i C i tres subtipus ER-, que comprenia els tumors Her2, basal i TN (Puztai et al., 2006; Sorlie et al., 2001).

Aquesta classificació té importants implicacions clíniques. Els tumors de tipus luminal són menys agressius ja que expressen receptors hormonals mentre que els tres darrers són tumors molt agressius associats a una baixa supervivència (Sorlie et al., 2001). Els tumors ErbB2+ i els TN (triple negatiu per als tres receptors ER, PR i ErbB2) són els que presenten un major risc de formació de metàstasis i de recaiguda (Foo et al., 2013; Kennecke et al., 2010), amb un pic als 3 anys després del diagnòstic (Boyle, 2012).

A partir d'aquests estudis, han aparegut noves sub-classificacions, com la de Teschendorff i col., on l'anàlisi de gens diferencialment expressats en tumors ER- ha mostrat que els de tipus basal són un grup heterogeni format per al menys 4 subtipus (Teschendorff et al., 2007). Dins d'aquest subtipus, l'anàlisi va revelar un mòdul d'expressió de gens de resposta immune amb bon pronòstic.

Entre els tumors negatius per al ER destaquen els tumors TN, un grup heterogeni que suma el 10-20% del total de carcinomes invasius (Boyle, 2012). Pietsenpol i col. van aprofundir en la subclassificació d'aquest tipus de tumors. L'anàlisi de 21 bases de dades de càncer de mama va identificar 6 subtipus de TN: 2 basal-like (BL1 i BL2), un immomodulatori

INTRODUCCIÓ

(IM), un mesenquimal (M), un tipus Luminal Androgen Receptor (LAR) i un fenotip claudin-low o mesenchymal-like o MSL (Lehmann et al., 2011). Aquest darrer té un pronòstic intermig entre els subtipus basal i luminal (Prat et al., 2010), i està enriquit amb cèl·lules amb propietats similars a cèl·lules mare de la glàndula mamària i potencial iniciador (Bruna et al., 2012; Hennessy et al., 2009; Lim et al., 2009). El tractament farmacològic de línies cel·lulars que recollien cadascun dels subtipus definits, va permetre establir susceptibilitats a drogues contra rutes concretes com cisplatí en els BL1 i BL2 o inhibidors de PI3K/mTOR en M i MSL (Lehmann et al., 2011).

En paral·lel amb la identificació d'aquests subtipus, altres grups han aprofundit en l'ús d'eines genòmiques per a la identificació de perfils d'expressió associats a pronòstic o risc de metastàsis en càncer de mama (Paik et al., 2004; van de Vijver et al., 2002). Destaca l'estudi de Van't Veer (2002), on es va descriure un perfil d'expressió format per 70 gens associats a mal pronòstic i risc de metastasi en pacients de càncer de mama i ganglis negatius (van 't Veer et al., 2002). La seva validació com a eina pronòstica en un grup de 295 pacients ha originat el MammaPrint, el primer test multigènic aprovat per la Food and Drug Administration (FDA) (Ross et al., 2008). També l'OncotypeDX, un assaig per PCR sobre 21 gens, ha rebut aquesta aprovació i l'eficàcia d'ambdós testos ha estat validada en assajos clínics (Cardoso et al., 2008; Sparano and Paik, 2008).

Altres paràmetres com la presència de cèl·lules tumorals circulants (CTC), tenen un potencial valor pronòstic i predictiu (Weigelt et al., 2005). Estudis recents confirmen que la detecció de ≥ 5 CTC per 7.5 ml de sang abans del tractament són un predictor de pitjor pronòstic reduint el temps lliure de malaltia i la supervivència. També és un indicador de l'eficàcia del tractament i de l'evolució clínica (Consoli et al., 2011).

L'heterogeneïtat intra i inter-tumoral requereix de sistemes complexos de classificació molecular que permetin integrar totes aquestes dades en classificadors útils en la clínica per al diagnòstic i tractament personalitzat del càncer de mama (Caldas, 2012). En aquest sentit, el grup de Caldas proposa un nou classificador, METABRIC, que permet la identificació de 10 clusters associats al resultat clínic mitjançant la integració d'informació genòmica i transcriptòmica (Dawson et al., 2013).

Altres estudis versen sobre la capacitat metastàtica dels diversos subtipus tumorals, permetent associar-los a patrons de disseminació metastàtica amb diferències clares en supervivència i recaiguda (Kennecke et al., 2010). L'os és el lloc més comú de metastasi en

tots els subtipus excepte en els tumors *basal-like*. Pel contrari, els tumors luminal/HER2 i tumors enriquits en HER2 s'associen a una major predilecció per cervell, fetge i pulmó. Els tumors *basal-like* tenen un major tropisme a cervell, pulmó i nodes però menor proporció de metàstasi a fetge i os. Els TN mostren un patró similar però no s'associen a menys metàstasi hepàtica (Kennecke et al., 2010).

Entre el 25 i el 50% de pacients diagnosticades amb càncer de mama desenvoluparan metàstasi fatals, fins i tot dècades després del diagnòstic i extirpació del tumor primari (Lorusso and Ruegg, 2012), essent aquesta la causa principal de mort. Només un 25 % de les pacients que desenvolupen metàstasi sobreviuen més de cinc anys (Weigelt et al., 2005).

Tot i els esforços realitzats, s'han fet avenços precaris en el control de les metàstasi de càncer de mama. La detecció es basa en manifestacions clíniques de l'expansió a òrgans distants, biòpsies d'òrgans afectats, avaluacions radiològiques, mètodes d'imatge i marcadors tumorals en sèrum (Lacroix, 2006; Sun et al., 2011). Les opcions terapèutiques radiquen en l'administració sistèmica de quimioteràpia o radioteràpia i cirurgia per a lesions aïllades, amb un impacte moderat en la supervivència a llarg termini (Lorusso and Ruegg, 2012) i no són efectius en la prevenció de les recaigudes. La metàstasi segueix sent el pas limitant en la supervivència de les pacients i el desenvolupament de tractaments efectius és un dels reptes més rellevants en la recerca experimental i clínica actual.

1.2. EL PROCÉS METASTÀTIC

La metàstasi és la disseminació de cèl·lules neoplàsiques cap a llocs secundaris, on proliferen per formar una massa extravascular (Welch, 2006). Són responsables del 90% de morts a partir de tumors sòlids i presenten diverses manifestacions clíniques. En el càncer de mama, les metàstasi poden no ser detectables i romandre latents durant anys a partir de l'extirpació del tumor primari, per ser finalment incurables (Talmadge and Fidler, 2010).

La metàstasi és conseqüència d'una cascada d'events que es donen de manera seqüencial (Figura 1). Quan el tumor primari creix més de 1-2 mm ha de desenvolupar una xarxa per a l'aport de sang que pugui afavorir les seves necessitats metabòliques, un procés anomenat angiogènesi (Carmeliet and Jain, 2000). Aquests nous vasos es transformen en una

INTRODUCCIÓ

ruta d'escapada per la qual les cèl·lules poden abandonar el tumor i entrar en circulació (Scully et al., 2012). Perquè això succeeixi cal que les cèl·lules sofreixin el que es coneix com a transició Epiteli-Mesènquima (TEM), una sèrie de processos que inclouen la pèrdua d'adhesions cèl·lula-cèl·lula, canvis en la polaritat, modulació del citoesquelet i transformació a cèl·lules aïllades, mòbils i resistents a anoikis (Klymkowsky and Savagner, 2009).

Un cop en el torrent sanguini, les cèl·lules han de sobreviure en circulació fins l'arribada al nou òrgan. Durant el trajecte moltes cèl·lules moren, amb una probabilitat d'èxit de la metastasi del 0.01% del total de cèl·lules circulants (Talmadge and Fidler, 2010). Les cèl·lules que han sobreviscut aturen el seu cicle cel·lular, s'adhereixen a les parets capil·lars i extravasen des de la circulació al teixit circumdant (Scully et al., 2012). Per a aquest pas és necessari que es doni el procés de la transició Mesènquima-Epiteli (TME), contrari a la TEM. Un cop en el nou òrgan, les cèl·lules han de reiniciar i mantenir la proliferació per tal de formar micrometastasis pre-angiogèniques. Per garantir el creixement a tumor macroscòpic les cèl·lules han d'establir nous vasos sanguinis i evitar el reconeixement del sistema immune (Chambers et al., 2002; Fidler, 2003; Langley and Fidler, 2007).

S'estima que un 80% de la disseminació en tumors sòlids com el de mama o melanoma, es dona a través dels vasos limfàtics, mentre el 20% restant es dona a través de vasos sanguinis (Leong et al., 2011). La limfangiogènesis és un fenomen patològic que es dona en la inflamació o el càncer. Aquests tipus de vasos aporten menys resistència ja que són més porosos (Alitalo and Detmar, 2012), permetent l'entrada de cèl·lules tumorals en circulació sanguínia de forma indirecta via sistema limfàtic. De fet, l'aparició de metastasis en el node limfàtic és el primer signe de progressió tumoral en la majoria de tumors epitelials (Weiss, 2000).

El descobriment de factors de creixement limfàtic, com VEGF-C o VEGF-D, o marcadors de vasos limfàtics, com VEGFR-3, LYVE-1, podoplanina i Prox-1, han permès estudis detallats del paper dels sistema limfàtic en el càncer. La teràpia contra la limfoangiogènesi (inhibició de VEGFR-3) és prometedora tot i que no aconsegueix bloquejar el procés metastàtic en diversos models pre-clínics (Burton et al., 2008; Roberts et al., 2006).

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

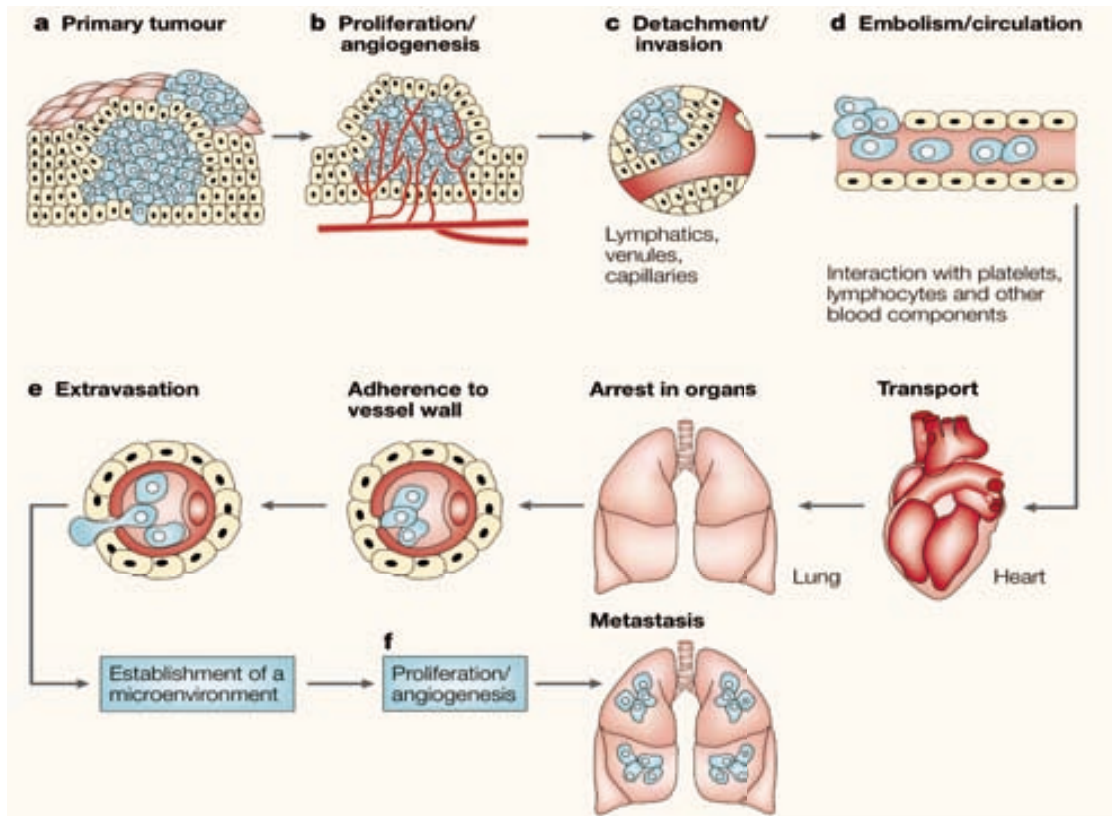
12

13

14

15

16



U E, U z Uggèr F Uè, I Uvpèr Uè r LngUguè 3è si t à U.sn I X-g XRèpè sè XsR-/Rn Rt cèpn Lsl è Ssl X-Rà è t pcs-Rt càmpRè ss-ERt è RsB-Ù à-g' 3è I àXpè s-cí X-g' 3è BRSpBI è 3è BRXRX-g BRU Xcl sà t S-L SVt -XàmpRè pBRT è Rt è U.sn I X-g BRXI , -è sàRt èRècR/-cèX-sXpn BI t c' 3è vi à-g' XI èBRèRàcsLn I ' 3è Rà, sRt -n Rt è Rn EL ecí X-g BRXVèpèRà 3è BRàL SsRSI cà'èRàXVèpèRàX-sXpè t càmpRèL EsRv-pRt èàgt è csl , I BRàRt èRè XI , -è sàBòsSI t àB-àc t cà, Rsè BMRà-g' XVèpèRàRt BLcRel èBè mpRàcàXI , -è sàL è èn Rn Esl t I èI àl è àpERt BLcRel è 3èR/csl vi àl X-g RàBLt I , Rsèn RXI t -àn Ràà-n -è sà èmpRèRàBLt Rt èBpsl t è è-t vi à-g' 3è èsLeUrsI X-g Rt èRè I svè mp-n I èBRè LpèusSI t 'èRsmVè èn Rcnàc à-èRSpR-/XsR-/Rt cèI èsNèBRàRt vLè, I sèpt I è /I s/I vi àXpè sè Rsè è , LscBRè pcs-Rt cà'è-BèRs: è ++%' è

17

18

1.3. PATOGÈNESI DE LA METÀSTASI

1.3.1. *Contribució del microentorn al procés metastàtic*

Històricament, l'estudi del desenvolupament metastàtic s'ha centrat en les modificacions genètiques de la cèl·lula tumoral que la fan més procliu a disseminar-se a òrgans llunyans, però l'estroma té un rol essencial en tant iniciant els estadis de progressió com facilitant l'ancoratge en l'òrgan diana (Geiger and Peeper, 2009). L'estroma tumoral està compost per matriu extracel·lular (MEC), cèl·lules no malignes (fibroblasts, cèl·lules infiltrants immunes o inflammatòries), vasculatura i molècules de senyalització (Dvorak, 1986). L'estroma evoluciona tal i com ho fan les característiques genètiques de la cèl·lula tumoral. La disseminació de cèl·lules tumorals des del tumor primari depèn d'aquest microentorn i també del microentorn que trobi en el lloc secundari de metastàsis (Sleeman, 2012).

L'estroma tumoral té característiques semblants a les que es donen durant el tancament d'una ferida (Dvorak, 1986). En aquest procés, les cèl·lules inflammatòries, els fibroblasts i les cèl·lules mare mesenquimals infiltren la ferida i remodelen el microentorn, activant l'angiogènesi i la proliferació cel·lular per reparar el teixit (Figura 2). Mentre que aquesta resposta fisiològica sol ser transient, en el cas del procés cancerós el microentorn tumoral i/o metastàtic es manté constantment actiu (Schafer and Werner, 2008).

L'inici del procés metastàtic es dona des del tumor primari i és mediat per fenòmens d'invasió. Els components del microentorn tumoral poden afavorir aquest procés provocant una remodelació de la MEC. Les cèl·lules tumorals secreten factors de creixement i citocines que activen i atrauen fibroblasts i cèl·lules inflammatòries cap al tumor. Aquestes cèl·lules infiltrades i les tumorals, segueixen remodelant el microentorn secretant factors de creixement i proteases (Mueller and Fusenig, 2004), que al seu torn influencien a la cèl·lula tumoral i a les cèl·lules de la MEC (Figura 2A). La presència de cèl·lules mare mesenquimals (MSC, Figura 2B) o de *Cancer-Associated Fibroblasts* (CAFs, Figura 2C), afavoreixen el potencial invasiu de la cèl·lula tumoral, la transformació epitelial, el creixement tumoral i l'angiogènesi (Orimo et al., 2005).

Per una altra banda, els components del sistema immune, especialment els d'immunitat innata (macròfags, neutròfils o mastòcits) participen en la inflamació (Figura 2D), un altre mediador del creixement tumoral i la invasivitat (Mantovani, 2010; Qian and

INTRODUCCIÓ

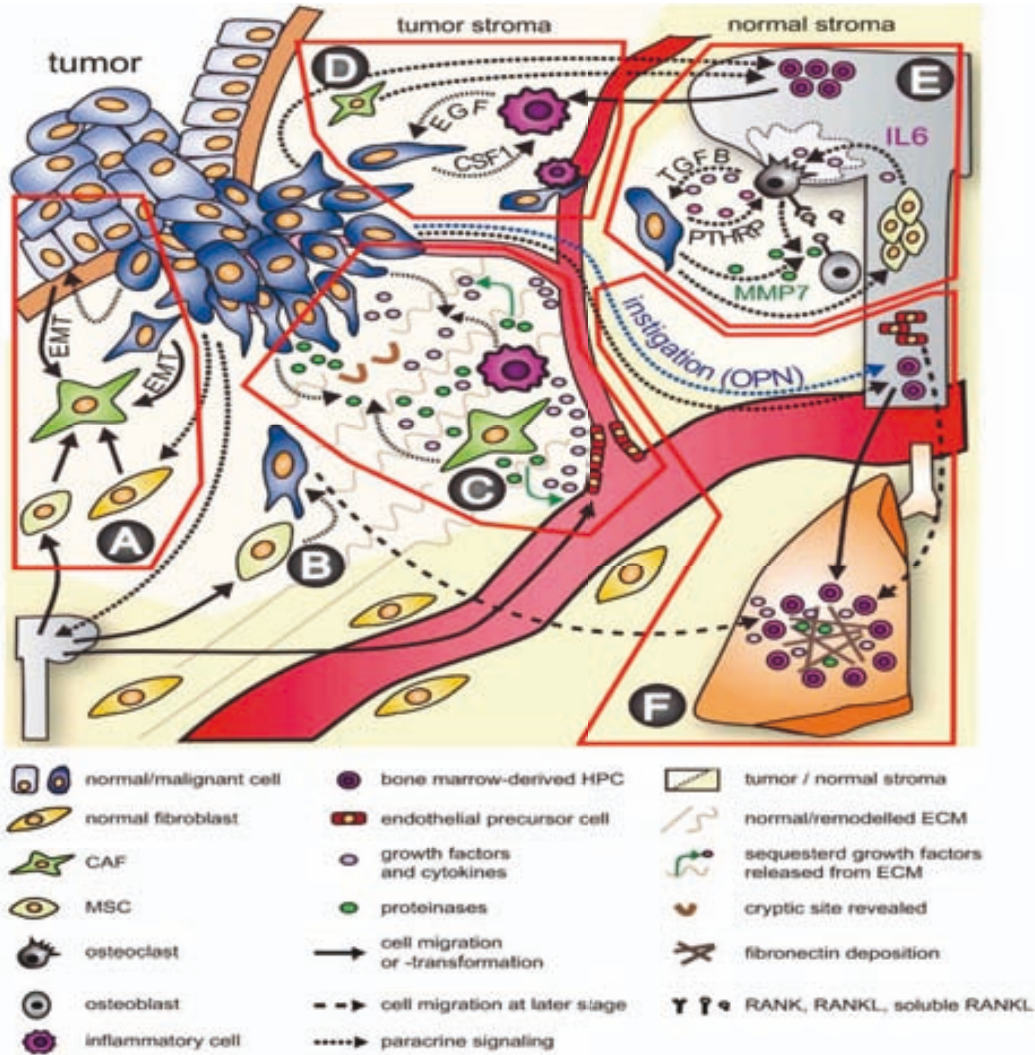
Pollard, 2010). Els factors de creixement i proteases secretats per les cèl·lules del sistema immune promouen el creixement tumoral, l'angiogènesi i la progressió tumoral. La presència de *Tumor-Associated Macrophages* (TAMs) es considera un element de mal pronòstic en models murins de càncer de mama, ja que promouen la intravasació i participen en la formació del nínxol pre-metastàtic (Lin et al., 2001).

Per tal de sobreviure en llocs distants, les cèl·lules tumorals disseminades han d'establir interaccions complexes similars a les descrites en el tumor primari. Un dels passos claus per a l'èxit del procés metastàtic és la formació del nínxol pre-metastàtic (Kaplan et al., 2005). El microentorn endògen de l'òrgan receptor aporta components al nínxol, però les modificacions de l'estroma pre-metastàtic són degudes a molècules secretades des del tumor primari (Sleeman, 2012). Així, la mobilització de cèl·lules derivades de la medul·la òssia des del tumor llunyà permeten la infiltració de l'òrgan diana (Figura 2F) i la remodelació de la MEC. Aquesta remodelació consisteix en la formació de dipòsits de fibronectina i l'enriquiment del microentorn amb factors de creixement i proteases (Geiger and Peeper, 2009).

La formació del nínxol no només atrau les cèl·lules del tumor primari, sinó que estableix un lloc d'inflamació, afavoreix la supervivència a través del reclutament de macròfags, promou la pluripotencialitat, la TEM (important per a l'establiment de noves metàstasis) i la latència de les cèl·lules disseminades (Sleeman, 2012). Així, Hiratsuka va demostrar que el tumor primari podia induir la sobreexpressió de MMP9 en cèl·lules endotelials de pulmó i acumulació de macròfags prèvia a l'implantació de les cèl·lules metastàtiques, promovent així la invasió preferencial d'aquest òrgan (Hiratsuka et al., 2002).

Finalment, la neovascularització és un altre element clau per a la supervivència de la cèl·lula metastàtica en el nou microentorn. La secreció de molècules com VEGFA o ID1 des del nou òrgan induiran la formació de vasos sanguinis (Gao et al., 2008).

Aquests fenòmens s'il·lustren prenent com a model la metàstasi òssia (Figura 2E) i s'analitzen amb més detall a l'apartat 2.A.



The diagram illustrates the complex interactions between tumor and normal stroma. In the tumor region, normal/malignant cells (A) undergo EMT to become CAFs (B). CAFs release growth factors like EGF and CSF1 (C) which stimulate tumor cells. In the normal stroma, bone marrow-derived HPCs (D) differentiate into osteoclasts (E) and osteoblasts (F). Osteoclasts resorb bone, while osteoblasts form bone. The process is regulated by factors like TGFβ, PTHrP, and IL6. MMP7 is shown degrading ECM, revealing cryptic sites (G) for fibronectin deposition (H). A legend at the bottom defines cell types (normal/malignant cell, normal fibroblast, CAF, MSC, osteoclast, osteoblast, inflammatory cell, bone marrow-derived HPC, endothelial precursor cell, growth factors and cytokines, proteinases, tumor/normal stroma, normal/remodelled ECM, sequestered growth factors released from ECM, cryptic site revealed, fibronectin deposition, cell migration or -transformation, cell migration at later stage, paracrine signaling, and RANK, RANKL, soluble RANKL).

1.3.2. Models de progressió metastàtica

Per garantir l'èxit de la metastasi és necessària la conjunció de diversos factors. Paget va proposar la idea que les cèl·lules tumorals ("seeds") estaven predisposades a aturar-se i proliferar només en els llocs anatòmics ("soil") que proporcionen un entorn adient per al creixement (Paget, 1989). Ewing posava en dubte aquest concepte postulant que únicament la direcció de circulació determinava la distribució de les metastàsis (Ewing, 1928). Actualment s'accepta que les rutes circulatòries influeixen la distribució de cèl·lules tumorals però que el creixement de les macrometastasis depèn de la compatibilitat amb el nou teixit (Fidler, 2003).

Per tal d'identificar les bases moleculars responsables de la distribució metastàtica s'han descrit diverses hipòtesis o models (Figura 3):

- El **model de selecció clonal** defensa que les subpoblacions tumorals evolucionen seguint un procés similar a la selecció Darwiniana. La variació genètica s'aconsegueix en estadis tardans de la tumorigènesi per mutacions estocàstiques que confereixen avantatges proliferatius i/o en supervivència i que provoquen la selecció del fenotip. Aquesta teoria ha incorporat les modificacions epigenètiques com a creadores d'heterogeneïtat molecular (Gupta and Massague, 2006).

- Una altra teoria descriu que totes les cèl·lules del tumor primari tenen la mateixa capacitat per originar metastasis. Aquestes afirmacions es basen en estudis de Weiss i col. (1983) que van aïllar fragments del mateix tumor primari i, després d'injectar-los subcutàniament en ratolins immunodeprimits, van observar una capacitat metastàtica idèntica.

- El **model d'heterogeneïtat dinàmica** proposa que les subpoblacions metastàtiques es generen a gran velocitat però són relativament inestables, resultant en un equilibri dinàmic entre la generació i la pèrdua de variants metastàtiques (Hill et al., 1984).

- El model de **dominància clonal** exposa que quan apareix un subclon metastàtic en el tumor primari, la progènie d'aquest subclon creix i domina la massa tumoral. Així, en fases finals de la tumorigènesi, les cèl·lules metastàtiques desplacen a les no metastàtiques (Kerbel et al., 1988).

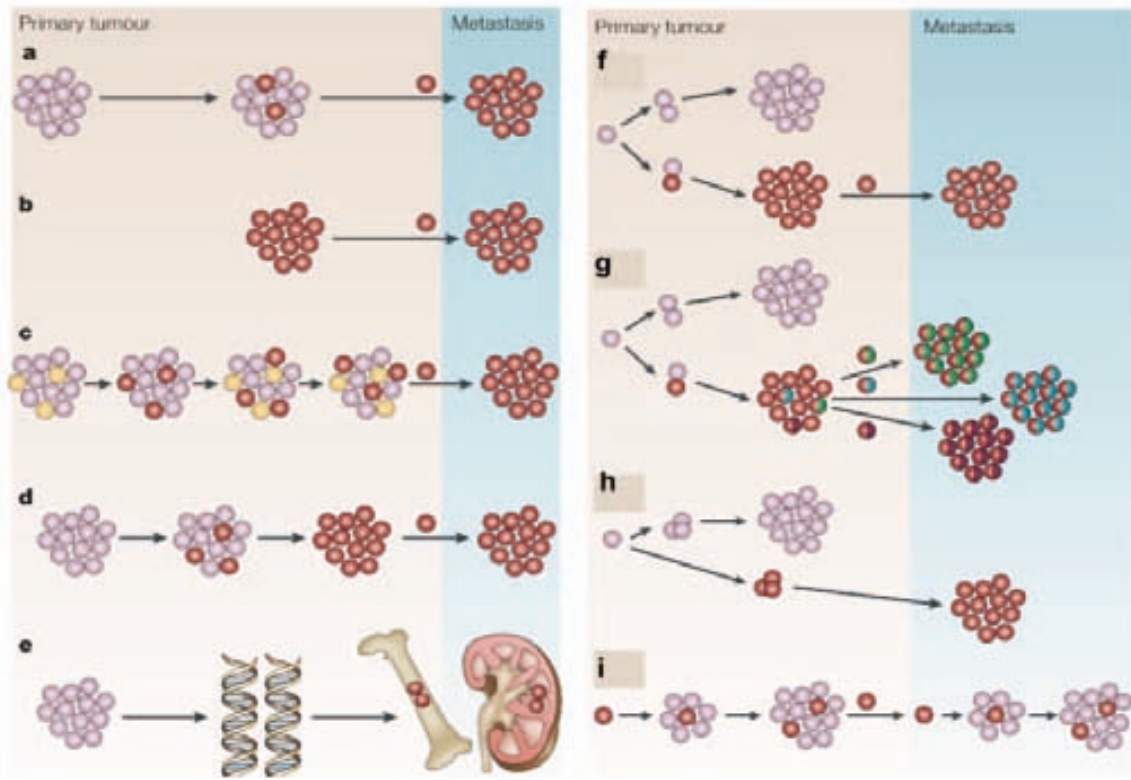
- García-Olmo i col. descriuen la provocativa **hipòtesi de la genometàstasi**, segons la qual la metastasi ocorre per la transfecció de cèl·lules susceptibles en òrgans distants amb

2

Lt XuSRt àBLn -t It càmpRàcsL ERt RT X-sXpdx-gmpRBRs-vRt BRcpn Ls s-n Is -99 Is X-I)
en LRde': +++y

)àcpB-àh TàBRXRt càBRcRsn -t Rt mpRàXI, IX-clc h Rdà cNeXIàRàcNà UpRt X-I BI RàUL t à
SRt Vc-XBRcpn Ls s-n Is -27 Rèn -XsL Rt clst '27/, Rs-n Rt càBòR/, sRàà-gSVt -XI27Sst RàXle27
9vit d27RRs27Rde': ++; yn LàcsRt mpRàmpRàcl27XI, IX-clc BòB mp-sR-/Rt RàdB -àt -X-leàBR
, sLXTàcpn Lsle27Bò ààLX-27R/, sRàà-gBRèn Is XIB LsàBR27 sLsRàà-g h Rdà cNeXI 27 R-SRà27Rd
le': ++%/

)àcsRà27sp, à:27XLn RàBR27 là àS pT:27XLn , èRn Rt cRt mpRàcl27Bis sRsl27M, ucRà-BBRURt àt d
mpRà27n TàBòpt 27, RsUèBòR/, sRàà-gBRèn le27, sLt uàc-XRt Rcpn Ls s-n Is -27/-àR-/27pt 27, RsUè
BòR/, sRàà-g27 BB-X-Lt le27Rà, RX4XBRàcR/-c27mpRà sRB-pRàXBRèn Rcnàà -27LàRde': ++Y27
It SRde': ++%27 -t t Rde': ++W27



Qu E, Uché èer ger q, è , rggup r LUgLnLw27 327 en LBRàcsi B-X-Lt l BRàRàRX-gXà t l è2727 327 LBRà RàmpI è
d cRà27RàXVèpà27cpn Lsl è27cRt Rt 27 d 27n I cR-/I 27XI , I X-d 27, Rs27SRt Rsl s27n Rcnàc à-à'2710327 LBRàBòVRcRSLSRt R3d 27
B-t Nh -XI '2710 327 LBRàBRàBLn -t Nt X-I 27Xà t l è2710327-, ucRà-BBR27 BRt Ln Rcnàc à-2710327RLs-I 27àRSLt à27h 27mpI è
RsUè27
BòR/, sRàà-gSVt -XI BRcpn Ls27 s-n Is -à27BRèn I n I 27 LBRt 27 sRB-sRàS-àX27n Rd àcNc-X27n I è sLt uàc-XRt 27Rsn RàVà'27
ELt 27 sLt uàc-XRt 27Làl 2727 327pn Ls27 s-n Is -à27 n E27XI , I X-d 27n Rd àcNc-XI 27 sRàRt cRt 27R/, sRàà-gBR27SRt à27BRèn I è
, sLt uàc-XRt 27RsUèBòR/, sRàà-g27Rà, RX4XBRàcR/-c27mpRà sRB-pRàXBRèn Rcnàc à-27VRSB:27LàZEd p:27URcSR27 Ls, sl 27
, pen 2727 327 LBRàBòVLeX-g27 I sl èRà '2727 LBRàBRà272727à'27BI , d 27BR27 R-SRà27Rd 27 ++W27

INTRODUCCIÓ

Són cèl·lules indiferenciades que es caracteritzen pel potencial de diferenciar a altres tipus cel·lulars, amb poder d'autorenovació i capacitat de mantenir un reservori de cèl·lules mare (Schulenburg et al., 2010). Aquestes cèl·lules són subpoblacions de cèl·lules tumorals que poden actuar com a cèl·lules propagadores del tumor (Clarke and Fuller, 2006), implicades en la iniciació i creixement tumoral i en l'habilitat metastàtica.

Poden resistir apoptosi i dany en el DNA induït per drogues. Per aquest mateix motiu els tractaments anti-tumorals dirigits en general a cèl·lules proliferants permetrien la selecció d'aquest tipus de cèl·lules, afavorint la recidiva. Bao i col·laboradors ho provenen en un model de glioma, on cèl·lules CD133⁺ són més resistents a la radioteràpia per activació de resistència al dany en el DNA (Bao et al., 2006). Aquesta habilitat per evadir la mort i autorenovar-se en llocs distants podria explicar la latència de micrometàstasis i la recurrència tumoral (Chiang and Massague, 2008).

Finalment, el nou òrgan té un paper clau en el procés ja que les CSC depenen del microentorn o nínxol metastàtic on resideixen. S'ha descrit que el tumor primari secreta factors que indueixen la formació d'un **nínxol premetastàtic** en el nou òrgan abans de l'arribada de les cèl·lules metastàtiques (Talmadge and Fidler, 2010). La formació d'un nínxol és imprescindible per a l'èxit de la metàstasi (Kaplan et al., 2005) i pot contribuir a la latència (i al fracàs) d'una cèl·lula tumoral disseminada (Li et al., 2007).

Per tal d'integrar totes aquestes teories, s'ha proposat un model segons el qual les mutacions oncogèniques en les cèl·lules mare de la mama podrien provocar la transformació a CSC, generant tumors de mal pronòstic. En canvi, si les mutacions es donen en cèl·lules diferenciades progenitores, es podria originar un carcinoma de mama no metastàtic amb bon pronòstic. En els tumors metastàtics de mal pronòstic, sota la influència dels fibroblasts de l'estroma, només podria metastatitzar la població CSCs. Poden haver-hi variants de CSC que difereixin en la selectivitat de teixit per a dur a terme la metàstasi, amb un perfil d'expressió addicional específic de teixit. En el lloc d'establiment de la metàstasi, les CSCs disseminades induïrien en l'estroma una resposta similar que el tumor primari (Weigelt et al., 2005).

1.4. ÒRGAN-ESPECIFICITAT DE LA METÀSTASI

Com hem apuntat prèviament, cada tipus de tumor només prolifera i genera metàstasis en determinats òrgans. Aquest procés es coneix com tropisme o òrgan-especificitat. Els patrons de distribució sanguínia ofereixen només una explicació parcial a l'òrgan-especificitat observada en pacients (Sethi and Kang, 2011). Per tant, aquest fenomen és conseqüència de les característiques moleculars de la cèl·lula tumoral però també de les característiques intrínseques del nou microentorn (Lorusso and Rugg, 2012).

A nivell molecular, la identificació d'oncogens i gens supressors així com l'anàlisi de mutacions durant el desenvolupament tumoral, ha originat un model on mutacions adquirides seqüencialment medien la transició entre els progressius estadis tumorals. (Crespi and Summers, 2005).

Així doncs, els **gens tumorigènics** inicien el procés tumoral, permetent que les cèl·lules adquireixin inestabilitat genòmica, evitin la mort i el sistema immune, i tinguin autonomia proliferativa. Els **gens iniciadors de la metàstasi** afavoreixen la invasió i infiltració de cèl·lules del tumor primari cap a la circulació. Els de **progressió**, es desregulen en sortir del tumor primari i permeten la supervivència en circulació o la infiltració a teixits distants. També poden aparèixer en el tumor primari però només desenvolupar la seva funció en el lloc metastàtic (Nguyen et al., 2009). Finalment, els gens de **virulència** (Valastyan and Weinberg, 2011) proporcionen una avantatge selectiva en el lloc secundari però no en el tumor primari. La seva expressió està relacionada amb la progressió òrgano-específica i l'adaptació al nou microentorn. No són útils com a marcadors de pronòstic però poden ser bones dianes terapèutiques (Chiang and Massague, 2008; Nguyen et al., 2009).

Totes aquestes observacions es poden unir en un model integratiu on la proclivitat per disseminar s'adquireix quan el tumor en formació es torna localment agressiu, mentre que el creixement de cèl·lules colonitzants en l'òrgan secundari necessita d'una posterior selecció de la heterogeneïtat genètica (Nguyen and Massague, 2007).

1.5. LATÈNCIA METASTÀTICA

El pas més restrictiu en la cascada metastàtica es dona després de l'extravasació, durant la colonització i creixement metastàtic. Una prova d'això és un estudi amb 4703 pacients de càncer de mama, on el 30% presentaven micrometàstasis en la medul·la òssia. D'aquestes, només el 50% van desenvolupar metàstasis 10 anys després de l'extirpació del tumor (Braun et al., 2005).

En alguns tipus de tumors com el de mama, algunes metàstasis només es detecten al cap de molt temps d'extirpació o tractament del tumor primari, la qual cosa indica que les cèl·lules disseminades resten viables i latents per llargs períodes de temps (Fehm et al., 2008). Aquest fenomen es coneix com latència tumoral o **latència metastàtica** (Goss and Chambers, 2010) i els mecanismes que la regeixen són pràcticament desconeguts.

En el moment de la seva arribada a l'òrgan, si aquestes cèl·lules no són capaces d'interpretar els senyals del microentorn i/o remodelar-lo per formar un nínxol adequat, poden entrar en G_0-G_1 i aturar el seu creixement (Irmisch and Huelsken, 2013). Aquest fet implica que les cèl·lules tumorals disseminades tenen nivells proliferatius i metabòlics molts baixos (Goss and Chambers, 2010). Per aquest motiu moltes teràpies adreçades a cèl·lules altament proliferatives, fracassen. La reactivació del creixement metastàtic s'aconseguiria per adquisició de noves mutacions i per efecte del microentorn (Lorusso and Ruegg, 2012).

Un altre possible mecanisme és la **latència angiogènica**. Es dona en micrometàstasis metabòlicament actives però que per problemes de vascularització es mantenen en un estat permanent de proliferació-apoptosi degut a la limitació de nutrients i oxigen. Un canvi en la senyalització pro-supervivència induït per alteracions en l'estroma podrien canviar el balanç i permetre el creixement metastàtic (Irmisch and Huelsken, 2013).

Finalment, el sistema immunològic també impedeix l'expansió de colònies micrometastàtiques proliferants. En models animals, aquest efecte és mediat per la llisi induïda per cèl·lules T $CD8^+$ citotòxiques. Per tal d'evitar la latència induïda pel sistema immunològic, les cèl·lules tumorals recorren a estratègies com la infra-expressió d'antígens tumorals (Aguirre-Ghiso, 2007).

La identificació dels senyals que afecten la renovació de les cèl·lules circulants i les propietats que requereixen per mantenir la viabilitat durant la latència, donarien claus per a la intervenció terapèutica contra aquestes cèl·lules residuals (Nguyen et al., 2009).

2. EL TROPISME DE LA METÀSTASI DE CÀNCER DE MAMA

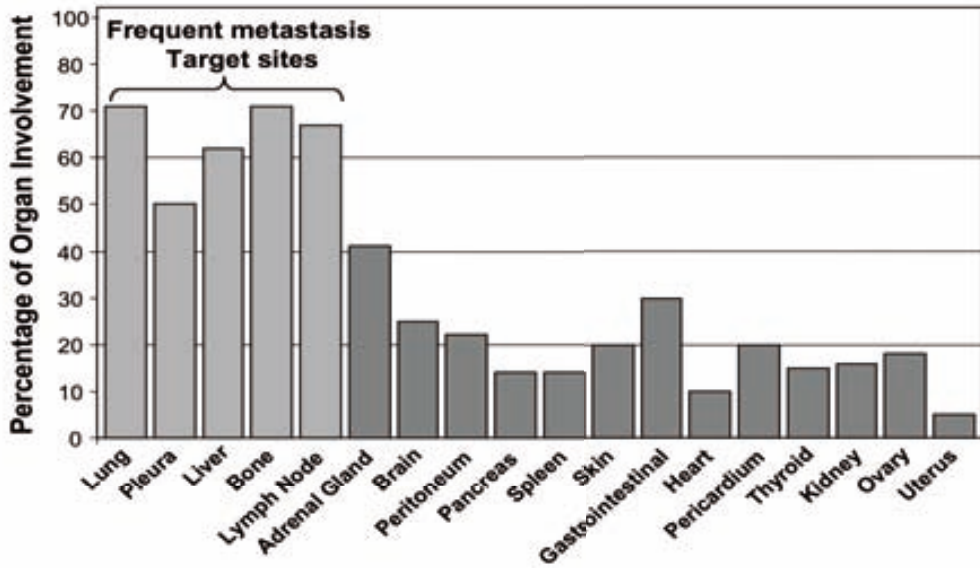
Com ja hem introduït anteriorment, el patró de distribució de la metàstasi de càncer de mama no es pot explicar només per les característiques d'irrigació del teixit. La pauta d'invasió dels tumors de mama (Figura 5) és diferent del d'altres tipus de càncers com el colorrectal, el de pròstata o el de ronyó (Lu and Kang, 2007). El càncer de mama metastatitza preferentment a os i pulmó, present en més del 70% de pacients amb càncer de mama, seguit de fetge i node limfàtic. La incidència en cervell ha augmentat molt en els darrers anys del 10 al 20% degut al tractament amb Herceptin (Trastuzumab), un fàrmac que no pot creuar la barrera hematoencefàlica o BHE (Olson et al., 2013).

A diferència del càncer de mama, les metàstasis de càncer de pròstata es donen casi exclusivament en os (85%), mentre que les de colorrectal es donen en fetge (80%) (Lu and Kang, 2007).

A nivell molecular, l'anàlisi de parelles de tumors primaris de mama i metàstasis revelen que l'expressió de certs gens ja en el tumor primari poden servir com a diagnòstic del lloc de metàstasi. Els tumors *basal-like* i *claudin-low* tenen gran predilecció pel cervell i pulmó, mentre que els HER2+ colonitzen el fetge (Harrell et al., 2012).

Diverses citocines són responsables de la distribució sistèmica de les cèl·lules tumorals als òrgans diana. En càncer de mama, els teixits expressen alts nivells de CXCR4 mentre que el seu lligand, CXCL12, s'expressa preferencialment en nodes limfàtics, pulmó, fetge i medul·la però gairebé no s'expressa en intestí, ronyó, cervell, pell i múscul esquelètic (Scully et al., 2012). Els òrgans que alliberen més CXCL12 s'associen als llocs més freqüents de metàstasi de càncer de mama, ja que la interacció dirigeix la migració de les cèl·lules tumorals (Orimo et al., 2005).

2



2

En France, les principales causes de décès sont les maladies cardiovasculaires, les cancers et les maladies respiratoires. Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de décès, suivies des cancers. Les maladies respiratoires sont la troisième cause de décès. Les maladies cardiovasculaires sont causées par une alimentation riche en graisses saturées et en sucres, un manque d'exercice physique, le tabac et l'alcool. Les cancers sont causés par des facteurs génétiques, des facteurs environnementaux et des facteurs liés au mode de vie. Les maladies respiratoires sont causées par des infections, des allergies et des facteurs environnementaux.

Le cancer est une maladie complexe qui peut affecter n'importe quelle partie du corps. Il est causé par des mutations génétiques qui entraînent une croissance incontrôlée des cellules. Les facteurs de risque du cancer comprennent le tabac, l'alcool, une alimentation malsaine, un manque d'exercice physique, des infections chroniques et des facteurs environnementaux. Les symptômes du cancer peuvent varier considérablement en fonction du type de cancer et de sa localisation. Les diagnostics du cancer sont effectués à l'aide de tests sanguins, de biopsies et d'imagerie médicale. Les traitements du cancer comprennent la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie et les thérapies ciblées. Les pronostics du cancer dépendent de nombreux facteurs, y compris le stade du cancer au moment du diagnostic, le type de cancer et la santé globale du patient.

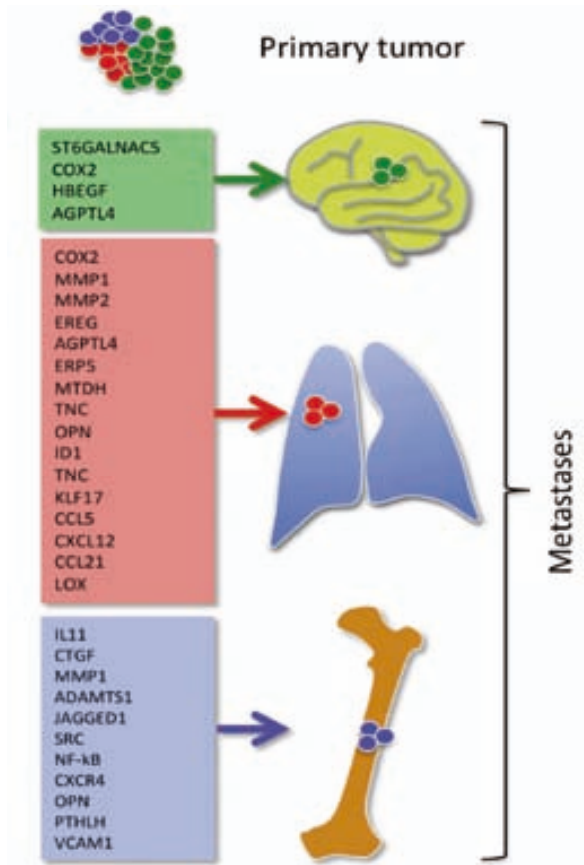
Le cancer est une maladie complexe qui peut affecter n'importe quelle partie du corps. Il est causé par des mutations génétiques qui entraînent une croissance incontrôlée des cellules. Les facteurs de risque du cancer comprennent le tabac, l'alcool, une alimentation malsaine, un manque d'exercice physique, des infections chroniques et des facteurs environnementaux. Les symptômes du cancer peuvent varier considérablement en fonction du type de cancer et de sa localisation. Les diagnostics du cancer sont effectués à l'aide de tests sanguins, de biopsies et d'imagerie médicale. Les traitements du cancer comprennent la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie et les thérapies ciblées. Les pronostics du cancer dépendent de nombreux facteurs, y compris le stade du cancer au moment du diagnostic, le type de cancer et la santé globale du patient.

?

BRSpclepracc/... -àcRt cRt csR... Rclà cNempR... -XSL Rt cL st :... XL t à-BRSls
Ràcslc VS-RàmpR... L Bpet ... -XSL Rt cL st ... IB SR... B...-B&S: +6+γ

...RXIt -àn Rà... L&Xpés àBR...)Rà, RX-UX-dc... t cRt dc... -s... -cRt Alt d
It Nè-à.../ , sRà-g...-XI ... àlt c)àR... M, ucRà-.../ , sRà-g...XRscà...SRT à...
XVèp... Rclà cNempR...XR... In l ...Ls-s-Rt ... t -c' IX-g.../Rn Rt cRt ...
B-It l' ...mpRà...c-c:...RE.../ , Rs-n Rt cleà...vL ø, Ic à, Rs... là àlS p...XL d...
BRÀs-c... Ru.../ , sRà-g...-XI ... àLX-I ... Rcnàlà -...sI t)Rà, RX4Xl ... LBR... -n l ...
mpRà...vle-BI ... LàcRs-Lsn Rt cRt ... I X-Rt ...XR... In ...Sps.../4...6:...6:
...; ... 6:... ; ...à àLX-Rt ... Rcnàlà -... pen Lt Is '...w... 6:...6:)
... Rcnàlà -...-l '...-t len Rt c...>...w... ; ...à àLX-Rt ... Rclà -à
XRREsle'...mpRà...RE...RàBRÀs-pslt ...Rde...XL t c-t pIX-g...LàRclè': ...++Y...It SRclè':
; ++%... -t t Rclè': ...++W

?



?

?

?

...E, U... r Fg... Er... reur F... U, F... q...v...U...er ...
vnFvr, ...er... U...M... t -BRT c-UXI ...SRT àBR...XR...
n l n l ...R... sL n LpRt ... Rcnàd -à-...sI t)Rà, RX4Xl ... à:
, pen g...XRsv... Xé pRt ... L é/Xp... sL)-t ... n l cus-Rà...
X-cL X-t Rà(sRXR, cL sà... 6: ... (...w...Rt í-n àBR...
BRSsl BI X-g...R... In l cs-p.../csi XR... s...)6: ...:
... γ... Xcl sà...sI t àXs-, X-g... 6: ...6çγ: ... sL cR... RàBR...
àRt él ecí l X-g...-t csl XR... s...)a...γ: ... sL cR... RàBR...
XL n pt -XI X-g...XR... s... 6: ... 6: ...γ... Spt à...SRT à...
, sL n LpRt ...R... 7...>... 6: ...w... 6: ...w...
mpR... l ...Rà, sL n LpRt ... XL t -c' l X-g... 6: ...: ...w...
.../csR...L spààL ...Rclè' e... +6; γ

?

?

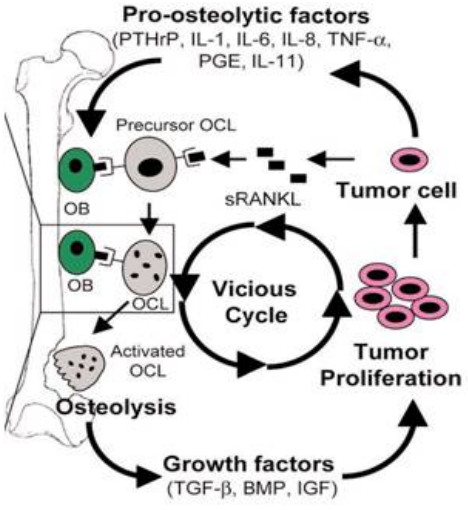
?

2

Vz-z

RSLT à R... RxC... Ss... NUX... Rn... Rnà... u... R... L... X... à... U... s... R... c... R... à... Ec... p... à... R... L... E... N... à... X... I... 9... m... R... R... à... X... s... IX... c... R... s... í... I... R... s... d... d... s... L... e... U... R... s... IX... -g... B... R... à... R... L... E... d... à... c... à... U... L... s... n... IX... -g... B... L... à... y... L... à... R... L... X... e... N... à... X... I... 9... L... t... R... e... à... m... R... s... L... e... U... R... s... R... t... d... g... t... R... e... à... L... à... R... L... X... d... à... c... à... s... L... v... L... X... i... t... d... L... à... R... u... e... à... L... B... R... S... s... I... B... IX... -g... u... à... l... y... à... h... -/d'... t... R... e... X... N... t... X... R... s... B... R... h... In... I... :... h... R... n... à... l... à... m... R... s... R... B... L... n... -t... I... T... à... h... L... à... R... L... X... e... N... à... X... I... 9... I... t... S... R... d... l... e... :... ++%/...

t... R... n... R... n... à... L... à... R... L... X... e... N... à... X... I... 9... à... R... à... d... E... r... /R... t... t... c... R... s... IX... X... -L... t... à... 3... R... X... 4... s... L... m... p... R... à... R... t... c... s... R... à... R... à... X... v... e... p... e... R... à... c... p... n... L... s... l... e... :... R... à... X... v... e... p... e... R... à... u... à... -R... à... L... à... R... L... E... d... à... c... à... R... L... X... d... à... c... à... y... à... h... I... c... s... -p... u... à... -I... 4... P... -S... p... s... i... l... e... ç... y... à... R... à... X... v... e... p... e... R... à... c... p... n... L... s... l... e... à... R... X... s... R... c... R... t... U... X... d... l... s... à... l... e... p... e... R... à... m... p... R... s... L... n... L... p... R... t... d... d... B... -U... R... s... R... t... X... -IX... -g... :... s... L... e... U... R... s... IX... -g... -I... X... c... -v... IX... -g... L... à... R... L... X... e... N... à... X... I... :... U... i... v... L... s... -t... d... R... e... s... L... X... T... à... B... L... à... R... u... e... à... '... m... p... R... à... d... B... R... S... s... I... B... IX... -g... B... R... e... à... L... à... e... e... E... R... s... l... U... X... d... l... s... à... B... R... X... s... R... /R... n... R... t... d... 9... G... :... G... :... :... :... :... y... à... m... p... R... U... i... v... L... s... R... /R... t... d... d... à... p... R... s... v... -v... t... X... -I... B... R... e... R... à... X... v... e... p... e... R... à... c... p... n... L... s... l... e... à... e... M... s... i... :... R... à... X... v... e... p... e... R... à... c... p... n... L... s... l... e... à... e... e... E... R... s... R... t... h... T... à... U... X... d... l... s... à... s... L...)... L... à... R... L... e... t... X... à... :... m... p... R... à... R... s... p... R... /R... t... s... L... n... L... v... R... t... d... d... L... à... R... u... e... à... -R... à... R... s... l... e... p... t... X... R... s... X... e... R... v... -X... g... à... -s... a... t... B... R... -R... E... R... s... n... I... t... :... ++ç... y...



3

du E, U... X... r... v... R... u... p... g... F... U... r... L... n... g... U... g... D... g... U... e... g... L... e... à... u... v... U... à... V... e... p... e... R... à... B... R... e... c... R... /-c... R... -c... R... e... l... e... n... l... n... l... s... -I... X... p... n... p... e... R... t... n... p... d... X... -L... t... à... 2... -2... R... à... X... L... t... v... R... s... c... R... /R... t... R... t... U... X... v... e... p... e... R... à... X... i... t... X... R... s... L... à... R... à... m... p... R... s... s... -E... R... t... U... X... d... l... s... à... l... à... m... p... R... à... R... à... X... v... e... p... e... R... à... e... e... E... R... s... R... t... U... X... d... l... s... à... s... L...)... L... à... R... L... e... t... X... à... :... s... :... :... :... :... x... :... :... :... :... :... y... à... m... p... R... s... L... n... L... p... R... t... d... d... X... c... -v... i... X... -g... B... R... e... à... R... e... à... L... à... R... u... e... à... '... X... c... -v... i... X... -g... B... R... e... à... R... e... à... R... e... à... L... d... B... L... t... I... s... t... R... s... t... c... R... s... l... X... X... -g... n... E... R... t... :... :... :... :... R... t... d... d... à... p... R... s... U... X... -R... B... R... e... à... R... e... à... L... R... s... d... B... s... p... d... e... R... s... t... l... c... -v... i... m... p... R... s... L... L... s... X... -L... t... I... h... U... X... v... e... p... e... R... à... c... p... n... L... s... l... e... à... e... à... R... X... s... R... c... s... 2... :... :... :... :... :... l... e... p... e... R... à... L... à... R... u... e... à... I... e... e... R... s... l... U... X... d... l... s... à... B... R... X... s... R... /R... n... R... t... d... B... R... e... à... h... I... c... s... -p... u... à... -I... m... p... R... I... U... v... L... s... R... /R... t... d... d... s... L... e... U... R... s... IX... -g... c... p... n... L... s... l... e... à... e... e... R... s... l... U... X... d... l... s... à... I... s... l... c... v... e... s... L... -B... M... L... s... n... L... t... R... e... R... e... c... R... B... R... R... c... -B... R... :... :... :... :... :... c... p... n... L... s... l... e... à... R... X... L... à... à... U... X... d... l... s... :... :... :... :... :... :... s... R... X... R... c... L... s... l... e... X... c... -v... i... d... l... s... L... U... i... t... p... X... e... R... i... s... U... X... d... l... s...)... à... 2... :... :... :... :... :... L... à... R... L... X... d... à... c... à... R... e... à... L... à... R... u... e... à... -s... a... t... B... R... d... e... ++ç... y...

4

R... S... p... d... R... à... R... v... R... à... X... s... IX... c... R... s... -c... m... p... R... à... :... h... à... R... à... B... R... v... T... p... t... h... -X... s... L... R... t... d... l... s... t... B... R... i... e... R... s... :... :... :... :... -S... s... IX... -g... -X... L... e... t... -c... í... IX... -g... B... R... e... à... R... e... à... X... i... t... X... R... s... L... à... R... à... :... :... :... :... p... t... c... R... /-c... h... L... e... v... i... à... X... p... e... s... -c... í... I... c... :... I... n... E... R... R... c... -c... à... v... i... à... L... à... B... R... t... B... L... c... R... e... à... X... L... t... c... -t... p... h... R... n... E... s... l... t... I... 2... E... i... à... I... e... t... X... L... n... ,... e... R... d... :... :... :... :... t... p... à... L... -B... R... à... y... à... m... p... R... à... R... t... B... L... c... R... e... U... R... t... R... à... c... l... c... I... U... i... v... L... s... R... /... h... -t... c... R... s... IX... X... -g... R... t... c... s... R... e... à... R... t... B... L... c... R... e... à... X... v... e... p... e... R... à... c... p... n... L... s... l... e... à... I... X... M... -à... c... l... p... R... d... e... :... :... +6;... y... à... R... e... à... -t... p... à... L... -B... R... à... U... i... v... L... s... R... /R... t... R... e... à... U... X... e... h... L... v... -n... R... t... d... B... R... e... à... R... e... à... X... v... e... p... e... R... à... c... p... n... L... s... l... e... à... :... :... p... à... l... s... B... R... d... e... :... :... ++Q... -s... a... I... t... B... R... -R... E... R... s... n... I... t... :... :... ++ç... y... à... h... T... à... :... :... :... R... n... L... B... R... e... X... -g... u... à... -I... e... e... E... R... s... l... U... X... d... l... s... à... B... R... X... s... R... /R... n... R... t... d... X... -L... X... -t... R... à...

INTRODUCCIÓ

de la matriu (com IGF oTGF- β) i moltes cèl·lules del sistema immunitari poden infiltrar-se afavorint el creixement de les cèl·lules tumorals (Gupta and Massague, 2006).

Per una altra banda l'os és un òrgan hipòxic, amb nivells baixos d'oxigen ($pO_2 = 1-7\%$), fet que també afavoreix el creixement metastàtic (Bos et al., 2001). La hipòxia permet la translocació de HIF-1 α al nucli, des d'on promou la transcripció de VEGF, IGF-2, CXCR4 i altres gens implicats en la colonització metastàtica de l'os. Finalment, HIF-1 α col·labora en la formació de cèl·lules similars a osteoclasts però inhibeix la diferenciació osteoblàstica, deixant clar el seu paper en la metàstasi osteoclàstica i la possible importància terapèutica dels inhibidors de HIF-1 (Dunn et al., 2009).

L'adaptació de la cèl·lula tumoral a aquest microentorn és fonamental per al seu creixement i per això diversos estudis han intentat identificar quins gens són importants per al creixement diferencial a l'os. Massagué i col·laboradors van descriure una estratègia transcripcional partint de la línia parental MDA-MB-231 de càncer de mama i una població metastàtica a os, obtinguda després de passes *in vivo-in vitro* de 231 (Kang et al., 2003). Aquest anàlisi va identificar un patró d'expressió de gens relacionats amb el tropisme a os, com CXCR-4 (que media el *homing*), MMP-1 (proteòlisi), el factor de creixement del teixit connectiu o CTGF (angiogènesi), IL-11 i osteopontina (osteoclastogènesi).

2.2. ÒRGAN-ESPECIFICITAT DE LA METÀSTASI CEREBRAL

És el tipus de metàstasi menys freqüent (20% de pacients amb càncer de mama) però és la que té pitjor pronòstic, amb una supervivència de 1-2 mesos sense tractament o 4-6 mesos amb tractament (Weil et al., 2005). És una metàstasi tardana, fet que posa en dubte si s'origina del tumor primari o com a metàstasi d'altres metàstasis (Fidler, 2011). En els darrers anys, la millora en les teràpies anti-tumorals ha augmentat l'esperança de vida de les pacients i ha donat més temps a aquest tipus de metàstasis per desenvolupar-se. Això sumat a la incapacitat de moltes drogues de creuar la BHE, com el trastuzumab, ha permès que les metàstasis cerebrals creixin en l'òrgan "santuari", augmentant-ne la incidència (Palmieri et al., 2007; Weil et al., 2005).

INTRODUCCIÓ

Les cèl·lules metastàtiques poden créixer al parènquima cerebral o en les leptomeninges, com la forma més agressiva (Gupta and Massague, 2006). L'accés al sistema nerviós central es dona a través de la BHE, una estructura molt compacta formada per cèl·lules endotelials amb *tight-junctions*, pericits (que s'estenen al llarg dels capil·lars i que envolten parcialment l'endoteli), la làmina basal i els astròcits (Abbott et al., 2010). La presència de la BHE i la manca de sistema limfàtic són responsables de crear el que es coneix com a privilegi immune (Felgenhauer, 1986) i de protegir el cervell de l'entrada de drogues i microorganismes (Shapiro and Shapiro, 1986). Aquesta barrera és tan restrictiva que fins i tot les proteïnes del sèrum en són excloses. Per tant, les cèl·lules metastàtiques han d'expressar gens que li permetin desestructurar-la localment, com les metal·loproteases (Bos et al., 2009).

Degut a la dificultat d'obtenir models experimentals, se sap relativament poc d'aquest tipus de metàstasi. Els models murins amb els que es treballa són per injecció intracarotídia de cèl·lules tumorals, ja que s'afavoreix la incidència de lesions cerebrals en front de les viscerals (Fujimaki et al., 1993; Schackert and Fidler, 1988). Amb aquests models s'intenten respondre qüestions com la de la resistència a quimioteràpia. Fins ara es relacionava amb la presència de la BHE, que impedia el pas de les drogues, però s'ha observat que en lesions més grans de 0.2 mm² la BHE no està intacta, i per tant, que la resistència a fàrmacs ha de ser deguda a altres factors (Fidler et al., 2002). Un dels mecanismes descrits és el paper anti-apoptòtic dels astròcits activats sobre la cèl·lula tumoral (Lin et al., 2010).

En cèl·lules tumorals de mama que metastatitzen a cervell, es va identificar una llista de 17 gens que correlacionava clínicament amb el tipus basal ER-. D'entre aquests es va identificar ST6GALNAC5 com a exclusiu de la metàstasi cerebral, un gen que facilita l'adhesió i el pas de la BHE (Bos et al., 2009). Una tercera part dels gens de metàstasi cerebral solapaven amb gens descrits per a la metàstasi pulmonar, i tot i que no es coneixen exactament els mecanismes de la metàstasi cerebral, es pot afirmar que aquests són diferents als de la metàstasi òssia. La semblança entre pulmó i cervell pot recaure en la similitud en la vasculatura d'aquests dos òrgans, que suposa una barrera important, en contraposició a la vasculatura fenestrada d'os i fetge. Això es demostra en analitzar els gens

comuns entre les llistes de pulmó i cervell. COX2, ANGPTL4, LTBP1 o lligands d'EGFR estan involucrats en el control de l'adhesió i la permeabilitat vascular (Lorusso and Ruegg, 2012).

Finalment, un altre element important en aquest tipus de metàstasi és el fenomen de "dormancy" o latència. S'ha descrit una relació aproximada de 3:1 de cèl·lules latents vs. cèl·lules colonitzants, indicant la importància que podria tenir l'atac terapèutic d'aquest fenotip (Palmieri et al., 2007).

2.3. ÒRGAN-ESPECIFICITAT DE LA METÀSTASI A PULMÓ

El pulmó és el segon òrgan més afectat en el desenvolupament de la metàstasi, degut a que la seva xarxa capil·lar rep tota la sang circulant des del cor. Les lesions s'inicien en arterioles pulmonars, des d'on les cèl·lules han de trencar les estretes unions endotelials dels vasos sanguinis i la membrana basal. Un cop en el parènquima, les cèl·lules han de sobreviure en un entorn que conté una matriu extracel·lular molt organitzada i tipus cel·lulars especialitzats que permeten la respiració (Gupta and Massague, 2006).

El pulmó, al contrari que l'os, està exposat a nivells d'oxigen superiors al d'altres teixits. Aquest fet provoca que les cèl·lules pulmonars estiguin sotmeses a un alt estrès oxidatiu, induint la secreció de citocines pro-inflamatòries (Chang et al., 2001). La presència d'espècies reactives d'oxigen (ROS) pot induir dany proteic o en el DNA, i per això l'epiteli respiratori està recobert per una fina capa de fluid que conté antioxidants i surfactants (Azad et al., 2008). A nivell metabòlic, la presència d'espècies oxidants pot atacar el bon funcionament de la cadena respiratòria provocant l'acumulació de més ROS, disminuint l'efectivitat del cicle de Krebs i la producció d'ATP i provocant dany mitocondrial (Rego and Oliveira, 2003).

Les rutes de TGF β i NF- κ B s'han relacionat amb la metàstasi de pulmó del càncer de mama (Luo et al., 2004; Siegel et al., 2003). Altres anàlisis han identificat en un grup de tumors de mama gens que correlacionen amb recaiguda en metàstasi pulmonar. Aquests són factors secretats (epiregulina, CXCL1, i SPARC), receptors de membrana (VCAM1 i IL13R α 2), proteases extracel·lulars (MMP1 i MMP2), i efectors intracel·lulars (ID1 i COX2).

Cal destacar que no existeix solapament entre aquests gens i els gens descrits per la metàstasi òssia de la mateixa línia parental seleccionada *in vivo* (Minn et al., 2005), reforçant la idea que diferents funcions són necessàries per colonitzar cada microentorn.

2.4. ÒRGAN-ESPECIFICITAT DE LA METÀSTASI A FETGE

El fetge és un teixit molt vascularitzat, amb aports dels sistemes circulatoris portal i sistèmic. El càncer de mama metastatitza a fetge per la circulació sistèmica. Els vasos que irriguen el fetge són molt porosos als nutrients i cèl·lules circulants, per tant l'extravasació no és una barrera important en la metàstasi hepàtica (Chambers et al., 2002). Els passos limitants són la invasió del parènquima hepàtic i l'evasió de la mort per cèl·lules residents del sistema immune.

L'activació d'Akt (Bao et al., 2004) i la neutralització de l'expressió del lligand pro-apoptòtic TRAIL en cèl·lules *Natural Killer* (NK) són mecanismes que faciliten la metàstasi hepàtica en models murins (Takeda et al., 2001).

3. “HALLMARKS” DEL PROCÉS METASTÀTIC

L'èxit del càncer de mama depèn de la generació d'heterogeneïtat genètica i epigenètica, així com de l'adaptació i supervivència als diversos obstacles del procés metastàtic (Valastyan and Weinberg, 2011)

Durant aquest procés, les cèl·lules tumorals han d'adquirir una sèrie de característiques resumides en els “10 *hallmarks* del càncer”, que inclouen el manteniment de la proliferació, l'evasió dels supressors del creixement, la resistència a mort cel·lular, la immortalitat replicativa, la inducció d'angiogènesi, l'activació de la invasió i la metàstasi, la inestabilitat genòmica, la inflamació, la reprogramació del metabolisme energètic i l'evasió de la resposta immune (Hanahan and Weinberg, 2011).

Aquestes funcions no només són importants per al creixement del tumor primari sinó també per a l'èxit del procés metastàtic en processos com la disseminació, el transport vascular o la proliferació en l'òrgan secundari. En aquesta secció analitzarem els *hallmarks* del càncer en el context del càncer de mama metastàtic.

3.1. MANTENIMENT DE LA PROLIFERACIÓ

Les cèl·lules tumorals poden induir la seva proliferació a través de diferents mecanismes. Un d'ells és la producció de factors de creixement de forma autocrina o l'activació de la producció paracrina en cèl·lules normals de l'estroma (Hanahan and Weinberg, 2011).

Una altra possible estratègia és mutar o augmentar la quantitat de receptors en membrana per tal d'amplificar i activar rutes de senyalització. Un dels casos més ben descrits en càncer de mama és la proliferació induïda per la ruta del ErbB2 o HER2, un receptor de la família del EGFR (Coussens et al., 1985). La seva activació requereix de la formació d'homo i heterodimers, i regula rutes oncogèniques com Ras/Raf/MAPK, PI3K/Akt/mTOR, PLC γ , PKC o JAK/STAT (Roy and Perez, 2009; Yarden and Sliwkowski, 2001) que afavoreixen la proliferació, migració i divisió tumoral.

L'augment en la capacitat proliferativa implica una desregulació de la divisió cel·lular i del control del creixement, que força a la cèl·lula a adaptar el seu metabolisme, com es tractarà al punt 3.10. Una ruta que media la proliferació reajustant el metabolisme de la cèl·lula és la del IGF1R, considerada durant la dècada passada una bona diana terapèutica en càncer de mama. IGF1R activa l'eix IGF1R/PI3K/AKT/mTOR, que és regulat en diversos punts tant per la disponibilitat de lligand IGF1, com pel feedback negatiu que exerceix mTOR (Wan et al., 2007) La ruta de IGF1R s'interrelaciona amb la de BRCA1 (Werner and Bruchim, 2012) així com amb la ruta de HER2, aportant resistència a trastuzumab (Berns et al., 2007).

3.2. EVASIÓ DELS SUPRESSORS DEL CREIXEMENT

A més d'induir la proliferació, les cèl·lules tumorals han de poder inhibir els circuits que regulen negativament el creixement; molts d'aquests programes depenen dels gens supressors de tumors, proteïnes amb l'habilitat de promoure la proliferació o l'apoptosi/senescència. Dos dels supressors tumorals més coneguts són TP53 i RB (Hanahan and Weinberg, 2011).

En el context de la metàstasi de càncer de mama, s'han descrit diversos supressors tumorals la inhibició dels quals correlaciona amb un pitjor pronòstic com KAI1 (Malik et al., 2009), mitogen-activated protein kinase kinase 4, breast cancer metastasis suppressor-1 (BRMS1), KiSS1, RHOGDI2 i CRSP3 (Steeg et al., 2003).

La infra-expressió de nm23 al tumor primari origina un fenotip més agressiu (Terasaki-Fukuzawa et al., 2002) i amb major risc de metàstasi (Leone et al., 1993). Experiments *in vitro* proven que la presència de nm23 pot reduir la motilitat i la invasió en cèl·lules de càncer de mama (MacDonald et al., 1996; Russell et al., 1998).

BRMS1 (Breast Metastasis Suppressor 1) ha provat ser un bon supressor metastàtic *in vivo* (Hedley et al., 2008) però no es coneix el mecanisme concret de la inhibició. BRMS1 no bloqueja completament cap dels passos de la cascada metastàtica, però inhibeix diversos *hallmarks* metastàtics fins a un 80-90% en models animals (Hurst and Welch, 2011; Stafford et al., 2008). Aquestes alteracions fenotípiques observades durant la invasió, migració i

anoikis són conseqüència de l'expressió de diversos gens sota l'acció de BRMS1 (Hurst and Welch, 2011).

Finalment, la presència de KISS1 s'ha relacionat amb la supressió de metàstasis en línies cel·lulars (Lee and Welch, 1997a) i *in vivo*, reduint el creixement metastàtic pulmonar fins a un 95% (Lee and Welch, 1997b). Estudis recents identifiquen el rol de KISS1 en la inhibició de la colonització, fet que s'associaria amb la infra-expressió observada en mostres de metàstasi cerebral en comparació amb tumors ductals (Ulasov et al., 2012). Tot i així aquestes dades indiquen que el tumor primari expressaria KISS1. Aquesta idea controvertida és recolzada en altres estudis que defensen una sobre-expressió de KISS1 en tumors primaris amb pitjor pronòstic (Martin et al., 2005). Darrerament s'ha descrit una relació entre KISS1R i l'estatus del ER, ja que la presència del ER regularia negativament la migració dependent de KISS1. Així, KISS1R mediarà la invasivitat en cèl·lules de càncer de mama ER- (Cvetkovic et al., 2013).

3.3. RESISTÈNCIA A LA MORT CEL·LULAR

La mort per apoptosi s'indueix en resposta a estressos produïts durant la tumorigènesi, com excessos en la senyalització oncogènica, dany al DNA per hiperproliferació, o com a resultat de la teràpia anti-tumoral. Però els tumors més malignes tenen la capacitat d'evadir aquest procés, adquirint també resistència al tractament (Hanahan and Weinberg, 2011).

L'apoptosi es divideix en dues branques, una que gestiona els senyals pro-mort extracel·lulars, i l'altra que integra els intracel·lulars. Cadascuna desemboca en l'activació d'una caspasa efectora (caspasa 8 o 9, respectivament) que inicia el procés de mort. La detonació de l'apoptosi és regulada per l'equilibri entre membres pro- i anti-apoptòtics de la família de Bcl-2 (Adams and Cory, 2007).

Els tumors poden evitar la mort sobreexpressant proteïnes antiapoptòtiques com Bcl-2, Bcl-xL o infra-expressant factors pro-apoptòtics com Bax, Bim o Puma (Hanahan and Weinberg, 2011). En concret, la sobreexpressió de Bcl-xL en un model cel·lular de càncer de

mama afavoria el procés metastàtic augmentant la resistència a l'apoptosi induïda per citocines, la supervivència en circulació i el creixement en suspensió (Fernandez et al., 2000).

En el procés metastàtic, la TEM origina un fenotip migratori i invasiu. Aquest és un dels passos claus que requereix de la resistència a l'anoikis, un tipus de mort induïda per la manca de contacte amb la MEC o les cèl·lules veïnes (Kim et al., 2012). La mateixa pèrdua de E-cadherina i l'expressió de N-cadherina, dos fenòmens imprescindibles per a l'adquisició del fenotip mesenquimal, indueixen aquesta resistència i promouen la metàstasi (Li et al., 2001). La inactivació somàtica d'E-cadherina i p53 en un model animal inicia tumors mamaris, la metàstasi i la resistència a anoikis (Derksen et al., 2006).

L'autofàgia és un altre mecanisme que pot ser activat en condicions d'estrès cel·lular, com la retirada de nutrients. Si bé s'ha considerat un mecanisme de mort que en alguns punts es creua amb l'apoptosi, la seva activació media la degradació de vesícules autofàgiques que poden proporcionar nutrients a la cèl·lula, afavorint la supervivència (Levine and Kroemer, 2008). Així, en diversos moments del procés metastàtic, pot tenir una funció pro-supervivència o pro-mort (White and DiPaola, 2009). En qualsevol cas, diversos estudis en models de càncer de mama mostren que la inducció de l'autofàgia representa un mecanisme de resistència a fàrmacs com bortezomib (un inhibidor del proteasoma) o trastuzumab (Milani et al., 2009; Vazquez-Martin et al., 2009).

3.4. IMMORTALITAT REPLICATIVA

Les cèl·lules tumorals requereixen d'un potencial replicatiu il·limitat per tal de generar tumors macroscòpics (Hanahan and Weinberg, 2011). En aquest fenomen hi contribueix la telomerasa, la polimerasa que afegeix segments de telòmers darrere el DNA telomèric dels extrems cromosòmics. La llargada d'aquestes regions defineix quantes generacions successives pot originar una cèl·lula abans que els telòmers s'erosionin i la cèl·lula entri en crisi (Blasco, 2005).

La cèl·lula tumoral ha de fer front a dos tipus de barreres durant la proliferació: la crisi o mort i la senescència, un estat no proliferatiu normalment irreversible però viable

(Hanahan and Weinberg, 2011). Experiments en ratolins deficients en telomerasa indiquen que l'escurçament dels telòmers pot dirigir les cèl·lules pre-malignes a un estat senescent que contribueixi, junt amb l'apoptosi, a atenuar la tumorigènesi (Artandi and DePinho, 2010).

Però cal destacar que la senescència també pot resultar un mecanisme protector (Hanahan and Weinberg, 2011). Aquest fenomen s'indueix per excessos en la senyalització oncogènica o bé, durant el procés metastàtic, quan les cèl·lules circulants aïllades arriben al nou òrgan. No es coneixen els mecanismes exactes que regeixen el procés però l'autofàgia podria contribuir-hi (Gewirtz, 2009). La senescència o "dormancy" s'ha observat en models de càncer de mama i en metàstasis associades, com la d'os i la de cervell (Fehm et al., 2008), tal i com hem descrit en l'apartat 1F. La importància clínica d'aquest fenomen radica en la seva contribució a la recurrència tumoral. Calen estudis que permetin la identificació dels mecanismes moleculars per tal de poder atacar-los farmacològicament (Allan et al., 2006).

3.5. INDUCCIÓ DE L'ANGIOGÈNESI

Per tal de mantenir la capacitat proliferativa, la cèl·lula tumoral requereix d'un aport constant de nutrients i oxigen i d'una eliminació de les substàncies metabòliques de rebuig i CO₂. La vasculatura que s'origina amb l'angiogènesi fa front a aquestes necessitats (Hanahan and Weinberg, 2011). Un dels principals mediadors d'aquest procés és el Vascular endothelial growth factor (VEGF), que actua a través de tres receptors tirosina quinasa, VEGFR1-3 (Carmeliet and Jain, 2000).

La vasculatura tumoral es caracteritza per un excés de ramificacions, nivells anormals de proliferació en les cèl·lules endotelials, i una alta porositat, que afavoreix el procés metastàtic (Baluk et al., 2005). L'angiogènesi és important tant en estadis inicials, afavorint la disseminació, com en estadis finals, sostenint el creixement metastàtic (Eroles et al., 2012). El paper de VEGF en l'angiogènesi i la seva limitada funció en la fisiologia adulta el converteixen en una diana terapèutica interessant. Existeixen diversos fàrmacs que ataquen aquest procés, com Sunitinib, sorafenib, pazopanib o cediranib i els seus efectes s'estan testant en clínica (Chan, 2009).

INTRODUCCIÓ

Una de les drogues més caracteritzades és el bevacizumab, un anticòs monoclonal humanitzat que reconeix VEGF. 3 estudis clínics l'han avaluat en càncers HER2- avançats: Phase III E2100 (Miller et al., 2007), AVADO (Miles et al., 2010) i RIBBON (Robert et al., 2011). Al 2010, la conferència ASCO va aportar dades sobre els 2664 pacients participants en aquests 3 assajos, mostrant una millora en la supervivència lliure de progressió independent de l'estatus dels receptors hormonals, el nombre de llocs metastàtics, l'ús anterior de taxans i l'interval lliure de malaltia (O'Shaughnessy et al., 2010). La combinació de bevacizumab i quimioteràpia respecte quimioteràpia sola, augmentava la supervivència lliure de progressió però no la supervivència general, a més d'activar la toxicitat (Rossari 2012). El mateix estudi en 621 pacients TN mostrava una caiguda del 35% en el risc de progressió però sense canvis en la supervivència total (O'Shaughnessy et al., 2011). L'atac de l'angiogènesi pot ser útil en el subgrup TN però calen marcadors que prediguin la resposta ja que no tots els pacients se'n poden beneficiar (Eroles et al., 2012).

La teràpia antiangiogènica s'ha provat com a alternativa en el tractament de la metastasi cerebral. És coneguda la resistència al trastuzumab, un fàrmac que no pot creuar la BHE (Kang, 2006). Fins i tot el desenvolupament de fàrmacs que sí poden creuar-la, com el lapatinib, han aportat poques millores. La combinació de teràpies anti-HER2 amb teràpies antiangiogèniques (inhibidors de VEGFR2) es presenten com una opció al tractament ja que han demostrat reduccions en el volum de la metastasi cerebral *in vivo* (Kodack et al., 2012).

3.6. INVASIÓ I METÀSTASI

Durant la progressió de les cèl·lules epitelials cap a cèl·lules malignes, un dels passos claus és la invasió local i l'establiment de metastasis llunyanes. Amb aquest propòsit, l'adquisició d'un fenotip mòbil és imprescindible i s'obté a través d'alteracions en la morfologia cel·lular i per desadherència de la MEC (Hanahan and Weinberg, 2011). La conseqüència més caracteritzada és la pèrdua d'E-cadherina (CDH1), una molècula clau en la adhesió cèl·lula-cèl·lula. Els mecanismes que medien aquesta pèrdua poden ser alteracions que provoquin una desaparició de l'E-cadherina en membrana o la síntesi d'una proteïna no funcional (Onder et al., 2008).

INTRODUCCIÓ

En càncer de mama, la repressió d'E-cadherina és regida per diversos factors de transcripció com Snail, Slug, TWIST1 i ZEB1/2 (Micalizzi et al., 2010), mentre que la relocalització de CDH1 fora de les unions adherents és mediada per SIX1, Goosecoid o FOXC2 (Drasin et al., 2011). La desregulació de vies cel·lulars com TGF- β (Taylor et al., 2010), EGF (Hardy et al., 2010), Wnt (Yook et al., 2006), Notch (Leong et al., 2007) i Hedgehog (Kasper et al., 2009) també poden induir la TEM modificant alguns dels factors de transcripció mencionats.

A més de la pèrdua de CDH1, altres gens participen en la pèrdua del fenotip epitelial del càncer de mama. Entre ells trobem la infra-expressió de plakoglobina (JUP), ocludina (OCLN), zonula occludens 1 (TJP1), α -catenina (CTNNA3) i claudines 3/4/7 (CLDN-3/4/7) (Zeisberg and Neilson, 2009).

La pèrdua d'unions adherents sol anar acompanyada de l'adquisició d'un fenotip mesenquimal, que requereix d'altres fenòmens com l'expressió d'enzims que degradin la MEC, un augment en la motilitat, i la resistència a apoptosi. En general, la infra-expressió d'E-cadherina es relaciona amb la sobre-expressió de N-cadherina, una proteïna que facilita els dos darrers processos (Li et al., 2001) però la presència de marcadors epitelials i mesenquimals es pot donar simultàniament (Drasin et al., 2011). En càncer de mama també s'han descrit augments en fibronectina (FN1), CDH2, VIM, ACTA2 i CTNNB1 nuclear (Zeisberg and Neilson, 2009).

Diversos estudis han relacionat el fenotip mesenquimal amb l'adquisició de trets de cèl·lules mare tumorals (CSC). Dos grups independents han demostrat que poblacions normals i transformades de HMECS CD44^{high}/CD24^{low} (marcadors de CSCs, (Jaggupilli and Elkord, 2012) presentaven un fenotip EMT (Mani et al., 2008; Morel et al., 2008). Aquesta hipòtesi es confirmava amb l'experiment contrari quan s'induia la TEM a través de TWIST1, SNAI1 o TGFB1. L'adquisició del fenotip mesenquimal augmentava el percentatge de cèl·lules CD44^{high}/CD24^{low} i la freqüència tumoral (Mani et al., 2008; Morel et al., 2008), demostrant un rol causa-efecte dels inductors de la TEM en la formació de CSCs.

Aquests estudis tenen conseqüències en l'establiment de la metastasi i el tractament, degut al rol de les CSCs en la iniciació metastàtica (Clarke and Fuller, 2006; Weigelt et al., 2005) i en la resistència a teràpia (Bao et al., 2006; Chiang and Massague, 2008). L'anàlisi de

INTRODUCCIÓ

tumors de pacients després de quimioteràpia revelava un enriquiment en la població CD44^{high}/CD24^{low} (Li et al., 2008). Creighton i col. van obtenir perfils d'expressió de càncers de mama pre- i post-teràpia endocrina/quimioteràpia. La comparació d'aquests amb perfils obtinguts en mammosferes mostrava una correlació del perfil post-teràpia amb el "mammosphere-CD44⁺/CD24^{-/low}". Igualment, aquest subgrup de pacients presentava un enriquiment en marcadors de la TEM (Creighton et al., 2009), mostrant la relació entre la resistència a teràpia, les CSCs i la TEM.

Ja hem analitzat la importància del microentorn tumoral en l'adquisició del fenotip mòbil (Apartat 1.C.1). L'estroma tumoral, format per cèl·lules inflamatòries, fibroblasts, cèl·lules mare mesenquimals, CAFs (Orimo et al., 2005) o cèl·lules inflamatòries secreten metalloproteases que remodelen el microentorn, activen l'angiogènesi i promouen la proliferació (Mueller and Fusenig, 2004; Lin et al., 2001; Schafer and Werner, 2008). En el context òrgan-específic, també hem descrit la importància d'adquirir funcions diferencials que permetin la infiltració i creuament de les diverses barreres típiques de cada teixit (Nguyen et al., 2009).

3.7. INESTABILITAT GENÒMICA I MUTACIONS

L'adquisició d'instabilitat genòmica depèn de la successió d'alteracions en el genoma/epigenoma de les cèl·lules de càncer de mama que afavoreixen la supervivència cel·lular en diverses fases del procés metastàtic. Les mutacions es poden accelerar si es malmeten els sistemes de vigilància que controlen la integritat genòmica forçant la cèl·lula a entrar en apoptosi o senescència (Jackson and Bartek, 2009). L'exemple més conegut és TP53, mutat en molts tumors i també en els de mama, on s'associa a major agressivitat, pitjor supervivència (Gasco et al., 2002) i resistència a teràpia (Knappskog and Lonning, 2012).

A part de l'amplificació en HER2, altres alteracions establertes en càncer de mama són les mutacions germinals de BRCA1 i BRCA2, que predisposa a aquest tipus de tumor i al d'ovari (Betts et al., 2013). Aquests gens són supressors tumorals involucrats en rutes de

reparació de dany en el DNA, remodelació de la cromatina i activació de diversos punts de control (Caestecker and Van de Walle, 2013) i la seva mutació anula aquestes funcions.

Altres mutacions afecten a gens com PIK3CA, AKT, PTEN o MYC (Lehmann BD 2011), algunes amb conseqüències en el context metabòlic que analitzarem en el punt 3.10.

La presència d'aquestes mutacions afavoreix l'iniciació i proliferació del tumor primari però altres alteracions poden aparèixer com a conseqüència de la pressió exercida pel microentorn, permetent l'adaptació òrgan-específica descrita en els articles de Massagué i en el capítol 2 d'aquesta introducció (Bos et al., 2009; Kang et al., 2003; Minn et al., 2005).

3.8. INFLAMACIÓ

Les cèl·lules del sistema immune innat i adaptatiu poden infiltrar els tumors, reflexant les condicions inflamatòries que es donen en teixits no neoplàstics (Dvorak, 1986). Històricament es creia que aquest procés formava part de la resposta anti-tumoral del sistema immune. Però estudis més recents defensen el paper pro-tumoral de les cèl·lules inflamatòries afavorint la progressió (Obeid et al., 2013; Qian and Pollard, 2012). És el cas de limfòcits B i T que poden induir el reclutament i activació de macròfags i neutròfils pro-tumorals (DeNardo et al., 2010).

La inflamació afavoreix l'angiogènesi, la proliferació, la invasió i la disseminació tumoral a través de l'alliberació de factors de creixement, factors pro-angiogènics, enzims que modifiquen la MEC i senyals que activen la TEM (Mantovani, 2010; Qian and Pollard, 2010). En tumors establerts, la inflamació en el microentorn pot alliberar ROS que acceleri la mutagènesi de les cèl·lules tumorals (Grivennikov et al., 2010).

En càncer de mama, la presència de cèl·lules mononuclears inflamatòries que expressen MMP-11 s'ha associat amb un pitjor pronòstic, ja que permeten la sobre-expressió de molècules pro-inflamatòries com IL-1, IL-5, IL-6, IL-17, IFN β i NF κ B (Eiro et al., 2012). La presència de mediadors inflamatoris (S100A9) i de cèl·lules mieloides CD11b⁺Gr1⁺ és necessària per la creació del nínxol pre-metastàtic en cervell (Liu et al., 2013). La inhibició

del fenomen amb celecoxib, un inhibidor de COX2, i anticossos anti-Gr1+ reduïa el nombre de metàstasis cerebrals.

En la metàstasi pulmonar de càncer de mama, Chen i col. han aportat claus per a desxifrar el mecanisme molecular pel qual els macròfags poden promoure la metàstasi adherint-se i aportant senyals pro-supervivència a les cèl·lules tumorals (Chen et al., 2011). Aquest procés es dona a través de la interacció d' α_4 -integrines expressades en la superfície dels macròfags associats a metàstasi i VCAM-1 en la superfície de les cèl·lules tumorals, un gen que ja apareixia sobre-expressat en els perfils d'expressió de metàstasi pulmonar definits prèviament al grup (Minn et al., 2005).

3.9. EVASIÓ DE LA RESPOSTA IMMUNE

Una de les qüestions no resoltes encara és el paper adjuvant o inhibidor del sistema immune en la progressió tumoral i metastàtica. La teoria de la vigilància immune defensa que les cèl·lules i teixits són constantment monitoritzats per un sistema immune responsable del reconeixement i eliminació de la majoria de cèl·lules tumorals incipients. Els tumors que es desenvolupen han de ser capaços d'evitar la detecció i l'eradicació per part del sistema immunològic (Hanahan and Weinberg, 2011).

Aquesta hipòtesi s'ha corroborat en animals immunodeprimits, on s'ha observat una major freqüència i/o creixement dels tumors induïts en comparació amb els controls immunocompetents. Especialment, la manca de funció de limfòcits T CD8+ citotòxics, limfòcits T CD4⁺ Th1 helpers o cèl·lules NK provoca un augment en la incidència tumoral, demostrant la importància de la immunitat innata i adaptativa en el control tumoral (Kim et al., 2007; Teng et al., 2008).

Diversos estudis analitzant la capacitat tumoral van demostrar que tumors de ratolins immunodeficients no prosperaven en ratolins immunocompetents, mentre que els tumors de ratolins immunocompetents sí creixien en animals immunodeprimits (Teng et al., 2008). Aquest fet s'explica per el procés de l'edició immunològica (*immunoediting*), que consisteix en l'eliminació de les variants tumorals altament immunogèniques per part del sistema

INTRODUCCIÓ

immunològic, permetent la proliferació de les variants que no originen resposta. En els animals immunodeprimits, aquestes variants immunogèniques no poden ser eliminades i al ser trasplantades en animals immunocompetents, són ràpidament detectades (Smyth et al., 2006).

Els mecanismes d'evasió de la resposta immune són diversos (Kim et al., 2007) i inclouen defectes en les rutes de transducció en les cèl·lules efectores. També la secreció de factors solubles des de la cèl·lula tumoral (VEGF, IL-10, TGF- β , prostaglandina, Fas/FasL) poden afavorir l'edició, creant una pressió selectiva en el microentorn tumoral/metastàtic que afavoreixi la progressió (Kim et al., 2006). El darrer mecanisme consisteix en la disminució dels antígens presentats per la cèl·lula tumoral .

El càncer de mama no es considera un tumor immunogènic comparat amb d'altres com el renal o el melanoma, que es tracten amb IL-2. Tot i així, la presència de limfòcits infiltrants en el tumor (CD8+) correlaciona amb un millor pronòstic i supervivència (Yoshimoto et al., 1993) així com amb una millor resposta a quimioteràpia (Denkert et al., 2010).

L'administració de taxans augmenta la infiltració limfocitària en el tumor (Demaria et al., 2001). El tractament amb trastuzumab activa la resposta NK contra les cèl·lules Her2+ (Barok et al., 2007). Aquestes dades plantegen l'ús de vacunes en el tractament del càncer de mama. Les vacunes poden suposar un benefici clínic limitant en pacients amb tumors grans o ja tractats previament, degut a estadis avançats d'immunosupressió. Tot i així, les vacunes poden alentir la progressió de la malaltia o augmentar la sensibilitat a quimioteràpia (Soliman, 2013).

El microentorn pot complicar el reconeixement ja que la presència de cèl·lules derivades de la medul·la òssia, els fibroblasts o la MEC poden unir-se a les cèl·lules tumorals (Savinov et al., 2003) i "competir" amb les cèl·lules dendrítiques per l'antigen (Kim et al., 2007). En aquest sentit, s'ha descrit augments de cèl·lules CD4⁺ i CD8⁺ en la medul·la de pacients amb metàstasi òssia de càncer de mama, que podrien explicar els fenòmens de *dormancy* observats en aquest òrgan (Feuerer et al., 2001). Aquesta idea suggereix que les cèl·lules metastàtiques a os haurien de desenvolupar estratègies per tal d'evitar el

reconeixement immune. L'estudi de la immunitat antitumoral és un hallmark emergent i requereix definir els mecanismes moleculars que la regeixen.

3.10. REPROGRAMACIÓ DEL METABOLISME ENERGÈTIC

En condicions aeròbiques fisiològiques, la cèl·lula converteix la glucosa en piruvat a través de la glicòlisi produint 2 ATPs. Aquest piruvat és transformat en Acetil-CoA per la piruvat deshidrogenasa (PDH) i entra en el cicle de Krebs, on es produeixen 34 molècules d'ATP. En condicions anaeròbiques, com en el múscul durant l'exercici, el piruvat és transformat en lactat (glicòlisi anaeròbica) però aquest procés és molt menys eficient en ATPs (Deberardinis et al., 2008) En condicions normals conviuen ambdós sistemes, amb una predominança de la ruta oxidativa mitocondrial.

Les observacions d'Otto Warburg en teixits de carcinoma humà i de rata van mostrar un elevat consum de glucosa i secreció de lactat en comparació amb el teixit normal (Warburg, 1956), fins i tot en presència de suficient oxigen per metabolitzar completament la glucosa a CO₂. Tot i que el pas de glucosa a lactat és menys eficient que la fosforilació oxidativa, l'elevat consum de glucosa en la cèl·lula tumoral permet una ràpida producció d'ATP (Cairns et al., 2011). Aquest fenomen s'anomena efecte Warburg i confereix un avantatge en supervivència i proliferació en el microentorn tumoral, superant la hipòxia per manca de vasos sanguinis d'estadis inicials (Hsu and Sabatini, 2008). La validesa de l'efecte Warburg es demostra en l'èxit de tècniques com la tomografia d'emissió de positrons o FDG-PET, possible gracies a la competència dels tumors amb el teixit circumdant per obtenir glucosa (Wallace, 2012).

Existeixen molts indicis que la desregulació del metabolisme cel·lular està vinculada a la resistència farmacològica en càncer. Tot i que la glicòlisi aeròbica és el procés metabòlic més caracteritzat, queden molts factors per definir com les condicions dels nutrients en el microentorn tumoral. Per altra banda, l'existència de tumors refractaris a FDG-PET suggereix que certs tumors no són principalment metabolitzadors de glucosa sinó que poden utilitzar altres fonts d'energia.

INTRODUCCIÓ

L'aprofundiment en l'estudi metabòlic tumoral ha revelat nous fenòmens derivats del Warburg. Publicacions recents descriuen l'efecte "Warburg invers" (Sotgia et al., 2012; Witkiewicz et al., 2012) segons el qual són els fibroblasts del microentorn tumoral qui consumeixen glucosa i alliberen lactat (Warburg) i cossos cetònics. La cèl·lula tumoral pròxima podria captar aquests metabòlits, convertir-los en Acetil-CoA i processar-los de forma oxidativa en el cicle de Krebs. Aquests resultats donen rellevància al metabolisme oxidatiu mitocondrial en el procés tumoral (Wallace, 2012).

Durant el procés tumoral s'acumulen una sèrie de mutacions, amplificacions i delecions en vies de senyalització que afavoreixen la transformació, iniciació, creixement i supervivència del tumor (Hanahan and Weinberg, 2011). Moltes d'aquestes rutes oncogèniques promouen canvis en el metabolisme cel·lular donant suport a tres necessitats bàsiques de les cel·lules proliferants: generació ràpida d'ATP per mantenir l'estatus energètic, augment en la biosíntesi de macromolècules i manteniment de l'estat redox (Cairns et al., 2011). Un exemple és P53, que afavoreix la fosforilació oxidativa i inhibeix la glicòlisi de manera directa (disminuint l'activador glicolític fructosa-2,6-bisfosfat a través de TIGAR) i de manera indirecta (augmentant els nivells de PTEN i per tant, inhibint PI3K). Així, la pèrdua de P53 en tumors de mama afavoreix el metabolisme glicolític (Hsu and Sabatini, 2008; Lacroix et al., 2006).

Es desconeix si són necessaris diferents passos d'adaptació metabòlica per passar de l'estadi de tumor primari al d'invasió i metàstasi (Hsu and Sabatini, 2008). L'enteniment d'aquests mecanismes suposaria una millora per al tractament personalitzat de les pacients amb càncer de mama avançat. A continuació s'analitzaran les implicacions metabòliques d'algunes alteracions oncogèniques clàssiques en càncer de mama.

3.10.1. PI3K/Akt/mTOR

Un dels oncogens mutats en una quarta part dels tumors de mama és PI3K (Baselga, 2011; Gonzalez-Angulo et al., 2011), que s'activa per mutacions en el supressor tumoral PTEN, en PI3K mateix o per senyalització aberrant dels receptor tirosina quinasa (Cairns et al., 2011). Aquests receptors poden ser membres de la família del HER o bé IGF1R.

INTRODUCCIÓ

La inducció d'Akt augmenta l'activitat de fosfofructoquinasa i la captació de glucosa a través de la sobre-expressió de transportadors (GLUT1) en la superfície cel·lular (Ward and Thompson, 2012a; Zoncu et al., 2011). Per tant, l'activació de la via induïx la glicòlisi.

Warburg defensava l'existència de defectes mitocondrials que provocarien l'augment en el flux glicolític (Warburg, 1956), però s'ha vist que moltes cèl·lules tumorals no presenten defectes en el metabolisme oxidatiu (Moreno-Sanchez et al., 2007; Sotgia et al., 2012). La importància de l'efecte Warburg recau precisament en la producció d'intermediaris (Figura 8) necessaris per a les rutes de síntesi com ATP, NADH i sobretot piruvat, imprescindible per la producció d'àcids grassos, nucleòtids i glúcids (DeBerardinis and Cheng, 2010; Deberardinis et al., 2008).

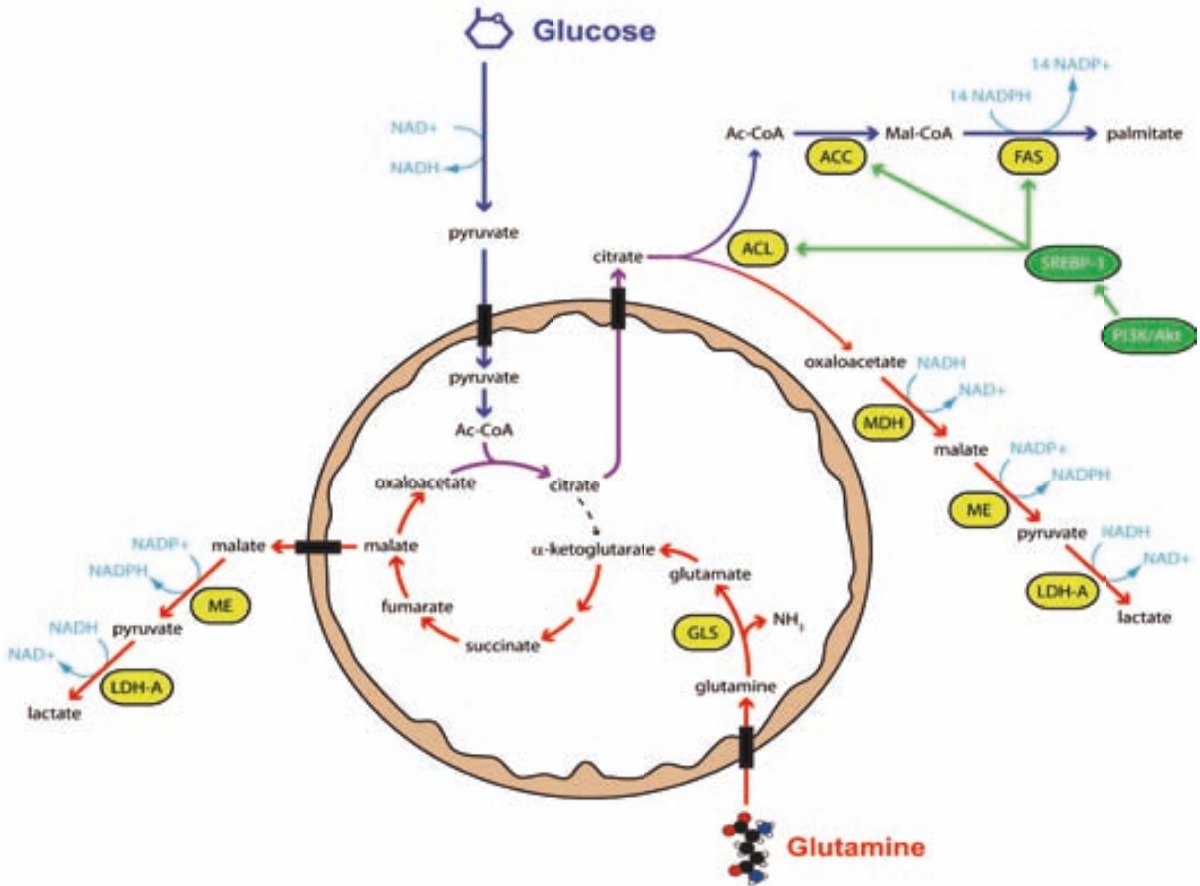
La ruta PI3K/Akt també regula l'ús de la glucosa amb propòsits biosintètics. El piruvat produït a partir de la glucosa pot entrar en el mitocondri i ser convertit a Acetil-CoA, que condensa amb l'oxalacetat per produir citrat (Figura 8). Les cèl·lules proliferants no oxiden tot el citrat en el cicle de Krebs sinó que en transporten al citosol per la síntesi de lípids. L'activació de l'eix PI3K/Akt activa rutes biosintètiques a través de mTORC1, que promou la síntesi de proteïnes i la síntesi de lípids a través de SREBP-1 o ACL (Duvel et al., 2010).

Existeixen 26 inhibidors de la ruta PI3K en proves clíniques. Nous estudis mostren que la inhibició d'aquesta via produeix un augment en la ruta JAK2/STAT5 que permet la resistència de les cèl·lules tumorals de mama. La combinació de fàrmacs contra les dues vies inhibeix la proliferació i la metàstasi, i augmenta la supervivència *in vivo* (Britschgi et al., 2012).

?

?

?



Le rôle de la mitochondrie est de convertir le glucose en énergie. Le glucose est transformé en pyruvate, qui est ensuite converti en Ac-CoA. L'Ac-CoA est utilisé pour la synthèse des acides gras (comme la palmitate) et pour la synthèse de SREBP-1, qui régule l'activité des enzymes ACC et FAS. Le pyruvate peut également être converti en lactate (LDH-A) ou en malate (ME). Le cycle de l'acide citrique est central, produisant des intermédiaires comme l'α-cétoglutarate, qui est utilisé pour la synthèse de glutamine (via GLS) et pour la régulation de l'enzyme ME. Le diagramme illustre également le rôle de l'ACC et de la FAS dans la synthèse des lipides.

?

?

3.10.2. HIF1 i el metabolisme glicolític

HIF1 s'estabilitza en hipòxia on actua com un adaptador del metabolisme glicolític. En condicions limitades d'oxigen, la producció d'ATP només per fosforilació oxidativa causaria estrès redox mitocondrial (Semenza et al., 1994). HIF1 inhibeix la piruvat deshidrogenasa de manera que bloqueja l'entrada de piruvat a cicle de Krebs, disminuint la fosforilació oxidativa i el consum d'oxigen. Addicionalment, promou l'expressió de gens involucrats en la glicòlisi anaeròbica com LDHA (Semenza et al., 1994), augmentant el fenotip glicolític (Cairns et al., 2011; Lum et al., 2007).

L'expressió de HIF1 és imprescindible per la formació del nínxol premetastàtic en càncer de mama (Wong et al., 2011). Concretament en la metàstasi pulmonar de càncer de mama, HIF1 i HIF2 activen gens com ANGPTL4 i L1, que promouen l'extravasació de cèl·lules tumorals circulants de la vasculatura pulmonar, així com membres de la família lisil oxidasa (LOX, LOXL2 i LOXL4) que promouen la invasió i formació del nínxol metastàtic (Semenza, 2012).

L'estabilizació de HIF-1 també pot succeir en condicions de normòxia per l'activació de rutes com Akt/mTOR, que augmenten la seva transcripció (Laplanche and Sabatini, 2012).

3.10.3. Myc i el metabolisme d'Aminoàcids

Les cèl·lules proliferants requereixen nitrogen per la síntesi de proteïnes i nucleòtids (Ward and Thompson, 2012b). Des dels anys 50 es coneix que els tumors consumeixen grans quantitats de glutamina (Gln) no només per la síntesi proteica (Wise and Thompson, 2010) sinó també per a la producció energètica (Figura 8, fletxes vermelles).

El metabolisme de la Gln és una font de carboni important per reemplenar els intermediaris del cicle de Krebs (anaplerosi). La Glutamina es pot convertir en el mitocondri en α -cetoglutarat (DeBerardinis et al., 2007) i finalment en citrat. Aquest procés dona suport a la proliferació ja que permet derivar acetil-CoA cap a la síntesi de citrat i d'àcids grassos (Figura 8, fletxes roses) sense afectar la demanda energètica de la cèl·lula. Igualment, regula la síntesi lipídica i de nucleòtids al convertir-se en malat, substrat de l'enzim màlic per a la

producció de NADPH (Figura 8, fletxes vermelles). Tot i així, més de la meitat del carboni derivat de Gln no es metabolitza i se secreta en forma de lactat i alanina, una altra característica metabòlica del tumors com ho és l'efecte Warburg (DeBerardinis and Cheng, 2010).

L'oncogen Myc es troba amplificat en càncer de mama metastàtic (Singhi et al., 2012) i promou la captació de glutamina augmentant l'expressió dels seus transportadors o mitjançant la sobre-expressió de la glutaminasa (Ward and Thompson, 2012a). c-Myc regula l'expressió de 13 perfils d'expressió de mal pronòstic en càncer de mama i la seva inhibició en cèl·lules tumorals de mama humanes inhibeix les metàstasis distants *in vitro* i *in vivo* (Wolfer et al., 2010).

3.10.4. Her2 i el metabolisme lipídic

Her2 és un dels oncogens més reconeguts en càncer de mama amb implicacions en la progressió dels pacients (Foo et al., 2013; Kennecke et al., 2010). Ja hem descrit algunes de les alteracions metabòliques que es produeixen quan interacciona amb la via de PI3K, mitjançant l'augment en la glicòlisi o la síntesi lipídica entre d'altres.

La relació de la síntesi lipídica amb el procés tumoral es coneix des dels anys 50 (Medes et al., 1953). En el cas del càncer de mama, aquesta relació s'estableix amb el descobriment que la progestina podia induir la FASN (Chalbos et al., 1987). La FASN és un gen diana de SREBP1, igual que altres enzims lipogènics com acetil-CoA carboxilasa (ACC), HMG-CoA reductasa i steroil-CoA desaturasa (Schug et al., 2012). En la síntesi d'àcid gras, el citrat citosòlic és convertit en Acetil-CoA, malonil-coA i finalment palmitat per l'acció d'ACL, ACC i FASN, respectivament (Figura 8). Ja que la lipogènesi depèn de la presència d'Acetil-CoA i NADPH, està directament acoblada a l'ús de glucosa i glutamina (Zhang and Du, 2012)

Her2 s'ha relacionat amb el control de la lipogènesi tumoral per mecanismes independents de PI3K i l'activació de SREBP-1 (Kourtidis et al., 2009). La proteïna PPAR γ binding protein (PBP) es localitza en la regió comú de l'amplificació de Her2 al cromosoma 17q12–21 i es co-amplifica amb ella (Kauraniemi et al., 2001). La sobreexpressió de PBP augmenta l'activitat transcripcional de PPAR γ , un regulador del metabolisme lipídic i de

INTRODUCCIÓ

l'adipogènesi (Lowell, 1999). La inhibició de PPAR γ (GW9662) sensibilitzava les cèl·lules de càncer de mama ErbB2+, provocant un augment en l'acumulació d'àcids grassos lliures i en l'apoptosi. PPAR γ permet a les cèl·lules ErbB2+ convertir els àcids grassos a triglicèrids per tal de fer front a la lipotoxicitat (Kourtidis et al., 2009).

La presència de FASN sha associat amb mal pronòstic en tumors de mama (Kuhajda et al., 1994) ja que l'augment en lípids media la senyalització, el tràfic intracel·lular, la polarització i la migració (Kuhajda et al., 1994; Menendez and Lupu, 2007; Swinnen et al., 2006), imprescindibles per la iniciació i progressió tumoral (Menendez and Lupu, 2007). La seva expressió s'associa amb resistència a docetaxel (Menendez et al., 2004) i adriamicina (Zhao et al., 2013), i cèl·lules tumorals de mama resistents a trastuzumab són més sensibles a la inhibició de la FASN, indicant que FASN és important en l'adquisició de resistències a teràpia (Vazquez-Martin et al., 2007).

En el cas concret de tumors de mama positius Her2+, s'ha descrit que la presència d'aquest receptor activa la transcripció de FASN i la lipogènesi. La inhibició de Her2 pot bloquejar aquest efecte (Baumann et al., 2013). Però la relació entre aquestes dues proteïnes és bidireccional. Cèl·lules epitelials de mama (MCF-10 i HBL100) forçades a sobreexpressar FASN pateixen una transformació que resulta en l'augment de les propietats oncogèniques com major proliferació, formació de colònies en agar, sobre-expressió de HER1/HER2 i resistència a cis-platin (Vazquez-Martin et al., 2008).

A més de la relació transcripcional entre Her2 i FASN, Jin i col. han descrit que FASN pot ser directament fosforilada per Her2, augmentant l'activitat lipogènica (Jin et al., 2010). Tots aquests resultats donen suport al fet que cèl·lules Her2+ tenen uns nivells de lípids acumulats majors que cèl·lules amb expressió normal de Her2 (Kourtidis et al., 2009).

INTRODUCCIÓ

ANTECEDENTS

ANTECEDENTS

ANTECEDENTS

ANTECEDENTS

El nostre grup s'ha interessat en els darrers anys en la identificació de proteïnes que intervenen en la patogènesi de la òrgan-especificitat de la progressió metastàtica del càncer de mama (Martin et al., 2008b; Sanz-Pamplona et al., 2011; Stresing et al., 2012).

La localització de tumors secundaris segueix un patró de distribució que afecta preferencialment sempre els mateixos òrgans (Kang, 2006). Paget va realitzar les primeres observacions en aquest sentit i va descriure que el procés metastàtic no es donava a l'atzar sinó que certes cèl·lules tumorals ("seeds" o llavors) tenien una afinitat específica per certs òrgans ("soil" o sòl). L'establiment de la metastasi només era possible quan la llavor i el sòl eren compatibles (Paget, 1989).

En els darrers anys s'ha aprofundit en l'estudi de la relació que s'estableix entre la cèl·lula metastàtica i el microentorn de l'òrgan diana. Des del punt de vista de la "llavor", les cèl·lules tumorals són altament heterogènies quant a genotip i fenotip i se'n poden diferenciar subpoblacions atenent al seu potencial metastàtic (Gupta and Massague, 2006). Aquestes cèl·lules pateixen un fort procés de selecció, que fins i tot involucra múltiples barreres fisiològiques, durant les diferents etapes de la progressió metastàtica (veure introducció Apartats 1B i 1C) fins al seu establiment en el nou teixit (Fidler, 2003).

Cada una d'aquestes etapes és facilitada per la coincidència d'alteracions en gens crucials per adquirir l'avantatge de supervivència en situacions i microentorns molt diferents de l'òrgan d'origen. En càncer de mama s'han descrit diverses mutacions, tant en gens de susceptibilitat de la línia germinal com BRCA1 i BRCA2 (Betts et al., 2013), com d'altres somàtiques que inclouen mutacions i alteracions en el nombre de còpies, especialment amplifícacions com la d'ERBB2 (King et al., 1985). L'amplificació d'aquest receptor facilita la seva dimerització i l'activació de rutes mitogèniques com PI3K/Akt i Ras/Raf/MEK/MAPK (Yarden and Sliwkowski, 2001) i ha permès l'èxit de teràpies com el Trastuzumab. Altres mutacions somàtiques conegudes (Cancer Genome Atlas Network, 2012), amb implicacions terapèutiques pel que fa al tractament i la resistència a fàrmacs, són PIK3CA (Samuels et al., 2004; Sjoblom et al., 2006), TP53 (Sjoblom et al., 2006), AKT (Carpten et al., 2007), GATA3 (Usary et al., 2004), MAP3K1 (Kan et al., 2010) o MYC (Betts et al., 2013).

Cada microentorn té unes característiques úniques que requeriran unes habilitats específiques en la cèl·lula metastàtica circulant per tal d'establir-s'hi i adaptar-s'hi. El cross-

ANTECEDENTS

talk establert entre la cèl·lula i el microentorn influeix en l'èxit de diversos passos clau per a l'establiment metastàtic (Lorusso and Ruegg, 2012) mitjançant l'adhesió i la invasió, la formació del nínxol o la secreció de citocines i factors de creixement (Joyce and Pollard, 2009), tal i com hem vist a l'apartat 1C de la Introducció. Concretament, cada tipus de teixit provocarà alteracions en l'expressió de certs gens indispensables per al procés adaptatiu. Per tant, a part d'aquestes mutacions mitogèniques i pro-supervivència, la cèl·lula tumoral pot presentar alteracions genètiques més específiques que predeterminin el seu creixement en un òrgan concret (Nguyen et al., 2009)

Ja que la modificació de gens pot repercutir en rutes de senyalització proteica, la metastasi és al final una malaltia proteòmica (Martin et al., 2008b). Tot i la modificació específica de gens, l'estudi conjunt d'aquests a través de xarxes d'interacció proteïna-proteïna (PPIN) permet establir relacions amb la funcionalitat del procés estudiat (Aragues et al., 2008; Reeves et al., 2009).

L'interès del grup estava adreçat a l'estudi de funcions específiques en el procés de l'òrgan-especificitat, partint de l'estudi diferencial de proteïnes que participaven en el creixement òrgan-específic de les cèl·lules metastàtiques del càncer de mama.

L'estratègia utilitzada inicialment per a la caracterització de fenotips funcionals que afavorissin la metastasi de càncer de mama, va consistir en estudis d'expressió diferencial de proteïnes, per tal de comparar les diferents localitzacions metastàtiques entre si. Ens vam interessar en l'anàlisi proteic de dues línies metastàtiques, de fetge (435-Lv) i pulmó (435-L), i en la combinació d'eines bioinformàtiques per a l'anàlisi de PPINs. Amb aquest anàlisi vam seleccionar funcions diferencialment expressades en ambdós models de metastasi, permetent definir les similituds i diferències funcionals existents entre les metastasis de teixit tou, com fetge i pulmó (Martin et al., 2008b).

Inicialment es va analitzar per electroforesi bidimensional-*difference gel electrophoresis* (2DE-DIGE) l'expressió diferencial de proteïnes entre la línia parental (MDA-MB-435P) i les seves variants metastàtiques a fetge (435-Lv) i pulmó (435-L), per tal de determinar el perfil d'òrgan-especificitat funcional. Es van analitzar per MALDI-TOF 44 spots per fetge i 51 per pulmó, donant lloc a 22 i 38 proteïnes identificades, respectivament. La majoria de proteïnes de fetge corresponien a filaments intermedis, transport intracel·lular i

ANTECEDENTS

síntesi d'ATP. Les de pulmó s'associaven funcionalment al proteasoma, síntesi de proteïnes, funció redox i txaperones.

La validació per WB d'algunes d'aquestes proteïnes va mostrar una sobre-expressió de GRP75 en fetge i una infra-expressió de galectina-1 i tioredoxina en ambdues metàstasis. La sobreexpressió de GRP75 en fetge es va validar també per IHC en teixit metastàtic de models animals i en teixit metastàtic de pacient (fetge, pulmó i os).

Es van construir xarxes d'interacció amb el programa PIANA (Aragues et al., 2006), que permet la integració de diferents fonts d'interacció proteïna-proteïna, per tal d'entendre les diferències entre les llistes proteiques de fetge i pulmó. Es va partir de les proteïnes diferencialment expressades en cada metàstasi respecte la línia parental (22 en fetge, 30 en pulmó) com a proteïnes arrel o "root". Les xarxes finals de 496 nodes (fetge) i 1338 (pulmó) van mostrar que 12 proteïnes de fetge i 20 de pulmó interaccionaven a través de proteïnes *linker*. Concretament en la xarxa de fetge, GRP75 apareixia vinculada a HSP27. La silenciació de GRP75 amb siRNA provocava una infra-expressió de HSP27 a 72h, confirmant aquesta relació.

Finalment, es va realitzar un anàlisi funcional amb les proteïnes de les xarxes a través del programa FatiGO. Un dels processos més destacats en metàstasi hepàtica va resultar la senyalització per receptors tirosina quinasa (HGFR, PDGF, VEGF o EGF). Aquesta funció es va validar tractant les cèl·lules amb HGF, que provocava un augment en la proliferació respecte a pulmó o la línia parental. El tractament amb Gleevec, un inhibidor d'aquests receptors, disminuïa la proliferació de forma diferencial en la metàstasi hepàtica respecte a la metàstasi de pulmó.

Aquests resultats suggerien que cada metàstasi requereix d'unes característiques específiques per a sobreviure en el nou microentorn. En consens amb aquesta idea, vam analitzar les diferències d'expressió proteica entre una línia metastàtica a cervell (435-Br1) i la seva línia parental (435-P). Vam identificar la sobreexpressió del receptor de laminina 1 (34/67-LMR) i l'infraexpressió de fins a 11 proteïnes com glioxalasa 1, keratina 1, HSP27, galectina 1 i peroxiredoxina IV, entre d'altres, en metàstasi cerebral comparat amb la línia parental (Martin et al., 2008a). L'expressió d'aquestes proteïnes es va analitzar per WB

ANTECEDENTS

validant la sobre-expressió de 34/67-LMR en dues línies de metàstasi cerebral, així com la infra-expressió de les proteïnes mencionades anteriorment (excepte per HSP27).

Seguint l'estratègia prèviament citada, vam construir xarxes d'interacció amb PIANA utilitzant les proteïnes diferencialment expressades com a proteïnes arrel. 34/67-LMR apareixia vinculat a HSP27 a través d'una proteïna de la família de les Proteïnes Regulades per Glucosa (GRPs), GRP94. Es va provar experimentalment que l'adhesió a laminina era òrgan-específica de cervell i es va demostrar que l'estimulació del receptor activava l'expressió de les txaperones HSP27 o GRP78. Totes aquestes proteïnes es van validar per IHC en teixit de metàstasi cerebral de pacient.

Aquest resultat suggerien que les cèl·lules metastàtiques cerebrals podrien respondre a l'estrès del microentorn induint proteïnes específiques del reticle, com *Heat Shock Proteins* o GRPs.

Degut a que el sistema nerviós central té unes característiques especials respecte la resta de microentorns, com la presència de la BHE o la manca de drenatge limfàtic, vam cercar funcions que fossin diferencialment importants en metàstasi cerebral respecte les altres metàstasis de càncer de mama (Sanz-Pamplona et al., 2011).

Així, per tal d'identificar proteïnes importants per la progressió metastàtica cerebral, vam integrar el PPIN obtingut anteriorment amb dades transcriptòmiques prèviament publicades (Landemaine et al., 2008) corresponents a l'estudi de 23 mostres de metàstasi de càncer de mama humanes (4 de cervell, 6 d'os, 6 de fetge, 5 de pulmó i 2 de pell). Els valors d'expressió de cada gen es van mapejar a la proteïna corresponent en la xarxa per tal d'enriquir amb dades experimentals el PPIN proposat i es van buscar proteïnes les activitats de les quals fossin discriminatives de metàstasi cerebral.

Es va validar l'expressió d'algunes d'aquestes proteïnes per IHC en metàstasi cerebral de pacients: GRP94, TRAF2, FN14, TOP1, VAV2, GFAP, TEM8, BAT8 i ARFGAP. Aquests resultats mostraven un augment en txaperones, en regulació redox i de l'estrès i transport intracel·lular de proteïnes. D'entre aquestes proteïnes, les més diferencialment expressades en cervell comparat amb altres metàstasis van ser GRP94, FN14, ARFGAP1 i TRAF2. L'anàlisi d'aquestes proteïnes en TMA's mostrava que l'expressió de GRP94, TRAF2 i Fn14 s'associava

ANTECEDENTS

amb la progressió de metàstasi cerebral. El major valor predictiu de metàstasi s'obtenia amb l'expressió positiva d'ErbB-2, FN14, GRP94 i TRAF2. Per tant, la presència del fenotip d'estrès de reticle en el tumor primari es podia associar a un alt risc de progressió metastàtica cerebral i esdevé una eina diagnòstica per predir l'aparició de metàstasis cerebrals i l'aplicació de nous tractaments.

Finalment, per tal d'aprofundir en la identificació de proteïnes importants per a la supervivència de la cèl·lula tumoral en el nou microentorn, vam ampliar l'estudi iniciat en metàstasi pulmonar (Martin et al., 2008b). L'expressió diferencial de proteïnes amb 2DE-DIGE comparant cèl·lules de càncer de mama que metastatitzen a pulmó havia posat de manifest que la PRDX2 podia tenir un paper rellevant en aquestes metàstasis (Martin et al., 2008b). L'estudi funcional de la causa-efecte de la PRDX2 en el desenvolupament de la metàstasi a pulmó va mostrar que la silenciació de PRDX2 en una línia metastàtica a pulmó (MDA-MB-435-L) disminuïa el creixement d'aquestes cèl·lules *in vivo* (Stresing et al., 2012).

El mecanisme pel qual PRDX2 afavoria el creixement de les cèl·lules metastàtiques en el microentorn pulmonar era a través de l'eliminació de ROS. Per una altra banda, la sobreexpressió de PRDX2 en cèl·lules metastàtiques d'os també inhibia el creixement cel·lular, demostrant que la mateixa proteïna podia tenir efectes contraris segons en quin microentorn actuava. PRDX2 es presentava com un possible adaptador metabòlic implicat en el creixement selectiu de les cèl·lules metastàtiques en el pulmó però no en l'os, protegint-les de l'estrès oxidatiu.

Partint de la idea que cada tipus de metàstasi necessita de l'expressió de certes proteïnes per a la seva adaptació al microentorn, vam aplicar l'estratègia prèviament citada, és a dir, la combinació d'eines proteòmiques, genòmiques i bioinformàtiques per analitzar l'expressió diferencial de proteïnes de la metastati òssia. Mitjançant tècniques de 2DE i MALDI-TOF es van comparar perfils d'expressió proteica de cèl·lules tumorals de mama (MDA-MB-231) amb la seva variant metastàtica a os (MDA-MB-231-BO2). L'anàlisi dels resultats va permetre la identificació de 35 spots corresponents a 31 proteïnes (16 sobreexpressades i 15 infraexpressades). Entre aquestes apareixien principalment proteïnes relacionades amb estructura cel·lular (tropomiosina 4, vimentina, citoqueratina 2), txaperones i estrès (HSP27, HSP60), metabolisme i regulació redox (tioredoxina, PRDX2,

ANTECEDENTS

ERp57, glioxalasa I, piruvat deshidrogenasa) o transport intracel·lular i energia (subunitat beta d'ATP sintasa, cadena D ATP sintasa mitocondrial). Altres funcions com transcripció (prohibitina), proliferació/mort (PCNA), proteases (catepsina D) o transducció de senyals (statmina 1, galectina 1) apareixien menys representades. Els resultats del 2DE es van validar per diverses tècniques com IHC, WB i 2D/WB.

Amb aquestes 31 proteïnes es va construir un PPIN. Es va utilitzar el programa BIANA (Garcia-Garcia et al., 2010), que permet crear, organitzar i analitzar xarxes d'interaccions proteiques a partir de diverses bases de dades com HPRD, BIND, DIP, MIPS, IntAct, MINT i BioGRID, UniProt i *Entrez Gene Identifier*. L'ús del BIANA va resultar en una xarxa d'interaccions entre proteïnes arrel (28, ja que de 3 no vam poder trobar interaccions) i proteïnes linker o interactuants (les que interaccionen amb aquestes proteïnes arrel), en total 1328 proteïnes (Figura 9).

La xarxa d'interacció es va enriquir amb el perfil transcriptòmic de 231-BO2 obtingut prèviament dins del projecte europeu MetaBre (Landemaine et al., 2008). Les dues línies cel·lulars (231-P i 231-BO2) es van analitzar amb l'Affymetrix GeneChip per tal de buscar diferències d'expressió gènica i es van trobar 833 gens diferencialment expressats. Aquests resultats es van creuar amb la xarxa d'interaccions de BIANA obtenint 93 proteïnes coincidents, 34 sobreexpressades i 59 infraexpressades.

Per tant, la xarxa final contenia informació tant de les interaccions entre les proteïnes del 2DE i altres proteïnes de la bibliografia com dels nivells d'expressió d'aquestes proteïnes.

Aquest anàlisi es va completar amb una nova eina bioinformàtica, GUILD (Guney and Oliva, *in press*). GUILD permet la prioritització de molècules de la xarxa amb certa rellevància per al desenvolupament de la metàstasi òssia. Per a cada proteïna arrel, es compten el nombre de gens expressats diferencialment al seu voltant i es calcula la mitjana NetCombo. El gen codificant per ERp57 apareixia amb la mitjana més elevada entre les proteïnes arrels i interaccionant amb un nombre més elevat de gens diferencialment expressats.

ANTECEDENTS

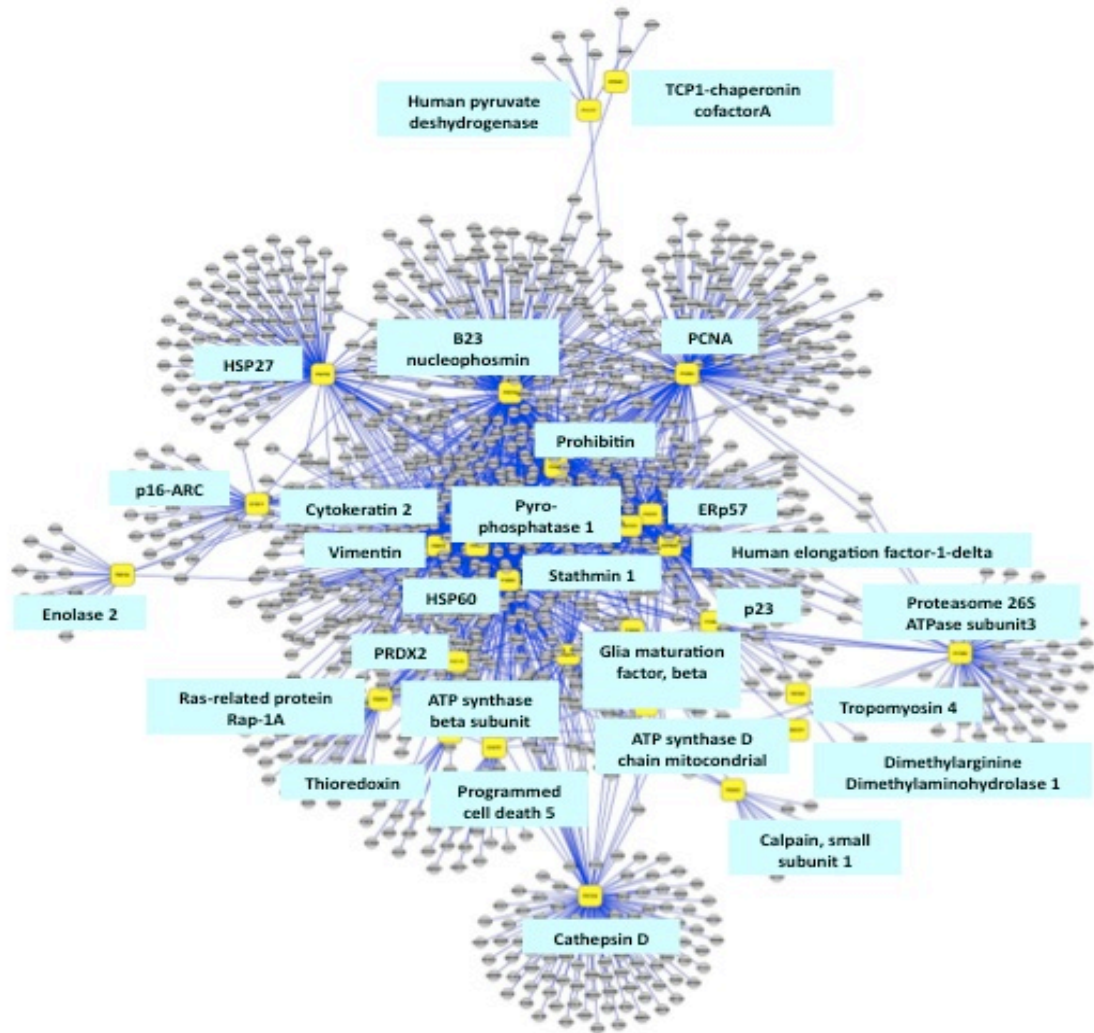


Figura 9. Xarxa d'interacció *in silico* obtinguda a partir de dades d'expressió proteica diferencial entre cèl·lules 231 i BO2. La xarxa conté 28 proteïnes arrel (groc) identificades per 2DE-DIGE/MALDI-TOF que interaccionen amb 1328 nodes (gris) o proteïnes interactuants.

Erp57, sobreexpressada en metàstasi òssia, era una proteïna arrel que formava un node de interacció amb diversos gens (Figura 10); alguns infraexpressats com diferents tipus d'HLA I (HLA-A, B, E i F), SLC2A1, APP i CBR1 i d'altres sobreexpressats (CCT2, CBFB, PHGDH, ILF3 i PPIB). A més, a través de Prohibitina i CCT2, ERp57 com a proteïna central que interaccionava amb un node agrupant proteïnes del citoesquelet i de l'adhesió cel·lular, amb la vimentina.

ANTECEDENTS

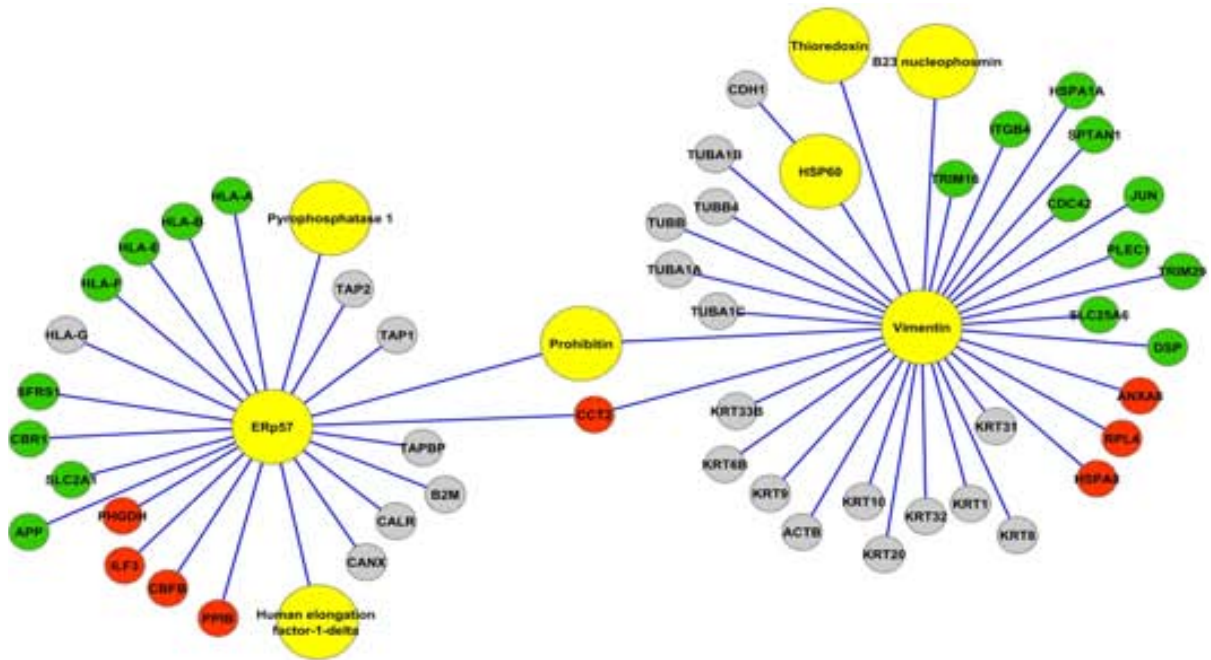


Figura 10. ERp57 apareix com una txaperona sobreexpressada que interacciona amb gens del sistema immune i citoesquelet. ERp57 ocupa un lloc central en el node que agrupa diverses proteïnes infra i sobreexpressades, d'on destaquen diversos tipus d'HLA I (infraexpressats). Per una altra banda, ERp57 connecta amb un node de citoesquelet i adhesió a través de Prohibitina i CCT2.

Aquestes dades induïen a pensar que ERp57 podria actuar com un regulador principal en la xarxa de rutes de senyalització específiques de metàstasi òssia, modulant sistemes diversos com resposta immune, metabolisme i citoesquelet.

HIPÒTESI

HIPÒTESI

HIPÒTESI

HIPÒTESI

Les cèl·lules amb habilitat metastàtica presenten un creixement òrgan-específic en el que intervenen no només les característiques intrínseques del tumor sinó també la relació que la cèl·lula metastàtica estableix amb el microentorn de l'òrgan diana. L'expressió diferencial de proteïnes entre metastàsis i tumor primari ens posa sobre la pista de funcions cel·lulars prevalents per l'adaptació de les cèl·lules metastàtiques a aquest microentorn.

El creixement metastàtic requereix d'una reestructuració del metabolisme de la cèl·lula per tal de respondre als requeriments bioenergètics i biosintètics que exigeixen el creixement en un entorn aliè al d'origen. La supervivència de la cèl·lula tumoral en aquestes condicions depèn en gran part de la capacitat de superar l'estrès induït en cada una de les etapes del procés, a través de mecanismes que inclouen la sobre-expressió de proteïnes regulades per glucosa (GRPs).

HIPÒTESI

OBJECTIUS

OBJECTIUS

OBJECTIUS

OBJECTIUS

1. Validar la causa-efecte de la proteïna regulada per glucosa ERp57 com a txaperona multifuncional en la metàstasi òssia.

1A. Identificar el paper d'ERp57 com a regulador principal d'una xarxa d'interacció proteica integrant la funció de sistema immune i citoesquelet

1B. Demostrar la importància d'ERp57 en el procés de metàstasi òssia

2. Caracteritzar els components metabòlics associats al procés òrgan-específic de la metàstasi del càncer de mama.

2A. Analitzar els gens reguladors del fenotip lipídic metastàtic

2B. Estudiar el perfil metabòlic característic de les cèl·lules metastàtiques.

2C. Analitzar el fenomen del catabolisme lipídic en relació a la disponibilitat de glucosa.

2D. Analitzar el paper de l'autofàgia en la patogènesi de la metàstasi

2E. Analitzar la contribució de la funció i dinàmica mitocondrial a la versatilitat metabòlica de les cèl·lules metastàtiques..

OBJECTIUS

MATERIAL I MÈTODES

MATERIAL I MÈTODES

1. CULTIUS CEL·LULARS

1.1. LÍNIES CEL·LULARS

Línies Parentals. Tots els experiments es van realitzar amb cèl·lules de procedència humana derivades de càncer de mama.

Les cèl·lules MDA-MB-231 (231) es van adquirir a l'ATCC (ECACC 92020424) i deriven d'una efusió pleural d'una pacient caucàsica amb adenocarcinoma de mama metastàtic (Cailleau et al., 1978). Aquestes cèl·lules epitelials presenten mutacions en la proteïna p53 (Lacroix et al., 2006).

La línia d'adenocarcinoma de mama MDA-MB-435-Parental (435-P) i la seva variant metastàtica a cervell MDA-MB-435-Brain (435-Br1), van ser cedides per la Dra Price del M.D. Anderson Cancer Centre (Houston, TX). Aquesta línia prové d'una efusió pleural d'una pacient caucàsica amb adenocarcinoma ductal de mama metastàtic (Cailleau et al., 1978). Conté una mutació en p53 (Lacroix et al., 2006) i amplificacions en c-myc i Neu (O'Connor et al., 1997). La procedència d'aquesta línia cel·lular ha originat controvèrsia ja que la seva alta homologia transcriptòmica amb altres línies melanocítiques (Ross et al., 2000) ha induït a pensar en una contaminació creuada amb la línia M14 de melanoma metastàtic. Tot i les discrepàncies a nivell d'expressió de marcadors de llinatge (Ellison et al., 2002; Howlett et al., 1994; Sellappan et al., 2004), els estudis cariotípics mostraven la presència de dos cromosomes XX en ambdues línies cel·lulars (Rae et al., 2007) i aquest fet no es correspon amb que la línia M14 prové d'un pacient masculí (Wong et al., 1988). Així, tot i que els stocks de M14 i 435 siguin idèntics a nivell cariotípic, no es prova que les dues siguin de melanoma, ja que és més fàcil explicar una contaminació creuada amb una línia de pacient femenina que expressi marcadors melanocítics (i per tant, de càncer de mama) que la pèrdua del cromosoma Y en la línia M14 i disomia del cromosoma X (Chambers, 2009).

Variants metastàtiques. Al contrari que en humans, els tumors de mama no solen metastatitzar a os en ratolins. Per això és necessària la injecció de les cèl·lules directament en el ventricle o bé en la tibia (Garcia et al., 2008).

MATERIAL I MÈTODES

Per tal d'obtenir un model de metastasi òssia de càncer de mama, les cèl·lules 231 es van injectar en ventricle esquerre cardíac i, després de 6 passes *in vivo/in vitro*, es va seleccionar la línia metastàtica a os MDA-MB-231-BO2 (BO2), cedides pel laboratori del Dr Clezardin (Bellahcene et al., 2007; Peyruchaud et al., 2001).

Aquestes cèl·lules són detectables per bioluminescència a partir del dia 10 post-injecció en la vena de la cua. Les lesions que formen en animals immuno-deprimits són de tipus osteolític, activant els osteoclasts per secreció de proteïnes com IL-8 o IL-11. Aquestes cèl·lules sobre-expressen proteïnes involucrades en adhesió o angiogènesi i presenten un perfil genètic semblant als osteoblasts normals. Les dades suggereixen un fort osteomimetisme, un fenomen pel qual les cèl·lules tumorals es camuflen actuant com osteoblasts per créixer en l'os i activar els osteoclasts (Garcia et al., 2008).

Al laboratori, es van obtenir variants metastàtiques de 435-P després de diversos passes *in vivo/in vitro* en ratolins immunodeprimits: pulmó MDA-MB-435-Lung3 (435-L3), a os MDA-MB-435-Bone (435-B1) i a fetge MDA-MB-435-Liver (435-Lv1) (Mendez et al., 2005). La línia metastàtica a cervell 435-Br1 va ser transfectada amb un vector retroviral preGFP-CMV-PLuc, que conté el gen de la *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) sota el control del 5'LTR, i el gen *photinus luciferase* (PLuc) sota el control del promotor del citomegalovirus (CMV). Es va seleccionar per FACS la població que expressava de manera uniforme els nivells més elevats de eGFP (BR-eGFP-CMV/Luc). Aquesta línia es va injectar en ventricle esquerre de ratolins Nu/Nu i, després de 5 passes *in vivo-in vitro*, es va obtenir la línia BrV5 (Martinez-Aranda et al., 2013).

Finalment, es van utilitzar dues línies de càncer de mama que originen metastasi cerebral, cedides a través del consorci europeu METABRE. La línia MDA-MB-361 va ser cedida pel Laboratoire d'Oncogénétique (Centre Rue Huguenin, Saint-Cloud, France) i són cèl·lules aïllades d'una metastasi cerebral de pacient (Cailleau et al., 1978; Weil et al., 2005). La línia SA52 (Noel et al., 1991) va ser cedida pel Laboratory of Experimental Cancerology (University of Ghent, Belgium).

Línies metastàtiques genèticament modificades. La línia 231-BO2 va ser transfectada pel laboratori del Dr. Clézardin amb un vector ttA (*tetracycline-regulated transactivator*) per a posteriors seleccions. A partir d'aquí sempre l'anomenarem 231-BO2.

En el nostre laboratori, BO2 es va transfectar amb un vector que permetia la infra-expressió d'ERp57 de manera estable (veure apartat 2B).

1.2. CONDICIONS DE CULTIU

1.2.1. *Manteniment cel·lular*

Les línies cel·lulars es van cultivar en medi DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementat amb un 10% de Sèrum Boví Fetal (SBF), L-Glutamina 2mM i piruvat 1mM (tot filtrat amb filtres de 0.22 µm). Es van mantenir a 37°C en un incubador humidificat al 5% de CO₂. Cada 3-4 dies les cèl·lules es rentaven amb PBS 1X i es dividien amb Tripsina/EDTA 0.05% (Gibco) en PBS 1X. La tripsina s'aturava amb MC 10% i les cèl·lules es centrifugaven a 1200 rpm durant 5 minuts. La sembra es realitzava amb nou medi a la dilució pertinent. Per a tots els experiments es van utilitzar cèl·lules en creixement exponencial, sense arribar mai a saturació.

Per als experiments de **deprivació de glucosa**, 4×10^4 cèl·lules es sembraven en plaques de 24 pous en MC10% i després de 24 h, es realitzava el canvi de medi. El medi sense glucosa es preparava amb medi DMEM (Invitrogen) complementat amb Glutamina 2 mM i SBF al 10% mentre que el medi amb glucosa 4.5 mg/ml es preparava igual afegint glucosa a la concentració adient. Els medis a 0 o 4.5 mg/ml es deixaven durant 48h o 72h i es mesurava la viabilitat cel·lular pel mètode del cristall violeta (Veure apartat 1.D).

1.2.2. *Comptatge cel·lular*

El comptatge cel·lular es va realitzar en una cambra de Neubauer de 0.1 mm de profunditat i 0.0025 mm d'àrea. El nombre de cèl·lules a sembrar a cada experiment es va definir a partir de les cèl·lules viables dins l'àrea de comptatge. Les cèl·lules viables es van determinar per exclusió de Blau tripà (Sigma) al 0.04% en PBS 1X, prèviament autoclavat.

1.2.3. Criopreservació cel·lular

Per tal de preservar les cèl·lules en congelació, les cèl·lules es dividien en fase exponencial segons el protocol previ. En el pas final, s'afegia medi de congelació fred: DMEM/F12 suplementat amb 20% de SBF i 10% de DMSO. Les cèl·lules es congelaven utilitzant criotubs (Corning®) en un criocontenedor amb 250 ml d'isopropanol (Nalgene™) a -80°C i posteriorment es mantenien en N₂ líquid.

1.2.4. Test de micoplasma

El fet de treballar en condicions de cultiu lliures d'antibiòtic per tal d'injectar les cèl·lules en l'animal d'experimentació, fan imprescindible el control periòdic de la presència de micoplasma en les línies cel·lulars en cultiu (Bernet et al., 1989). Per a això, es deixaven els cultius en MC sense sèrum (MCSS) i es recollien els sobrenedants a 72h de confluència. Aquests es centrifugaven 5 min a 1500 rpm i el sobrenedant es recuperava i es congelava a -20°C fins a la realització del test. La tècnica utilitzada per a la detecció del micoplasma és la reacció en cadena de la polimerasa (PCR).

1.3. TRACTAMENTS

Les cèl·lules han estat sotmeses a tractaments amb diverses drogues que es detallen a continuació.

Etomoxir: És un inhibidor irreversible del CPT-1 (Carnitina palmitoiltransferasa), el transportador d'àcid grassos mitocondrial que permet la seva oxidació en aquest orgànul (Samudio et al., 2010). Els tractaments es van realitzar a una concentració final de 200 µM d'etomoxir (Sigma) durant 48 o 72 h, dissolent el producte en medi a 0 o 4.5 mg/ml de glucosa (veure Apartat 1B.1).

Bafilomicina: És un inhibidor de la ATPasa de protons vacuolar que impedeix la fusió del lisosoma amb l'autofagosoma, aturant d'aquesta manera la degradació en vesícules autofàgiques (Yamamoto et al., 1998). Per tal d'analitzar el fenomen de l'autofàgia, les cèl·lules es van sembrar i després de 24h, es van tractar amb bafilomicina (Sigma Aldrich) a

20 nM. Les cèl·lules es van recollir a diferents temps després del tractament per tal d'analitzar l'expressió de LC3 (Taula 9) per Western Blot. Els experiments de supervivència es van realitzar a 5 i 20 nM de bafilomicina en medi 0 o 4.5 mg/ml de glucosa durant 48 h.

1.4. D. TINCIÓ CRISTALL VIOLETA

Les cèl·lules es van cultivar en les condicions especificades (1B.1) i es van incubar en absència o presència dels fàrmacs mencionats en l'apartat previ (Apartat 1C).

Per tal de determinar el nombre de cèl·lules adherides després de cada tractament, es va utilitzar la tinció amb cristall violeta. En primer lloc, es va retirar el medi i les cèl·lules adherides romanents es van tenyir amb cristall violeta al 0.2 % (pes/v) en 2% (V/V) d'etanol durant 30 min a temperatura ambient. A continuació, els pous es van rentar amb PBS 1X i després amb aigua destil·lada. Les plaques es van deixar assecar 24h i es va afegir Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) al 10% per tal de solubilitzar-les. L'absorbància de cada placa es va llegir a 595 nm utilitzant un lector de plaques espectrofotomètric. La supervivència es va calcular com el percentatge d'absorbància respecte les cèl·lules control no tractades.

2. TRANSFECCIONS

2.1. TRANSFECCIONS TRANSIENTS

Per tal de provocar la infra-expressió de proteïnes, es va utilitzar el sistema dels iRNA, concretament dels *small interfering* (siRNA) o dúplex d'oligonucleòtids iRNA. Els dúplex contra ERp57 i el control negatiu (RNAi Duplex Stealth™) es van obtenir d'Invitrogen (Praisley, UK). La seqüència escollida per a la silenciació de ERp57 va ser: **5'-GAAGCUAAAUCCAAGAAA-3'**.

Cèl·lules 231-BO2 es van transfectar amb el siRNA contra ERp57 o el siRNA control utilitzant Lipofectamine™ 2000 com a medi de transfecció (1.5 µg/ml). Les cèl·lules es van sembrar 24h abans a un 50-60% de confluència en plaques de 6 o de 24 pous, segons

convingués. L'oligo es va utilitzar a una concentració de 50 nM dissolt en aigua destil·lada estèril. La silenciació proteica es va seguir a 24, 48 i 72h per PCR semi-quantitativa (veure Apartat 3) i per Western Blot (veure Apartat 4).

2.2. TRANSFECCIONS ESTABLES

Les cèl·lules 231-BO2 es van marcar utilitzant un vector víric peGFP-CMV/Luc que indueix l'expressió de la luciferasa (Luc) i de la eGFP. El doble marcatge permet la selecció de les cèl·lules que expressen el vector (gracies a eGFP) així com el seguiment *in vivo* en l'animal d'experimentació (gracies a la bioluminescència). La construcció (Figura 11) va ser cedida pel Dr. Jerónimo Blanco (Degano et al., 2008).



Figura 11. Representació esquemàtica del vector lentiviral peGFP-CMV/Luc. L'expressió dels gens eGFP i Luciferasa es troba controlada per el LTR lentiviral i els promotors SV40 i CMV respectivament.

El procés de transfecció vírica es va realitzar en cèl·lules BO2 adherides durant 24h. El sobrenedant es va retirar i es van afegir 500 µL de sobrenedant víric junt amb polybrene a una concentració final de 8 µg/ml. El procés es va repetir dos cops més (cada 24h), i finalment es va avaluar l'eficiència de transfecció per observació de fluorescència en les cèl·lules. Les cèl·lules positives eGFP es van seleccionar per *cell sorting*.

Es va avaluar la capacitat bioluminescent de la població GFP⁺ escollida. Per això es van fer assajos d'activitat luciferasa *in vivo* (injecció de 5x10⁴ i 1x10⁵ cèl·lules en la pota del ratolí). Les cèl·lules es van expandir per ser transfectades de nou amb el vector de silenciació.

El short hairpin RNA (shRNA) es va generar utilitzant el sistema siSTRIKE U6 Hairpin Cloning (Promega). La seqüència codificant d'ERp57 es va analitzar en busca de llocs per al direccionament del iRNA utilitzant el siRNA Target Designer de Promega. La seqüència escollida va ser la següent: shERp57 (5'-GAGCTTACTGCATGTTTAT-3'). Aquesta correspon als

MATERIAL I MÈTODES

nucleòtids 2378-2396 del transcrit d'ERp57 (GI:67083697). De manera similar, els constructes control es van produir utilitzant versions scramble de la seqüència diana del shERp57 indicada anteriorment: shControl (**5'-GGACCCTTAAATGGTTTTT-3'**). Es van dissenyar primers al voltant d'aquestes seqüències (5'→3'):

shERp57 S: -ACCGAGCTTACTGCATGTTTATAAGTTCTCTATAAACATGCAGTAAGCTCTTTTTTC-

shERp57-AS: -TGCAGAAAAAGAGCTTACTGCATGTTTATAGAGAACTTATAAACATGCAGTAAGCT-

shControl-S: -ACCGGACCCTTAAATGGTTTTTAAAGTTCTCTAAAAACCATTTAAGGGTCCTTTTTTC-

shControl-AS: -TGCAGAAAAAGGACCCTTAAATGGTTTTTATAGAGAACTTAAAAACCATTTAAGGGTC-

Aquests primers es van lligar i insertar en la regió Pst1 del vector psiSTRIKE Neomycin (Figura 12) segons instruccions del fabricant. Les dues seqüències (shERp57 i shControl) es van comprovar en el GenBank per prevenir interaccions no desitjades amb altres transcrits de mRNA. Els plàsmids es van originar amb el protocol Qiagen MaxiPrep (Qiagen). La seva puresa i concentració es va confirmar per anàlisi espectrofotomètric amb NanoDrop i la qualitat del DNA, en gel d'agarosa.

Abans de transfectar, les cèl·lules BO2 peGFP-CMV/Luc es van testar per descartar contaminació per micoplasma. També es va calcular la concentració d'antibiòtic G-418 (Invitrogen) necessària per a la selecció de clons. Després dels assajos de citotoxicitat es va establir la dosi de 1 mg/ml de G-418 (neomicina).

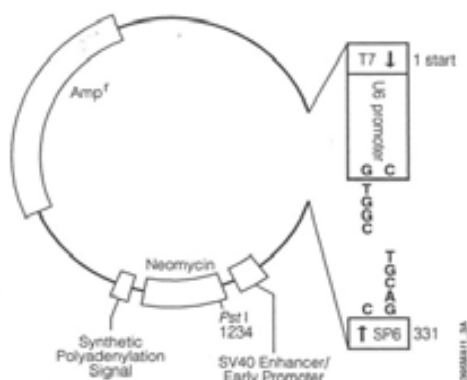


Figura 12. Mapa del Vector psiSTRIKE™ Neomycin (4560 bp). El vector psiSTRIKE conté el promotor U6 que és reconegut en cèl·lules eucariotes per la RNA polimerasa III per tal de transcriure petits RNAs, el gen que li confereix resistència a ampicilina (Amp^r) que permet la selecció en E. Coli i el gen de resistència a Neomicina.

MATERIAL I MÈTODES

Per a la silenciació estable, es van sembrar 2×10^5 cèl·lules BO2 per pou en placa de 6 pous. Es van deixar créixer dos dies i al tercer es van transfectar amb 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) en MCSS i 3 μg del vector control (pSiStrike/mERp57) o del vector que contenia la seqüència contra ERp57 (pSiStrike/hERp57). Al cap de 4 hores de silenciació, es va afegir un volum igual de MC 20% per tal de deixar les cèl·lules en 10% de SBF. Després de 16h, es va afegir neomicina a 1 mg/ml en MC 20%. El medi amb antibiòtic es canviava cada 3-4 dies fins que la majoria de cèl·lules que no havien incorporat el vector morien i es podien seleccionar els clons que sí l'havien incorporat.

Finalment, la selecció de clons shERp57 es va realitzar per dilució límit. Aquest mètode consisteix en la tripsinització de les cèl·lules resistents a l'antibiòtic i la seva posterior sembra en plaques de 96 a una dilució molt elevada, per tal de tenir una sola cèl·lula per pou. Aquesta tècnica permet el creixement de poblacions amb origen monoclonal. En el cas dels clons control, la selecció es va realitzar picant colònies ja que la seva distribució en la placa permetia el bon aïllament i amplificació d'aquestes poblacions monoclonals.

Durant el procés es van utilitzar diversos controls interns per validar l'eficàcia del procés de transfecció. En primer lloc, cèl·lules BO2 en MC 10% van servir per controlar el correcte estat i creixement d'aquestes cèl·lules. Per una altra banda, es van utilitzar cèl·lules BO2 crescudes en medi amb antibiòtic sense vector per tal de determinar la susceptibilitat a l'antibiòtic i per indicar el moment en què que les cèl·lules transfectades havien incorporat el vector. Finalment, també vam afegir un control intern amb lipofectamina però sense vector per assegurar-nos que la lipofectamina no era tòxica per les cèl·lules.

Els clons aïllats es van caracteritzar per Western Blot (Apartat 4) utilitzant l'amplificació de Neo com a control positiu de la presència del vector (Apartat 3B).

3. ANÀLISI D'EXPRESSIÓ GÈNICA

3.1. EXTRACCIÓ DE RNA i RT-PCR

L'anàlisi de la silenciació transient d'ERp57 es va fer per PCR. Es va aplicar TRIzol (Invitrogen) directament sobre les cèl·lules silenciades i es va seguir el protocol del fabricant (Chomczynski and Sacchi, 1987) per tal d'extreure el RNA total. La puresa i concentració de RNA es va avaluar utilitzant el NanoDrop i la seva qualitat, en gel d'agarosa 1% (SeaKen®LE Agarose, Cambrex).

Per a l'anàlisi de la silenciació d'ERp57 es va fer la transcripció inversa amb 300 ng de RNA total en un volum final de 20 µl. En cada reacció es van utilitzar per a cada mostra 4 µl de RT buffer 5X (Promega Corporation, WI), 2 µl de DTT (0.1 M), 10 µl de dNTPs (1 mM) (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) (1 mM), 0.1 µl de poliT (100 µM), 1 µl de M-MLV RT i 0.5 µl d'inhibidor de ribonucleases RNasin® (Promega Corporation, Madison, WI).

Les condicions de reacció van ser les següents: 1 h a 37 °C i 5 min a 95 °C. Com a control negatiu es va utilitzar aigua, en lloc de RNA.

3.2. PCR SEMI-QUANTITATIVA I REAL TIME

La reacció de PCR semi-quantitativa es va realitzar per tal d'avaluar el grau de silenciació gènica utilitzant ciclofilina com a gen de control (TAULA 1). En cada reacció es van utilitzar 2 µl de mostra amb 23 µl de MIX (16.3 µl d'aigua, 2.5 µl de tampó 10X, 3 µl de dNTPs, 0.5 µl de primer up i 0.5 µl de primer down, 0.2 µl de Taq polimerasa). L'especificitat dels productes es va validar utilitzant l'electroforesi de gels d'agarosa al 2%. El tamany dels fragments obtinguts es va determinar a partir del marcador Hae III.

2

Fase	T (°C)	Temps	Nº cicles
Desnaturalització inicial	94	4 min	1
Desnaturalització	94	30s	25-35
Hibridació	55-60	30s	25-35
Elongació	72	1 min	25-35
Elongació final	72	5 min	1

2

UE d'Enzimologia i de Bioquímica

2

Respecte als efectes de la temperatura sobre l'activitat enzimàtica, s'ha realitzat un experiment amb la fosfatasa alcalina (FA) de *Bacillus pasteurii*. Els resultats obtinguts són els següents:

Temperatura (°C): 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100
 Activitat (U/mg·min): 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0

Com es pot observar, l'activitat enzimàtica és zero a totes les temperatures estudiades. Això pot ser degut a diversos factors, com ara la inactivació de l'enzim durant el procés de purificació, la manca de substrat adequat o la degradació de l'enzim durant l'emmagatzematge.

2

2

2

2

Primers	Seqüència (5' → 3')	Tamany (bp)	T d'hibridació (°C)
ERp57	Fw: AAGCTCAGCAAAGACCCAAA Bw: CACTTAATTCACGGCCACCT	160	60
Ciclofilina	Fw: CTCCTTTGAGCTGTTTGACG Bw: CACCACATGCTTGCCATCC	310	55
Neo	Fw: CTGTGCTCGACGTTGTCAC Bw: CCGCTCAGAAGAAGTCGTC	280	60
GAPDH	Fw: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC Bw: GAAGATGGTGATGGGATTTC	265	55
Beta2-m	Fw: TTCTGGCCTGGAGGCTATC Bw: TCAGGAAATTTGACTTCCATTC	86	58
HLA-HC	Fw: CCTGGAGAACGGGAAGGAGA Bw: CTCAGGGTGAGGGGCT	309	60
HLA-A	Fw: C(C/T)TTGGAGCT(G/A)TG(A/T)TC(A/G)C Bw: AAGGGCAGGAACAACCTCTTG T	196	58
HLA-B	Fw: TCCTAGCAGTTGTGGTCATC Bw: TCAAGCTGTGAGAGACACAT	139	58
HLA-C	Fw: TCCTGG(C/T)TGTCCTAGCTGTC Bw: CAGGCTTTACAAGTGATGAG	150	58
TAP1	Fw: CGCCTCACTGACTGGATTCTAC Bw: TCCGTCTCCTGGCGCAGGAC	194	60
TAP2	Fw: GTCGTGTCATTGACATCCTG Bw: TCAGCTCCCCTGTCTTAGTC	228	55
TAPASINA	Fw: AGTGACACGACCCCGCGGG Bw: CAGGCCGCTGGCCATTTCCG	120	58
LMP2	Fw: TTGTGATGGGTTCTGATTCCCG Bw: CCATGTCGGCCACGGCTTGGG	141	60
LMP7	Fw: TCGCCTTCAAGTCCAGCATGG Bw: GCTGCACAGCCAGACATGGTGCC	139	60

EUFLULURU, el r, gE LuLNULg FULF nugu, EUFLULURU EUFLULURU

2

Rz 2021 2022

2

Rz-z 2021 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040

2021 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040

2021 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040

2021 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040

2021 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040

2021 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040

2021 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040

2021 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040

Q

Q Ràh Làcs RàRàVlt Et XpEls Q%+h -t Rrt SRe QXL t c-t pIX -g:RàVlt XRt cs-ùSIs QQ6%+++
s, n Bpslt d%+h -t Q WZQ' QàVIsRxp, Rsls RcaL EsRt RBit dRàVIXL t SRés Q)Q+2Q' Q

Components RIPA	Concentració final
NaCl (3M)	150 mM
Tritó X-100	1%
Deoxicolat	0.5 %
SDS (10%)	0.1 %
Tris-HCl pH=8 (1M)	50 mM

Components	Concentració final
DTT (1M)	3 mM
Aprotinina (5 mg/ml)	50 µg/ml
PMSF (0.2 M)	30 mM
Ortovanadat (100 mM)	1 mM
NaF (500 mM)	5 mM

Q

UE JhZU qper Bagu

Q

BzVz

Q Q Q QQQQQQ QQQQ QQ Q QQQ QQQ QQQ QQQ QQQ QQQ Q

Q

Q

Q mplt c-UXI X-gBR, sLcR3 RàRàVlt URSp-c-é It dRe QQQQQraGo QccAQQQTQs QQQs QQQ
9R-RsXR:QpRayàRSp-t dRà-t àcspXX-L àBRQUE s-Xit c'QQL XL t XRt csIX-gBR, sLcR3 RàRàVlt
BRcRsn -t Is Qn Ràpslt dQE àLsENtX-100 Ww+Et n 'QQL XLsE BRQle-EsIX-gRàVlt sRIe-í Is Qn E
B-qX-Lt àRs-IB RàBdeEón -t IQW'+%ùs(bq' Q

Q

Bzhz

Q Q Q QQQQQQ Q QQQQQQQQQQ QQQQQ Q QQQQQQ QQQ QQQ

Q

Q

QRsQQt NèQ, RsQ RàcRst Qd.c:RàVlt, Is c-sBR; +)W-QSQBòr/cslX cR, sLcR-XmpRàVlt
BRàt Ic psle-í Is RàXI dUt dW -t QYWQQRt Qt IàL qX-g-XIQRt Q)n RsXI, dL Rdt LéRà? sLcR3 Rà
RàVlt QR, Is Is Rrt SReQBò Xs-dn -BIQQQ QQQQQ)QQQ QVle? RsXRt dc SRQB RmpIc QRSLt àRQn It é
BRàRà? sLcR3 RàQt le-í IB RàQ)6W vRt Qv-BsRàB'Vh n 'QRàh Làcs RàRàVlt QXis sRSIs Qd
n l cR-/I? XL t XRt csl X-g -vL qn Q Ut le'Q QRqXcsL ULsRà? Rà? vi? Bps? I? cRsn R? Rt Q Qn , g
BQRqXcsL ULsRà-QQQQQQQQQWQ+Q)Bpslt dRQ) Ià BRàRà? sLcR3 Rà? RQRQXL t XRt csIB Ls:Q) Q
6; +Q)Bpslt dRQ) Ià? RQRQR, Is IB Ls'Q) RàL àh LqXpés àRàVlt BRcRsn -t l sQ, Is c-sBR
n l sXIB LsRRRQQRQ) sRàcl-t RBQd t ULsBQv-csLRt :QIt Q-RSL:Q)QV?

5. TINCIONS

5.1. TINCIONS LIPÍDIQUES

Es van utilitzar dos tipus de tincions per tal de veure tant els nivells com la distribució de lípids en les cèl·lules.

Nile Red (9-diethylamino-5H-benzo[a]phenoxazine-5-one): És una molècula que s'utilitza en la detecció de lípids ja que s'hi uneix amb alta afinitat i especificitat (Greenspan et al., 1985). Addicionalment, mostra alta sensibilitat al grau d'hidrofobicitat que resulta en un viratge de l'espectre d'emissió del vermell característic dels lípids polars, al groc dels lípids no-polars (Diaz et al., 2008).

Es van sembrar 6×10^4 cèl·lules en plaques de 24 que contenen cobreobjectes recoberts de gelatina al 2%. 24h després, les cèl·lules es van fixar en paraformaldehid (PFA) 4%, es van rentar amb PBS 1X i es van tenyir amb Nile Red (Sigma) a una concentració final de $1 \mu\text{g/ml}$ en PBS 1X durant 1 h. Els cobreobjectes es van muntar sobre portaobjectes utilitzant Vectashield (Vector Laboratories) marcat amb DAPI, per tal d'observar els nuclis.

Filipin: És una molècula que es fixa al colesterol lliure de la cèl·lula. La intensitat de la tinció és proporcional als nivells de lípids intracel·lulars. El procediment per a la tinció va ser el mateix que per al Nile Red, però sembrant 8×10^4 cèl·lules i utilitzant Filipin (Sigma) a una concentració final de $20 \mu\text{g/ml}$ en PBS 1X durant 2 h. Els cobreobjectes es van muntar com ja s'ha descrit però utilitzant Vectashield sense DAPI, ja que Filipin emet en la regió de l'UV. Les preparacions es van analitzar en el microscopi Olympus BX60 (Olympus, Japó), utilitzant els filtres adequats i magnificació de 40 o 60X.

La quantificació de les imatges es va realitzar amb el software ImageJ, quantificant la densitat integrada (Int Dens) en una àrea constant i dividint pel nombre de cèl·lules en aquella àrea. Els valors es van representar com la mitjana de fluorescència per cèl·lula (Int Dens/cell).

5.2. IMMUNOTINCIONS

5.2.1. *Microscòpia de fluorescència i confocal*

Per als experiments de microscòpia de fluorescència i/o confocal, es van sembrar $60-150 \times 10^3$ cèl·lules en plaques de 24 o 6 pous que contenien cobreobjectes. Els cobreobjectes s'havien recobert prèviament amb gelatina al 2%. El protocol es va adaptar segons si es detectava antigen de membrana o intracel·lular.

Per a la **detecció d'antígens intracel·lulars**, les cèl·lules es van rentar amb PBS 1X i es van fixar amb PFA 4% fred durant 15 min a 4°C. A continuació es va bloquejar i permeabilitzar amb SBF 20% en PBS 1X que contenia Tritó X-100 0.2% durant 45 min a temperatura ambient. La incubació amb l'anticòs primari es va realitzar durant 1.5 h a la concentració adequada. Es van fer 3 rentats amb PBS 1X i es va incubar durant 35 min amb l'anticòs secundari fluorescent pertinent (TAULA 9).

Per a la **detecció d'antígens de membrana**, es va rentar amb PBS 1X i es va procedir al bloqueig i incubació amb l'anticòs primari. Aquest es va diluir a la concentració pertinent en PBS1X amb SBF al 5% durant 1.5 h a 4°C. Es van fer 3 rentats amb PBS 1X i es va fixar en PFA 4% com ja s'ha indicat. Després de 3 rentats en PBS 1X, es procedia a la incubació amb el secundari com s'ha descrit prèviament (TAULA 9).

Els cobreobjectes es van muntar com s'ha descrit en l'apartat anterior 5A. Les preparacions es van analitzar en un microscopi Olympus BX60. En tots els casos, com a control negatiu es van utilitzar les cèl·lules incubades només amb l'anticòs secundari a la concentració de treball, sense anticòs primari.

En el cas concret de detecció de vimentina, la fixació es va realitzar amb metanol fred durant 2 minuts i es van rentar les cèl·lules varies vegades amb PBS 1X fins eliminar totes les restes de metanol. A partir d'aquí, es va procedir com ja s'ha descrit.

Per a l'**anàlisi confocal de co-localització**, es va utilitzar un sistema de visualització *laser-scanning* Nikon C1-Si (Nikon Inc), muntat sobre un microscopi invertit Nikon Ti-E. La quantificació es va fer utilitzant el programa ImageJ. En primer lloc es van seleccionar els

plans d'interès per a cada imatge i es va restar el fons. A continuació, es va determinar el llindar de positivitats en els dos canals (vermell i verd). Aquests valors s'aplicaven per igual a totes les imatges. A continuació es procedia a l'anàlisi de co-localització dels dos canals, aplicant una ratio del 50% i els valors mínims dels llindars determinats anteriorment per a cada canal. Aquest pas crea una imatge en blanc i negre que conté els pixels on co-localitzen els dos canals. Aquesta màscara s'aplica sobre la imatge original, obtenint dos valors: el percentatge d'intensitats del vermell que colocalitzen amb el verd en l'àrea d'interès i el contrari. En el nostre cas, vam representar el percentatge de verd (HLA I) que co-localitzava amb el vermell (ERp57).

Per a les **tincions mitocondrials** es va utilitzar el mitotracker green (Molecular Probes® Invitrogen M-7514) a 100 nM en Medi Complet 10%. Les cèl·lules es van incubar durant 30 min, es van rentar amb medi complet i es van analitzar per microscòpia confocal sense fixar. Per a la presa d'imatges, es va utilitzar el microscopi confocal SP2 Leica amb un objectiu de 63X. Com a làser d'excitació es va utilitzar un làser d'argó (488 nm) i es va detectar l'emissió a 500-540. La quantificació de l'elongació i interconnectivitat mitocondrial es va realitzar amb el programa ImageJ seguint el mètode descrit (Dagda et al., 2009).

Breument, el canal verd es va passar a escala de grisos, es va invertir per tal de mostrar la fluorescència específica de mitocondris com a pixels negres i es va fixar el llindar entre 90 i 100 per tal de resoldre mitocondris de manera individual. Es va utilitzar la funció *Analyze particles*, per a l'estudi dels paràmetres circularitat, àrea i perímetre mitocondrial. L'elongació es va definir com la inversa de la circularitat, mentre que la interconnectivitat mitocondrial es va calcular com la ratio area/perímetre. En ambdós casos es va utilitzar un anàlisi de freqüències per tal de definir l'abundància de cada fenotip o interval de valors definit i es va calcular el percentatge en front del total de mitocondris analitzats. Els fenotips establerts corresponen als fenotip fragmentat, intermig i tubular. No es van tenir en compte els valors de circularitat de 1 per tal de minimitzar els errors del programa en la identificació mitocondrial. Es van analitzar una mitjana de 90 cèl·lules per cada línia.

5.2.2. Immunocitoquímica

Es van realitzar immunotincions en cèl·lules, utilitzant anticossos secundaris no fluorescents que requerien d'un tipus de revelat específic. Per a aquest tipus de tinció, es van realitzar citospins amb les línies cel·lulars 231 i BO2, carregant 500 µl d'una suspensió de 5×10^4 cèl·lules/ml i centrifugant la mostra a 1000 rpm durant 3 min. Els portaobjectes es van assecat i fixar en acetona durant 5 min.

Els anticossos utilitzats contra diferents subtipus d'HLA I apareixen a la TAULA 9. El revelat es va realitzar amb el Sistema de Detecció Novolink Polymer (Leica Microsystems Inc., Bannockburn, USA)

Per a la quantificació, les cèl·lules marcades van ser analitzades per dos examinadors diferents i l'expressió d'HLA tipus I va ser determinada per a cada anticòs seguint els següents paràmetres: la reactivitat amb els diferents anticossos monoclonals es va graduar (segons el HLA & Cancer Component of the 12th IHW (Garrido et al., 1997) com a negatiu quan <25% de cèl·lules estaven marcades, com heterogènia entre 25-75% de cèl·lules marcades, o bé positiva si >75% de cèl·lules estaven tenyides. Els resultats es van etiquetar com a marcatge altament positiu (+++), mitjà (++) i poc positiu (+) quan el marcatge cel·lular era fluix però encara superior al control negatiu, on normalment s'utilitza sèrum no-immune en lloc d'anticòs específic.

5.2.3. Citometria de flux

La tècnica de la citometria de flux es va utilitzar com a eina quantitativa del marcatge fluorescent i, per tant, com a quantificació de l'abundància de la proteïna d'interès.

El protocol seguit va ser el mateix que l'aplicat pel cas de la immunofluorescència (IF), excepte que per a l'antigen de membrana les cèl·lules es van fixar després de les incubacions amb els anticossos.

L'anàlisi per citometria es va realitzar en un FACSCalibur (Becton Dickinson) i les dades es van analitzar amb els programes CellQuest Pro i FlowJo. Per a cada línia cel·lular es

van utilitzar dos tipus de control negatiu: cèl·lules sense marcar, com a control d'autofluorescència, i cèl·lules incubades només amb l'anticòs secundari. Aquest darrer control servia per fixar els *settings* de l'instrument per a cada experiment. Els valors de MFI del control negatiu es van restar dels valors de MFI de cada anticòs per a cada línia cel·lular. Per tal de comparar dades de diferents experiments, es van normalitzar tots els valors pels de la línia parental (435-P o 231, segons l'experiment).

6. ANÀLISIS METABÒLICS

6.1. ESPECTROSCÒPIA RAMAN

Per a l'anàlisi d'àcids grassos es va utilitzar la tècnica d'espectroscòpia Raman (RS) en col·laboració amb el grup del Dr. Petrov (ICFO). RS és una tècnica òptica que utilitza la dispersió inelàstica de fotons per tal de descriure enllaços moleculars específics (Freudiger et al., 2008). Quan una mostra s'il·lumina amb un feix òptic, una petita porció de fotons es dispersa de forma inelàstica degut als enllaços intramoleculars presents. Quan això succeeix, un fotó cedeix energia a, o bé rep energia de la molècula, produint un canvi en l'estat vibracional d'aquesta. Quan el fotó s'escapa de la mostra presenta un nivell energètic alterat i, per tant, una longitud d'ona alterada. Aquest canvi energètic es coneix com a *Raman shift* i és específic de cada tipus d'enllaç químic; així, cada molècula té el seu propi espectre Raman, un gràfic on es representa la intensitat del *Raman shift* com a funció directa de la composició molecular del material que s'està estudiant.

El Raman és una tècnica no-destructiva que no necessita cap tipus de tinció i que permet l'anàlisi directe de mostres biològiques tant *in vitro* com *ex vivo* (Min et al., 2011; Popp et al., 2011). Aquestes característiques la fan una tècnica ideal per a múltiples aplicacions biomèdiques, com en el camp del càncer, degut a la seva habilitat per detectar DNA/RNA, proteïnes o lípids i que, per tant, permet el seguiment de canvis cel·lulars.

Les cèl·lules es van sembrar en plaques de Petri que contenien un cobreobjectes #0 i, després de 48h en medi amb glucosa o sense (4.5 o 0 mg/ml, respectivament) es van fixar en PFA 4% com ja s'ha descrit a la secció 5B.1 i es van mantenir en PBS 1X per l'anàlisi.

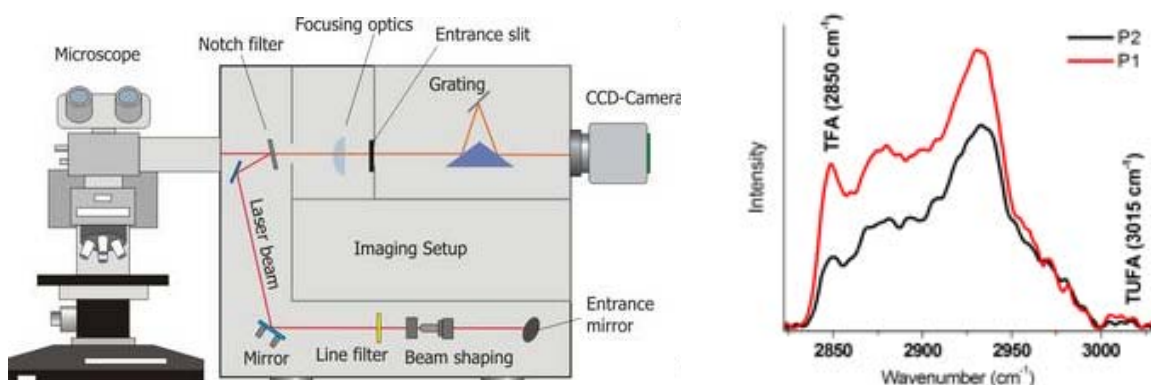


Figura 13. Esquema de microscopi Raman i d'espectre obtingut. Esquerra: Microscopi Raman InVia (Renishaw) amb un feix làser de 514nm centrat en un objectiu de 60X i 9mW de potència. Dreta: Exemple d'espectres crus mostrant les bandes de TFA (2853 cm⁻¹) i TUFA (3015 cm⁻¹) en dues poblacions de cèl·lules 435P.

El sistema Raman utilitzat és un inVia Renishaw (Apply Innovation, Gloucestershire, UK) amb un làser de 514 nm que produeix un feix d'excitació d'aproximadament 10 mW de potència. Aquest làser s'enfoca a la mostra amb un microscopi que té un objectiu de 60X (Edmund, York, UK) i utilitza una configuració *backscatter*. Les mesures es van realitzar en la regió citoplasmàtica de les cèl·lules i també fora de la cèl·lula (PBS 1X), com a control de que les mesures no presentaven interferències. L'espectre Raman es va enregistrar en un dispositiu CCD (*charge-coupled device*) que funciona com a detector (Renishaw RenCam). L'espectre enregistat s'analitza posteriorment amb el programa Renishaw WiRE que permet fixar els paràmetres d'interès.

Als espectres obtinguts se'ls va restar el fons amb el programa Labview segons el mètode establert (Mikhailyuk and Razzhivin, 2003) i es van realitzar els *Gaussian fits* per a la banda de TFA (2853 cm⁻¹) o TUFA (3015 cm⁻¹) amb el programa Matlab (Freudiger et al., 2008). Aquesta tècnica espectroscòpica va permetre la quantificació d'àcids grassos totals o *Total Fatty Acids* (TFA) i d'àcids grassos insaturats totals o *Total Unsaturated FA* (TUFA) en el citoplasma. La quantificació es va realitzar utilitzant l'alçada de la banda.

1

L'objectif principal de cette étude est de déterminer l'impact de la supplémentation en carnitine sur le métabolisme des lipides et la production d'énergie dans les mitochondries. Les participants ont été recrutés à l'hôpital et ont été randomisés dans deux groupes : un groupe de traitement recevant de la L-carnitine et un groupe de placebo. Les données ont été recueillies pendant une période de quatre semaines. Les résultats ont montré que la supplémentation en carnitine a entraîné une augmentation significative des niveaux de carnitine dans le sang et une amélioration de la capacité aérobie. Cependant, aucune différence n'a été observée concernant la composition corporelle ou la pression artérielle. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que la carnitine joue un rôle important dans le transport des acides gras vers les mitochondries pour la production d'énergie. Les implications de ces résultats pour la santé humaine nécessitent des études supplémentaires.

2

7.2.1

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES

3

Les résultats de l'étude indiquent que la supplémentation en carnitine a entraîné une augmentation significative des niveaux de carnitine dans le sang et une amélioration de la capacité aérobie. Cependant, aucune différence n'a été observée concernant la composition corporelle ou la pression artérielle. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que la carnitine joue un rôle important dans le transport des acides gras vers les mitochondries pour la production d'énergie. Les implications de ces résultats pour la santé humaine nécessitent des études supplémentaires.

4

L'objectif principal de cette étude est de déterminer l'impact de la supplémentation en carnitine sur le métabolisme des lipides et la production d'énergie dans les mitochondries. Les participants ont été recrutés à l'hôpital et ont été randomisés dans deux groupes : un groupe de traitement recevant de la L-carnitine et un groupe de placebo. Les données ont été recueillies pendant une période de quatre semaines. Les résultats ont montré que la supplémentation en carnitine a entraîné une augmentation significative des niveaux de carnitine dans le sang et une amélioration de la capacité aérobie. Cependant, aucune différence n'a été observée concernant la composition corporelle ou la pression artérielle. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que la carnitine joue un rôle important dans le transport des acides gras vers les mitochondries pour la production d'énergie. Les implications de ces résultats pour la santé humaine nécessitent des études supplémentaires.

KRBH	400 µl
[1- ¹⁴ C] Palmitat 2.5 mM	50 µl
Glucosa 50 mM + 8 mM carnitina	50 µl

5

6

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES

7

?

Le XL t ct Sp d t le BR à è à Rt Re ...

Table with 2 columns: Component and Volume. Rows include KRB 5X (20 ml), NaHCO3 100 mM (2 ml), HEPES 1 M pH 7.4 (1 ml), and H2O destil·lada (77 ml).

UE d J ...

?

Le XL t ct ...

Table with 2 columns: Component and Weight/Volume. Rows include NaCl (19.72 g), KCl (0.67 g), NaH2PO4 (0.17 g), MgSO4 (0.25 g), CaCl2 (0.55 g), and H2O destil·lada fins (500 ml).

?

UE d J ...

Le XL t ct ...

Rà, stà BR L àis ...

MATERIAL I MÈTODES

4.5 h en un incubador a 37°C sense CO₂. Durant aquest temps, el CO₂ produït en l'oxidació passa a través dels forats del parafilm impregnant el Whatman en reaccionar amb el KOH. Per avaluar les possibles fugues de gas a través del sistema, en cada experiment es col·loquen pous sense mescla radioactiva i es compta la radioactivitat adherida al paper Whatman. Si apareix una quantitat significativa de radioactivitat, l'experiment es descarta degut a la presència de difusió de gas entre pous.

Passat el temps d'incubació, es van injectar a través del parafilm 100 µl d'àcid perclòric 40% i ràpidament es va col·locar una altra peça de parafilm sobre el pou i es va ajustar. D'aquesta manera, el CO₂ que comença a desprendre's no s'escapa pel forat realitzat amb la xeringa. Es torna a col·locar la tapa i es deixa tota la nit perquè tot el CO₂ quedi atrapat al paper. Degut a l'acció de l'àcid perclòric cal posar pous extrems en els que no es realitzi l'oxidació i que serveixen per a la determinació de la concentració proteica.

Al dia següent, la peça de paper Whatman es va col·locar en vials amb 5 ml de líquid de centelleig i es van comptar durant 1 min. Per a cada línia cel·lular, es va incloure un pou per a la quantificació de la concentració de proteïna; així, les cèl·lules es van recollir amb 250 µl de tampó de llisi i es van quantificar com ja s'ha descrit (Apartat 4B).

Els resultats s'expressen com:

$$\text{nmol palmitat} \times \text{mg}^{-1} \text{ prot} \times \text{h}^{-1} = (\text{cpm mostra} - \text{cpm blanc}) \times 125 / (\text{cpm totals} \times \text{mg prot} \times \text{h})$$

on 125 són els nmols de palmitat per pou, cpm totals són les comptes resultants de comptar directament 50 µl de palmitat radioactiu utilitzat per pou i h és el temps d'incubació en hores.

7. EXPERIMENTACIÓ *IN VIVO*

7.1. MANTENIMENT ANIMAL

Per als experiments *in vivo* es van utilitzar ratolins SPF (animals lliures de patògens) del tipus NOD/SCID (Charles River). Tots els animals eren femelles amb un pes entre 22 i 25 g. Els animals es van mantenir estabulats en gàbies apilades en un rack individual ventilat tipus IIL (IVC) de la casa Allentown que compleix la normativa vigent. Els ratolins es van mantenir en gàbies amb menjar i beguda *ad libitum* a una temperatura de 20-22 °C, humitat relativa del 60-70% i amb cicles llum/fosc de 12h, a l'estabulari de l'IDIBELL. La neteja de les gàbies així com la revisió veterinària es va realitzar de manera setmanal i complint la normativa establerta per la AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International).

7.2. INDUCCIÓ DE METÀSTASIS ÒSSIES

Les cèl·lules shERp57BO2C21, shERp57BO2C32 i shBO2/GFPCT4 (n=7 per a cada línia) es van injectar en la vena de la cua amb una xeringa d'insulina i agulla de 30G a una concentració de 1×10^6 cèl·lules en 0.10 ml HBSS. El seguiment de les metàstasis òssies es va realitzar per bioluminescència com es detalla a l'apartat 7C.

A temps final de l'experiment, els animals es van sacrificar i es van preservar ossos i pulmons tal i com s'explica a l'apartat 8A. L'experiment es va realitzar sota l'aprovació del comitè ètic d'experimentació amb animals.

7.3. SEGUIMENT DE METÀSTASIS ÒSSIES

Per tal de valorar la capacitat metastàtica de les cèl·lules transfectades, es va realitzar el seguiment mitjançant la mesura no invasiva de bioluminescència (BLI). Aquesta tècnica permet el monitoratge del creixement cel·lular a través d'una reacció catalitzada per la Luciferasa en la qual s'alliberen fotons.

7.3.1. Obtenció d'imatges de bioluminescència

Els animals es van controlar fins a l'aparició de símptomes de metàstasis cada 3-4 dies i un cop detectades les metàstasis, el seguiment es va fer de manera setmanal.

Per tal de fer el seguiment de les metàstasis, es va administrar als ratolins el substrat de la luciferasa, la luciferina, abans de cada mesura (Caliper, 150 mg/kg en PBS1X). 5 min després de la injecció, els ratolins s'anestesiaven amb una mescla d'O₂ (2.0 L/min) i isofluorà (4.0 L/min durant la inducció, 2.0 L/min durant la obtenció d'imatges). L'aparell de medicació està unit al sistema d'anestèsia que permet prendre la imatge del ratolí controlant també la temperatura dins l'aparell. Per tant, un cop adormits, els ratolins es col·locaven boca amunt sobre la plataforma de l'aparell de mesura de BLI (LI4 Ivis Lumina XR, Caliper). Les mesures es feien a cos sencer de l'animal. Totes les imatges es van prendre aproximadament a partir dels 10 minuts posteriors a la injecció de la luciferina, temps on el senyal és màxim.

Inicialment es prenia una imatge fotogràfica de referència que servia per validar la posició de l'animal. A continuació, sense moure l'animal, es prenia la imatge bioluminescent durant 3 minuts en condicions d'alta sensibilitat de detecció (*small binning*). D'aquesta manera s'aconsegueix augmentar la relació senyal/soroll per a cada píxel.

7.3.2. Anàlisi i quantificació de la bioluminescència

Previ a l'experiment amb animals, es va mesurar la bioluminescència de cada una de les línies cel·lulars *in vitro*. Per això es van fer rectes de regressió sembrant 500, 1000, 2500, 5000 cèl·lules i mesurant els nivells de BLI. Per a l'anàlisi *in vitro*, la concentració de luciferina requerida és de 150 µg/ml en Medi Complet. Les imatges es van prendre a temps curts (15, 30, 45 i 60s) després d'una breu incubació de 5 min.

Per a l'anàlisi i quantificació de les imatges es va utilitzar el software d'anàlisi Living Image 4.0 (Caliper). Les dades finals es van expressar com a regressió lineal dels ph/s detectats en front del nombre de cèl·lules.

Pel que fa a l'anàlisi de les dades de BLI en animals, es van delimitar regions d'igual àrea (ROI, *region of interest*) englobant les potes dels animals i es va quantificar la intensitat del senyal en aquestes regions. Tots els paràmetres d'ajust de la càmera, temps d'exposició, distància entre la lent i els animals i l'indar de quantificació es va mantenir constant per a totes les imatges. Com que les àrees o ROIs delimitats eren iguals per a tots els animals, es va utilitzar per a la quantificació el paràmetre Flux Total de Fotons.

Els valors de luminescència es van dividir per 1000 i es va aplicar el \log_{10} . Degut a les diferències intrínseques en BLI entre línies, es va normalitzar la llum emesa pel nombre de cèl·lules utilitzant la corba de regressió *in vitro* descrita anteriorment. D'aquesta manera, finalment es va representar el logaritme del nombre de cèl·lules (mitjana dels animals del grup) en front del temps després de la injecció. Les comparacions estadístiques es van establir sempre comparant cada un dels clons amb les cèl·lules control (proba T student).

7.3.3. Radiografia de metàstasis òssies

Les lesions osteolítiques es van seguir per radiografia amb el mateix aparell en la regió inferior de l'animal. Només es van fer dues mesures, a dia 45 i a dia 54. Les lesions osteolítiques es van identificar com a regions no brillants en l'os. Finalment, els animals es van sacrificar a dia 67 i els teixits (ossos i pulmons) es van preservar tal i com s'explica a la secció 8.A.

8. HISTOLOGIA

8.1. PRESERVACIÓ DE TEIXITS

Després de la necròpsia, i previ a qualsevol tipus de tinció, els teixits experimentals (pulmons) es van fixar en formaldehid 4% tota la nit. Pel cas de les potes dels animals, i abans de la inclusió en parafina, els ossos van ser tractats amb HNO_3 al 5% durant 24h. Els ossos es van col·locar en càpsules adients i es van rentar durant 1h amb aigua corrent de l'aixeta per eliminar els excessos d'àcid. Finalment, es van incloure en parafina.

8.2. HEMATOXILINA-EOSINA

Seccions de 4 µM de gruix es van desparafinar i hidratar (Xilol 100% 10 min (3 cops), Etanol 100% 5 min (3 cops), Etanol 96% 5 min (3 cops), Etanol 70% 5 min (2 cops) i aigua destil·lada (5 min)) i es van tenyir amb Hematoxilina (Sigma MHS32) durant uns 4 min aturant la tinció amb aigua de l'aixeta (5 min). A continuació, es va procedir a la tinció amb Eosina (Sigma HT110232) entre 1.5-2.5 min i es va fer un rentat ràpid en aigua per aturar la reacció. Les seccions es van deshidratar (Etanol 70% 5 min, Etanol 96% 5 min (3 cops), Etanol 100% 5 min (3 cops), Xilol 100% 10 min)) i es van muntar en DPX (BDH UN1307). Les mostres es van visualitzar en un microscopi d'epifluorescència Nikon 80i/Nikon Ds-Ri1 controlat pel software Nis-Elements (Br).

8.3. IMMUNOHISTOQUÍMICA

Les tincions immunològiques es van portar a terme en seccions de 4 µM parafinades. En primer lloc, les seccions es van desparafinar i rehidratar, com es detalla en la secció anterior. Per al desemascament de l'antigen, les mostres es van bullir 7 min en una olla a pressió en tampó citrat sòdic (10 mM, pH=6). Després de refredar-se a temperatura ambient en la mateixa solució (20 min), es van rentar 5 min amb aigua destil·lada. Per tal de desactivar les peroxidases endògenes, les mostres es van incubar 10 min en H₂O₂ al 6% (v/v). A continuació es van rentar en aigua destil·lada (5 min) i es van permeabilitzar amb una solució 0.1% tween 20 en PBS 1X (10 min). Les mostres es van bloquejar durant 2 h a 4°C en una cambra humida i a les fosques amb la solució adequada (PBS 1X-Tween 0.1% amb BSA al 3%) i a continuació es va rentar amb PBS 1X-Tween 0.1% durant 10 min (2 cops). La incubació amb els anticossos primaris adients (TAULA 9) es va realitzar durant 16h a 4°C. Després d'un rentat amb PBS 1X-Tween 0.1% (10 min), es va incubar amb l'anticòs secundari biotinitat corresponent (kit *DakoCytomation LSAB+system HRP* K0690). Es va fer un rentat i es va revelar amb un kit que conté diaminobenzidina com a substrat (*Dako DAB+Chromogen, DAB+Substrate buffer* K3468). La reacció es va aturar submergint en una cubeta amb aigua. Per acabar, es va realitzar una contratinció amb Hematoxilina, es va deshidratar i es va muntar amb DPX (veure secció anterior).

Les mostres es van visualitzar en un microscopi d'epifluorescència Nikon 80i/Nikon Ds-Ri1 controlat pel software Nis-Elements (Br). Com a control negatiu de la tècnica s'utilitza una mostra que no ha estat incubada amb anticòs primari.

9. ANÀLISI ESTADÍSTICA

En el cas de l'**experimentació *in vitro***, tots els experiments es van fer com a mínim 3 cops i els resultats de supervivència cel·lular en diferents condicions metabòliques, d'oxidació d'àcid gras i quantificació dels WB es representen com a mitjana \pm error típic (SEM). En totes les ocasions es va aplicar la prova T (Excel) per tal de determinar les diferències significatives. Es va considerar com a significatiu el p-valor inferior o igual a 0.05.

En el cas dels **experiments *in vivo***, també es va aplicar la prova T comparant cada clon de silenciament respecte el control i es va considerar el mateix llindar de significació.

MATERIAL I MÈTODES

Anticòs	Casa comercial	IF/IHC	WB	Citometria
ERp57	ACris, Germany	1/400, 1/1000	1/2000	1/300
HLA I, clone MEM-147	ExBio, Praha, Czech Republic	1/200	1/100	1/200
alpha-tubulin, clone B-5-1-2	Sigma, Saint Louis, Missouri		1/10000	
beta-tubulin, clone H-235	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA		1/500	
beta-actin	Abcam, Cambridge, UK		1/50000	
Vimentin, clone RV 202	Abcam		1/500	
Stathmin 1, C-terminus	Sigma	1/500	1/500	
CD3 PE, clone UCHT1	BD Biosciences, San José, CA			20µl/test
CD56 FITC, clone MEM-188	BioLegend, San Diego, CA			20 µl/test
PCNA, clone PC10	Santa Cruz Biotechnology	1/50		
Caspase 3	Cell Signaling	1/200		
W6/32, anti HLA-ABC	(Barnstable CJ et al 1978)	*		
L-368, anti β2m	(Lampson LA et al 1983, López-Nevot MA 1986)	*		
1082C5, anti HLA-A locus	(Lozano F et al 1989)	*		
42-IB5, anti HLA-B locus	(Lozano F et al 1990)	*		
HC-10, anti HLA-BC free heavy chain	(Stam NJ et al 1990)	*		
SRF-8, anti HLA-Bw6	(Radka SF et al 1982)	*		
LC3	MBL, Woburn MA		1/2000	
ACOT7	Abcam		1/1000	
SREBP1c	Abcam		1/500	
LXRα	PPMX, Tokyo, Japan		1/1000	
Mfn1	Santa Cruz		1/1000	
Mfn2	Abcam		1/1000	
VDAC	Abcam		1/5000	
Peroxidase conjugated anti-rabbit secondary Ab	Amersham		1/2000	
Peroxidase conjugated Antimouse secondary Ab	Pierce, Perbio Science Ltd., Cheshire, U.K		1/2000	
Alexa Fluor® 555 anti-rabbit	Invitrogen	1/1000		
Alexa Fluor® 488 anti-mouse	Invitrogen	1/500		1/500
Alexa Fluor® 647 anti-rabbit	Invitrogen			1/2000

TAULA 9: Anticossos utilitzats

RESULTATS

RESULTATS

RESULTATS

1. Causa-efecte de la proteïna regulada per glucosa ERp57 com a txaperona multifuncional en la metàstasi òssia.

ERp57, també coneguda com PDIA3, GRP58, Erp60 o Erp61, és una tiol oxidoreductasa de la família de les disulfur isomerases. És una txaperona responsable del correcte plegament de noves glicoproteïnes sintetitzades al Reticle Endoplasmàtic (RE) i s'ha descrit com a peça clau en l'ensamblatge del Complex Major d'Histocompatibilitat tipus I en la ruta endògena de presentació d'antigen (Turano et al., 2011). ERp57 és necessària tant en estadis inicials del plegament (amb funció catalítica) com en estadis finals de càrrega d'antigen, amb funció estructural dins el complex conegut com Complex de Càrrega de Pèptid o PLC (Coe et al., 2010). El paper d'ERp57 en càncer ha estat poc explorat, amb rols oposats en diferents tipus de tumors (Leys et al., 2007; Liao et al., 2011).

L'expressió diferencial d'ERp57, augmentada en cèl·lules altament metastàtiques a os respecte les cèl·lules parentals, identificava ERp57 com un dels reguladors principals en una xarxa d'interacció proteica de metàstasi òssia. Aquest fet suggeria que ERp57 podia ser una proteïna cabdal en el creixement òrgan-específic de les cèl·lules de càncer de mama amb habilitat per créixer a l'os. La disposició central en el network d'interacció proteïna-proteïna era indicativa de que la seva funció estava associada a varies estructures intracel·lulars (veure apartat Antecedents) com proteïnes de sistema immune (HLA I, infraexpressat), i citoesquelet i adhesió (vimentina, infraexpressada).

1.1. Identificar el paper d'ERp57 com a regulador principal d'una xarxa d'interacció proteica integrant la funció de sistema immune i citoesquelet

La xarxa d'interacció proteica de la metàstasi òssia mostrava una infraexpressió de molècules d'HLA I associades a una sobre-expressió d'ERp57. En primer lloc, vam voler confirmar aquestes dades amb una tècnica alternativa, utilitzant el model cel·lular emprat per a la comparació per 2DE-DIGE: el model de metàstasi òssia MDA-MB-231-BO2 (BO2) i la línia parental de la qual derivava, MDA-MB-231 (231).

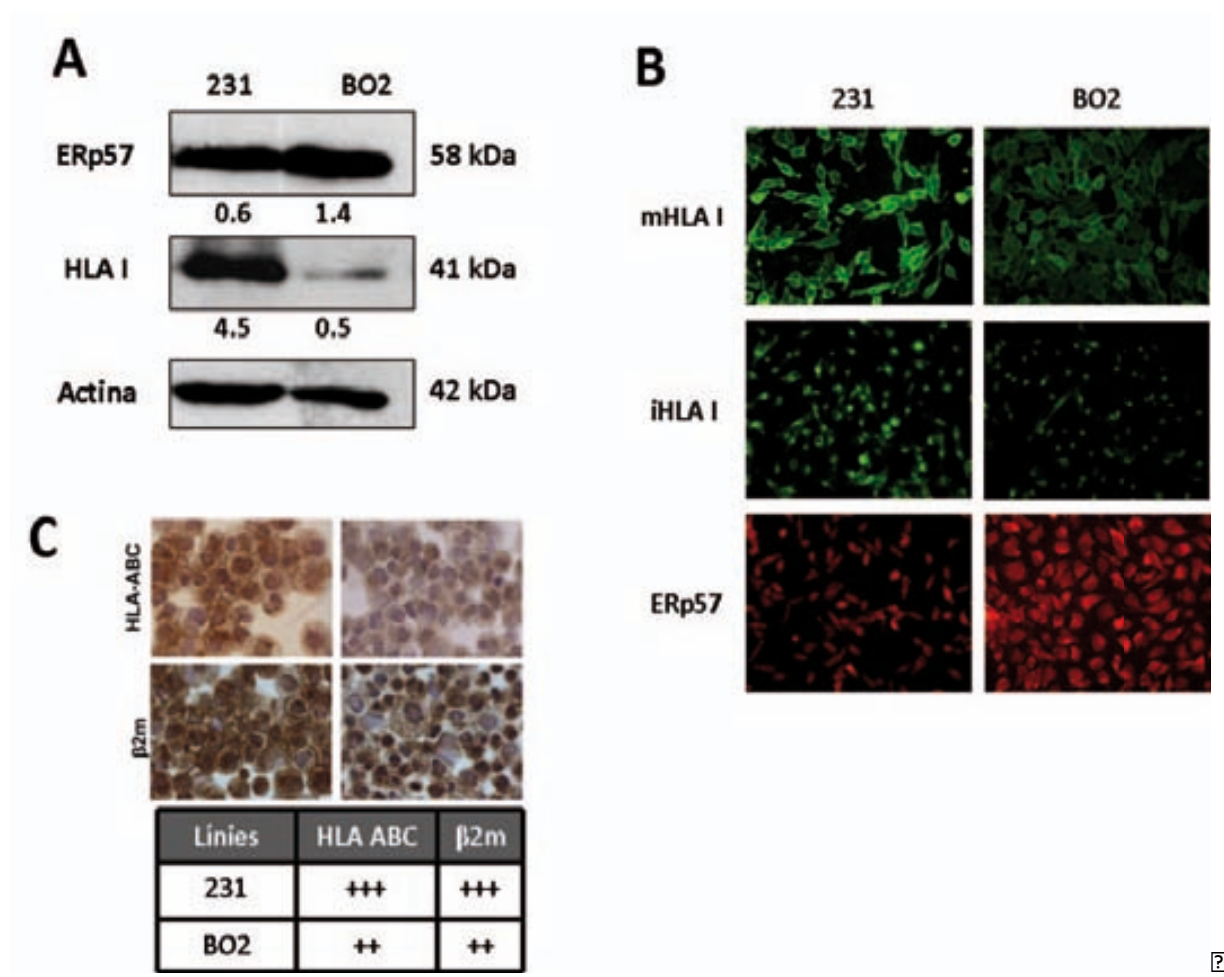
RESULTATS

Vam analitzar per WB l'expressió d'ERp57 i HLA I en extractes totals de proteïna de les línies 231 i BO2. ERp57 se sobre-expressava en BO2 fins a nivells de gairebé el doble comparat amb la línia parental (Figura 14A). Per a l'anàlisi d'expressió d'HLA I per WB es va utilitzar un anticòs que només reconeix HLA-B i HLA-C, de manera similar al W6/32. Aquestes formes d'HLA I es trobaven infra-expressades en BO2 en comparació amb 231 (Figura 14A), demostrant la relació inversa entre HLA I i ERp57.

L'expressió d'ERp57 i HLA I també es va validar per IF. La tinció contra ERp57 mostrava una clara sobreexpressió de la proteïna en BO2 comparat amb 231 (Figura 14B). Per tal d'examinar la distribució i expressió d'HLA I, es van realitzar tincions en dues condicions: permeabilitzant (HLA intracel·lular o iHLA I) i sense permeabilitzar (HLA de membrana o mHLA I) les cèl·lules. En ambdues condicions, les cèl·lules BO2 presentaven una infraexpressió d'HLA I en comparació amb 231 (Figura 14B).

Finalment, per tal d'observar l'expressió d'HLA I per immunocitoquímica, es van utilitzar anticossos contra les dues subunitats (Figura 14C): contra la cadena pesada, representada aquí com els subtipus A, B i C (HLA-ABC) i contra la beta2-microglobulina (β 2m). Les tincions revelaven una infra-expressió dels dos components del HLA I en BO2 vs. 231. La detecció d'altres subtipus d'HLA I (A, B, BC intracel·lular), també infraexpressats de manera general, confirmava les dades genòmiques (Figura 10) i demostrava que la disminució en els nivells d'HLA I es donava de forma generalitzada en BO2 vs 231 (Santana-Codina et al., 2013).

2



U E, Ua Bzñ Fnguer úr Tq, r ggpæ qHX(???) F uñf Wæ r NglLugDggU?? Vbt/Ugr RUñf Wæ, u F Uæ r vnFvr, ær U UñVh- 3?? 3?? 2XLt csl ???, Vç???)BRæàl cà?Ld à'èàvi òn Ràpsi sè BRt à-d dU, c-XI BRæRàd EIt BRæRàvi Ì Lsn I ecí s?Xl BI ? sLcR3 I ? RæXl t csl BRæNssRSI ? Xc-t I γ???)XLt csl ??, Vç???)R/I ?WVW???) ??? R/I ?yWQQ? ?t-X-g???) Vç???)BRævi ?RI ecí s?Rt ?Xl t B-X-Lt àBR? Rsn RI E-ecí I X-g???)s-cg?+; " γ???)BRævi ? BRcXcd s?Rt òn Rn Esl t I ?n ????)BRt àR? Rsn RI E-ecí I s?RàVæpæRàl ?t csl XRe? s????)R? Rsn RI E-ecí I t dW+/γ???) 13???) n pt LX-clmp4 -XI ?W+/?XLt csl ? ?Xl BRT I ? Ràl BI ????)???)v? ?Xl BRT I ?Rd); n -XLSæ Epet I ?; n ?BR? ????)BRt ?Rà? -Rà??); ?%?'? ?mpl t c-UXI X-g???)BRævi ?RI ecí I s?RSLt àBRæRSOrt d?Xs-cRs-? el n Rt d? L-à-c-p?'" γ???) n -cN??)" γ???) LX?, L-à-c-p??) ?mpl t ?R?n I sXI cSR?XRe? s?RSI ?Up-/; Rsu?Rt XI si ?àp, Rs-Ls? ?XLt csl ?t RSI c-p: ?t ? t Lsn I en Rt d'èp-ecí I ?Rspn ? L)-n n pt R?Rt ?X? ?t c-XuàRà, RXU?X?

2

??sReX-g , sLcR-XI -t vRsàl?Rt csR?L EsR)/, sRàà-g?B??, Vç -?t U)R/, sRàà-g?B??)?Rt ? XVe?RàmpR?n Rclà d c-í Rt ?L: ? L?àMv -I ?sLElc ?Rt ?ecsRà? Rf Lsaà?Bèt cRSIX X-g? sLcR3 I) , sLcR3 ?It I ecí It d'vIs -It cà?n Rclà cNempRà??, pen g???)csRà-t S?Rd?e':? +6; γ???)XRsVRe?? Is c-t ?Rd? Ie':? ++Q γ???)mpRàcl?-B-L-à-t XsNàl?BRæRàVæpæRàmpR?n Rclà dc-í Rt ?L?àRàvi?vle-Bis ?Rt ?pt ? Ràcp?-BRæX-cl n Rcs-?B?R?Up/ :?L t ?Vin ?It Ie-í I s?R?, sRàà-g?B??)mpRàcRà? sLcR3 RàBR?n It RSI?

RESULTATS

semi-quantitativa en altres línies de metàstasi de càncer de mama. Com a models cel·lulars, es van utilitzar la línia parental 231 amb la seva variant metastàtica a os BO2 i la línia MDA-MB-435 (435-P) i les seves variants metastàtiques a cervell (435-Br1), fetge (435-Lv1), pulmó (435-L3) i os (435-B1).

La línia de metàstasi òssia BO2 expressava uns nivells més baixos d'HLA I intracel·lular i en membrana que la línia parental 231 (Figura 15, esquerra). El mateix fenomen s'observava en una altra línia de metàstasi òssia, 435-B1, en comparació amb la seva corresponent línia parental 435-P, descartant possibles atribucions a la característica genètica intrínseca de la línia cel·lular (Figura 15, dreta). Es va calcular un índex de retenció d'HLA I dividint els valors d'HLA I intracel·lular pels de membrana, i vam observar que el percentatge d'HLA I retingut en la línia BO2 i 435-B1 era un 60-80% major que en les seves respectives parentals (231 i 435-P). Aquest fenotip de retenció d'HLA I estava associat a uns nivells d'ERp57 més elevats (Figura 15, baix) en les línies metastàtiques a os que en les línies parentals (66% més en BO2 que en 231 i 41% més en 435-B1 que en 435-P).

Per veure si aquest fenomen era específic de metàstasi òssia, vam comparar aquest anàlisi amb l'anàlisi d'altres variants metastàtiques derivades de 435-P (Figura 15, dreta). La línia metastàtica a cervell, 435-Br1, presentava uns nivells d'HLA I i ERp57 similars a 435-P. En les línies de pulmó (435-L3) i fetge (435-Lv1) s'observava una disminució en els nivells d'iHLA I i mHLA I comparat amb 435-P, però el fenotip retentiu només apareixia a la línia 435-Lv1. Tal i com vèiem pel cas de metàstasi òssia, el fenomen de retenció s'associava a uns nivells més elevats d'ERp57 (15% més en 435-Lv1 que 435-P). Aquests experiments mostraven que el fenotip sobre-expressió d'ERp57-retenció d'HLA I apareixia en diverses línies de metàstasi òssia independentment del fons genètic però que no era exclusiu, ja que també es trobava en metàstasi hepàtica.

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

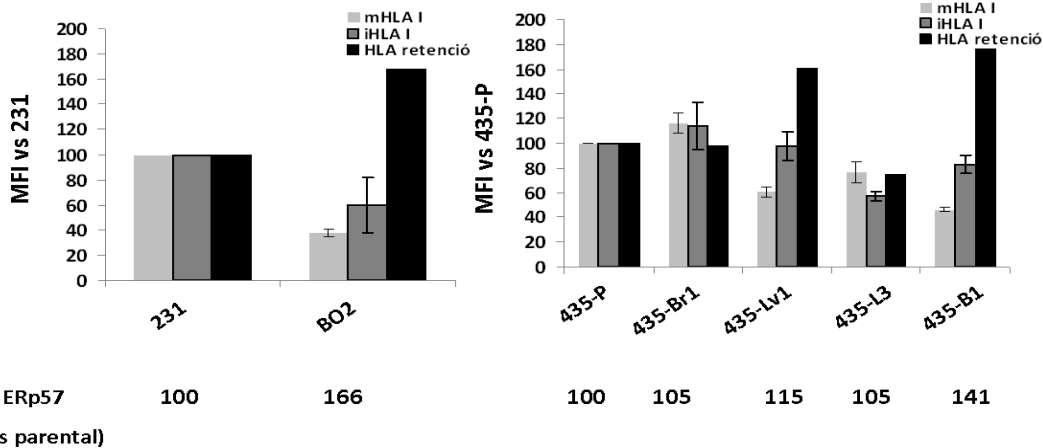
2

2

2

2

2



En el present treball, s'ha estudiat l'expressió i la funció de les molècules de superfície cel·lulars (MHC I, HLA I i HLA retenció) en les cèl·lules progenitores hematopoètiques (HPC) i en les cèl·lules progenitores hematopoètiques (HPC) i en les cèl·lules progenitores hematopoètiques (HPC). Els resultats indiquen que la presència de les molècules de superfície cel·lulars és essencial per a la supervivència i la proliferació de les HPC, i que la seva funció està relacionada amb la interacció amb les cèl·lules T reguladores (Treg) i amb les cèl·lules T auxiliars (Th17). Els resultats també indiquen que la presència de les molècules de superfície cel·lulars és essencial per a la supervivència i la proliferació de les HPC, i que la seva funció està relacionada amb la interacció amb les cèl·lules T reguladores (Treg) i amb les cèl·lules T auxiliars (Th17).

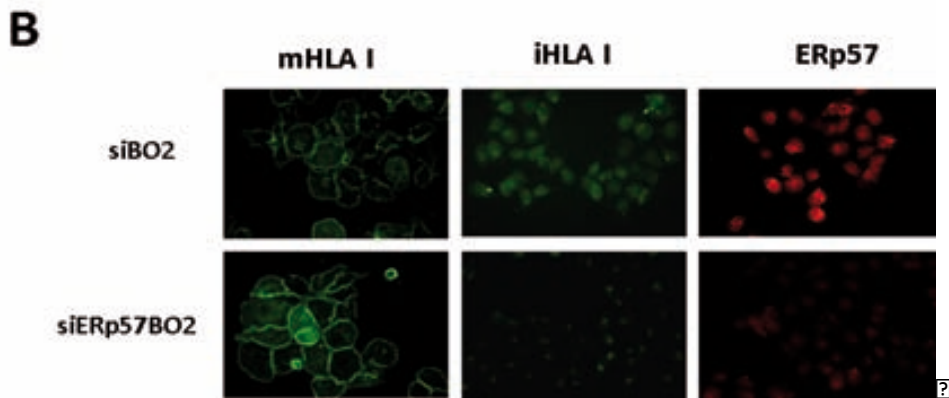
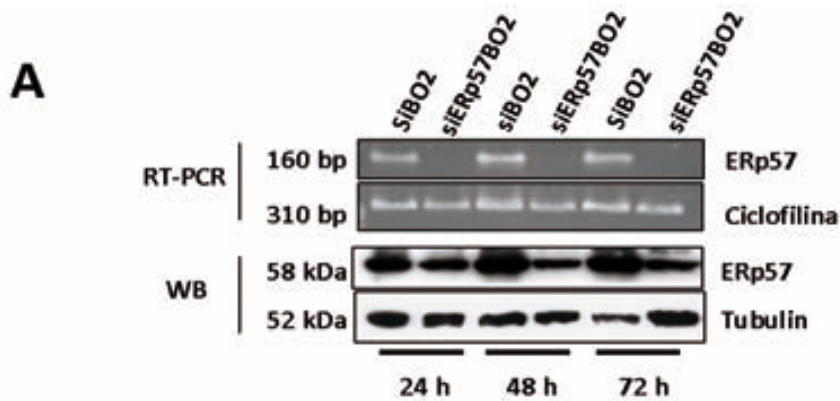
2

Els resultats indiquen que la presència de les molècules de superfície cel·lulars és essencial per a la supervivència i la proliferació de les HPC, i que la seva funció està relacionada amb la interacció amb les cèl·lules T reguladores (Treg) i amb les cèl·lules T auxiliars (Th17). Els resultats també indiquen que la presència de les molècules de superfície cel·lulars és essencial per a la supervivència i la proliferació de les HPC, i que la seva funció està relacionada amb la interacció amb les cèl·lules T reguladores (Treg) i amb les cèl·lules T auxiliars (Th17). Els resultats també indiquen que la presència de les molècules de superfície cel·lulars és essencial per a la supervivència i la proliferació de les HPC, i que la seva funció està relacionada amb la interacció amb les cèl·lules T reguladores (Treg) i amb les cèl·lules T auxiliars (Th17).

Els resultats indiquen que la presència de les molècules de superfície cel·lulars és essencial per a la supervivència i la proliferació de les HPC, i que la seva funció està relacionada amb la interacció amb les cèl·lules T reguladores (Treg) i amb les cèl·lules T auxiliars (Th17). Els resultats també indiquen que la presència de les molècules de superfície cel·lulars és essencial per a la supervivència i la proliferació de les HPC, i que la seva funció està relacionada amb la interacció amb les cèl·lules T reguladores (Treg) i amb les cèl·lules T auxiliars (Th17). Els resultats també indiquen que la presència de les molècules de superfície cel·lulars és essencial per a la supervivència i la proliferació de les HPC, i que la seva funció està relacionada amb la interacció amb les cèl·lules T reguladores (Treg) i amb les cèl·lules T auxiliars (Th17).

2

En IS Rrr/rrmpRàcà sRàpèlc àpSSRs-Rt ptt I, RsBòp, WçRt qn LBpeX-gBRèstl à, LsdBòp 2022 2022 BRàBRèX-cl, dà n l2022 2022 Rn EsIt l2022 2022 s'2



Qu E, Ua 720Ugur FvUvUpèuqHXF F2022 Va, èRèvUEFEUE l r FLr F2 2022 2022UEFUègl uFEvupr F2022 2022 2022 322Rà2
XVèpèRà2022; BRàVI t èsl t àURXd s2 n E2pt l eSL èXsl n EèR2022; vLXLt csl 2022, Wç2022, Wç2022; v2022RUX-Vt X-l BRè2022
csl t àURX-g2022Rà2022vI 2022vI eBl s2l 2022cRn , à2022B-URsRt cà20229; w2022; Q2022-2ç; M/20222022R/, sRàà-g2022Bò2022, Wç2022Rà2022vI 2022l t l ecí l s2, Rs202220222022
àRn -mpI t c-d c-vI 2022 l t R2022èp, Rs-Lsy20222022, Rs2022 2022 l t R2022èt URs-Lsy2022pc-ecí l t d2022-Xd Uet l 20222022pEpet l 2022XLn 2022 2022XLt cSL èBR2022
XNssRSI :èRà, RXc-vI n Rt d'202220222022 n pt LUp LsRàXvt X-l XLt csl 2022, Wç2022 èR/l 2022vWV2022XLt csl 2022 2022 2022 èR/l 2022vWV2022Rt 2022
XLt B-X-Lt à2022 Rsn RI E-ecí l t cà2022 2022 2022 2022 L2022 Rsn RI E-ecí l t cà2022 2022 2022 2022 wMBRèstl t àURX-g'2022

2

2022 2022 d è BR2022 XLt Usn Is 2022 ImpRàcà2022 sRàpèlc à2022 vIn 2022 sRIe-cí Is 2022 èR/, Rs-n Rt d2022 XLt csIs -2022
àL EsRR/, sRààIt 20222022, Wç2022Rt 2022èt -l2022, l sRt de2022 %:2022mp2022 sRàRt dv l2022pt à2022t -vR2022èEI àlèà2022Bò2022, Wç2022
n Tà2022EI-/Là'20222022 mpR20222022, Wç2022Tà2022pt l2022, sLcR3 2022 sRSpeB l2022, Rs2022SèpXL àl2022-2022àR2022àL EsRR/, sRàà2022 Rt 2022
XLt B-X-Lt à2022BRèR, s-vIX-g2022èmpRàcà2022 pcs-Rt 20222022RR:2022 ++6γvIn 2022pc-ecí l s 2022ImpRàcà2022 Rcl Eued2022 Rs2022lè2022
Bòt Bp-s20222022, Wç2022Rt 2022èRà2022XVèpèRà20229-Spsl2022 6çγ20222022lè2022-2022XLn 2022Mv 4Rn 2022, sRv-àc:2022d2022 àL EsRR/, sRàà-g2022
Bò2022, Wç2022Rslè2022t Bp3l2022In ERèRàcIs vIX-g2022BRèSèpXL àl20229-2022In S(n e20222022Rsl 2022v-à-E2022 Rs20222022:Rv-BRt X-It 2022èRà2022
B-URsvt X-Rà2022sRà, RXcR20222022 èRà2022XVèpèRà2022Xpc-vIB Rà2022Rt 2022XLt B-X-Lt à2022EI àlèà2022wW2022In S(n e/20222022mpRàcà2022

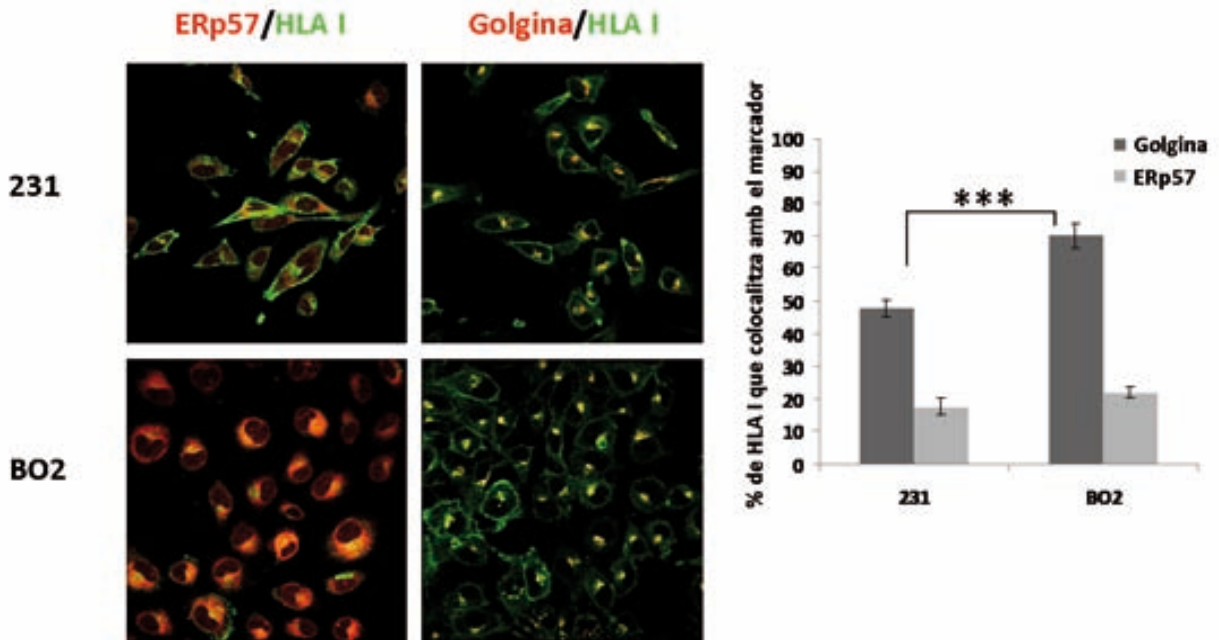
2

2

2

2

En l'empresament de les cèl·lules de rató, els nivells de X-galactosidasa són més baixos que en les cèl·lules de rató. Els nivells de X-galactosidasa són més baixos que en les cèl·lules de rató. Els nivells de X-galactosidasa són més baixos que en les cèl·lules de rató.



En l'empresament de les cèl·lules de rató, els nivells de X-galactosidasa són més baixos que en les cèl·lules de rató. Els nivells de X-galactosidasa són més baixos que en les cèl·lules de rató. Els nivells de X-galactosidasa són més baixos que en les cèl·lules de rató.

2

En l'empresament de les cèl·lules de rató, els nivells de X-galactosidasa són més baixos que en les cèl·lules de rató. Els nivells de X-galactosidasa són més baixos que en les cèl·lules de rató. Els nivells de X-galactosidasa són més baixos que en les cèl·lules de rató.

RESULTATS

Aquest fenomen era particularment interessant ja que la Tapasina és la única de les proteïnes analitzades que interacciona de manera directa amb ERp57 en el Complex de Càrrega de Pèptid (Dong et al., 2009). Tapasina participa en el control de qualitat de les molècules d'HLA I, restringint el transport a la membrana de molècules HLA I carregades amb un antígen poc estable. Així, si una molècula d'HLA I no està ben carregada, s'empaqueta en vesícules COP-I i s'inicia el transport retrògrad de Golgi a Reticle, on es torna a carregar un altre antígen. El procés es repeteix fins que el pèptid és el de més afinitat i pot vehiculitzar-se fins la seva localització funcional a la membrana cel·lular (Paulsson et al., 2002).

La línia BO2 presentava un fenotip combinat d'infra-expressió de molècules de la APM i d'HLA I, que provocaria una caiguda en els nivells de la proteïna especialment en membrana. Els baixos nivells de Tapasina podrien malmetre el control de qualitat de l'HLA I, provocant una retenció en Golgi que evitaria l'expressió defectuosa a la membrana. Malgrat que la silenciació d'ERp57 no modificava la transcripció d'HLA I, és probable que millorés el procés de càrrega antigènica degut a l'augment en els nivells de Tapasina. Això explicaria l'augment d'HLA I en membrana i la menor retenció en Golgi.

ERp57, a part d'estar relacionada amb funció immune, apareixia en la xarxa d'interacció vinculada a proteïnes de citoesquelet i adhesió com citoqueratines, tubulines, cadherina o vimentina (Figura 10). La relació d'ERp57 amb el citoesquelet s'ha descrit en els darrers anys com un mecanisme de resistència a Paclitaxel en càncer d'ovari (Cicchillitti, 2009; Hishiya, 2008). ERp57 formaria un complex nuclear amb β -actina o vimentina, exercint un control redox sobre el plegament de TUBB3 i mitjançant la correcta associació dels microtúbuls al cinetocor (Cicchillitti et al., 2010).

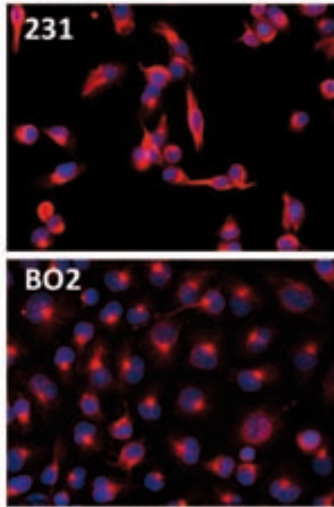
Els processos requerits per a la metàstasi de cèl·lules epitelials del tumor primari necessiten de la Transició Epiteli Mesènquima (TEM), un fenomen que es caracteritza per un augment en la vimentina entre d'altres marcadors mesenquimals (Polyak and Weinberg, 2009) i que afavoreixen la motilitat cel·lular. Aquest procés es reverteix en la Transició Mesènquima Epiteli (TME), quan les cèl·lules metastàtiques colonitzen el nou òrgan diana.

En conseqüència, vam analitzar els nivells d'expressió de vimentina en 231 i BO2. Les dades proteòmiques indicaven que la vimentina apareixia sobreexpressada en 231 i

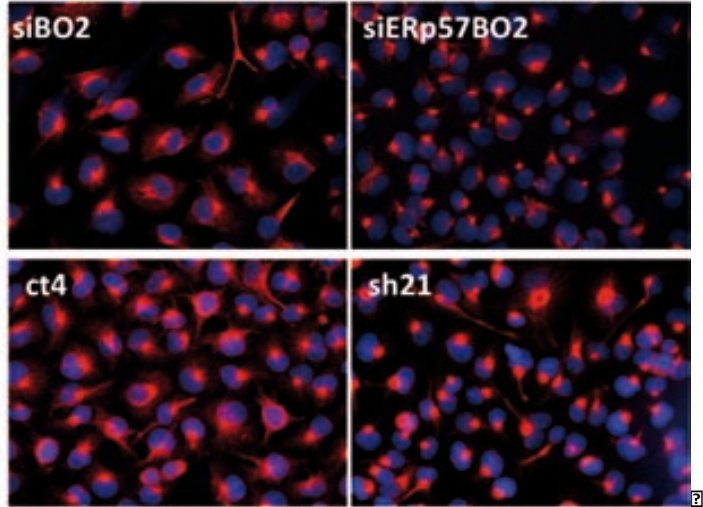
2

-t UIR /, sRààB I Rt 2022; '2022 BRcRX-g, Rs2022BòmpRàc 2, sLcR3 I vIe-BIv I ImpRàcàÈsRàpælc à 2022-SpsI2; +2022BIB I ImpRàpSSRs-ImpRàcàÈsRàpælc 2022; 2022Mv -Rt 2 I à àlc 2022 sLXTàBR2022 2022

A



B



2022 E, U2V5z 2022qHX2 èeEdUàrgl, EvLE, U2er 2022vLègí Er α 2022UL, URt g2022er 2022Rù r FLUF 2022XL t csl 2022v-n Rt c-t I 2022(W++2022 Rn , sl t 2022r/I 2022VWXLn 2022 2022Xpt BI s-'20222022RàvI 2022pc-éd I s2022 Rs2022 2022 2022-àpl ed I X-g 2022BRæI pXeà2022+/2022 2022B-àcs-EpX-g 2022BRv-n Rt c-t I 2022RàvI 2022 I t I edí s2022Rt 2022 2022; %62t c2022; 2022L 202230Rt 2022XVèpæRà2022; 2022-èRt X-I BRà2022BR2022ULsn I 2022csl t à-Rt 2022 2022-2022, Vç 2022; 2022c2022; 2022L BRàc Eæ2022M 62022cXcw2022

2

2022 2022 In 2022Rle-dí s2022In Ic R-/I2022c-t X-g 2022Rt 2022XVèpæRà2022-èRt X-I BRà2022 Rs2022, Vç 2022; Rs2022le 2022BRvRpsR2022-è 2022 2022n LB-UXIX-g 2022BRæI, sRàà-g 2022BòmpRàc2022, sLcR3 I 2022cRt -I 2022leSpt 2022URXcR2022Rt 2022 2022B-àcs-EpX-g 2022BRæI 2022 v-n Rt c-t I '2022In 2022pc-éd Is 2022Re2022BLà2022n LBRe2022BR2022-èRt X-IX-g 2022Bò2022, Vç 2022Rt 2022; 2022èd 2022-èRt X-I X-g 2022 csl t à-Rt 2022-2022, Vç 2022; 2022c2022; 2022Re2022n LBRe2022BR2022-èRt X-IX-g 2022RàcE æ2022M 62022cXcw2022V RpsR2022, Is dc 2022 àRSorT ç/2022 2022-èRt X-IX-g 2022Bò2022, Vç 2022, Rs2022à-202220222022-2022, Vç 2022; 2022L 2022àM 202220222022M 62022Rsi2022 XI, IA 2022BR2022 n LB-UXIs 2022 2022B-àcs-EpX-g 2022BRv-n Rt c-t I 2022BRæI 2022XVèpæRà2022n Rdà cNempRà2022L:2022BLt I t 2022L X2022pt I 2022 RàcspXcpsi 2022 n Tà2022, Rs-t pXeRIs :2022 In E2022, sLcpERsNtX-Rà2022 sRn -t -àXRt cà2022 BR2022 èd XLt BRt àIX-g 2022 BR2022 n -XsL cóE pæ2022-SpsI2; +2022V 2022Rsi2022t c:2022, Vç 2022Rt -I 2022pt 2022 I, Rs2022Rt 2022 2022sSit -cí IX-g 2022BRæI v-n Rt c-t I 2022 , sLEIE æRn Rt 2022Rt 2022æ sLXTà2022 2022:2022n , sRàX-t B-Eæ2022 Rs2022RàcE en Rt 2022BRæI 2022n RcNàcà-'2022

2

1.2. Demostrar la importància d'ERp57 en el procés de metastasi òssia.

Per tal d'analitzar el paper d'ERp57 en el desenvolupament de la metastasi òssia, es va silenciar aquesta proteïna amb un shRNA en cèl·lules BO2 que expressaven luciferasa i eGFP (Figura 11 i 12). Es van seleccionar dos clons de shERp57 (sh21 i sh32) i un control (ct4), que es van analitzar per WB i IF (Figura 21A i B). L'anàlisi per WB es va realitzar per a 3 clons (sh25, sh21 i sh32), un control (ct4), i les dues línies 231 i BO2 (Figura 21A). El ct4 presentava uns nivells d'ERp57 similars a la línia BO2. La silenciació d'ERp57 provocava una caiguda en l'expressió de la proteïna en els clons comparat amb el ct4 o BO2. Per una altra banda, l'anàlisi d'expressió d'HLA I mostrava diferències en modificar ERp57. El ct4 presentava uns nivells d'HLA I similars als de BO2 mentre que els clons shERp57 presentaven un augment en HLA I fins a nivells similars als de la línia parental 231 (Figura 21A).

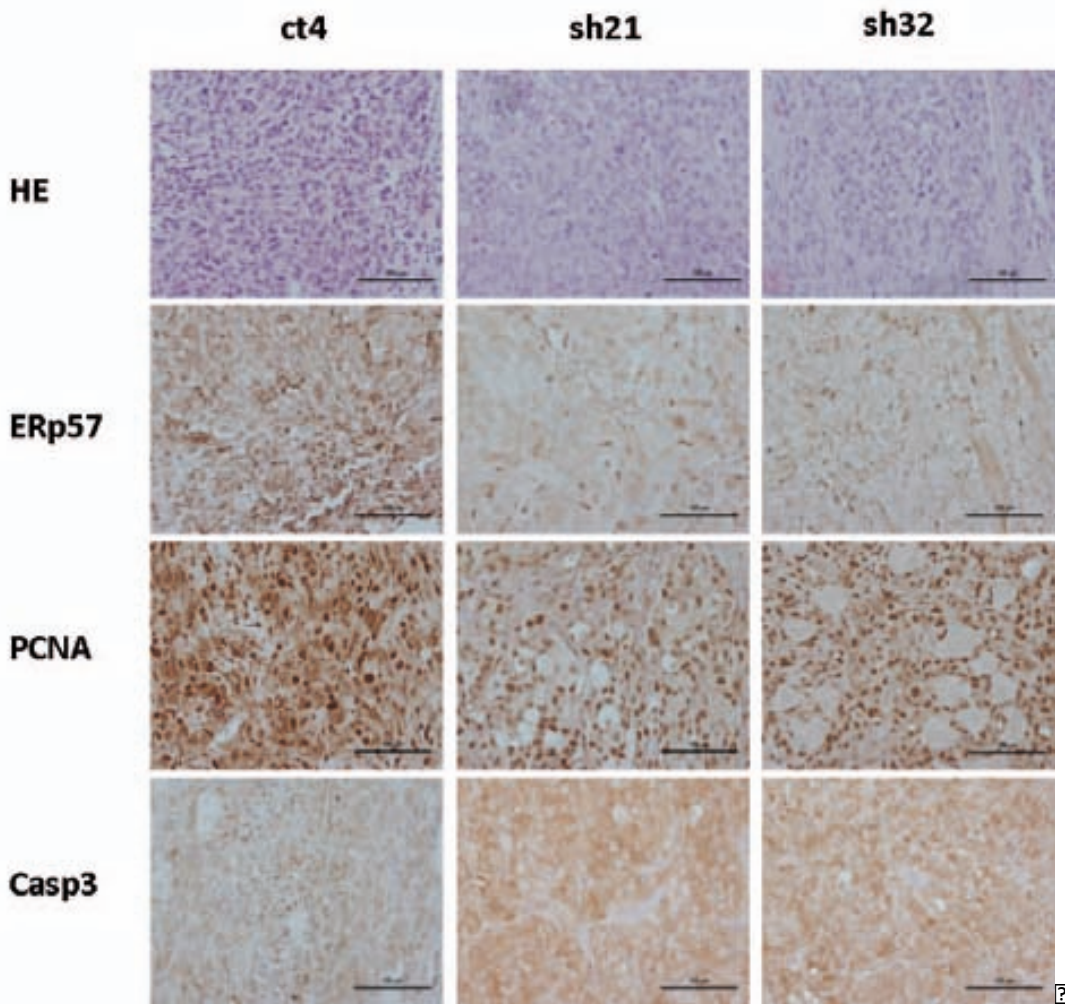
Per tal de validar els canvis en distribució d'HLA I observats en la silenciació transient, vam analitzar ERp57 i HLA I per IF. La silenciació d'ERp57 es confirmava en els clons sh21 i sh32 en comparació amb el control ct4. L'anàlisi del HLA I de membrana en condicions no permeabilitzants, mostrava que tal i com havíem vist en la silenciació transient, la infraexpressió d'ERp57 s'associava a un augment en mHLA I (Figura 21B).

Previ a la injecció *in vivo*, vam caracteritzar *in vitro* l'eficiència de bioluminescència dels clons i control seleccionats (Figura 21C). Es van establir rectes de regressió representant la bioluminescència (ph/s) vs. el nombre cel·lular. Aquest anàlisi va confirmar que la correlació entre ambdós paràmetres era de tipus lineal ($r^2=0.993-0.999$).

2

2022, V2022 R2022n n pt LMàLmp4n -XI: 2022 R2022de2022BR2022vle-BI s2022mpR2022Rà2022n It cRt -I2022d2022-t 2022LIR /, sRàà-g2022BR2022d2022 , sLcR3 I2022Rt 2022Rè2022Xè2022t à'2022URXc-vIn Rt c:2022Rà2022n RcNà2022là -à2022uàà-Rà2022BRè2022t -n leà2022t PRXd cà2022n E2022M 62022 àM2022 2022t 2022L)R/, sRààlv Rt 20222022, V20222022Rt 2022XLn , Is IX-g2022In E2022Rè2022Xt cSLe2022Xw2022

2022 2022-t len Rt c:2022, R2022de2022BR2022vRpsR2022à-2022Rà2022B-UrsVt X-Rà2022Rt 2022Rè2022XsR-/Rn Rt c2022n Rdà cNeX2022RsRt 2022 BRSpBRà2022 I2022 èXc-vIX-g2022BR2022, sLcR3 Rà2022, sL)n Lsc2022L2022 I2022 d2022 -t 2022L)R/, sRàà-g2022BR2022, sLcR3 Rà2022BR2022 , sLeURsIX-g:2022In 2022t le-cíI s2022R/, sRàà-g2022BR2022là, là I2022%2022BR20222022 2022'202220222022 2022òt 2022L)R/, sRààlv I2022Rt 2022Rè2022 Xè2022t à:2022t B-XI t c2022pt I2022B-àn -t pX-g2022Rt 2022d2022, sLeURsIX-g2022BR2022Rà2022n RcNà2022là -à2022M2022, V20222022; 2022XLn , Is Ic2022 In E2022Rè2022Xt cSLe2022'2022Rs2022pt I2022 csi 2022EIt BI: 2022là, là I2022%2022Rà2022L EsR)R/, sRààlv I 2022Rt 2022Rà2022n RcNà2022là -à2022BR2022 àM2022, V20222022; 2022à'2022Rè2022Xt cSLe2022àpSSRs-t c2022pt 2022pSn Rt c2022BR2022 2022n Lsc2022XRe2022pès '2022



2022 U E, U2022 Vh2022 2022Fna2022g2022er 2022Lr 2022f2022Ug2022er 2022I r LngL2022Ug2022 DggL2022 e2022Uf2022 U2022g2022 f2022d2022vL2022Ug2022 U i 2022gA2022qHX20222022 V2022 è2022gAvèFL, èc2022 2022Rn I cL/-et I)2022L-à-t I 20222022V20222022n pt LMàLmp4n -XI 2022Rt 2022n RcNà2022là -à2022uàà-Rà2022BR2022Vè2022pèRà20222022; àM 6:2022M2022 2022c2022M2022; Xow2022 2022àVI 2022t I ecíI s2022R/, sRàà-g2022BR2022, V2022:2022202220222022I, I àl 202242022 +/ :Rà2022XI d 202220222022 2022n 2022v2022

RESULTATS

Tots aquests resultats posaven de manifest que la sobre-expressió d'ERp57 afavoria el procés metastàtic a os indicant dos mecanismes diferents que podien ser complementaris: 1) reorganitzant el citosquelet de manera que fos més eficient l'establiment de la cèl·lula metastàtica a l'os, i 2) desregulant el reconeixement immunològic a través de l'infra-expressió de molècules d'HLA I en la membrana de les cèl·lules metastàtiques, la qual cosa podria induir una evasió de la resposta immune.

2. Caracteritzar els components metabòlics associats al procés òrgan-específic de la metastàsis del càncer de mama.

L'os es un òrgan hipòxic amb uns nivells de glucosa baixos, a diferència del pulmó i el cervell (Stresing et al., 2012). La relació causa-efecte de la sobreexpressió d'ERp57 i l'habilitat metastàtica a os, juntament amb el fet de constatar que la seva expressió era susceptible de modificar-se pels nivells de glucosa extra-cel·lulars, va suscitar la hipòtesi de que el metabolisme de les cèl·lules que metastatitzen a os havia de ser diferent del metabolisme de les cèl·lules que metastatitzen a pulmó o cervell.

En aquest sentit, l'entorn hipòxic de l'os podria afavorir la sobre-expressió d'ERp57 donada la relació directa que existeix entre ambdós factors (Xu et al., 2009), condicionant la selecció del fenotip metastàtic amb una millor adaptació. Per una altra banda, el pulmó és propens a la creació d'estrès oxidatiu i requeriria de proteïnes com la PRDX2 per fer front a aquest insult (Stresing et al., 2012). Vam plantejar la hipòtesi que les cèl·lules metastàtiques necessiten d'una adaptació metabòlica per tal de sobreviure en el microentorn de l'òrgan diana i alhora que el metabolisme podria actuar com un factor de selecció òrgan-específic.

Otto Warburg va descriure al 1956 que les cèl·lules tumorals amb alts índex proliferatius presentaven un augment en la glicòlisi fins i tot en presència d'oxigen, el que es coneix com l'efecte Warburg. En conseqüència, la concentració d'àcid làctic augmenta, acidificant el microentorn (Warburg, 1956). Aquest tipus de metabolisme és menys eficient que el que es realitza a partir de l'acetil-CoA en el mitocondri. Tot i que inicialment es va relacionar amb defectes mitocondrials (Gillies et al., 2008), estudis recents demostren que el mitocondri no sol presentar defectes en la majoria de cèl·lules tumorals (Vander Heiden et al., 2009).

En primer lloc, vam analitzar la susceptibilitat de les cèl·lules metastàtiques als nivells de glucosa del medi com un indicatiu de la influència del microentorn en la diversitat metastàtica. Per això vam mesurar la supervivència cel·lular cultivant les variants metastàtiques a os (435-B1), pulmó (435-L3) i cervell (435-Br1) en presència (4.5 mg/ml) o

RESULTATS

absència (0 mg/ml) d'aquest nutrient (Figura 24). La línia parental (435-P) es va incloure en l'estudi com a control del fons genètic comú a totes les variants.

Els resultats van posar de manifest que les cèl·lules 435-P eren especialment sensibles a la deprivació de glucosa, suggerint un metabolisme glicolític molt dependent d'aquest nutrient. A 48h en hipoglucèmia, la línia metastàtica a cervell presentava una supervivència superior en front de les cèl·lules 435-P ($p < 0.001$). En contrast, 435-L3 i 435-B1 no mostraven diferències significatives respecte a la línia parental.

En els experiments en els que l'estarvació de glucosa es mantenia 72h, la supervivència es reduïa en totes les variants metastàtiques a la meitat respecte les mateixes condicions a 48h. La línia parental era més sensible a la deprivació de glucosa i la viabilitat es veia reduïda un 75% a les 72 h respecte les 48h. Totes les línies metastàtiques presentaven una supervivència superior a la línia parental, tant la de pulmó ($p < 0.01$) com la d'os ($p < 0.001$), essent la de cervell la que més sobrevivia, respecte 435P ($p < 1E-05$) i respecte os ($p = 0.001$).

Donat que la línia 435-P era la línia més sensible a la deprivació de glucosa, els resultats suggerien que la dependència de glucosa és un fet associat a l'habilitat de les cèl·lules metastàtiques, essent la variant metastàtica a cervell la que té un metabolisme més independent d'aquest nutrient.

Igualment, les diferències observades entre les variants metastàtiques respecte a la supervivència cel·lular en condicions de deprivació de glucosa, suggerien que aquestes tenien característiques específiques a nivell metabòlic.

?

El XLt XsRc: w SRT àI, I sR-/Rt àL EsRR/, sRààlc àRt R eRàBIB RàcsIt àXs-, cun -mpRà 6+ yè écl àL eXé L Rt í-n R ML RàcRs MBSL d àR 9çy: cMit Lén -t R) ML, Mc R éc-BécsIt àUrsIà R 9çy: sIt à, LsdB Ls BR X-csic n Ielc 9 y - - , ML, MLn RvleLt Ic RBRXIs EL/éà R 9çy mpRàcàSRT àRàRàL EsRR/, sRààlv Rt In Ept 6w s TBR 6w çy: '+w çy: '+Y 9çy: '+> 9çy: sRà, RXcR Rcpn Ls s-n Is - BR In I' ?

Èt Neà n EBR BòmpRàcàSRT àvi , Lsds écsRàSRT àt cRsiX cplIt càsRdX-Lt Ic à In Eè àà cRà-e, 4-XIè/éàcRsl eRXR, cL sE)ERcd 9çy: Ey: , L RXR, cL s; 9çy, L; çy Rc-t L-t X-B RXR, cL s x y

Swissprot	Nom	Localització	Funció
O00154	CYTOSOLIC ACYL COENZIME A THIOESTER HYDROLASE	Citoplasmàtica/ mitocondrial	Acil-coA tioesterasa
Q99447	ETHANOLAMINE-PHOSPHATE CYTIDYLTRANSFERASE	Citoplasmàtica	Biosíntesi de fosfolípids
P53007	CITRATE TRANSPORT PROTEIN	Mitocondrial	Bescanvi citrat/malat
P53602	DIPHOSPHOMEVALONATE DECARBOXYLASE	Citoplasmàtica	Biosíntesi de colesterol i lípids
P55055	OXYSTEROLS RECEPTOR LXR-BETA	Nuclear	Regulador positiu de la biosíntesi de lípids, eflux de colesterol i activitat lipasa
Q14114	APOE RECEPTOR 2	Membrana	Metabolisme lipídic
P19793	RETINOIC ACID RECEPTOR RXR-α	Nuclear	Metabolisme lipídic i del colesterol

?

UEd- 5z r Fgeur, r FvUd r FL Tq, rggUgr F r LngLugv, ri, Uer vnfvr, er U U r gqr vlr dU, r gLUer r LngLugv àvi I sc-sBR BI BRàcsIt àXs-, cun -mpRàL Ec-t SpBRà n EBR Uén Rcs-/Rt R M, pn I t Rt Ln R 6% çy: '+BR R/-cñ Rd àNc-XBR I X-Rt c'è t Neà-BR/, sRàà-gB-UrsRt X-I vI L s-S-t I s 6Y% SRT àRà, RXUXà BRXRsvRe çy: s-n RsàBR çI pd , I sR-/Rt àL EsRR/, sRààlc àB-UrsRt X-I en Rt dRt XRsvRe mpRàcàBI BRàRà vi t I t I ecI sI n EBR :LEcRt -t d/I s/Rà Bèt cRsi XX-g SVT-XI 'éSRT àt-t cRsi Xcpl t càsRd X-Lt I càI n E n Rd ELèà R, 4-XLN , eRt çI pd ' ?

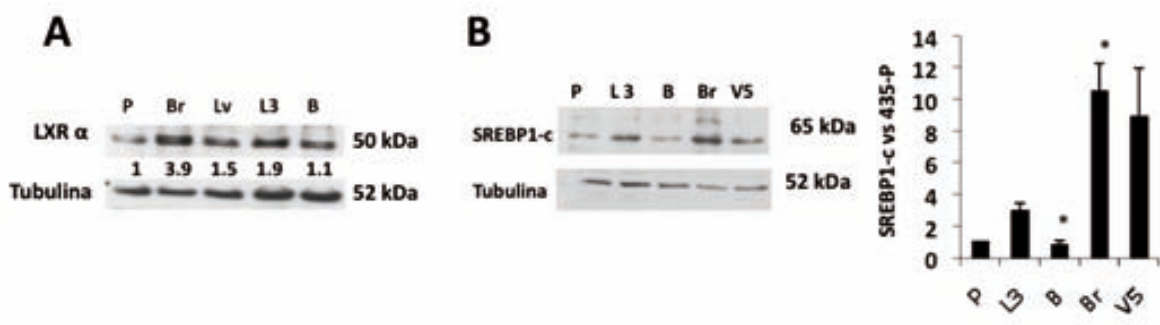
?

È, sRàvt X-BòmpRàcàSRT àpSSRs-Ipt Ip Sn Rt cRt àà cRà-BRSsIB IX-g, 4-XIèRt è n RcNàdà -XRREsle'ImpRàc n Lc-p: vit It Ie-cí Is eR/, sRàà-gBòeSpt RàBòmpRàcà , sLcRà Rà Rs 'Rà, RXcRà sLcRà RàBRà cRà:Rt vIn ts-Is BpRàmpRàcàL Elv Rt E/ / cG n BR, sLXTàE-Làt cVc-X'X)mpRàcà RXRà-càRs dcdB I, Rs 6(; ; , Rs dceBR

2

, sLBP-spt ULS n Rt dXc-pB-s-S-de pXePà àRs-rt Bpàc-t : +6; zpsLf t t B L B àcR-t : 6YYçy Decs, sLcR3 It It le-cí IB I V I àRs x : pt DecsRUX d s t pXerIs ImpR3RSpel eRp d st 6) XmpR èt BpR- / Rsl / -àcRSL e / f ReR d é : ++% al í la -Rde' : +6+y

2 2dt Neà, Rs n L àcsl vI pt I àL EsRR/, sRàà-gBR x Rt d et -I n Rdà cNeXI I XRsvRe s6yXLn , Is Ic n E et -I, I sRt de y t n Rt Ls sL, LsX-g: àL EàRsvlv I ImpRàd àL EsRR/, sRàà-gRt RàXV e RàmpR n Rdà dc-cí Iv Rt p en g % Rt Xis n Rt éàRt et -I n Rd àcNeXI L à 6y. mpR sRàRt dv I pt à -vRe B R/, sRàà-gBR x Rt URs-Lsà Spsl; W y àn -s à et -I, Is Rt d é n Ic R- / XLn , Lscdn Rt àL EàRsvlv I, Rs e ULS n Rt dXc-pBR 6) X Spsl ; W y et -I n Rd àcNeXI I XRsvRe àL EsRR/, sRààlv I ImpRàd , sLcR3 I XLn , Is Ic n E W : SplempR et -I BR p en g : mpR àL EsR)R/, sRààlv I Rt n Rt Ls n Ràpsl' n Tà: R/, sRàà-g B òmpRàd, sLcR3 I Rà n It cRt -I Rt pt I Decs et -I n Rdà cNeXI BR XRsvRe s 2 W W L Ec-t SpBI B Rà, sTà BR W, I àRà a s t d a l a t Gray. àpSSRs-t d mpR e R/, sRàà-g BR 6) XRsl -n , Lsdt d Rs e URt Lc-, n Rdà cNeXI XRsvRe t len Rt c et -I n Rdà cNeXI I L à 6) sRàRt dv I pt à -vRe B R/, sRàà-g BR x Rt 6) X n -s à e BR et -I Is Rt de'



2 u E, U M H è i , r r Tq, r ggp e r t q, è L r d f r g d, r d U v è F U e r g U i e g f L r g u a q è w U r F r L n g U g v r, r i , U c t c s l t 2 x 6) X y e v i e s à BR x Rà v i t L Lsn I e c í s R s p E p e t I t N e à B R t à - d . n V c s - X B R, s R à R t d c - p B R e R /, R s - n R t c à y 6) X R à v i t L s n I e c í s B o S p l e n I t R s l R s u R à v i t X i e p e s y s L n - c R à B R W e R /, R s - n R t c à - t B R, R t B R t c à : n - c R t I : s L v l v à W W : à, = + ' + W

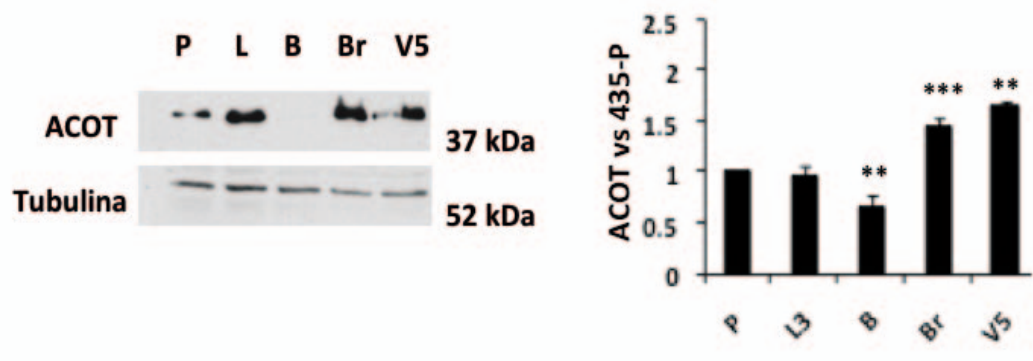
2

2 t I BR e R , sLcR3 Rà mpR I, Is R- /-Rt àL EsRR/, sRààIB Rà Rt e Rà BIB Rà csl t àXs-, cun -mpRà BR n R c N à l à - X R s R E s l e B R IX -Rt c à R s l e t e t ' m p R à d , s L c R 3 I X l c l e - c í I d M B s u e à B R t e A L à - c - L V à c R s B R e N X - B à S s i à à L à B R X I B R t e s S I e L X p s d : e e E R s l t d N X B à S s i à à L L R à c R s - U X i c à X L R t í - n e X - c l à L e R à v i e à v t X - R à S R e X - L t I n E B R U R X c R à R t

2

à/-BI X-g, B-XI29-saEéRde': +6+zff I sEs-XaRde': +66yRst dRSpeReIelt ABòNBà Ssl ààl àRt X-cl àl empRàBRàct Rt 224 cRàL àl /-BIX-g'

2 2dt NeàBR/, sRàà-gB222 2ç2 Rs22 2Rt 2Ràvis-It càh Rdà cNc-mpRàBRWÀVh Làcsl vl2 pt 2àl EsRR/, sRàà-gB222 2ç2Rt 2Ràet -Ràh Rdà cNempRà22 XRsvRe22s222 W2Rt 2XLn , Is IX-g2 In E22et -2, I sRt de22-Sps2; >y222et -2n Rd àcNeXl22, p2n g2h Làcslv 2pt 2p Sn Rt c2B-àXsRc2 t L2-St -UXic-p:2Rt 2222 2ç2Rà, RXcR22et -2, Is Rt de'22-t len Rt c:22e22XLn 2Vn 2-àc2Ut às I :22 et -I BR2h Rcnàdà -2uàl -I Rt -2pt 2XLn , Lsc2n Rt c2n -2s 2222, Is Rt de:2n E2pt à2 -vRe2222 22 Rt Xis I 2t Urs-Lsà22wÀV2'



2u E, 2V7:2222 2Xgr 2èi , rr Tq, rgg2R F22f ur g2 r Ugl2nLú Erg22Vr, Rr c2R F2 èerg2 Tqr, 2 rFLUg2r 2 rLngLug2 vr, ri, U2R F2 rLngLug2vr, ri, U2R 2UvR FLg2U i 2, ur FLEI è, U2uR, g22 22 22R, sRàRt cl c-p2BR2R/, sRàà-g2 B2222 2ç2Rt 2R2h LBR2WÀV222Ràvi s-I t càh Rd àcNc-mpRà22 p2n g22y22 à22222XRsvRe22s222 W2Rt 2pEpet I 2Ràvi 2 pce-éI s2XLn 2 2XLt csL2BR2NsRSI '22àvi 2RI edí s2 t Neà-BRt à-cL2n Vcs-X2BR2RàE I t BRà:2Ràvi 2t Lsn I edí I s2222 2ç2 , Rs2pEpet I 22Ut I 2n Rt c2Ràvi 2t Lsn I edí I s2 Rs2R/, sRàà-g2Rt 2WÀV222 sL2n -cL à2BR2WÀV/, Rs-n Rt cà2t BR, Rt BRt cà:2 2sLvi 222 cWÀV2:2ú, =+'6:2úú, =+'6y22

2

2mpRàcRà2BIB Rà2R/, 2 sic us-Rà2mp2 sLvRt -Rt 2BR22dt Neà-2cst às-, cun -X2BR2h Rcnàdà -à2 BR2XNtXR22BR2h In 2 Ls-S-t IB Rà2Rt 2B-URsRt cà2usSIt à:2RsRt 2-t B-Xic -vRà2BR2mpR2d2 B-vRsà-dc2 n Rd EueXl2, LB-2àRs2pt 2UX cLs2n , Lsd t c2Rt 2R2XsR-/Rn Rt c2usSIt)Rà, RX2X2BR2Ràh Rcnàdà -à2 BR2XNtXR22BR2h In I' 22

2

2

2

2.2. Estudiar el perfil metabòlic característic de las cèl·lules metastàtiques.

Les diferències en composició lipídica han estat àmpliament relacionades amb la tumorigenicitat. Estudis en cèl·lules epitelials de mama forçades a sobreexpressar FASN han mostrat que l'augment en la síntesi lipídica es relaciona amb el procés de transformació oncogènica a través d'una major proliferació, activació de HER1/HER2 i resistència a cisplatin (Vazquez-Martin et al., 2008). Per una altra banda, la transformació tumoral (per inducció de Src en cèl·lules 3T3) provoca un augment en la síntesi lipídica i es relaciona amb l'augment en la formació d'invadopodia i la secreció de metalloproteases (Scott et al., 2012). Finalment, el nostre grup també ha relacionat l'aparició d'un fenotip lipídic en cèl·lules de càncer de mama amb l'augment en gens de la TEM i amb major capacitat metastàtica (Nieva et al., 2012).

Per constatar les diferències observades a nivell metabòlic en les variants metastàtiques, vam analitzar-ne el contingut lipídic mitjançant una tècnica fluorescent, la tinció per Nile Red (Figura 27). Aquesta tècnica permet la visualització de lípids en dues regions de l'espectre: en el vermell s'observen els lípids més hidrofílics (com fosfolípids), mentre que els lípids més hidrofòbics produeixen un viratge cap al groc (Greenspan et al., 1985) (Diaz et al., 2008).

La tinció amb Nile Red en condicions basals de glucosa (4.5 mg/ml) mostrava un augment en els nivells de fosfolípids de les variants metastàtiques respecte la línia parental (Figura 27, superior).

Es va realitzar el mateix anàlisi en condicions de deprivació de glucosa (0 mg/ml) i en aquest cas ens vam interessar pels canvis que es produïen en el contingut de lípid droplets, que funcionen com a reserva energètica de la cèl·lula (Beckman, 2006). L'estarvació de glucosa provocava una disminució en els lípid droplets de les línies de cervell i pulmó únicament, com mostra l'ampliació del requadre interior (Figura 27).

2

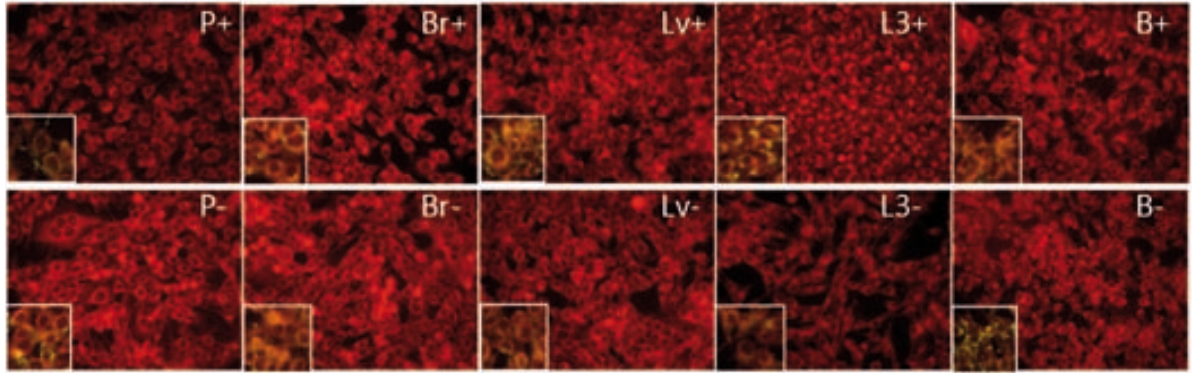


Fig. 1. **UAS-Xenopus** ELN expression in the brain, retina, and liver. **UAS-Xenopus** ELN expression was driven by the **UAS-Xenopus** promoter in the brain, retina, and liver. The top row shows the expression of **UAS-Xenopus** ELN in the brain, retina, and liver. The bottom row shows the expression of **UAS-Xenopus** ELN in the brain, retina, and liver. The insets show the expression of **UAS-Xenopus** ELN in the brain, retina, and liver. The scale bar represents 100 μ m.

2

The **UAS-Xenopus** ELN expression was driven by the **UAS-Xenopus** promoter in the brain, retina, and liver. The top row shows the expression of **UAS-Xenopus** ELN in the brain, retina, and liver. The bottom row shows the expression of **UAS-Xenopus** ELN in the brain, retina, and liver. The insets show the expression of **UAS-Xenopus** ELN in the brain, retina, and liver. The scale bar represents 100 μ m.

The **UAS-Xenopus** ELN expression was driven by the **UAS-Xenopus** promoter in the brain, retina, and liver. The top row shows the expression of **UAS-Xenopus** ELN in the brain, retina, and liver. The bottom row shows the expression of **UAS-Xenopus** ELN in the brain, retina, and liver. The insets show the expression of **UAS-Xenopus** ELN in the brain, retina, and liver. The scale bar represents 100 μ m.

The **UAS-Xenopus** ELN expression was driven by the **UAS-Xenopus** promoter in the brain, retina, and liver. The top row shows the expression of **UAS-Xenopus** ELN in the brain, retina, and liver. The bottom row shows the expression of **UAS-Xenopus** ELN in the brain, retina, and liver. The insets show the expression of **UAS-Xenopus** ELN in the brain, retina, and liver. The scale bar represents 100 μ m.

RESULTATS

glucosa provocava una caiguda en la quantitat de TFA en la població P1 mentre que no es produïen canvis en la població P2.

Pel que fa a les metàstasis, les variants metastàtiques a cervell i pulmó presentaven uns nivells més elevats de TFA que la població P2. En condicions de deprivació de glucosa, Br i L3 es comportaven com P1, amb una disminució en els nivells de TFA que podria ser deguda al consum. Per una altra banda, B1 i Lv1 es comportaven com P2, amb uns nivells inferiors de TFA i sense canvis en els nivells lipídics al retirar glucosa (Figura 28A).

Aquests resultats indicaven que, assumint la heterogeneïtat de la línia parental, es podien distingir dues subpoblacions segons els nivells d'àcids grassos totals. Aquestes poblacions podrien ser les predecessores de les diferents metàstasis: una més (P1, com 435-Br1) i una menys lipogènica (P2, com 435-B1). Per una altra banda, observàvem de nou una composició lipídica similar entre la variant metastàtica a pulmó i la de cervell en contraposició a la variant metastàtica a os, tal i com suggerien les dades d'expressió de gens de síntesi analitzats anteriorment (Figura 25).

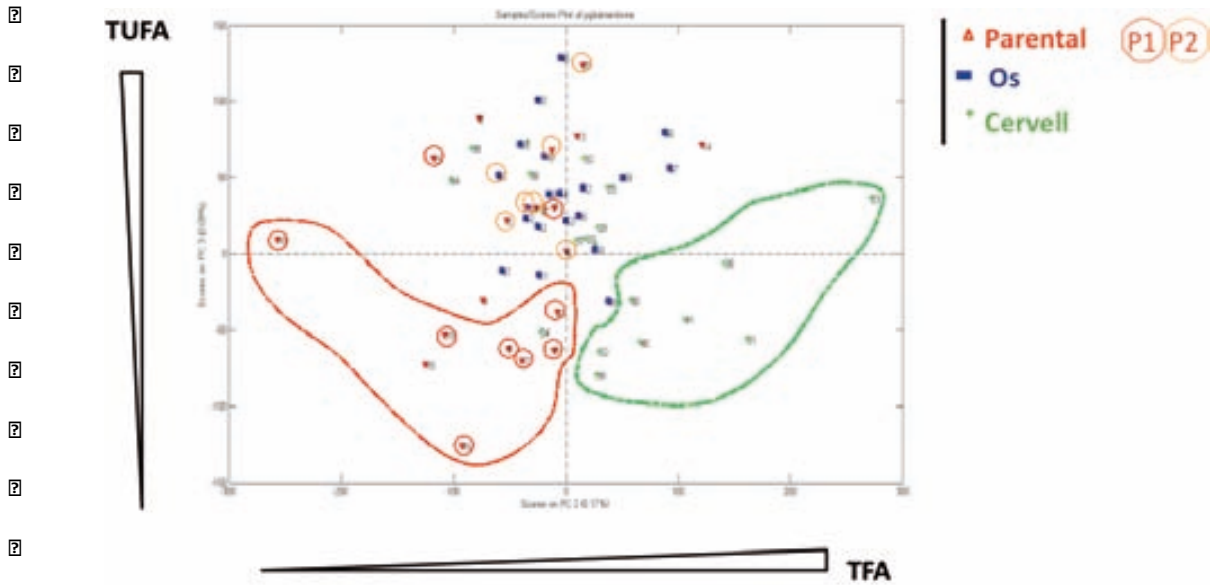
La síntesi lipídica indueix un augment en el percentatge d'àcids grassos saturats (Schug et al., 2012) i la presència de més àcids grassos saturats s'ha relacionat amb malignitat ((Hilvo et al., 2011; Rysman et al., 2010), migració i invasió (Scott et al., 2012). Així doncs, una ratio baixa TUFA/TFA, l'anomenat fenotip lipogènic, s'ha proposat com a marcador molecular per aquests tumor agressius (Nieva et al., 2012). Vam calcular la relació TUFA/TFA per tal de conèixer l'índex d'insaturació (Figura 28B).

La subpoblació P1 presentava uns nivells d'insaturació (TUFA) menors que la subpoblació P2. Aquests resultats es corresponen de manera inversa amb els nivells de TFA, ja que l'augment en àcids grassos provoca un augment en el percentatge de saturats i per tant, una caiguda en els TUFA (Figura 28B).

Les cèl·lules metastàtiques a cervell i pulmó mostraven uns nivells de TUFA baixos (per tant, un major grau d'àcids grassos saturats), de nou amb un comportament similar a P1. Per una altra banda, P2, B1 i Lv1 eren les poblacions amb major TUFA, en acord amb la menor quantitat de TFA (Figura 28B).

0

XL n , eRdn Rt d'n E d'et -l'n Rdà cNeXI l' L' à: w'w'6: In Ept àt -vReè BR 00 00 0n TàRvIc à 00
pt l' mlt c-dc 0000000-t URs-L s'mpR d' , LE dX-g'w'w's6' 00 mpRàcà s'Ràp c à s'ic-UmpRt 00
It cRs-Lsà 00BLt Rt 0-n , LscNtX-l' l' d' B-URsRt X-IX-g'BR 0, LE dX-Lt à 0n Rdà cNempRà 0, R 0àRp 0
XL t ct Spd e, 4-X 00 Rs 00 BR/BR 0 c psIX-g' 0



0u E, UeWw'Ue' w' r LUgLnLwUe'Ue'v, Rr c'q, r gr FLUEEFG'fUR c'q'p' 00000 Ue, g'p'p' 000 000 r Fè, g' Er d'Ue'f w'
l r LUgLnLwUe'Ue'g'Ue'Ue'LEI è, q, u U, u' t Neà 0 Rs 0l n l t 00000 BR 00Ràc'et -Ràw'w'0: w'w'w'6' 00 00 -vReè 0
B0X-Bà 00 si àà l' 00Ld 00000: 0 Qw'w'Xn ⁶⁶ v'Rà s'R, s'RàRt cRt 0Rt 0eR-/0B0 EàX-ààRà 0n l R. s'Xl , 0 0 0B s'Rd v' 00 00 -vReè 0
B0X-Bà 00 si àà l' 00 àl cpsl cà 00Ld 00000: 0%+6w'w'Xn ⁶⁶ v'Rà s'R, s'RàRt cRt 0Rt 0eR-/0B0 sBRt l BRà 0n l R. s'Xl , 0 0 0l c'v' 0

0

0-t à 0BR 00 n , e'0Rà, RXcsR'0e, 4-X: 00R 00XL e'RàcRsl e'cT'0Rà, RX-le'0sRe'vNtX-l' 0Rt 00R 00URt Lc-, 0
e, LSVt -X' 00 0, s'RàVt X-l' 00BR 00XL e'RàcRsl e'cM'0à à LX-lc 00 0n -SsIX-g': 0t vIà-g' 00 0t S-LSVt Rà-00IS M'0Rd'
le': 0 +6+Y' 00 0p Sn Rt c'RT 0NXBà 00 s'là à l' 00 c' psic à 00 00 0àRvI 00 s'RdX-g' 0n E 00 0-t BpXX-g'BR 00Ràc'sVà 00BR
sRc-Xe' 00 0n ET 00 0Mit 0à à LX-lc 00 0 0RcRt X-g'BR 00XL e'RàcRsl e'RT 0mpRàc' l s'Ntpe 00 0mpR 00XL e'RàcRsl e'
cT'0t 0n l R. s'U-t -dc 0 R 00NXBà 00 s'là à l' 00 c' psic à 00 0-t Rip 00 0le': 0 ++Y' 00

0

0Rs 00le'00t le-c' l s'0Rà 0 -vReè 00BR 00XL e'RàcRsl e'RT 0RàXV 00 0Rà 0n Rdà cNempRà 0n 0p-c' d' l s'
0-e, t 00 0à à le' 0t B 00 si Mn : 06YYW' 00 0t 0n Le'Xp d' 00L s'RàXrt d' mpRàc' t R-/0e'XL e'RàcRsl e'c'psR'
, Rsu 00t L' 00e'XL e'RàcRsl e'RàcRs-UXl c' 00-Spsl 00 %+Y' 00 0t X-g' 0n E 00 0e, t 0n L' 00slv l' 00BR 00t Lp' 00 0t 0
à-n -ep 00 0Rt csR' d' 0t -l' 00w'w' 00 00 00 00 vls -It d'n Rd àcNeXI l' l' L' à: w'w'w'6: In Ept àt -vReè 00BR 00
XL e'RàcRsl e'c'psR'-t URs-L sà' mpR' d' 0t -l' 00w'w'w'6' 00 00 vls -It d'n Rdà cNeXI l' l' XRsvRà 0, s'RàRt clv l' 0
dn ET 00 pt cà 00BR 00RcRt X-g' 0t csIX Rà 00 0e' s' mpR' 00XL t XLsBls -Rt 0n E 00R 00URt Lc-, 00Ràc'sVà 00BR 00Rc-Xe'
BRàXs-c'RT 0mpRàc' t-, pà 00BR 0n Rcnàdà -00 0t í) 0n , d. t l' 00Rd' 0le': 0 +66Y' 00

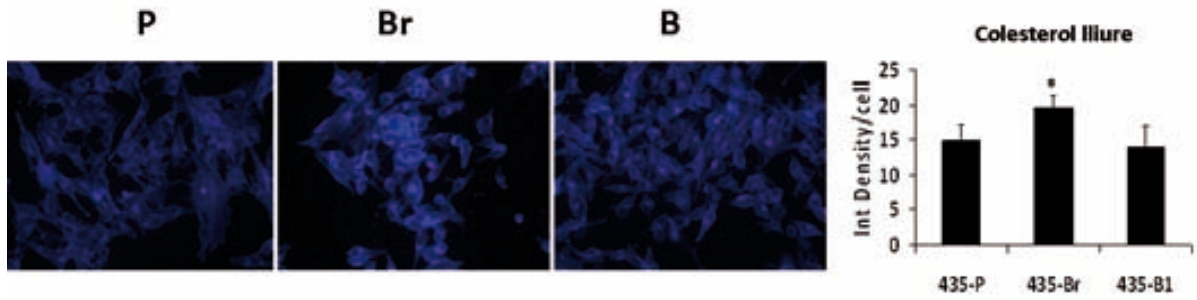
0

0

0

?

?



En E, Ush5... rR... è... E, r... t... RUL... r... Rr... Er... eùg... U, r... I... n... e, t... Lé/Xpè... U/I... R... s... t... R... s... R... t... c... X... g... R... I... s... n... R... L... f... I... s... R... t... c... X... t... c... R... t... à... d... c... R... S... I... B... I... R... t... à... v... v... B... t... c... R... t... L... n... E... R... B... R... V... e... p... R... à... R... t... p... t... I... N... S... R... I... U/I... '... I... e... s... à... R... s... R... t... d... c... à... K... L... n... U... p... L... s... R... à... X... V... t... X... I... n... -... c... R... t... I... R... s... V... e... p... e... R... t... à... (X... R... e... v... t... -... c... R... t... I... R... à... v... I... X... g... R... à... c... N... t... B... I... s... B... R... s... L... v... I... R... à... v... e... p... e... R... t... à... = + ' + W

??

?

à... v... I... U... R... s... R... à... v... e... p... e... R... t... à... R... à... c... B... -... p... e... t... -... I... n... R... d... à... c... N... e... X... I... I... R... s... v... R... e... v... e... R... t... R... s... t... e... B... o... v... l... e... p... l... s... e... R... v... L... e... p... X... g... R... t... R... e... X... L... t... c... t... S... p... a... c... e... ,... B... -... X... à... R... t... U... p... t... X... g... R... B... R... à... R... e... X... c... -... v... d... c... R... s... X... R... s... v... R... e... v... e... R... t... L... c... ,... B... o... X... p... n... p... e... X... g... e... ,... B... -... X... I... ,... I... s... c... X... p... e... s... B... R... e... R... à... v... e... p... e... R... à... n... R... d... à... c... N... e... m... p... R... à... I... R... s... v... R... e... v... e... R... à... n... I... t... c... R... t... -... I... R... t... I... e... c... s... R... à... n... L... B... R... e... B... R... n... R... c... N... à... l... à... -... X... R... s... R... e... s... l... e... 99... S... p... s... l... %... 6... /... 2... 2... 2... 2... 2... t... B... -... X... I... v... I... p... t... à... t... -... v... R... e... v... e... B... R... e... v... e... R... t... n... T... à... R... e... v... i... c... à... p... t... d... n... R... t... c... I... n... E... p... t... à... v... i... e... L... s... à... B... R... e... v... e... p... e... R... t... U... R... s... -... L... s... à... R... t... R... à... v... e... p... e... R... à... s... V... i... m... p... R... t... R... e... v... e... t... -... I... R... t... ,... I... s... R... t... d... e... 99... S... p... s... l... %... 6... :... R... à... m... p... R... s... s... l... y... '... m... p... l... t... c... X... I... X... g... R... B... R... e... v... e... R... t... B... R... e... v... e... I... t... B... I... B... R... e... v... e... R... t... n... L... à... c... s... l... v... I... m... p... R... e... v... e... t... -... I... R... t... V... i... n... I... t... c... R... t... -... I... R... t... p... t... à... t... -... v... R... e... v... e... e... B... -... X... à... R... e... v... i... c... à... U... t... à... R... e... v... L... c... a... p... ,... R... s... -... L... s... à... l... e... à... B... R... e... v... e... s... 6... 99... S... p... s... l... %... 6... :... B... s... R... d... y... '... R... t... X... L... t... à... R... m... o... v... t... X... I... :... R... e... p... S... n... R... t... c... R... t... R... e... v... e... R... t... R... e... v... e... R... t... N... X... B... à... S... s... i... à... à... l... à... à... c... p... s... i... c... à... T... à... p... t... U... R... t... L... c... ,... R... -... n... ,... L... s... d... t... c... ,... R... e... B... R... à... R... t... v... L... e... p... ,... I... n... R... t... c... B... R... e... v... e... n... R... c... N... à... l... à... -... X... R... s... R... e... s... l... e... m... p... R... e... v... e... R... à... n... I... t... c... T... R... t... R... e... v... e... R... à... n... T... à... R... e... ,... R... X... -... l... e... c... i... B... R... à... '... R...

?

?

?

?

?

?

?

?

RESULTATS

procés oxidatiu, es trobava sobreexpressada en metàstasi cerebral (Figura 26). Les cèl·lules metastàtiques a cervell solen restar latents per llargs períodes de temps (Gewirtz, 2009); per tant, les cèl·lules capaces de sobreviure han de poder suportar insults metabòlics imposats durant llargs períodes de temps (Singh et al., 2012) i alts nivells d'estrès oxidatiu (Singh et al., 2012; Spitz et al., 2000).

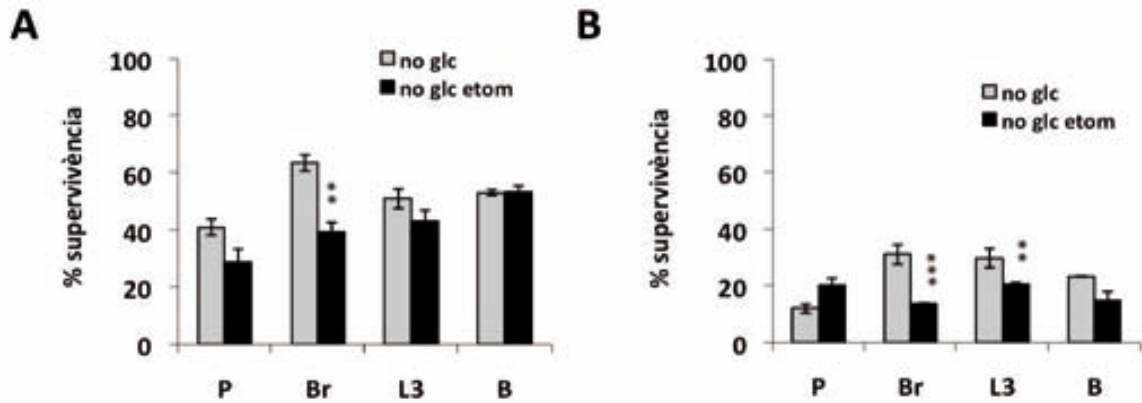
Per posar de manifest aquesta hipòtesi, vam analitzar la supervivència cel·lular en presència d'etomoxir, un inhibidor del transportador carnitina palmitoiltransferasa I, també conegut com CPT1, que facilita la internalització d'àcids grassos en el mitocondri (Samudio et al., 2010).

S'ha descrit que les cèl·lules tumorals per tal de mantenir els nivells d'ATP transformen el piruvat en lactat (Samudio et al., 2010), fet que s'interpreta com una mesura adaptativa de la cèl·lula quan no pot oxidar lípids en el mitocondri. Sospitant que la presència de glucosa en el medi podia afavorir el seu ús en detriment de l'oxidació lipídica, vam realitzar l'experiment en condicions de deprivació de glucosa i piruvat, mantenint la concentració habitual de glutamina i sèrum, de 2 mM i 10%, respectivament.

En les condicions d'estarvació de glucosa durant 48h, s'obtenien resultats coincidents amb una major supervivència de la línia metastàtica a cervell en comparació amb 435-P (Figura 34A, barres grises). La retirada de glucosa combinada amb etomoxir (Figura 34A), mostrava a les 48h una disminució específica en la supervivència de la línia de metàstasi cerebral 435-Br1 respecte a la retirada de glucosa ($p=0.002$). Aquesta variant sobrevivia més que la resta de metàstasis ($p<0.05$) en deprivació de glucosa. La combinació amb etomoxir no produïa canvis significatius en la supervivència de les metàstasis a pulmó i os respecte les condicions de no glucosa.

A 72h en hipoglucèmia (Figura 34B), la línia metastàtica a cervell presentava una supervivència superior en front de les cèl·lules 435-P ($p<0.001$) i la combinació amb etomoxir reduïa la supervivència més d'un 50% respecte les condicions sense glucosa ($p=2E-05$). Les diferències en supervivència entre 435-Br1 i les altres metàstasis es reduïen. La combinació d'etomoxir i retirada de glucosa, provocava una disminució en la supervivència en 435-Br1 però també en 435-L3 ($p=0.006$), confirmant la semblança entre aquestes línies respecte el seu comportament metabòlic dependent de lípids (Figura 34B).

2



Qu E, Uehsz?? wí uLULer ?ShH2??or ggr Rr gRU, uF Lg? r LUgLnLú Er gR F?er q, uRUv?er ? cEvègU?EL, uLUer g?U i ? r Lèl èTy uLsf ?KVAz??RàXVèp RàwWY? :wWY?6wWY?6RàVi t Xpè-vi sàRt àR?SèpXL àl ?EI ssRàs-s-àRàV. ? àRt àR?SèpXL àl ?-? n E?RcLn L/-s?; ++? ?EI ssRà? RSsRàV?Bpsl t c?wQV?3L ?ç; M?3?? ?v-I E-ed c?XRe?e s?RàV? n Ràpsl s? Rs?S-àc? ev-L Rcd 'EàS Ràp?c càRàS R, sRàRt cRt ?XL n ? ? RsXRt d cSR?BR?V-I E-ed cBRUt -cXL n ? ? ?n -cR t I ? BR?E? EàL sENt X-I ?XVèp Rà?csi Xcl BRà(I EàL sENt X-I ?XVèp Rà?T L?csi Xcl BRàV/6+++? -cR ?BR?h TàBR?ç?R/, Rs-n Rt cà? -t BR, Rt BRt cà? ?n -cR t I ?á???? :?S Lvl ???XL n , I sl t d?t L?Sè?RcLn L/-s?t d?t L?Sè?Rt ?XI BI ?et -I ?úú, =++6? úúú, =++6? ?

2

? ?en Ic R-/R/, Rs-n Rt c?RàV?I?S R, Rc-s?n E ?ecsRà?et -Rà?n Rcdà cNempRà? ?XRsvRe??s? W? %6???? W? ? R?cl?e BR?XL t Usn Is ?àRà, RX-UX-dc ?BR?URt Ln Rt '??I?S Rà-àcVt X-I?I?d?BR, s-vIX-g ?BR? SèpXL àl?Rà?UR-I ? I cRt cRt ?cL cRà?Rà?et -Rà?BR?h RcNàclà -?XRSEsle?Rt ?XL n , I sIX-g?n E ?d?et -I? , I sRt de?? ?wQV? =++?≥? Rs? ?cL cRà?Rà?et -Rà? c?wWY?y?BRn Làcsl t c?d?-n , LscNtX-I? BR?d? sRà-àcVt X-I? I ?d? BR, s-vIX-g ?BR?SèpXL àl?, Rs? ? ImpRà?c-, pà?BR?URt Lc, '?? Ln Tà?d? et -I? %6? , sRàRt dv I?pt ?p Sn Rt c?St -UXic-p?Rt ?p, Rsv-vVt X-I?S Rà, RXcR? ? et -I??s? =++6? ?B B-X-g? B?RcLn L/-s?Rt ? ImpRà?Rà?XL t B-X-L t à?B-àn -t p3? ? ?àp, Rsv-vVt X-I? Rt ?cL cRà? ImpRà?Rà?et -Rà? R/XR, c?Rt ?d? et -I? , Is Rt de?-?cdn , LX?BR?n It Rsl? à-St -UXic-vI? Rt ???W? ?Spsl? %W?y? ? ? sRc-sIB ? BR?SèpXL àl? XL n E-t IB ? In E?RcLn L/-s? ?Spsl? %W?y?n Làcslv I ?I? ?Rà?wQV?pt I? B-àn -t pX-g?Rà, RX4XI? Rt ?d? àp, Rsv-vVt X-I? Rt ?Rà?et -Rà?BR?h RcNàclà -?XRSEsle?S Rà, RXcR? ? d? sRc-sIB ? BR?SèpXL àl?èwWY?s6? , k+?++; ? ?w? , k+?++w? %6? , k+?6w? ?

2

? ?t ?RèR/, Rs-n Rt cà?Rt ?mpRà?Rà?ads vIX-g ?BR?SèpXL àl?Rà?n It cRt -I?ç; M?Spsl? %W?y? ? ? àp, Rsv-vVt X-I ?Rà?SRBp3?Rt ?cL cRà?Rà?et RRà?n Rcd àcNempRà? Rsu?àRn , sR? Rs?àL EsR?BR? ? et -I? , I sRt de?? =++6? Rs? ?cL cRà?Rà?et -Rà? c?wWY?y? ? ?XL n E-t IX-g ?BR?BR, s-vIX-g ?BR?SèpXL àl? ? RcLn L/-s?, sLvLXiv I? R?en Ic R-/RURXc?mpRà? ?wQV?In E?pt I? XI -SpBI? Rt ?d? àp, Rsv-vVt X-I?

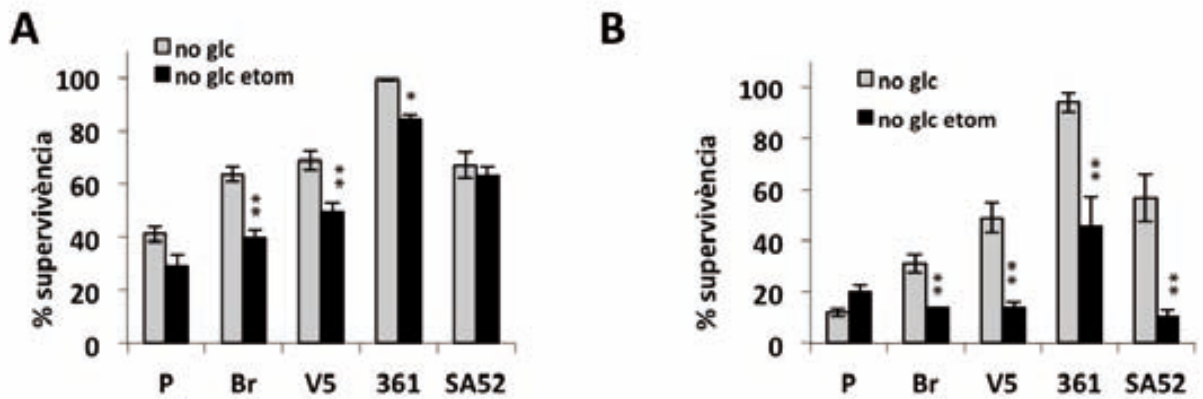
2

2

2

2

sRà, RXCRàXL t B-X-L t àBRt L SèpXL àlRt t LCRàRàt -RàXRREsleà? Rsut L Rt W/W/ Spsl
%Wyeis9, κ; 2)+W:W, κ++6y:69, κ++++Q:WY, κ++++Yγ



Eu E, UñHr gvs OEα gā r LUlnLú Er gLr, Rr cōpF t grr ggr Lr FgLUr q, uRvper d EvèU t ggr Fgi α gLU
L, UuLl r FLU i Br Lèl è TyULBf DUkVAzRàXVèpèRàW/W:W/W/s6:W/W/s2 W? ?))%62-?W? RàvI t
Xpè-vI sàRt àRèpXL àl EI ssRàs-àRàvL RàRt àRèpXL àl n ERdLn L/-s? ++O EI ssRàt RSsRàvBpsl t dWQV? 3L
ç; M?3?-H E-ed dXRèpè s, RsXs-àc èv-L R d Ràpæd càR/, sRààl càd d XLn R RàM R/, eXI c' -c t l BRW
R/, Rs-n Rt càt BR, Rt BRt càpSLvl XLn , l sl t d L SèRdLn L/-s? d L SèRt XI BI et - úú, =++Wúú, =++6:úú,
úúú, =++++6γ

2 2

ImpRàcàRsRàpèlc àXL t Usn Iv Rt ? , Rs?pt I? EIt BI? mpRèRàXVèpèRà n Rclà cNempRàBR
XRsvRègt ?n Rt éàRt à-E Rà? d M, L SèpXvN -I? mpRè et -I?, Is Rt de? mpRècsRà?n Rcnàclà -à?
R?R?pt I? I èsl? EIt BI: ?d ?àpàXR, c-E-edc I? Rcln L/-s? ? n pB-L R d Ie': ?; +6+?àpSSRs-I? mpR
ImpRàRàt -RàRsRt XI, IX RàB/-Bis IXBàsIà àl àRt XL t B-X-L t àRàcs-Xc-vRàBRt pcs-Rt cà?

? ?ERd)L/-BIX-gTàpt ? sLXTàmpR? sL, LsX-Lt I?IX Rc-è) L? ? , Is c-sBR? -Bà? R?èRàp?
óàRt ?X-XèBR?SRE à? ? ssIX RBL R d Ie': ?; +6%/? Lt IB Rà? RàB-UrsVt X-RàRt csR?vis -It cà
n Rd àcNempRàRsRà, RXCRèd àp, Rsv-vVt X-I ? èRàcs vl X-g?BR?SèpXL àl -?d? BR, Rt BVt X-I? BRè ?
BRSSIB IX-gè, 4-XI?Rt XL t B-X-L t àRàcs-Xc-vRàBR?SèpXL àl: Rt àVIn ?t cRsRààl Rt RàpB-BR? ?
XI , IX-dc I/-Bic-vI?BR?RàXVèpèRàXL n ?pt ?t B-XIB LsBR?RàVl?vRsàlc-ed d Rspc-èd Is ? -Bà?
Rt R-cpIX-Lt àBsNàc-mpRàBRn It XI?BR? pcs-Rt cà?

R?mpIt c-UXIs RààBR? ERd)L/-BIX-g?BRèX-XèBR?SRE à:Vl n ?URS-s? ?), I en -dc ?
XVèpèRà n E?V? ? V L RàRt àR?+?n ? V SèpXL àl -VIn ?n Ràpsis ? , sL BpXX-gBR? ? ; ?n l XIc ?
sIB -LIX c-vIn Rt d?Spsl? %γ

2

RESULTATS

La beta-oxidació s'inicia amb l'entrada d'àcids grassos a la cèl·lula a través de transportadors de membrana. Un cop dins, la *fatty acyl-CoA synthase* (FACS) afegeix un grup CoA, formant acil-CoA de cadena llarga. A continuació, el CPT-1 converteix aquests acil-CoAs en acilcarnitina, que entra a través de la membrana mitocondrial interna mitjançant la translocasa de carnitina (CAT). El CPT2 de la membrana mitocondrial interna converteix l'acilcarnitina en acil-CoA. L'Acil-CoA entra en la β -oxidació, resultant en la producció d'un Acetil-CoA per cada cicle (Extret de The AOCS Lipid Library). Aquest Acetil-CoA pot entrar en el cicle de Krebs i cadena respiratòria, produint ATP, poder reductor i CO_2 , que mesurem radioactivament (Collins et al., 1998).

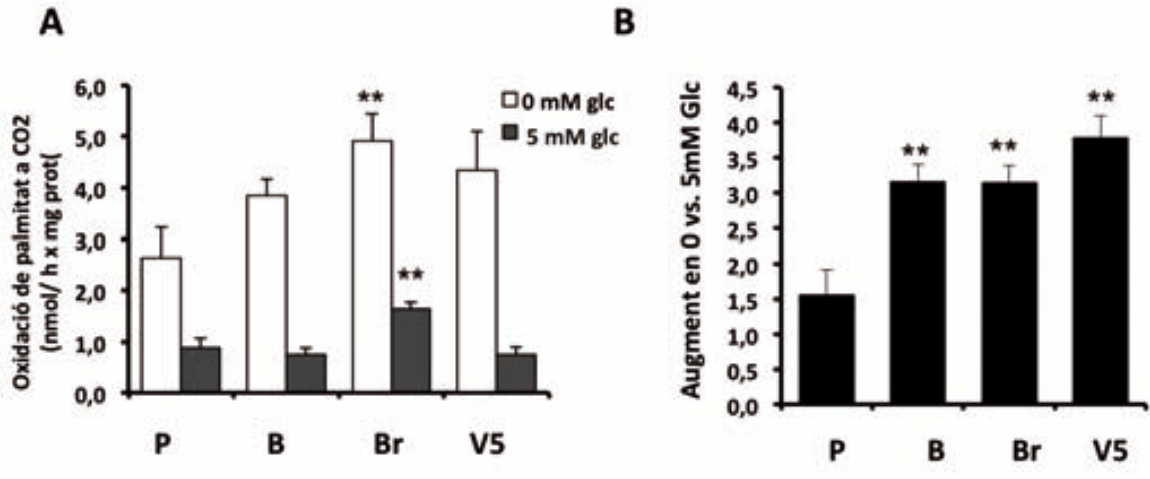
El càlcul dels nmols de palmitat transformats a CO_2 (Figura 36A), va posar de manifest que en presència de glucosa en el medi (barres negres), les cèl·lules 435-Br presentaven un augment significatiu en l'ús de lípids comparat amb la línia parental ($p=0.005$). En contrast, les línies metastàtiques B1 i V5, no presentaven canvis en l'oxidació respecte 435-P.

El cultiu de les cèl·lules en condicions d'estarvació de glucosa (barres blanques) induïa la β -oxidació en la línia 435-P (Figura 36A). Aquesta inducció era més important en la resta de línies metastàtiques, tot i que no significativa. Únicament la línia 435-Br1 presentava un augment significatiu en la producció de CO_2 respecte 435-P ($p=0.01$).

Ja que els nivells basal d'oxidació de CO_2 no eren iguals per a totes les línies, vam calcular l'augment net en oxidació restant els valors de CO_2 produït a 0 mM de glucosa menys els produïts a 5 mM (Figura 36B). L'augment en oxidació de la línia parental era de 1.5 en deprivació de glucosa vs. condicions basals. La línia 435-Br1 induïa un augment significatiu de l'oxidació que doblava el de la parental ($p=0.006$). La resta de línies metastàtiques mostraven una relació similar a les cèl·lules de cervell, amb diferències significatives respecte 435-P: B, $p=0.006$ i V5, $p=0.01$.

Aquest experiment demostrava que totes les línies metastàtiques podien respondre a la deprivació de glucosa oxidant àcid gras saturat a temps curts i que probablement, les diferències en supervivència en aquestes condicions no eren degudes a defectes mitocondrials.

2



En E, un 72% de les cèl·lules de múscul esquelètic de ratolons de línia C57BL/6J (C57BL/6J) i en -d c d Vn d BRT n RB- n E d n d :
 El ssRàt RSSRàt àRt d n d :EI ssRàt E d t mpRàt S q XL à l 'àvi n Ràpsl s d /-BI X-g BRT, I en -d c d d d , d Ràt d
 sR, sRàt d s d XL n d n L d BRT, I en -d c d /-BI c (n S BRT, s d /E M s l B d à à -S' d d p S n Rt d t R d Rt R d d d , d s L B p d
 XI d p d d XL n d d /-BI X-g d d + d n d d k d /-BI X-g d d n d d BRT S q XL à l 'àvi -c t l d BRT d R/, Rs- n Rt c à t BR, Rt BRT c à
 9h -c t l d d d : d s l v d d c y d d d d R s d d BI XL t B-X-g: d d , = + + 6 ú ú , = + + 6 v d

2

ss-Elc à d d ImpRà d pt c Ràt V d Ràt BRT n XR s BRT n In I mpRà n Rdà d c -c í Rt d XR s v R d d
 sRvR d v Rt d In E d pt d -B-L à t X s d d Rà, R X d d : Lt d R d n Rd EL e à n R d e, B-X d sR, sRàt d v l d pt d
 Iv It d c SR d IE B l e d R s d d d d R v l d d p, R s v-vVt X-I' d mpRà d R d Ràt B-U s Rt X-iv d BRT d Ràt V d Ràt B d à d
 In E d t l d n I t XI d Bò t B-Xlc -p à U t à l e n RdE Le à n R d e, B-X: XL t à c -p -t d pt d Rt L c, d n Rà d s L, R s d
 l e c Rà d e c R s t It XR d n Rd E u e m p Rà d d c s Rà t S R d e ' : d + 6 ; v d

Lt R-/RBL s à d mpRà d p c l UNS- d , L d X c p l s d XL n d pt d n R X it -à n R d s L) à p, R s v-vVt X-I d Rt d R d
 , s L X T à d n Rdà d n e X d B L t It d d p, L s d d e d n RdE Le à n R d n -d XL t B s -l e d d d s a R d R d e ' : d + 6 ; v d v In d
 m R à c -L t l s d d p c l UNS- d , L B s -l d R s d p t d p t X-g d R d e d s d XI E B l e d t d B -U s Rt d B I, d X-g d B R d d
 X v e p R à n Rdà d n c -m p R à d d n It XI d B R d p c s -Rt c à d

2

2

2

2.4. Analitzar el paper de l'autofàgia en la patogènesi de la metastasi

L'autofàgia és un mecanisme que pot actuar de forma contradictòria suprimint la iniciació tumoral o promovent el creixement en càncers establerts (Kenific et al., 2010; White, 2012). En la seva vessant pro-supervivència, l'autofàgia alleugera l'estrès produït (per exemple, per restricció de nutrients) afavorint la degradació de proteïnes malplegades. Per una altra banda, la degradació de proteïnes i membranes dona lloc a intermediaris com aminoàcids o àcids grassos que es poden utilitzar en el cicle de Krebs en el mitocondri (Clarke et al., 2012).

Fins ara, es considerava que la mobilització de lípids des dels *lipid droplets* era funció exclusiva de les lipases. Aquestes proteïnes hidrolitzen triglicèrids per donar àcids grassos processables en la beta-oxidació mitocondrial per produir energia. Però nous estudis impliquen a l'autofàgia en aquest procés, en el que es coneix com lipofàgia (Singh and Cuervo, 2012) que consisteix en la nucleació dels droplets en autofagosomes i la seva degradació als lisosomes, on s'obtindrien àcids grassos de cadena curta, útils per a la producció d'energia en el mitocondri (Czaja, 2010; Liu and Czaja, 2013). Estudis recents fins i tot suggereixen que l'autofàgia pot proporcionar components més eficients energèticament com àcids grassos lliures (Singh and Cuervo, 2012)

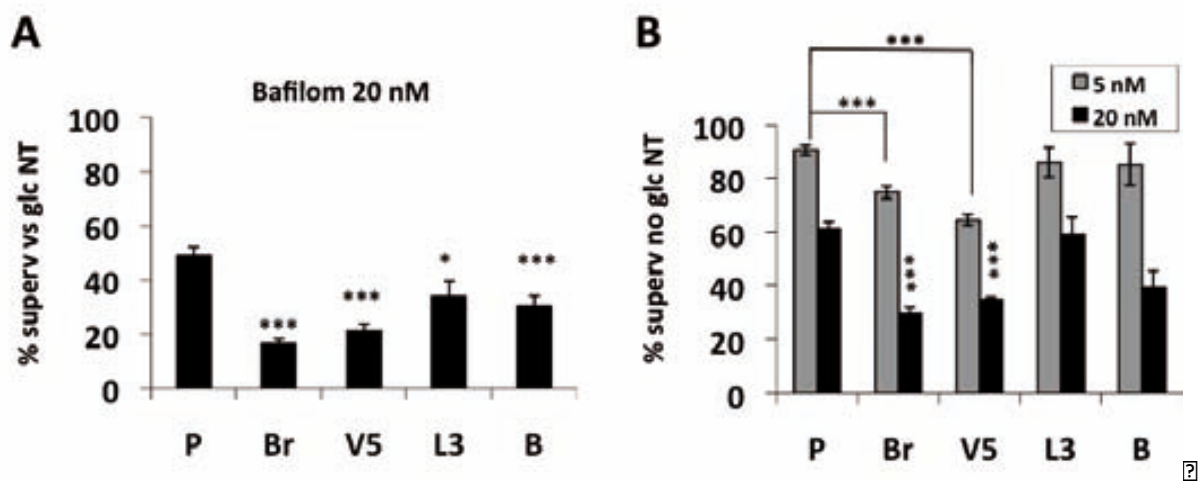
Degut a la resistència a la deprivació de glucosa i a l'augment en el metabolisme lipídic i oxidatiu observat en les cèl·lules metastàtiques a cervell, ens vam proposar d'analitzar el fenomen de l'autofàgia com a possible mecanisme pro-supervivència en aquestes línies.

Les cèl·lules 435-P, 435-Br1 i 435-BrV5 es van cultivar en condicions basals de glucosa (4.5 mg/ml) i es van tractar amb bafilomicina, un inhibidor específic de la ATPasa de protons vacuolar. Aquest tractament inhibeix l'autofàgia en el pas final de fusió de l'autofagosoma amb el lisosoma (Klionsky et al., 2012).

Es va analitzar una corba de temps, recollint extractes proteics a 0, 3, 6, 9 i 24h de tractament (20 nM). La bafilomicina indueix un acúmulo de LC3 II en les cèl·lules, la proteïna que envolta l'autofagosoma. (Yamamoto et al., 1998). La quantificació de l'autofàgia es va realitzar mesurant l'acumulació de LC3-II en les cèl·lules per WB (Klionsky et al., 2012).

2

On a étudié l'impact de la Bafilomycine (Baf) sur la survie des cellules infectées par le virus de la dengue (DENV) dans différents stades de développement (P, Br, V5, L3, B). Les résultats montrent que la Baf agit comme un inhibiteur de la survie des cellules infectées, avec une efficacité accrue à des concentrations plus élevées (20 nM) et dans les stades précoces (P, Br, V5). Ces observations sont corroborées par les données de survie en présence de Baf (Figure 4) et par les analyses de la réponse immunitaire de l'hôte (Figure 5).



Les résultats de cette étude démontrent que la Bafilomycine agit comme un inhibiteur de la survie des cellules infectées par le virus de la dengue. Cette action est plus prononcée à des concentrations plus élevées (20 nM) et dans les stades précoces de développement (P, Br, V5). Ces observations sont corroborées par les données de survie en présence de Baf (Figure 4) et par les analyses de la réponse immunitaire de l'hôte (Figure 5). Ces résultats suggèrent que la Bafilomycine pourrait être utilisée comme un agent thérapeutique pour réduire la survie des cellules infectées par le virus de la dengue.

On a étudié l'impact de la Bafilomycine (Baf) sur la survie des cellules infectées par le virus de la dengue (DENV) dans différents stades de développement (P, Br, V5, L3, B). Les résultats montrent que la Baf agit comme un inhibiteur de la survie des cellules infectées, avec une efficacité accrue à des concentrations plus élevées (20 nM) et dans les stades précoces (P, Br, V5). Ces observations sont corroborées par les données de survie en présence de Baf (Figure 4) et par les analyses de la réponse immunitaire de l'hôte (Figure 5).

RESULTATS

basals i en condicions de restricció de nutrients, especialment en la línia metastàtica a cervell.

L'autofàgia pot afavorir la supervivència en diferents passos del procés metastàtic: durant la circulació proporciona resistència a l'anoikis, durant l'establiment i adaptació al nou microentorn permet a les cèl·lules tumorals disseminades (DTCs) sobreviure a la *dormancy* o quiescència, i finalment, promou el creixement de la macrometàstasi permetent sobrepassar l'estrès del creixement tumoral en un microentorn estrany (Kenific et al., 2010). Totes aquestes funcions, unides a la capacitat de degradar proteïnes malplegades i produir intermediaris per al cicle de Krebs (Clarke et al., 2012) presenten l'autofàgia com un possible mecanisme imprescindible per a l'èxit de la metàstasi cerebral. Particularment la metàstasi cerebral es veuria beneficiada d'aquesta funció quan la disponibilitat de glucosa està limitada, suggerint un bescanvi cap a mecanismes d'obtenció d'energia alternatius, on els lípids tindrien un paper rellevant.

2.5. Analitzar la contribució de la funció i dinàmica mitocondrial a la versatilitat metabòlica de les cèl·lules metastàtiques.

El mitocondri és un orgànul clau a l'hora de delimitar el metabolisme cel·lular i pot actuar com a regulador de la modulació energètica global (Nunnari and Suomalainen, 2012). La funció mitocondrial és essencial perquè les cèl·lules tumorals compensin les alteracions bioenergètiques que presenten, algunes cap a més glicolítiques i altres cap a més oxidatives (Wallace, 2012). En front d'un requeriment elevat d'ATP, la cèl·lula ho pot contrarestar amb un augment en la massa mitocondrial i una inducció de la fosforilació oxidativa (Nunnari and Suomalainen, 2012).

Ja que la morfologia i dinàmica mitocondrial juguen un paper important en la regulació metabòlica i es consideren un indicador de l'activitat d'aquest orgànul (Song et al., 2008), ens vam plantejar analitzar aquestes funcions en les variants metastàtiques.

Inicialment vam utilitzar una tinció específica de mitocondris, Mitotracker Green (Figura 39) per observar la morfologia mitocondrial en les diferents línies. La línia 435-P presentava uns mitocondris fragmentats distribuïts perinuclearment, a més d'una baixa intensitat de marcatge que suggeria una massa mitocondrial reduïda. En la variant metastàtica a cervell 435-Br1 s'observava una distribució de mitocondris per tot el citosol (tot i que les cèl·lules són més arrodonides que la resta), amb un fenotip una mica més elongat que 435-P, que augmenta en les cèl·lules BrV5 que presentava uns mitocondris encara més elongats i interconnectats que 435-Br1, distribuïts al llarg del citosol i amb una intensitat de marcatge molt elevat.

A diferència de la línia 435-Br1, la variant metastàtica a pulmó presentava un fenotip elongat i amb mitocondris distribuïts al llarg del citosol fins a l'extrem de la cèl·lula, més proper a V5 tot i que amb menys interconnexió i elongació. Finalment la línia 435-B1 també presentava un fenotip intermig pel que fa a elongació i distribució en el citosol, més similar a 435-Br1 (Figura 39).

?

?

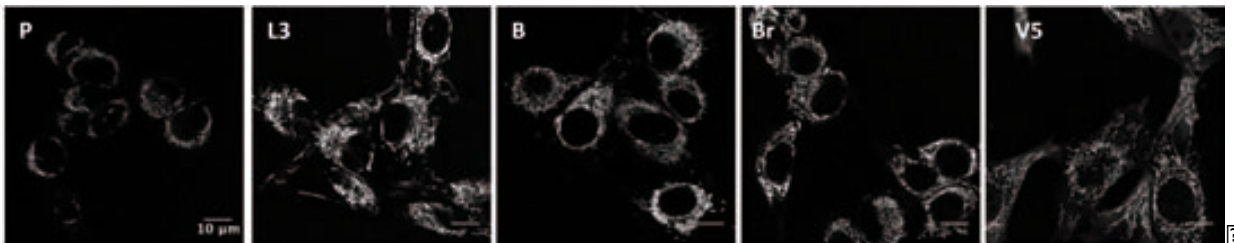


Figure 1. Immunofluorescence analysis of the expression of the *Utr* protein in the developing eye. Panels show the expression of *Utr* (green) in the eye of *Drosophila melanogaster* at different developmental stages: P (Pupa), L3 (3rd instar larva), B (Blastoderm), Br (Brain), and V5 (V5-tagged protein). Scale bar = 10 µm.

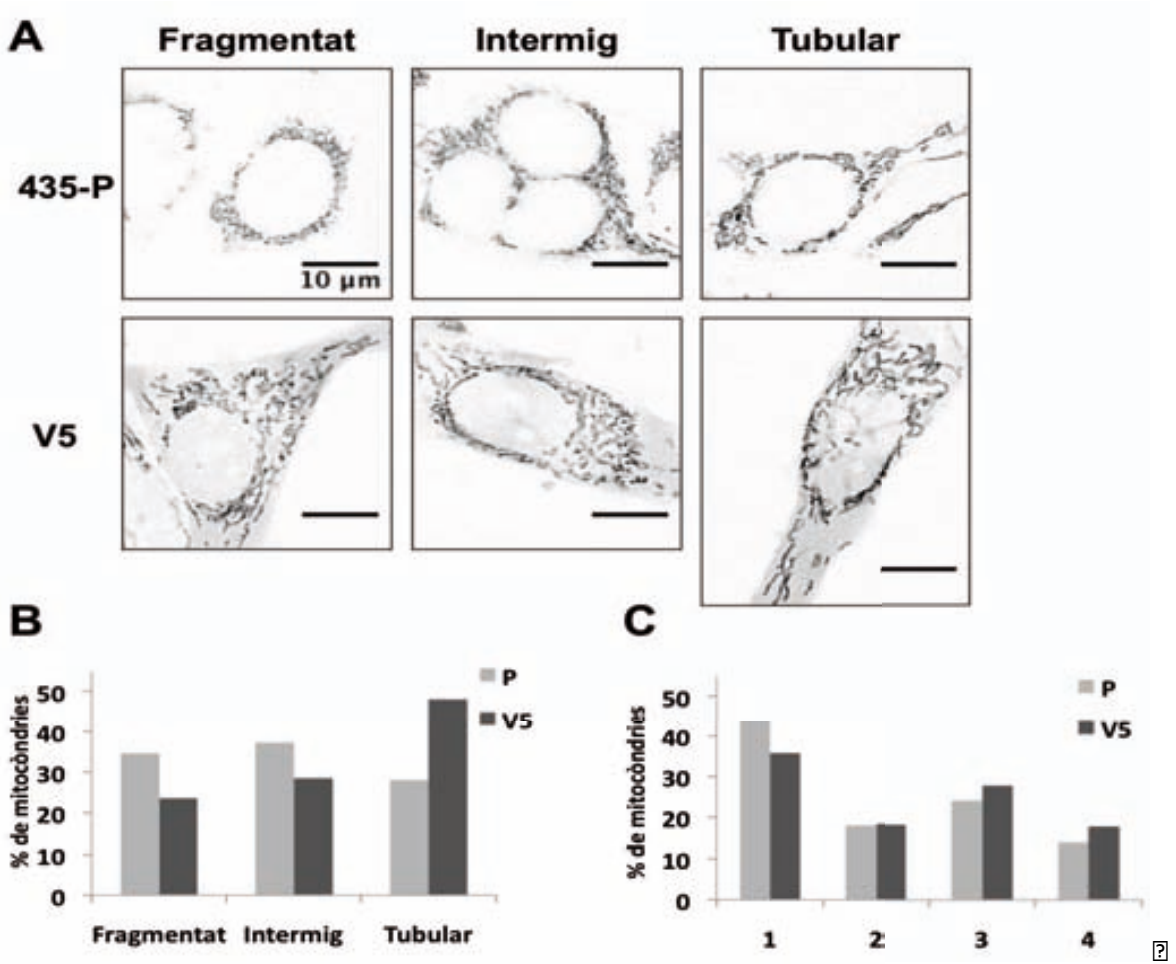
?

The expression of *Utr* is ubiquitous in the developing eye, with strong expression in the outer layers of the eye. *Utr* is expressed in the eye of *Drosophila melanogaster* at all stages of development, from the blastoderm stage to the adult stage. The expression of *Utr* is observed in the eye of *Drosophila melanogaster* at all stages of development, from the blastoderm stage to the adult stage.

The expression of *Utr* is ubiquitous in the developing eye, with strong expression in the outer layers of the eye. *Utr* is expressed in the eye of *Drosophila melanogaster* at all stages of development, from the blastoderm stage to the adult stage. The expression of *Utr* is observed in the eye of *Drosophila melanogaster* at all stages of development, from the blastoderm stage to the adult stage.

The expression of *Utr* is ubiquitous in the developing eye, with strong expression in the outer layers of the eye. *Utr* is expressed in the eye of *Drosophila melanogaster* at all stages of development, from the blastoderm stage to the adult stage. The expression of *Utr* is observed in the eye of *Drosophila melanogaster* at all stages of development, from the blastoderm stage to the adult stage.

2



U E, U³⁵... r Lng... ri, U³⁵... r FLU... UèVeFe, ug... t g... èF Uer g... FLr, vèFFrvLUerg... Er... h2
 222 322Rà... n cSRà... Ec-t SpBRà... n E... -cLsl XaRs... SsRRt... Rs... W... V... t... t l ecí s... n E... I SR... Rs...
 à t Neà... BR... t SI X-g: Rà... l XI èpè s... t vRsà... BR... X-sxpè s-d c'... n I cSRà... Rt Rà... d BR... s-àL à... Rs... W... V...
 sR, sRà... t d c-vRà... BR... cSRà... URt Lc-, à... Rà... E... c... à... Sn Rt d c... t cRsn -S... p... Epè s'... R... R... t d cSR... BR... -cLXLt Bs-à...
 à... EsR... R... d... t l ecí d... Rs... l BI... URt Lc-, '... -c... t l BR... V... è... Rà... t l ecí BR... V... R... /, Rs-n Rt d... R, sRà... t d c-p... BR...
 ; ... t cR... XLt t RXc-v-d... Rà... l XI èpè s... X... n... n... RI (, Rs4 RcsR'... LEsR... R... è... sà... L Ec-t Sp... c... Rà... l t... n I sXI s... W...
 vl è... sà... BR... è... Rs... BRUt -s... URt Lc-, à... BR... n Rt éà... v... n Tà... s... è... t cR... XLt t RXd... c... BR, sRà... t d c-p... BR... v...
 ? ?
 ?

El el t ARt cSR... è... sLXRàà... à... BR... U... à... g... U... à... g... BR... R... sn -t I... è... è... sIB I... è... t cR... XLt t RXc-v-clc...
 BR... è... U... n Rt cà... n -cLXLt Bs-leà... Rt X... V... è... Rà... M... n It Rà... è... RSsL... à... R... c... è...': ++; ... mpR... è... U... à... g... Rà... M...
 sRè X-Lt Ic... n E... Ip Sn Rt cà... RT U... à... U... s-dX-g... L/-Bic-vl 9 Lsít L... R... d... è...': +6+y... vIn... è... t le-d'Is...
 èR/, sRà... g... BR... è... p... Rà... è... sLcR3 Rà... è... t vL... è... XsIB Rà... è... t ImpRà... è... t sLXT... è... t 6... è... t ; ... Spsl... è... W... è... t

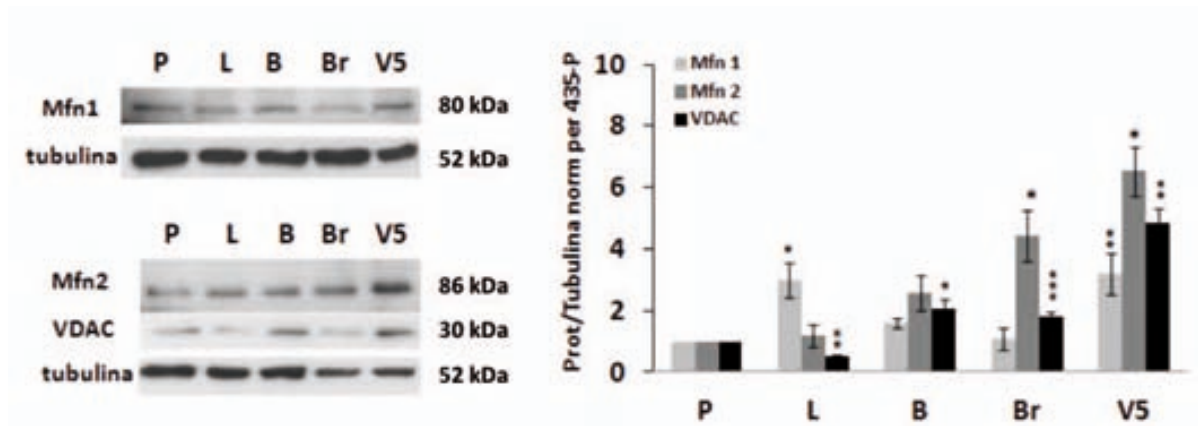
RESULTATS

L'expressió de Mfn1 era particularment baixa en la línia parental però també en la variant metastàtica a cervell, 435-Br1, i os, 435-B1. Mfn1 apareixia diferencialment augmentada en 435-L3 ($p=0.002$) i 435-B1 ($p=0.03$) respecte 435-P (Figura 41), coincidint amb la morfologia observada en la figura 39. L'anàlisi d'expressió de Mfn2 mostrava una sobreexpressió d'aquesta proteïna en les variants metastàtiques de cervell en comparació amb la línia parental ($p<0.05$). La resta de variants metastàtiques no mostraven diferències significatives respecte 435-P. Aquest fenomen és especialment interessant ja que Mfn2 s'encarrega de posar en contacte reticle i mitocondri afectant així a l'homeòstasi del Ca^{2+} i a fenòmens metabòlics, com l'oxidació de glucosa i el cicle de Krebs. Cèl·lules on aquesta proteïna no s'expressa veuen aquesta activitat reduïda i la compensen amb un augment en la velocitat de captació de glucosa i glucòlisi (Zorzano et al., 2010).

Finalment, ens vam interessar per la quantitat de mitocondris presents en cada línia cel·lular. Per això, vam avaluar per WB la massa mitocondrial, que es pot considerar proporcional a l'expressió de la porina o VDAC (*Voltage-dependent anion channels*), un canal iònic situat a la membrana mitocondrial externa (Sebastian et al., 2012; Zorzano et al., 2010) que a més és responsable de l'entrada d'àcids grassos de cadena llarga i curta en el mitocondri (Lemasters and Holmuhamedov, 2006).

L'anàlisi de VDAC per WB, mostrava uns nivells baixos d'aquesta proteïna en la línia parental. L'expressió augmentava progressivament en les variants metastàtiques de cervell, 435-Br1 i V5 (Figura 41, barres negres), de manera significativa en comparació amb la línia parental ($p<0.001$ i $p<0.01$, respectivament). La variant metastàtica a os presentava un lleuger augment en VDAC respecte 435-P ($p<0.05$), amb uns nivells similars als de 435-Br1. Finalment, la variant metastàtica a pulmó presentava una baixa expressió d'aquesta proteïna, fins i tot per sota de la línia parental ($p<0.01$).

2



u E, U3- zgr g r Ugl nLú Er gUv, Rr cñ, r gr FLr FEFUE I r FLr F r U UggU uè vè Fe, U r F r, è Lr Fr g
 er zEgup uè vè Fe, U r sR, sRàRt d c-pBR/ , sRà-gBRà, sLcR3 RàBRUpà-g U 6 U ; BR, Ls-t I
 sRd :I t Neà BRT à-cl n Vcs-XBRXI BI , sLcR3 I t Lsn I ecí I BI , RsqEpet I 'XL t c-t pl X-g: Ràvi
 t Lsn I ecí I s mpRààvi d sà, RsRààvi d sàBRwVn -c t I á : , sLvi XLn , I sl t XI BI et -I t cywV:
 , ='+Wú, ='+6:úú, ='+6γ

2

2

2

mpRààRsàp c à pSSRs-Rt mpR c-, pàBRn RclE Leàn RLEàRsvlc Rt XI BI et -I
 n Rd àcNeXI, L Bs-I Ràà s RàX-L t Ic :L U t à L càRsXL t àRmVt X-I: BR un Rt àBR-t Nn-XI
 n -cXLt Bs-lempRààBLt Rt BR It RslB-UrsRt X-le'

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

RESULTATS

DISCUSSION

DISCUSSION

DISCUSSION

1. Relació causal entre l'expressió d'ERp57 i la metastasi òssia

El reticle endoplàsmic (RE) és la llar d'una gran varietat de xaperones que interaccionen per propiciar el plegament correcte d'altres proteïnes. L'ensamblatge de les cadenes multimèriques de proteïnes és crucial perquè puguin secretar-se de forma correcta. La complexitat del sistema depèn de la interacció de les xaperones amb lectines unides a la membrana del RE com la calnexina (CNX) i el seu homòleg soluble, la calreticulina (CRT), que funcionen conjuntament en el processament amb els enzims glucosidasa I i II, que constitueixen un punt de control de qualitat, i la glucosiltransferasa (UGT1), que facilita el plegament de les glicoproteïnes formades (Moremen and Molinari, 2006). El RE allotja també un conjunt de proteïnes regulades per glucosa (GRP), homòlogues a les proteïnes de xoc tèrmic citoplasmàtiques HSP90/HSP70, GRP94/GRP78, respectivament, conformant un complex de multixaperones.

En aquest context i funcionant tant en tàndem com independentment dels sistemes de lectina i GRP, es troba ERp57 (GRP58, ERp60, ERp61, PDI-Q2, Pdia3 o 1,25D3-MARRS) que pertany a la família de la *Protein Disulfide Isomerase* (PDI). És una oxidoreductasa del lumen del RE que catalitza l'enllaç disulfur de les noves glicoproteïnes a través de la seva interacció amb CRT i CNX. PDIA2, ERp72 i PDIA6 actuen sota els auspicis d'aquest complex multi-xaperona amb funcions reguladores del RE (Appenzeller-Herzog and Ellgaard, 2008; Maattanen et al., 2006; Meunier et al., 2002). ERp57 participa en el control de qualitat de noves glicoproteïnes sintetitzades i és un component del complex de càrrega de pèptid (PLC) de les molècules HLA I (Dong et al., 2009). ERp57 també s'ha localitzat fora del reticle, en nucli, citoplasma i superfície cel·lular (Turano et al., 2011)

Fins ara no s'havia descrit el paper fonamental que té la ERp57 en la regulació de processos complexos com la colonització metastàtica, reprogramant el procés de la TEM per induir l'anomenat procés transició mesènquima-epiteli (TME) que facilita l'ancoratge de les cèl·lules a l'òrgan diana (Li et al., 2001). Les nostres dades indiquen que la sobre-expressió d'ERp57 s'associa a caigudes en els nivells de vimentina. Per una altra banda, la silenciació d'ERp57 pot reorganitzar la vimentina i distribuir-la perinuclearment, conformant protuberàncies reminiscents de la condensació de microtúbuls, necessàries per l'adquisició d'un fenotip més mòbil. Així, és probable que la sobre-expressió d'ERp57 s'associï a

l'adquisició de trets necessaris per l'ancoratge i l'arraigament de les cèl·lules metastàtiques a l'os (Santana-Codina et al., 2013).

L'aclaparadora complexitat de la colonització en la metastasi òssia es veu facilitada no només per aquest fet, sinó també perquè en les cèl·lules que han difós amb èxit, la sobreexpressió d'ERp57 repercutirà en l'habilitat per controlar l'activitat redox intra i extracel·lular a través de la seva capacitat reductasa dependent de tiol (Hirano et al., 1995). Aquesta habilitat permet la seva funció com a sensor redox per tal d'adaptar les cèl·lules als insults oxidatius (Grillo et al., 2006).

Durant el procés oncogènic, algunes regions del tumor experimenten hipòxia i estrès metabòlic (Pan and Mak, 2007). Aquest fet propicia una transformació metabòlica en la cèl·lula tumoral amb l'objectiu de mantenir els nivells bioenergètics, que es caracteritza per un augment en la glicòlisi (Brown and Wilson, 2004; Shaw, 2006). La glicòlisi és un procés bioenergètic poc eficient per la producció d'ATP en comparació amb els mecanismes fisiològics oxidatius (Hsu and Sabatini, 2008). Warburg justificava aquesta predominança amb l'existència de defectes mitocondrials que resultarien en un augment compensatori del flux glicolític (Warburg, 1956) tot i que diversos autors han demostrat que moltes cèl·lules tumorals proliferants no presenten defectes en el metabolisme oxidatiu oxidatiu (Moreno-Sanchez et al., 2007; Sotgia et al., 2012).

El microentorn ossi es caracteritza per baixos nivells de glucosa i un ambient d'hipòxia (Stresing et al., 2012), fenòmens que indueixen la UPR (Elanchezhian et al., 2012). ERp57 o GRP58 és una proteïna regulada per glucosa, i com a tal, la seva expressió s'indueix quan els nivells de glucosa del microentorn són baixos (Lee, 1981). Degut a la importància de la hipòxia en el microentorn ossi i al paper de HIF-1 en la promoció de la glicòlisi (Deberardinis et al., 2008), era esperable un fenotip clàssicament Warburg en les cèl·lules que metastatitzen a os. Tant els resultats de privació de glucosa com els de morfologia mitocondrial suggereixen que aquestes cèl·lules podrien dependre de la fosforilació oxidativa.

Existeixen molt pocs estudis en la literatura sobre metabolisme glicolític en el microentorn ossi i encara menys en càncer de mama. D'entre ells, un estudi metabòlic en metastasi òssia de càncer de pròstata descriu una elevada presència d'aminoàcids, colesterol, àcid cítric o fumarat comparat amb el tumor primari o altres metastasis òssies (Thysell et al.,

2010), suggerint la possibilitat del metabolisme oxidatiu en un microentorn tan restrictiu. La sobre-expressió d'ERp57 en metàstasi òssia està en concordança amb estudis previs que mostren una relació inversa entre els nivells d'ERp57 i els nivells d'oxigen (Xu et al., 2009). Xu i col. descriuen que cèl·lules que sobre-expressen ERp57 tenen tendència a la mort per apoptosi en ambients hiperòxics. Així, la seva sobre-expressió en ambients hipòxics (com l'os) afavoriria la supervivència. Per tot això, la presència d'ERp57 permetria el creixement metastàtic òrgan-específic en l'os, tal i com mostren els nostres experiments *in vivo*. En canvi, altres òrgans com el pulmó es veuen invadits per cèl·lules amb unes característiques d'oxido-reducció diferents que no suporten un creixement sostingut a l'os (Stresing et al., 2012).

La combinació de l'espectroscòpia de Raman (RS) amb tècniques d'anàlisi multivariat ens ha proporcionat un mètode quantitatiu poderós per a la discriminació de fenotips metastàtics, basant-nos en les seves característiques metabòliques (Nieva et al., 2012). L'ús del RS ens ha permès distingir un fenotip lipídic associat a la òrgan-especificitat de la metàstasi, ja sigui per un augment o disminució de certs metabòlits. Així, espectres adquirits en el rang 2820-3030 cm^{-1} , on trobem les bandes dels TFA (2845 cm^{-1}) i els TUFA (3015 cm^{-1}) permeten la distinció de cèl·lules de càncer de mama amb capacitat per metastatitzar a l'os de altres amb capacitat per a metastatitzar a cervell o pulmó.

L'augment en la síntesi de molècules o la capacitat de fer front als requeriments energètics són claus per a la progressió tumoral i metastàtica (Deberardinis et al., 2008) i mantenen a la cèl·lula en un estat perpetu de demanda energètica. Aquests processos, que poden ser induïts pel microentorn, generen estrès metabòlic (Mathew and White, 2011). La correcta adaptació a l'estrès en la iniciació i progressió tumoral que desencadena la metàstasi depenen de l'activació de rutes que promoguin el benestar cel·lular. Aquesta idea, s'ha anomenat "*non-oncogene addiction*" (Luo et al., 2009) i es podria resumir com l'activació del fenotip d'estrès del càncer (metabòlic, proteotòxic, oxidatiu o mitòtic). Luo incorpora recentment aquest procés als *hallmarks* del càncer (Luo et al., 2009), junt a la evasió de la resposta immune (Kroemer and Pouyssegur, 2008).

Una de les funcions més destacables d'ERp57 en el citosol és la seva participació en l'ensamblatge i activació de mTORC1 a través de la seva interacció amb mTOR (Ramirez-Rangel et al., 2011). Aquest regulador de la síntesi proteica acobla la sensibilitat a nutrients amb el creixement cel·lular i el càncer (Hsieh et al., 2012). A més, el paper que té ERp57 en la modulació de la senyalització de STAT3 també contribuiria a un estat tumoral avançat (Coe et

al., 2010; Guo et al., 2002). S'ha descrit la seva interacció a nivell proteic en membrana, des d'on ERp57 podria regular la fosforilació de STAT3, en el nucli, mitjançant la resposta transcripcional de STAT3 afavorint la unió STAT3-DNA, i en el citosol (Chichiarelli et al., 2010). Però altres autors apunten a una regulació negativa des del lumen del RE a través del complex ERp57-CRT, tot i que el mecanisme concret no s'ha definit (Coe et al., 2010; Guo et al., 2002)

La plasticitat metabòlica de les cèl·lules tumorals es revela com un fenomen bàsic en la consecució de la metastàsis clínica. Hem constatat que gens vinculats a la reprogramació del (Ogino et al., 2006) donar suport al creixement i la proliferació cel·lular a os, indicant que entre el conjunt de gens que defineixen la malignitat, les GRPs tenen funcions primordials en el procés metastàtic. El que podem concloure és que ERp57 indueix atributs diferents a les cèl·lules de càncer de mama, funcionalment importants pel desenvolupament de la metastàsis òssia i podria ser un distintiu fenotípic essencial.

Si el primer atribut de la sobre-expressió d'ERp57 consisteix en la reprogramació del metabolisme energètic donant suport al creixement i la proliferació cel·lular a l'os, la segona implicaria l'evasió activa de les cèl·lules tumorals de l'atac i eliminació per les cèl·lules immunes, conseqüència de l'ineficaç plegament de molècules HLA I que dificulta el transport a membrana i afavoreix la retenció en Golgi.

La pèrdua total o selectiva d'HLA I és un dels mecanismes d'escapada del sistema immune més freqüent en tumors experimentals i espontanis (Algarra et al., 2004; Garrido et al., 1993; Rodriguez et al., 2007). Aquest procés facilita l'arribada i colonització del nou òrgan. Per aquest motiu, la infraexpressió d'HLA I es considera un factor de mal pronòstic (Ogino et al., 2006; Tanaka et al., 2012; Watson et al., 2006). A més, la supressió d'HLA I afecta la funció de la cèl·lula independentment del sistema immune i s'associa a l'activació anormal de p53 i estrès de reticle, conferint avantatges per a la supervivència (Sabapathy and Nam, 2008).

En les cèl·lules que metastatitzen a os la sobre-expressió d'ERp57 s'associa a la retenció de les cadenes de HLA I, dificultant la seva expressió a nivell de la membrana de la cèl·lula. La detecció d'aquestes proteïnes en dos models de càncer de mama i la seva metastasi òssia confirma aquesta relació i posa de manifest l'òrgan-especificitat del fenomen. En consonància amb aquest resultat, dades proteòmiques han confirmat la infra-expressió d'HLA I en la membrana de cèl·lules que metastatitzen a os (Kischel et al., 2008).

ERp57 participa en diverses fases del plegament del HLA I. En una primera etapa, junt a Calreticulina i Calnexina, participa en la formació dels ponts disulfur del nou HLA I. A

DISCUSSIÓ

continuació forma un pont disulfur amb Tapasina, i aquest dímer s'encarrega de l'edició del repertori peptídic que s'uneix a HLA I. En aquest darrer pas, ERp57 no té un paper redox sinó estructural (Peaper and Cresswell, 2008).

Les cèl·lules metastàtiques a os BO2 presenten un fenotip combinat de disminució en la síntesis de les cadenes pesada i lleugera d'HLA I, així com una infraexpressió de proteïnes de la Maquinària de Processament Antigènic o APM. La pèrdua d'ERp57 i altres proteïnes de l'APM s'ha associat en la literatura amb grau tumoral, metàstasi a node limfàtic i profunditat d'invasió en carcinoma escamós d'esòfag (Ayshamgul et al., 2011).

A part d'aquesta infraexpressió d'HLA I, les cèl·lules metastàtiques a os (BO2 i 435-B1) presenten una major retenció d'HLA I que la línia parental. Aquesta retenció es dona principalment en el Golgi, no en el RE, fet que suggereix un defecte en el transport d'HLA I. La silenciació d'ERp57 provoca una translació de les molècules retingudes cap a la membrana, sense afectar els nivells de transcripció d'HLA I. Aquesta silenciació sí que produeix canvis transcripcionals en Tapasina, una de les proteïnes de la APM.

La tapasina participa en el control de qualitat de l'HLA I amb diverses funcions: estabilitzant i retenint-lo en el reticle, editant el repertori peptídic per tal de seleccionar els pèptids d'alta afinitat (Wearsch and Cresswell, 2007) i restringint el transport de molècules tipus I sense pèptid més enllà del cis-Golgi (Hansen and Bouvier, 2009). També funciona com un receptor de càrrega, mitjançant el *packaging* de molècules HLA I inestables en vesícules COP-I per al transport retrògrad del Golgi al RE (Paulsson et al., 2002).

La infraexpressió de molècules de la APM, com TAP, s'han associat a una menor presència d'HLA I en membrana (Chapman and Williams, 2010) degut a defectes en el processament antigènic. Entre aquestes proteïnes, Tapasina segresta entre el 15-80% d'ERp57 total, independentment de les txaperones calnexina i calreticulina (Wearsch and Cresswell, 2007). Això suggereix que la seva interacció covalent afecta l'estabilitat del PLC i el reclutament de molècules d'HLA I però a més, que baixos nivells d'ERp57 són suficients per al bon funcionament del complex. Inicialment es creia que ERp57 podia tenir un paper oxidatiu dins el PLC (Dick et al., 2002) però l'estat redox del HLA I no es veu afectat per ERp57 en cèl·lules B deficientes en aquesta proteïna. La resolució de l'estructura del dímer ERp57-Tapasina va aclarir que la funció d'ERp57 és estructural, augmentant el reclutament de

DISCUSSIÓ

molècules d'HLA I associades a Calreticulina més que mitjançant l'estat redox de les molècules tipus I (Garbi et al., 2006; Peaper et al., 2005)

Ja que el complex disulfur que ERp57 forma amb tapasina és estable, els complexos covalents ERp57-tapasina podrien complicar la sortida de molècules HLA I (Chapman and Williams, 2010). El fenotip BO2 és compatible amb defectes en el plegament d'HLA I i càrrega d'antigen, que disposarien les proteïnes malplegades per a retrotranslocació i degradació en el RE (Rutkevich et al., 2010). Aquest fet seria responsable de la retenció general d'HLA I en el RE i compartiments post-RE degut a la càrrega d'antígens de baixa afinitat. Així, la retenció d'HLA I en Golgi es pot associar a una infraexpressió de tapasina. La silenciació d'ERp57 provoca un augment en els nivells d'aquesta proteïna, millorant el transport retrògrad a RE, afavorint la càrrega de l'antigen més afí i millorant l'export a membrana.

En relació amb el paper d'ERp57 en la resposta a l'estrès de RE, l'activació d'ATF6 i XBP-1 disminueix els nivells d'HLA I en membrana sense afectar la seva expressió (de Almeida et al., 2007), fenomen visible en el nostre model. En aquest sentit, Granados i col·laboradors mostraven com l'estrès de reticle, una característica comuna en cèl·lules infectades per virus i en cèl·lules malignes, proporcionava vies per a l'escapada de la resposta immune adaptativa (Granados et al., 2009). Igualment s'ha descrit una relació entre la sortida de molècules del RE i la UPR, a través de la modulació dels nivells de proteïnes de càrrega, indicant que la resposta a estrès afecta el tràfic des de i més enllà del RE (Nyfeler et al., 2003; Sato et al., 2002). El temps de retenció del HLA I en el RE és proporcional a l'optimització de la càrrega peptídica (Lewis and Elliott, 1998); així, la sortida prematura (cap a Golgi) és indicatiu d'una càrrega inapropiada, hipòtesi que dona força a la marcada retenció en Golgi que observem en el model BO2.

El RE, es presenta com a cruïlla de dos processos fonamentals: la UPR i la presentació d'antigen a l'HLA I. Aquest fet es demostra en induir la UPR per tunicamicina, palmitat o estarvació de glucosa, que provoca una inhibició de mTOR aturant la síntesi proteica (Hollien and Weissman, 2006). Però es produeix una disminució diferencial en mHLA I respecte altres glicoproteïnes de membrana, sense afectar els nivells d'HLA I totals. En conseqüència, els autors defensen una retenció d'HLA I degut a defectes en la presentació antigènica (Falagas and Kompoti, 2006; Shaikh et al., 2008).

La modulació dels nivells d'ERp57 podria ser un dels mecanismes per re-establir la resposta immune antitumoral afavorint l'efecte de la quimioteràpia i sensibilitzant la cèl·lula a

DISCUSSIÓ

senyals citotòxiques, en la prevenció de la metàstasi òssia,. Molt recentment, Ricci i col·laboradors han descrit que la inhibició de la glicòlisi (2-DG) en combinació amb agents citotòxics provoca un augment en la resposta anti-tumoral en ratolins immuno-competents. Aquest fenomen és mediat per l'exposició d'ERp57/CRT en la membrana cel·lular, que activa la resposta de cèl·lules T (Beneteau et al., 2012). ERp57 no té funció immunogènica *per se* en la membrana però facilita l'externalització de la CRT, proteïna responsable de l'activació de les cèl·lules dendrítiques (Obeid, 2008).

Una característica dels tumors sòlids és la seva capacitat de dividir-se de forma agressiva i de disseminar en condicions d'estarvació de nutrients i reduïda disponibilitat d'oxigen (Feldman et al., 2005). El procés metastàtic imposa altres factors limitants com la capacitat de sobreviure a l'anoikis, l'extravasació i la supervivència en un microentorn advers. Aquests processos activen rutes de senyalització d'estrès i en molts casos, forcen un estat de latència que permet la supervivència de la cèl·lula aïllada (Ranganathan et al., 2006). La resistència de la cèl·lula tumoral a tots aquests estressants comporta un mecanisme de supervivència per fer front als insults del microentorn, tant en fases inicials com tardanes del desenvolupament metastàtic.

El RE es un òrgan cabdal en la compensació de l'estrès. L'anomenat estrès de reticle (SRE) s'origina per la disrupció en la capacitat de plegament proteic del RE, fet que desencadena l'activació d'un sistema de senyalització molt conservat que intenta restaurar l'homeòstasi (Eletto et al., 2012). Aquesta resposta es tradueix en un augment en la síntesi de proteïnes específiques amb funció protectora en un intent d'equilibrar el sistema. Quan l'estímul és shock tèrmic o la inflamació, són les HSPs les que se sobre-expressen, mentre que, com hem apuntat al començament, en condicions de deprivació de glucosa, son les GRPs, les que s'indueixen, per depleció de Ca^{2+} del reticle, bloqueig de la glicosilació, en un entorn reductor, per inhibició del proteasoma i sobre-expressió de proteïnes malplegades (Yang and Li, 2005), fenomen conegut com UPR.

L'expressió de GRPs es considera un marcador de la resposta a UPR que desencadena l'activació de tres rutes de senyalització: Ire1, ATF6 i PERK, per tal d'induir la sobre-expressió de txaperones, l'atenuació de la síntesi proteica i l'acceleració de la degradació de proteïnes malplegades. Si aquests mecanismes fracassen, la cèl·lula mor per apoptosi (Lee, 2001),

DISCUSSIÓ

Es coneix l'important paper de les GRP com participants en la resposta cel·lular per superar l'estrès metabòlic i alguns aspectes de com la seva desregulació contribueix en els processos malignes. GRP78 és imprescindible per al creixement tumoral, participant en proliferació, supervivència (Lee, 2007; Li and Lee, 2006; Wang et al., 2009) i angiogènesi (Dong et al., 2011). GRP78 se sobre-expressa en càncer de mama, pulmó, fetge i pròstata correlacionant amb malignitat, metàstasi i resistència a drogues (Li and Lee, 2006). La sobre-expressió de GRP78 en metàstasi protegeix la cèl·lula de microentorns adversos i afecta la motilitat cel·lular (Ramsay et al., 2005).

GRP94, l'homòleg reticular de HSP90, afavoreix la transformació cel·lular, la tumorigènesi i la resistència a raigs X mentre que la seva infraexpressió produeix sensibilitat a etopòsid (Fu and Lee, 2006; Lee, 2001). Destaca el seu paper en immunitat ja que pot associar-se a pèptids antigènics tumorals en el RE. Aquests complexos són capturats per cèl·lules presentadores d'antigen, que alhora presenten els pèptids a HLA I i medien la resposta immune anti-tumoral. D'aquí la importància de GRP94 en el camp de les vacunes anti-tumorals (Fu and Lee, 2006; Lee, 2001). Globalment, les dades d'aquest experiments junt amb altres obtingudes pel grup, indiquen la importància que tenen aquestes proteïnes en el procés òrgan-específic de la metàstasi. Recentment hem reportat que el fenotip de resistència a SRE vindria representat per la sobre-expressió de GRP94 en la metàstasi cerebral i en els tumors de mama que metastatitzen a cervell, essent un biomarcador del risc que les pacients puguin desenvolupar metàstasi cerebral i un indicador de teràpies adreçades a aquesta proteïna (Sanz-Pamplona et al., 2011).

2. Reprogramació del metabolisme energètic i òrgan-especificitat de la metàstasi

Durant la disseminació metastàtica, diversos processos actuen com a coll d'ampolla contribuint a la selecció metastàtica, entre ells l'arribada al nou òrgan i la capacitat de proliferació en el nou microentorn (Eckhardt et al., 2012). El creixement metastàtic requereix d'una re-estructuració del metabolisme de la cèl·lula per tal de respondre als requeriments bioenergètics i biosintètics exigits en un entorn aliè al d'origen.

Diferents subtipus tumorals pateixen alteracions bioenergètiques, algunes cap a més glicolítiques i altres cap a més oxidatives. Aquest context específic de teixit invalida que hi pugui haver una única transició comuna en tots els tipus de càncer tal i com va proposar Warburg (Wallace, 2012). Aplicant aquest concepte a la metàstasi, els nostres resultats suggereixen que les metàstasis de càncer de mama són en general més oxidatives que el tumor primari. Tanmateix, l'arribada i establiment en el nou microentorn poden primar unes funcions metabòliques de manera òrgan-específica, com demostren els anàlisis espectroscòpics amb Raman, que ha resultat una tècnica utilíssima en els estudis metabòlics de les cèl·lules (Nieva et al., 2012).

En general, els espectres de Raman de mostres biològiques són molt complexes, i les dades espectroscòpiques requereixen un processament matemàtic. Les tècniques multivariants redueixen la dimensionalitat de les dades espectrals i permeten l'extracció d'informació menys complexa i més objectiva (Lieber et al., 2010; Pichardo-Molina et al., 2007). L'anàlisi de la composició lipídica de cèl·lules de càncer de mama utilitzant el Principal Component Analysis (PCA) ja descrit (Jackson, 1991), ha permès identificar un fenotip lipogènic característic de les cèl·lules que metastatitzen a cervell, en base a l'anàlisi d'àcids grassos saturats i insaturats (Freudiger et al., 2008) que les diferencia de la resta de metàstasis per un augment en els nivells de TFA i d'àcids grassos saturats. Per tant, obtenir perfils espectroscòpics diferencials de poblacions metastàtiques segons el seu contingut lipídic i segons el percentatge d'àcids grassos insaturats, segrega el fenotip metastàtic a os respecte del fenotip amb més similituds com cervell i pulmó (Nieva et al., 2012).

Els resultats obtinguts en les cèl·lules parentals de càncer de mama concorden amb les característiques del fenotip glicolític, amb una alta sensibilitat a la deprivació de glucosa,

DISCUSSIÓ

menor síntesi i degradació lipídica, i menor càrrega mitocondrial (veure apartat 4). Una explicació per a l'ús primordial de glucosa en el tumor primari és que tot i produir menys ATP a través de la glicòlisi, si el flux és ràpid, el percentatge d'ATP produït pot superar el de la fosforilació oxidativa. Addicionalment es produeixen intermediaris necessaris per a les rutes de síntesi (riboses per nucleòtids, glicerol i citrat per lípids), i NADPH a través de la ruta pentosa fosfat (DeBerardinis and Cheng, 2010; Deberardinis et al., 2008). En conseqüència, el metabolisme glicolític afavoriria tant la biosíntesi de noves molècules com el manteniment de les necessitats bioenergètiques tumorals (DeBerardinis and Thompson, 2012).

Estudis transcriptòmics previs (Landemaine et al., 2008) han estat d'utilitat per identificar en les metàstasis cerebrals provinents de càncer de mama, un augment en proteïnes de síntesi lipídica com SREBP-1 o LXR α que podrien ser responsables de l'acumulació de lípids observada mitjançant el Raman.

LXR α actua de forma sinèrgica amb SREBP-1c, induint la seva transcripció i també la directa transcripció d'ACC i ACLY (Maxwell et al., 2003; Okazaki et al., 2010). SREBP-1 és diana de les rutes PI3K/Akt i MAPK (Muñoz-Pinedo C et al, 2011) i és un dels reguladors principals de la síntesi lipídica, ja que activa gens pro-síntesi com FASN, ACC o ACLY (Shaw and Cantley, 2012). Addicionalment, les nostres dades transcriptòmiques apuntaven a la sobre-expressió d'altres proteïnes involucrades en síntesi lipídica com Ethanolamine-Phosphate Cytidyltransferase i el transportador de citrat-malat.

L'augment en la síntesi lipídica, a través de proteïnes com FASN, es considera un element de mal pronòstic en càncer de mama (Kuhajda et al., 1994; Flavin et al., 2010) ja que participa en la resistència a teràpia (Menendez et al., 2004; Warmoes et al., 2013) i en la capacitat metastàtica i d'invasió (Scott et al., 2012; Nieva et al., 2012)

Però no només és important la quantitat sinó també la composició lipídica. Ja que el palmitat és el producte final de la lipogènesi *de novo*, un augment en la síntesi provoca un canvi en la proporció d'àcids grassos saturats i insaturats, afavorint l'augment dels saturats (Swinnen et al., 2006). L'anàlisi d'aquesta característica en les línies metastàtiques ho confirma, ja que les línies amb un fenotip lipogènic (435-Br1 i 435-L3) presenten un augment en el contingut d'àcids grassos saturats que no es troba en les cèl·lules metastàtiques a os.

És conegut que els àcids grassos saturats en la membrana cel·lular actuen com una pel·lícula protectora contra insults com espècies reactives d'oxigen (ROS) o incorporació de quimioterapèutics (Rysman et al., 2010), a més d'afavorir la migració i la invasió (Scott et al.,

2012) (Nieva et al., 2012). Aquestes darreres característiques tenen a veure amb l'agregació de fosfolípids saturats en els lipid rafts de membrana (Scott et al., 2012).

L'acumulació de colesterol s'ha relacionat amb el desenvolupament d'altres càncers com el de pròstata (Krycer and Brown, 2013) i les seves metàstasis òssies associades (Thysell et al., 2010) però no s'ha descrit quin paper podria tenir en la metàstasi cerebral de càncer de mama. El colesterol, junt amb els esfingolípids i àcids grassos saturats, és un component dels lipid rafts, regions de membrana amb una menor fluïdesa i resistència a detergents no iònics (Pike, 2009). L'enriquiment en colesterol dels rafts coordina processos com l'augment en la transducció de senyals, tràfic vesicular i migració cel·lular (Staubach and Hanisch, 2011), en l'activació de JNK (Holzer et al., 2011) i en l'angiogènesi del càncer de mama, ja que afavoreix l'acció d'uPAR i MMP9 (Raghu et al., 2010).

Les cèl·lules metastàtiques a cervell presenten també un augment en el colesterol lliure. El creuament de la BHE és probablement un dels elements òrgan-específics més destacats en la metàstasi cerebral, ja que és una estructura compacta que dificulta la invasió (Irmisch and Huelsken, 2013) i requereix de l'expressió de metal·loproteases que permetin la seva desorganització (Bos et al., 2009). És necessari un estudi en profunditat del possible rol que pot tenir l'enriquiment en colesterol i àcids grassos saturats de les cèl·lules metastàtiques a cervell en la secreció de MMPs i el creuament de la BHE.

Al contrari del que passa a les cèl·lules metastàtiques a os, que pràcticament no pateixen canvis lipídics durant l'estarvació, la retirada de glucosa disminueix els nivells d'àcids grassos de la línia metastàtica a cervell i pulmó. Aquest fet es tradueix en una caiguda en la quantitat de lipid droplets observats. Els lipid droplets s'han descrit com magatzems lipídics per a posterior β -oxidació, biogènesi de membranes i fins i tot senyalització (den Hartigh et al., 2010). Els experiments d'oxidació de palmitat radioactiu confirmen una major oxidació lipídica en la línia metastàtica a cervell que en les cèl·lules metastàtiques a os. En privació de glucosa, totes les línies responen amb un augment en l'oxidació, però de manera diferencial en les línies metastàtiques vs. la línia parental. Aquests resultats estan d'acord amb els experiments de supervivència en aquestes condicions, suggerint la importància d'aquest procés en l'adaptació a l'estrès metabòlic.

Hem demostrat que les cèl·lules metastàtiques a os són capaces d'induir l'oxidació de palmitat però el tractament amb etomoxir, un inhibidor de l'oxidació lipídica (Carracedo et al., 2013; Pike et al., 2011; Samudio et al., 2010), no provoca canvis significatius en la

DISCUSSIÓ

supervivència en deprivació de glucosa, mentre que l'etomoxir sí provoca una disminució en la viabilitat de les cèl·lules metastàtiques a cervell i pulmó a temps llargs. Per tant, tot i la capacitat de la cèl·lula d'oxidar àcids grassos a temps curts, cal tenir en compte la presència d'altres factors amb impacte a temps llargs, com l'expressió de proteïnes antiapoptòtiques o de detoxificació cel·lular o fins i tot la quantitat de lípids en reserva que contingui cada cèl·lula (més baixos en os) i dels quals pugui fer ús.

Així, a part del seu paper estructural, els àcids grassos també són elements claus en la bioenergètica cel·lular. Estudis recents suggereixen reconsiderar el paper de l'oxidació d'àcid gras en el procés tumoral (Hirsch et al., 2010; Liu, 2006; Swinnen et al., 2006; Yamashita et al., 2000) ja que proporciona plasticitat a la cèl·lula tumoral produint ATP i NADPH, eliminant lípids citotòxics, inhibint rutes pro-apoptòtiques i aportant intermediaris metabòlics pel creixement cel·lular (Carracedo et al., 2013).

La sobre-expressió en metàstasi cerebral de pacients de l'enzim Acil-CoA tiosterasa 7 (ACOT7), una proteïna que catalitza la hidròlisi d'enllaços tioèster d'Acil-CoA, alliberant àcids grassos no esterificats i coenzim A al citosol suggereix la seva implicació en el fenotip lipídic de les cèl·lules. ACOT7 actua com a reguladora del balanç entre síntesi/degradació lipídica i la seva absència es relaciona amb defectes en l'oxidació d'àcid gras (Kirkby et al., 2010; Swarbrick et al., 2011). El paper d'ACOT7 és important en el cervell (neurons) ja que la seva expressió evita la neurodegeneració. També té un rol en inflamació ja que pot alliberar àcid araquidònic provinent de fosfolípids per a la posterior síntesi de prostaglandines (Kirkby et al., 2010; Swarbrick et al., 2011).

Les cèl·lules metastàtiques a cervell tenen les mateixes capacitats oxidatives però l'augment lipídic podria afavorir l'ús d'aquest nutrient en condicions restrictives. Els resultats estan en concordança amb estudis previs *in vivo* amb cèl·lules metastàtiques a cervell (Chen et al., 2007a) i en models animals de glioblastoma (Marin-Valencia et al., 2012). En concret, els resultats de Chen (2007) descriuen un augment en el metabolisme oxidatiu en la metàstasi cerebral. Els autors van injectar cèl·lules tumorals circulants de pacients en ratolí i les van recuperar del cervell dels animals. L'anàlisi proteòmic d'aquestes cèl·lules vs. les cèl·lules parentals, posava de manifest un augment específic de proteïnes involucrades en l'oxidació de glucosa (glicòlisi i cicle de Krebs), ruta pentosa fosfat (producció de NADPH per a la síntesi lipídica) i beta-oxidació. Aquestes dades, en acord amb les nostres, ressalten la importància del metabolisme oxidatiu en l'adaptació metabòlica al microentorn cerebral, suggerint una

DISCUSSIÓ

predominança de rutes metabòliques comunes en metàstasis cerebrals de diferent origen tumoral.

En el sentit de l'òrgan-especificitat, és notable el paral·lelisme observat entre la metàstasi cerebral i pulmonar en molts dels aspectes metabòlics analitzats. El grup de Massagué va descriure un solapament en diversos gens d'aquestes dues metàstasis, en contrapartida a la metàstasi òssia (Bos et al., 2009). Degut a que aquests perfils d'expressió s'havien realitzat amb línies *claudin-low*, altres autors han definit una tendència en tumors *claudin-low*, basal-like i TN per metastatitzar preferencialment a cervell/pulmó (Harrell et al., 2012). El grup de Perou descriu en aquest mateix article una relació entre l'índex de diferenciació cel·lular i els subtipus de càncer de mama, des dels menys diferenciats, com *claudin-low*, basal-like o HER2+, fins als més diferenciats, com luminal B i A (Prat et al., 2010). Altres autors han identificat trets de cèl·lules mare embrionàries en cèl·lules poc diferenciades (Ben-Porath et al., 2008). Ja que els tumors menys diferenciats són els que metastatitzen preferencialment a cervell i pulmó, els autors descriuen un solapament en els perfils d'expressió d'aquestes metàstasis amb els de cèl·lules mare embrionàries i cèl·lules tumorals iniciadores, que no es dona en os (Harrell et al., 2012).

La lipogènesi mediada per SREBP-1, s'ha descrit com un requisit indispensable per a l'establiment del carcinoma ductal infiltrant i aquesta funció es troba augmentada en les CSCs (CD44+/CD24-) aïllades de tumors de mama (Pandey et al., 2012). La línia metastàtica a os presenta uns nivells de síntesi lipídica inferiors als observats en cervell o pulmó, que concorda amb les dades anteriors. Per tant, la síntesi lipídica es podria relacionar amb alguns dels trets descrits en l'article de Harrell, ja que afavoreix la migració (Raghu et al., 2010) (Staubach and Hanisch, 2011; Scott et al., 2012) i la proliferació (Vazquez-Martin et al., 2008). Moltes d'aquestes característiques s'han observat també en metàstasis cerebrals de diferent origen, com les de melanoma, suggerint que l'expressió de gens en resposta a les condicions òrgan-específiques podrien ser més importants que l'expressió de gens des del tumor primari. En aquest sentit prendria força la hipòtesi que les metàstasis cerebrals i de pulmó tenen en comú la restricció de creuar barreres molt compactes, que podrien ser el factor determinant en la selecció del fenotip.

En el model metastàtic a cervell convergeixen dos fenòmens claus per a la malignitat tumoral: la lipogènesi i l'habilitat per utilitzar aquests lípids, dues idees que sempre s'han

descriu com antagòniques i que no podien coexistir (Carracedo et al., 2013). Aquest concepte necessita ser revisat, ja que ambdós processos són fonamentals per a la proliferació cel·lular. Alguns autors hipotetitzen que la producció d'acetil-CoA per beta-oxidació podria servir com a precursor en la síntesi lipídica, de manera que un procés podria alimentar l'altre (Caro et al., 2012). En condicions basals, la glucosa s'utilitzaria per establir un reservori lipídic en el model de metastasi cerebral i, tenint en compte els augments basals en beta-oxidació, el fenomen descrit podria donar-se de manera espontània, establint una mena de cercle viciós. Durant períodes d'estarvació de nutrients, els lípids s'utilitzarien per produir energia en la beta-oxidació.

3. Contribució de l'autofàgia en l'adaptació metabòlica òrgan-específica

Havent constatat que les cèl·lules metastàtiques adapten el seu metabolisme, fent-lo afí a les necessitats i característiques del microentorn de l'òrgan diana, hem observat que les cèl·lules metastàtiques no sempre utilitzen preferentment la glucosa a través de la glicòlisi aeròbica. De fet, un recent anàlisi metabolòmic ha reportat que cèl·lules humanes de carcinoma de colon i càncer gàstric mostraven nivells baixos de glucosa, augments de lactat i productes intermediaris de la glicòlisi. Addicionalment, l'acumulació d'aminoàcids excepte de glutamina suggerien l'autofàgia acoblada a glutaminòlisi com una font energètica important (Hirayama et al., 2009)

És ben conegut que les cèl·lules tumorals tenen més necessitat d'energia i carboni/nitrogen per la producció de biomassa degut a l'augment proliferatiu, que aconsegueixen principalment a través del metabolisme. Un important proveïdor de substrats energètics en condicions d'estrès és l'autofàgia, funció cel·lular capaç de mantenir el metabolisme sota unes condicions d'extrema demanda (Mizushima, 2007; Rabinowitz and White, 2010).

L'autofàgia és un dels mecanismes claus en la resistència a l'estrès. Consisteix en l'embolcallament de fraccions del citoplasma per part d'una membrana d'aïllament. La

DISCUSSIÓ

formació d'un orgànel de doble membrana (autofagosoma) propicia la fusió amb el lisosoma, resultant en la degradació de les proteïnes i orgànuls segregats (Debnath, 2011). Molecularment, es caracteritza per augments en el tall de *microtubule-associated protein 1 light chain 3* (LC3) i menor acumulació de p62 (Klionsky et al., 2012).

Els nostres resultats mostren augments en els nivells d'autofàgia basal en les cèl·lules metastàtiques a cervell en comparació amb la línia parental. L'autofàgia basal constitutiva participa en el control de qualitat de proteïnes i orgànuls, exercint una funció homeostàtica (Mizushima and Komatsu, 2011). En conseqüència, actua en paral·lel amb el sistema de degradació de la ubiquitina-proteosoma per evitar l'acumulació de proteïnes agregades i poliubiquitinades (Mathew et al., 2007). El cervell destaca com un òrgan amb alts nivells d'autofàgia basal; la seva inhibició per deleció d'Atg5 o Atg7 provoca l'acumulació de proteïnes poliubiquitinades i degeneració neuronal (Komatsu et al., 2006). Els nivells basals d'autofàgia en cervell són suficients per al control de qualitat i degradació de proteïnes ja que l'estarvació no en provoca un augment (Kohli and Roth, 2010)

La deprivació de nutrients o factors de creixement és un regulador fisiològic de l'autofàgia que indueix aquest procés per inhibició de mTOR (Choi et al., 2013). És imprescindible pel desenvolupament embrionari ja que ratolins deficientes en Atg5 no superen el període neonatal, durant el qual els teixits pateixen depleció d'aminoàcids i insuficiència metabòlica (Kuma et al., 2004). En tumors sotmesos a estrès metabòlic, la capacitat catabòlica de l'autofàgia pot mantenir la viabilitat cel·lular degut al seu rol com a font de reserva energètica i en la degradació de proteïnes o orgànuls danyats, que controla el dany cel·lular (Mathew et al., 2007).

L'autofàgia s'ha descrit com un procés ambigu que pot actuar com a promotor o supressor tumoral segons l'estadi del procés oncogènic (Mathew and White, 2011). Estudis en models pre-clínic mostren que en fases inicials de la tumorigènesi pot actuar com a supressor tumoral (Debnath, 2011), ja que la pèrdua de Beclin 1 o ATG6 és freqüent en càncer de mama, ovari i pròstata (Aita et al., 1999; Liang et al., 1999).

En general, el procés autofàgic és protector en estadis metastàtics inicials com l'intravasació, supervivència en el torrent sanguini i extravasació, així com en l'adaptació al nou microentorn (Kenific et al., 2010). L'autofàgia és un mecanisme que promou la

supervivència i l'adaptació metabòlica a l'estrès per privació de nutrients (Debnath, 2011), activació d'oncogens o insult terapèutic, fenòmens que promouen la *dormancy* i la resistència tumoral (Mathew and White, 2011). La *dormancy* és un procés reversible que es caracteritza per una aturada en la proliferació de la cèl·lula tumoral durant períodes variables de temps i que se sol donar freqüentment en metàstasi cerebral (Gewirtz, 2009). L'autofàgia basal observada en aquestes cèl·lules podria ser un mecanisme candidat a explicar aquests fenòmens.

En les línies metastàtiques derivades de 435, l'autofàgia adquireix un paper pro-supervivència com confirmen els experiments amb bafilomicina. Les diferències en supervivència observades en privació de glucosa, mostren que la inducció d'autofàgia és especialment important per a la supervivència de la metàstasi cerebral i que pot suposar un procés imprescindible en l'adaptació de la cèl·lula a l'estrès metabòlic imposat pel microentorn. Aquests resultats estarien d'acord amb els estudis que descriuen que la inhibició de l'autofàgia per pèrdua de Beclin 1 o Atg5 disminueixen la supervivència cel·lular, fins i tot si l'apoptosi està inactiva (Mathew et al., 2007).

En el sentit bioenergètic, existeix un tipus d'autofàgia que permet l'accés als dipòsits intracel·lular de lípids (lipofàgia), proporcionant àcids grassos per la β -oxidació i cicle de Krebs (Rodríguez-Navarro and Cuervo, 2010). Defectes en l'autofàgia poden tenir un gran impacte en la disponibilitat de substrats per al mitocondri i la seva funció (Singh et al., 2009). Degut a la rellevància del metabolisme oxidatiu en les línies de metàstasi cerebral, caldria aprofundir en l'estudi de la interacció entre l'autofàgia i el metabolisme lipídic.

L'atac de l'autofàgia amb cloroquina presenta l'avantatge que aquest fàrmac pot creuar la BHE per simple difusió (Adelusi and Salako, 1982; Adjene and Caxton-Martins, 2006) però els efectes que pot tenir sobre el sistema nerviós central han de ser avaluats amb delicadesa. Molt recentment la cloroquina ha provat ser útil en combinació amb radioteràpia per al tractament de pacients amb metàstasi cerebral (Eldredge et al., 2012). La inhibició de l'autofàgia es podria perfilar com una bona diana terapèutica per a la metàstasi cerebral, sola o en combinació amb drogues que provoquin un col·lapse de la cèl·lula per estrès metabòlic o amb altres quimioteràpèutics clàssics.

4. La funció i dinàmica mitocondrial en el manteniment del metabolisme energètic.

Les cèl·lules tumorals tenen alteracions en els mecanismes d'autofàgia que desencadenen canvis metabòlics per tal d'afavorir el creixement del tumor. L'objectiu final del procés autofàgic és protegir la salut mitocondrial en condicions d'estrès per tal de mantenir la homeòstasi cel·lular, ja que són una font important d'energia i de ROS (Wild and Dikic, 2010). Per assolir aquest equilibri, els mitocondris estan sotmesos a múltiples cicles de fusió-fissió que els permet mantenir les funcions mitocondrials de forma òptima. En aquest procés intervenen la proteïna PINK1 que indueix la proteïna d'ubiquitinació Parkin1. Aquest eix controla els fenòmens de fusió/fissió per ubiquitinació de proteïnes com Mitofusina (Mfn) o canals d'anions (VDAC1), a més de mediar la mitofàgia (Gegg et al., 2010; Twig et al., 2008).

L'estudi de les variants metastàtiques posa de manifest que, atenent a la morfologia mitocondrial podem discriminar dos fenotips, un de mitocondris fragmentats distribuïts de forma perinuclear i un altre on mitocondris elongats segueixen una distribució citoplasmàtica. Aquesta elongació és pròpia de les cèl·lules metastàtiques a cervell i pulmó, mentre que les cèl·lules metastàtiques a os tenen uns mitocondris una mica més arrodonits i menys massa mitocondrial que la línia V5. L'augment en la massa mitocondrial en les línies metastàtiques a cervell 435-Br1 i V5 es correspon amb una major oxidació de palmitat i producció de CO₂, confirmant la relació de la massa mitocondrial amb augments en la fosforilació oxidativa.

La línia metastàtica a pulmó presenta un fenotip oxidatiu, semblant a l'observat en la línia de cervell. Tot i així, el nombre de mitocondris és notablement inferior. Per tant, en restricció de nutrients és possible que puguin utilitzar altres substrats com àcids grassos però el procés oxidatiu podria ser menys eficient degut a la menor quantitat de mitocondris. Caldria avaluar la capacitat respiratòria d'aquestes cèl·lules per comprovar si la cadena de transport electrònic és plenament funcional.

La dinàmica no es refereix només al moviment del mitocondri al llarg del citoesquelet sinó també als canvis en la morfologia mitocondrial (Zorzano et al., 2010). Aquests fenòmens són controlats per GTPases relacionades amb dinamina que remodelen les membranes

DISCUSSIÓ

mitocondrials. La divisió mitocondrial és regulada per *Dynamin-related protein 1* (Drp1), mentre que la fusió requereix de dues famílies *dynamin-like*, MFN1/MFN2 i Opa1 (Nunnari and Suomalainen, 2012; Zhao et al., 2012).

Les línies metastàtiques, especialment la línia de metàstasi cerebral V5, presenten en general uns mitocondris més fusionats i elongats, amb màxima interconnectivitat comparat amb la línia parental. Aquestes característiques estan en concordança amb l'augment en l'expressió de Mfn1 però especialment en Mfn2. Aquests trets s'observen també en 435-Br tot i que en menor mesura, indicant la importància d'aquest fenotip en el procés d'especialització de la metàstasi cerebral.

Associat al fenotip amb una morfologia de mitocondris fissionats, com són les cèl·lules parentals 435-P, hem trobat nivells baixos de Mfn1 i 2 així com de VDAC.

Els mitocondris són orgànuls que actuen com a centres de senyalització metabòlica ja que acullen els complexos de la cadena respiratòria i participen en la producció d'ATP (Nunnari and Suomalainen, 2012). Igualment, allotgen parts de les rutes biosintètiques de pirimidines i àcids grassos, regulen els nivells de Ca^{2+} i la iniciació de l'apoptosi. Canvis en aquests paràmetres poden afectar rutes de síntesi o transducció de senyals provocant el pas de cèl·lula quiescent i diferenciada a un estat proliferatiu (Wallace, 2012).

Per tant, el mitocondri és un regulador de la modulació energètica global. En condicions fisiològiques, requeriments de nivells elevats d'ATP provoquen un augment en la massa mitocondrial i una inducció de la fosforilació oxidativa (Nunnari and Suomalainen, 2012).

La determinació de la massa mitocondrial es va realitzar per anàlisi d'expressió de VDAC, el primer transportador mitocondrial per on els ésters d'àcid gras àcil-CoA passen a l'espai intermembrana. Aquí es converteixen en acil carnitina gracies al CPT-1 i entren en la matriu mitocondrial a través del transportador de carnitina (Lemasters and Holmuhamedov, 2006). La implicació de VDAC en l'oxidació lipídica és un fenomen reconegut ja que el seu bloqueig inhibeix la beta-oxidació d'àcids grassos de cadena llarga i mitja, sense afectar els de cadena curta. Per una altra banda, participa en l'entrada al mitocondri d'altres metabòlits com NADH, piruvat, malat, succinat o colesterol (Shoshan-Barmatz and Mizrachi, 2012).

DISCUSSIÓ

Però VDAC és important en altres passos del procés tumoral. S'ha descrit que Bcl-2 i CPT-1 formen un complex en la membrana mitocondrial (Paumen et al., 1997) en el qual es localitza també VDAC (Thupari et al., 2001). Així, VDAC pot actuar com a punt d'ancoratge de proteïnes com hexokinasa, c-Raf, creatina quinasa o mtHSP70. En el cas concret de Bcl-2 i hexokinasa, VDAC adquireix un rol en la regulació de l'apoptosi (Shoshan-Barmatz and Mizrachi, 2012) que es ratifica amb la seva presència en el canal d'alliberació de citocrom C (Granville and Gottlieb, 2003)

La sobre-expressió de VDAC en diversos tumors, interaccionant amb proteïnes anti-apoptòtiques, mitjançant el transport de colesterol i mitjançant l'acció de fàrmacs com Cis-platin o 17-AAG, apunten a aquesta proteïna com una diana terapèutica interessant per al tractament de tumors (Maldonado et al., 2013; Shoshan-Barmatz and Mizrachi, 2012).

Mfn1 i Mfn2 tenen un 63% d'identitat i regulen la fusió en la membrana mitocondrial externa. Són proteïnes imprescindibles per al desenvolupament embrionari (Chen et al., 2003), especialment Mfn2 que té un paper clau en el desenvolupament del cerebel (Chen et al., 2007b). Mfn1 se sobre-expressa en condicions de restricció calòrica en cervell, cor, fetge o teixit adipós (Zorzano et al., 2010).

Mfn2 es troba en el mitocondri però també s'ha localitzat en el RE, controlant morfologia reticular i afavorint el contacte amb el mitocondri (de Brito and Scorrano, 2008). L'augment en fusió (Mfn2) s'ha relacionat amb augments en oxidació de glucosa i lípids (Liesa et al., 2009), consum d'oxigen i inhibició d'apoptosi, a més de protegir el mitocondri de la seva degradació en el procés autofàgic (Zorzano et al., 2010). La silenciació de Mfn2 provoca una disminució en els fenòmens anteriors, en el potencial de membrana mitocondrial, i en l'activitat dels complexos respiratoris. Aquesta reducció en el cicle de Krebs i la cadena de transport electrònic provoca una compensació per part de la cèl·lula, resultant en un augment de la captació de glucosa, de la glicòlisi i en una menor síntesi de glicogen (Zorzano et al., 2010).

La implicació d'aquests fenòmens en càncer esdevé des del punt que defectes en fusió o fissió promouen l'acumulació de mitocondris disfuncionals, una manera d'explicar per què les cèl·lules tumorals utilitzarien la glucòlisi primordialment com a mètode de generació d'ATP (Grandemange et al., 2009).

Existeixen pocs estudis que relacionin aquestes proteïnes amb el procés metastàtic. L'anàlisi de línies humanes de carcinoma de pulmó revela un augment en Drp1 i una caiguda

en Mfn2 comparat amb el teixit normal (Rehman et al., 2012). En aquest sentit, Drp1 s'ha trobat sobre-expressada i Mfn1 infraexpressada en carcinoma de mama invasiu humà i en metàstasi a node limfàtic, associat a una presència de mitocondris més fragmentats en cèl·lules amb habilitat metastàtica (Zhao et al., 2012). Aquest fet permetria la redistribució mitocondrial cap a lamel·lipodies del front invasiu, pas crític per a la migració i invasió en resposta a gradients quemoatracients (Zhao et al., 2012). Els autors proposen Drp1 com una nova diana per a la supressió de la metàstasi de càncer de mama (Zhao et al., 2012).

Per una altra banda, l'alta interconnectivitat afecta el transport electrònic augmentant l'eficiència de la fosforilació oxidativa; així, una xarxa mitocondrial connectada produeix alts nivells d'ATP (Otera and Mihara, 2012). Aquestes idees estan d'acord amb els resultats obtinguts en l'oxidació de palmitat, més elevada en V5 que 435-P.

La sobre-expressió de Mfn2 podria ser imprescindible per superar els passos necessaris per a l'arribada de la cèl·lula metastàtica al cervell i l'adaptació a l'estrès metabòlic del microentorn. Aquestes dades són recolzades per l'evidència que l'exposició de cèl·lules en cultiu a diversos estressants (UV, privació de nutrients) induïx la fusió, ja que la formació d'òrgànuls interconnectats pot tamponar estressos transients millorant la supervivència cel·lular (Chen et al., 2003). El paper de Mfn2 en fosforilació oxidativa apunta a aquesta proteïna com a un dels responsables del *switch* metabòlic que observem del tumor primari (glicolític) a la metàstasi (oxidatiu).

5. Paper de les eines bioinformàtiques en l'obtenció de dades biològiques

L'avanç en tècniques *high-throughput* ha permès l'obtenció de grans quantitats de dades sobre diferents tumors (Pe'er and Hachohen, 2011). La integració de xarxes proteïques amb dades genòmiques suposa una bona eina per a la predicció de gens involucrats en càncer (Aragues et al., 2008; Reeves et al., 2009).

Tot i la gran quantitat d'estudis en càncer, no es coneixen amb detall els mecanismes moleculars responsables de l'especialització metastàtica del càncer de mama (Nguyen et al., 2009). Per aquest motiu, el nostre grup ha fet ús de les xarxes d'interacció per tal

d'identificar mecanismes moleculars que medien en el procés de l'òrgan-especificitat de la metàstasi. Estudis previs del grup havien aprofundit en el descobriment de molècules importants en el desenvolupament de la metàstasi òrgan-específica de pulmó (Stresing et al., 2012), de fetge (Martin et al., 2008b; Sanz-Pamplona et al., 2011; Stresing et al., 2012) i de cervell (Martin et al., 2008a).

En aquest estudi, hem partit de l'estudi diferencial de proteïnes que participen en el creixement òrgan-específic de la metàstasi òssia del càncer de mama. L'eina bioinformàtica utilitzada ha estat el programa BIANA (Garcia-Garcia et al., 2010), que facilita la creació i l'anàlisi de xarxes d'interaccions proteiques a partir de diverses bases de dades públiques. BIANA ha permès la integració de dades genòmiques i proteòmiques a través d'una xarxa d'interacció proteica.

L'estructuració de la informació en xarxes és un primer pas cap a la identificació de molècules però cal la prioritització de funcions o de proteïnes concretes segons la seva importància.

Existeix una alta probabilitat que un gen implicat en càncer ocupi un lloc amb alta centralitat funcional i topològica com a nucli en la xarxa (Kar et al., 2009), degut a la gran quantitat d'interaccions i rutes en les que sol participar. Aquesta és la base del GUILD (Guney E, en preparació) una altra eina bioinformàtica que permet la prioritització de molècules de la xarxa. El gen codificant per ERp57 apareixia amb la mitjana més elevada entre les proteïnes arrels i interaccionant amb més gens diferencialment expressats. La importància d'ERp57 en el desenvolupament de la metàstasi òssia es va validar a nivell funcional tant *in vitro* com *in vivo*, demostrant la importància de l'ús d'eines integratives en la prioritització de dades transcriptòmiques i genòmiques.

L'evolució de la genòmica i la proteòmica ha permès l'obtenció de grans quantitats de dades que requereixen d'un correcte processament per al seu estudi (Aragues et al., 2008; Reeves et al., 2009). En el context del càncer de mama, l'anàlisi integratiu representa una eina robusta per a la identificació de noves dianes terapèutiques i marcadors moleculars amb potencial pronòstic i predictiu. La integració de les tecnologies "omics" facilita la identificació de nous biomarcadors tumorals per al diagnòstic precoç (Trape and Gonzalez-Angulo, 2012).

DISCUSSION

Adicionalment, permet el tractament personalitzat de pacients i el monitoratge de la resposta o resistència a fàrmacs, augmentant l'eficàcia terapèutica i retrassant la progressió tumoral (Gonzalez-Angulo et al., 2010).

Per concloure, la combinació d'eines bioinformàtiques (GUILD, xarxes d'interacció) permeten dilucidar el rol d'ERp57 com a mediador del procés metastàtic a os regulant fenòmens immunogènics. Els nostres resultats mostren que les cèl·lules metastàtiques a os presenten nivells més baixos d'HLA I en membrana degut a una disminució general de la transcripció de molècules HLA I i a una acumulació additiva en compartiments post-RE. Aquest fenomen podria estar associat a la inducció d'una resposta d'SRE conseqüència de la pressió selectiva exercida pel microentorn. Un aprofundiment en l'estudi d'aquest fenomen ens ha portat a evidenciar les diferències existents en el perfil bioenergètic de les metàstasis a os vs. cervell/pulmó, indicant que el metabolisme de les cèl·lules metastàtiques és imprescindible en el procés de selecció/adaptació de la cèl·lula tumoral al microentorn de l'òrgan diana.

6. Expectatives de futur

Aquest treball analitza una de les funcions cel·lulars crítiques per l'establiment de la metàstasi: l'adaptació/selecció metabòlica de les cèl·lules com a conseqüència de les condicions imposades pel microentorn de l'òrgan diana (Deberardinis et al., 2008).

Hem demostrat com els nivells de glucosa del microentorn poden modular la resposta a estrès de la cèl·lula que metastatitza en l'os, augmentant en l'expressió de proteïnes GRP com ERp57. Aquest procés té com a conseqüència la regulació immunològica i del citoesquelet de la cèl·lula, característiques imprescindibles per a l'establiment tumoral i metastàtic (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011). Els processos iniciats en l'adaptació metabòlica de la metàstasi òssia són diferents dels que es donen en la metàstasi cerebral, on destaca un augment en la síntesi lipídica i en el metabolisme oxidatiu. Resten diverses qüestions per resoldre sobre la importància d'aquests fenòmens en l'arribada a l'òrgan secundari, l'establiment i la proliferació de la cèl·lula metastàtica

cerebral.

L'augment en fosfolípids i colesterol observats en la membrana de les cèl·lules que metastatitzen a cervell suggereixen un enriquiment en lipid rafts. La relació establerta entre els augments de colesterol en els rafts i la secreció de MMPs/migració (Raghu et al., 2010) reclamen un estudi imminent de la participació d'aquests processos en el trencament de la BHE, un dels passos limitants de l'establiment de la metastasi cerebral. En aquest sentit, hem posat a punt un model de BHE *in vitro* (Bos et al., 2009) per analitzar la importància d'aquest fenomen.

Adicionalment, calen estudis *in vivo* per demostrar l'efecte anti-metastàtic d'algunes de les dianes metabòliques mencionades en l'apartat anterior. La complexitat d'establir models animals de metastasi cerebral dificulta aquests experiments. La inconveniència dels models subcutanis, que no permeten l'estudi de l'efecte del microentorn cerebral, així com dels xenografts, que obvien el pas de la BHE, requereixen l'ús de models de metastasis cerebrals per injecció intra-carotídia (Martinez-Aranda et al., 2013), per a l'avaluació de l'evolució metastàtica després del tractament.

Existeixen molts pocs estudis que relacionin les proteïnes de dinàmica mitocondrial amb la funcionalitat mitocondrial en la metastasi. Els nostres resultats destaquen el paper de la Mfn2 i la fusió mitocondrial en el fenotip metastàtic cerebral. Seria interessant modificar l'expressió d'aquestes proteïnes i analitzar l'efecte sobre l'òrgan-especificitat de la metastasi de càncer de mama.

Finalment, cal definir amb precisió el paper de l'autofàgia en la metastasi cerebral. Aquest fenomen podria col·locar-se en la cruïlla de dos processos fonamentals per a l'èxit de l'establiment metastàtic al cervell: la superació de l'estrès i l'aport d'intermediaris pel cicle de Krebs (Clarke et al., 2012). Dades prèvies del grup descriuen un augment en proteïnes d'estrès de reticle en la metastasi cerebral (Sanz-Pamplona et al., 2011). Les nostres dades suggereixen la importància de l'autofàgia en la supervivència de la cèl·lula metastàtica cerebral. Adicionalment, la latència metastàtica és un fenomen predominant en aquest tipus de metastasi i caldria definir la rellevància de l'autofàgia com a medidora d'aquest procés. Finalment, ja que inhibidors de l'autofàgia com la cloroquina poden creuar la BHE, serien imprescindibles estudis *in vivo* per avaluar l'èxit d'aquesta teràpia, sola o en combinació amb altres quimioterapèutics.

DISCUSSION

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

- 1- La relació causal entre l'expressió d'ERp57 i l'activitat metastàtica a os posa de manifest el paper de les proteïnes regulades per glucosa en la progressió metastàtica del càncer de mama .
- 2- ERp57 actua com un distribuïdor de diferents funcions bàsiques per a la progressió maligna entre les que destaquen la reprogramació del procés de la transició epiteli mesènquima (TEM), per induir l'anomenat procés transició mesènquima-epiteli (TME) que facilita l'ancoratge de les cèl·lules a l'òrgan diana, la reprogramació metabòlica i la disminució de molècules de reconeixement immunitari que dificulta la resposta antitumoral.
- 3- ERp57 participa en la re-estructuració del citoesquelet a través de la re-organització de la vimentina. Aquest fet té implicacions en el procés de la transició mesènquima-epiteli, fonamental per a l'establiment de la cèl·lula metastàtica en el nou òrgan.
- 4- La sobreexpressió d'ERp57 afecta a nivell transcripcional l'expressió de Tapasina, dificulta el transport de molècules d'HLA I a la membrana cel·lular i afavoreix la retenció en el Golgi, mediant l'anergia tumoral i l'evasió de la resposta immune.
- 5- L'augment d'ERp57 intervé en la reprogramació metabòlica en un microentorn hipòxic i amb baixos nivells de glucosa com l'os. Pel contrari, la seva expressió no es rellevant per l'establiment de metàstasis en el pulmó, un microentorn hiperòxic.
- 6- Les cèl·lules metastàtiques presenten en general un metabolisme més oxidatiu que el tumor primari.
- 7- Les diferències existents en el perfil bioenergètic de les metàstasis a os vs. cervell/pulmó, indiquen que el metabolisme de les cèl·lules metastàtiques és imprescindible en el procés de selecció/adaptació de la cèl·lula tumoral al microentorn de l'òrgan diana.

CONCLUSIONS

- 8- L'ús del RS ens ha permès distingir un fenotip lipídic associat a la òrgan-especificitat de la metàstasi que es tradueix en un augment en els nivells d'àcids grassos totals i de saturats en cèl·lules metastàtiques a cervell vs. les d'os.

- 9- El mecanisme d'autofàgia actua induint supervivència en les línies metastàtiques que presenten un fenotip lipídic, com son les cèl·lules metastàtiques a cervell, suggerint un paper imprescindible en l'adaptació de la cèl·lula a l'estrès metabòlic imposat pel microentorn. És en aquestes cèl·lules on es manifesta un augment en la fusió i l'interconnectivitat mitocondrial.

ANNEX

ANNEX

Article 1:

- A transcriptome-proteome integrated network identifies ERp57 as a hub that mediates bone metastasis.

Santana-Codina N, Carretero R, Sanz-Pamplona R, Cabrera T, Guney E, Oliva B, Clezardin P, Olarte OE, Loza-Alvarez P, Méndez-Lucas A, Perales JC, Sierra A. Mol Cell Proteomics. 2013 Apr 26. [Epub ahead of print]

Article 2:

- The lipid phenotype of breast cancer cells characterized by Raman microspectroscopy: towards a stratification of malignancy.

Nieva C, Marro M, **Santana-Codina N**, Rao S, Petrov D, Sierra A.
PLoS One. 2012;7(10):e46456

REFERÈNCIES

REFERÈNCIES

REFERÈNCIES

REFERÈNCIES

- Abbott, N.J., A.A. Patabendige, D.E. Dolman, S.R. Yusof, and D.J. Begley. 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 37:13-25.
- Adams, J.M., and S. Cory. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene.* 26:1324-1337.
- Adelusi, S.A., and L.A. Salako. 1982. Tissue and blood concentrations of chloroquine following chronic administration in the rat. *J Pharm Pharmacol.* 34:733-735.
- Adjene, J.O., and A.E. Caxton-Martins. 2006. Some histological effects of chronic administration of chloroquine on the medial geniculate body of adult wistar rat. *Afr J Med Med Sci.* 35:131-135.
- Aguirre-Ghiso, J.A. 2007. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer.* 7:834-846.
- Ahmad, A. 2013. Pathways to breast cancer recurrence. *ISRN Oncol.* 2013:290568.
- Aita, V.M., X.H. Liang, V.V. Murty, D.L. Pincus, W. Yu, E. Cayanis, S. Kalachikov, T.C. Gilliam, and B. Levine. 1999. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics.* 59:59-65.
- Algarra, I., A. Garcia-Lora, T. Cabrera, F. Ruiz-Cabello, and F. Garrido. 2004. The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol Immunother.* 53:904-910.
- Alitalo, A., and M. Detmar. 2012. Interaction of tumor cells and lymphatic vessels in cancer progression. *Oncogene.* 31:4499-4508.
- Allan, A.L., S.A. Vantighem, A.B. Tuck, and A.F. Chambers. 2006. Tumor dormancy and cancer stem cells: implications for the biology and treatment of breast cancer metastasis. *Breast Dis.* 26:87-98.
- Althuis, M.D., J.H. Fergenbaum, M. Garcia-Closas, L.A. Brinton, M.P. Madigan, and M.E. Sherman. 2004. Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 13:1558-1568.
- Appenzeller-Herzog, C., and L. Ellgaard. 2008. The human PDI family: versatility packed into a single fold. *Biochim Biophys Acta.* 1783:535-548.
- Aragues, R., D. Jaeggi, and B. Oliva. 2006. PIANA: protein interactions and network analysis. *Bioinformatics.* 22:1015-1017.
- Aragues, R., C. Sander, and B. Oliva. 2008. Predicting cancer involvement of genes from heterogeneous data. *BMC Bioinformatics.* 9:172.
- Artandi, S.E., and R.A. DePinho. 2010. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis.* 31:9-18.
- Ayshamgul, H., H. Ma, S. Ilyar, L.W. Zhang, and A. Abulizi. 2011. Association of defective HLA-I expression with antigen processing machinery and their association with clinicopathological characteristics in Kazak patients with esophageal cancer. *Chin Med J (Engl).* 124:341-346.
- Azad, N., Y. Rojanasakul, and V. Vallyathan. 2008. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 11:1-15.
- Baluk, P., H. Hashizume, and D.M. McDonald. 2005. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 15:102-111.
- Bao, S., G. Ouyang, X. Bai, Z. Huang, C. Ma, M. Liu, R. Shao, R.M. Anderson, J.N. Rich, and X.F. Wang. 2004. Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. *Cancer Cell.* 5:329-339.

REFERÈNCIES

- Bao, S., Q. Wu, R.E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A.B. Hjelmeland, M.W. Dewhirst, D.D. Bigner, and J.N. Rich. 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 444:756-760.
- Barok, M., J. Isola, Z. Palyi-Krekk, P. Nagy, I. Juhasz, G. Vereb, P. Kauraniemi, A. Kapanen, M. Tanner, and J. Szollosi. 2007. Trastuzumab causes antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated growth inhibition of submacroscopic JIMT-1 breast cancer xenografts despite intrinsic drug resistance. *Mol Cancer Ther*. 6:2065-2072.
- Baselga, J. 2011. Targeting the phosphoinositide-3 (PI3) kinase pathway in breast cancer. *Oncologist*. 16 Suppl 1:12-19.
- Basseri, S., and R.C. Austin. 2012. Endoplasmic reticulum stress and lipid metabolism: mechanisms and therapeutic potential. *Biochem Res Int*. 2012:841362.
- Baumann, J., C. Sevinsky, and D.S. Conklin. 2013. Lipid biology of breast cancer. *Biochim Biophys Acta*.
- Beckman, M. 2006. Cell biology. Great balls of fat. *Science*. 311:1232-1234.
- Bellahcene, A., R. Bachelier, C. Detry, R. Lidereau, P. Clezardin, and V. Castronovo. 2007. Transcriptome analysis reveals an osteoblast-like phenotype for human osteotropic breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 101:135-148.
- Ben-Porath, I., M.W. Thomson, V.J. Carey, R. Ge, G.W. Bell, A. Regev, and R.A. Weinberg. 2008. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet*. 40:499-507.
- Beneteau, M., B. Zunino, M.A. Jacquin, O. Meynet, J. Chiche, L.A. Pradelli, S. Marchetti, A. Cornille, M. Carles, and J.E. Ricci. 2012. Combination of glycolysis inhibition with chemotherapy results in an antitumor immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:20071-20076.
- Bernet, C., M. Garret, B. de Barbeyrac, C. Bebear, and J. Bonnet. 1989. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 27:2492-2496.
- Berns, K., H.M. Horlings, B.T. Hennessy, M. Madiredjo, E.M. Hijmans, K. Beelen, S.C. Linn, A.M. Gonzalez-Angulo, K. Stemke-Hale, M. Hauptmann, R.L. Beijersbergen, G.B. Mills, M.J. van de Vijver, and R. Bernards. 2007. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell*. 12:395-402.
- Betts, J.A., J.D. French, M.A. Brown, and S.L. Edwards. 2013. Long-range transcriptional regulation of breast cancer genes. *Genes Chromosomes Cancer*. 52:113-125.
- Blasco, M.A. 2005. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*. 6:611-622.
- Bos, P.D., X.H. Zhang, C. Nadal, W. Shu, R.R. Gomis, D.X. Nguyen, A.J. Minn, M.J. van de Vijver, W.L. Gerald, J.A. Foekens, and J. Massague. 2009. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature*. 459:1005-1009.
- Bos, R., H. Zhong, C.F. Hanrahan, E.C. Mommers, G.L. Semenza, H.M. Pinedo, M.D. Abeloff, J.W. Simons, P.J. van Diest, and E. van der Wall. 2001. Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 93:309-314.
- Boyle, P. 2012. Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. *Ann Oncol*. 23 Suppl 6:vi7-12.
- Braun, S., F.D. Vogl, B. Naume, W. Janni, M.P. Osborne, R.C. Coombes, G. Schlimok, I.J. Diel, B. Gerber, G. Gebauer, J.Y. Pierga, C. Marth, D. Oruzio, G. Wiedswang, E.F. Solomayer, G. Kundt, B. Strobl, T. Fehm, G.Y. Wong, J. Bliss, A. Vincent-Salomon, and

REFERÈNCIES

- K. Pantel. 2005. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med.* 353:793-802.
- Britschgi, A., R. Andraos, H. Brinkhaus, I. Klebba, V. Romanet, U. Muller, M. Murakami, T. Radimerski, and M. Bentires-Alj. 2012. JAK2/STAT5 inhibition circumvents resistance to PI3K/mTOR blockade: a rationale for cotargeting these pathways in metastatic breast cancer. *Cancer Cell.* 22:796-811.
- Brown, J.M., and W.R. Wilson. 2004. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer.* 4:437-447.
- Brown, M.S., and J.L. Goldstein. 1997. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.* 89:331-340.
- Bruna, A., W. Greenwood, J. Le Quesne, A. Teschendorff, D. Miranda-Saavedra, O.M. Rueda, J.L. Sandoval, A.T. Vidakovic, A. Saadi, P. Pharoah, J. Stingl, and C. Caldas. 2012. TGFbeta induces the formation of tumour-initiating cells in claudinlow breast cancer. *Nat Commun.* 3:1055.
- Burton, J.B., S.J. Priceman, J.L. Sung, E. Brakenhielm, D.S. An, B. Pytowski, K. Alitalo, and L. Wu. 2008. Suppression of prostate cancer nodal and systemic metastasis by blockade of the lymphangiogenic axis. *Cancer Res.* 68:7828-7837.
- Bussard, K.M., C.V. Gay, and A.M. Mastro. 2008. The bone microenvironment in metastasis; what is special about bone? *Cancer Metastasis Rev.* 27:41-55.
- Caestecker, K.W., and G.R. Van de Walle. 2013. The role of BRCA1 in DNA double-strand repair: past and present. *Exp Cell Res.* 319:575-587.
- Cailleau, R., M. Olive, and Q.V. Cruciger. 1978. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro.* 14:911-915.
- Cairns, R.A., I.S. Harris, and T.W. Mak. 2011. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer.* 11:85-95.
- Caldas, C. 2012. Cancer sequencing unravels clonal evolution. *Nat Biotechnol.* 30:408-410.
- Cardoso, F., L. Van't Veer, E. Rutgers, S. Loi, S. Mook, and M.J. Piccart-Gebhart. 2008. Clinical application of the 70-gene profile: the MINDACT trial. *J Clin Oncol.* 26:729-735.
- Carmeliet, P., and R.K. Jain. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 407:249-257.
- Caro, P., A.U. Kishan, E. Norberg, I.A. Stanley, B. Chapuy, S.B. Ficarro, K. Polak, D. Tondera, J. Gounarides, H. Yin, F. Zhou, M.R. Green, L. Chen, S. Monti, J.A. Marto, M.A. Shipp, and N.N. Danial. 2012. Metabolic signatures uncover distinct targets in molecular subsets of diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell.* 22:547-560.
- Carpten, J.D., A.L. Faber, C. Horn, G.P. Donoho, S.L. Briggs, C.M. Robbins, G. Hostetter, S. Boguslawski, T.Y. Moses, S. Savage, M. Uhlik, A. Lin, J. Du, Y.W. Qian, D.J. Zeckner, G. Tucker-Kellogg, J. Touchman, K. Patel, S. Mousses, M. Bittner, R. Schevitz, M.H. Lai, K.L. Blanchard, and J.E. Thomas. 2007. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature.* 448:439-444.
- Carracedo, A., L.C. Cantley, and P.P. Pandolfi. 2013. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Rev Cancer.* 13:227-232.
- Carretero, R., J.M. Romero, F. Ruiz-Cabello, I. Maleno, F. Rodriguez, F.M. Camacho, L.M. Real, F. Garrido, and T. Cabrera. 2008. Analysis of HLA class I expression in progressing and regressing metastatic melanoma lesions after immunotherapy. *Immunogenetics.* 60:439-447.

REFERÈNCIES

- Chalbos, D., M. Chambon, G. Ailhaud, and H. Rochefort. 1987. Fatty acid synthetase and its mRNA are induced by progestins in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 262:9923-9926.
- Chambers, A.F. 2009. MDA-MB-435 and M14 cell lines: identical but not M14 melanoma? *Cancer Res.* 69:5292-5293.
- Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald. 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer.* 2:563-572.
- Chan, A. 2009. Antiangiogenic therapy for metastatic breast cancer: current status and future directions. *Drugs.* 69:167-181.
- Chang, J.W., H.B. Jeon, J.H. Lee, J.S. Yoo, J.S. Chun, J.H. Kim, and Y.J. Yoo. 2001. Augmented expression of peroxiredoxin I in lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 289:507-512.
- Chapman, D.C., and D.B. Williams. 2010. ER quality control in the biogenesis of MHC class I molecules. *Semin Cell Dev Biol.* 21:512-519.
- Chen, E.I., J. Hewel, J.S. Krueger, C. Tiraby, M.R. Weber, A. Kralli, K. Becker, J.R. Yates, 3rd, and B. Felding-Habermann. 2007a. Adaptation of energy metabolism in breast cancer brain metastases. *Cancer Res.* 67:1472-1486.
- Chen, H., S.A. Detmer, A.J. Ewald, E.E. Griffin, S.E. Fraser, and D.C. Chan. 2003. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol.* 160:189-200.
- Chen, H., J.M. McCaffery, and D.C. Chan. 2007b. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell.* 130:548-562.
- Chen, Q., X.H. Zhang, and J. Massague. 2011. Macrophage binding to receptor VCAM-1 transmits survival signals in breast cancer cells that invade the lungs. *Cancer Cell.* 20:538-549.
- Chiang, A.C., and J. Massague. 2008. Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med.* 359:2814-2823.
- Chichiarelli, S., A. Ferraro, F. Altieri, M. Eufemi, S. Coppari, C. Grillo, V. Arcangeli, and C. Turano. 2007. The stress protein ERp57/GRP58 binds specific DNA sequences in HeLa cells. *J Cell Physiol.* 210:343-351.
- Chichiarelli, S., E. Gaucci, A. Ferraro, C. Grillo, F. Altieri, R. Cocchiola, V. Arcangeli, C. Turano, and M. Eufemi. 2010. Role of ERp57 in the signaling and transcriptional activity of STAT3 in a melanoma cell line. *Arch Biochem Biophys.* 494:178-183.
- Choi, A.M., S.W. Ryter, and B. Levine. 2013. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med.* 368:1845-1846.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-159.
- Cicchillitti, L., A. Della Corte, M. Di Michele, M.B. Donati, D. Rotilio, and G. Scambia. 2010. Characterisation of a multimeric protein complex associated with ERp57 within the nucleus in paclitaxel-sensitive and -resistant epithelial ovarian cancer cells: the involvement of specific conformational states of beta-actin. *Int J Oncol.* 37:445-454.
- Clarke, M.F., and M. Fuller. 2006. Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell.* 124:1111-1115.
- Clarke, R., K.L. Cook, R. Hu, C.O. Facey, I. Tavassoly, J.L. Schwartz, W.T. Baumann, J.J. Tyson, J. Xuan, Y. Wang, A. Warri, and A.N. Shajahan. 2012. Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response, autophagy, and the integrated regulation of breast cancer cell fate. *Cancer Res.* 72:1321-1331.

REFERÈNCIES

- Coe, H., J. Jung, J. Groenendyk, D. Prins, and M. Michalak. 2010. ERp57 modulates STAT3 signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 285:6725-6738.
- Cohnheim, J. 1867. Ueber Entzündung und Eiterung. *In Path Anat Physio Klin Med Vol.* 40. 1-79.
- Collins, C.L., B.P. Bode, W.W. Souba, and S.F. Abcouwer. 1998. Multiwell 14CO₂-capture assay for evaluation of substrate oxidation rates of cells in culture. *Biotechniques.* 24:803-808.
- Comen, E., L. Norton, and J. Massague. 2011. Clinical implications of cancer self-seeding. *Nat Rev Clin Oncol.* 8:369-377.
- Consoli, F., S. Grisanti, V. Amoroso, C. Almici, R. Verardi, M. Marini, and E. Simoncini. 2011. Circulating tumor cells as predictors of prognosis in metastatic breast cancer: clinical application outside a clinical trial. *Tumori.* 97:737-742.
- Coussens, L., T.L. Yang-Feng, Y.C. Liao, E. Chen, A. Gray, J. McGrath, P.H. Seeburg, T.A. Libermann, J. Schlessinger, U. Francke, and et al. 1985. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science.* 230:1132-1139.
- Creighton, C.J., X. Li, M. Landis, J.M. Dixon, V.M. Neumeister, A. Sjolund, D.L. Rimm, H. Wong, A. Rodriguez, J.I. Herschkowitz, C. Fan, X. Zhang, X. He, A. Pavlick, M.C. Gutierrez, L. Renshaw, A.A. Larionov, D. Faratian, S.G. Hilsenbeck, C.M. Perou, M.T. Lewis, J.M. Rosen, and J.C. Chang. 2009. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:13820-13825.
- Crespi, B., and K. Summers. 2005. Evolutionary biology of cancer. *Trends Ecol Evol.* 20:545-552.
- Cvetkovic, D., M. Dragan, S.J. Leith, Z.M. Mir, H.S. Leong, M. Pampillo, J.D. Lewis, A.V. Babwah, and M. Bhattacharya. 2013. KISS1R Induces Invasiveness of Estrogen Receptor-Negative Human Mammary Epithelial and Breast Cancer Cells. *Endocrinology.* 154:1999-2014.
- Czaja, M.J. 2010. Autophagy in health and disease. 2. Regulation of lipid metabolism and storage by autophagy: pathophysiological implications. *Am J Physiol Cell Physiol.* 298:C973-978.
- Dagda, R.K., S.J. Cherra, 3rd, S.M. Kulich, A. Tandon, D. Park, and C.T. Chu. 2009. Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. *J Biol Chem.* 284:13843-13855.
- Dawson, S.J., O.M. Rueda, S. Aparicio, and C. Caldas. 2013. A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications. *EMBO J.* 32:617-628.
- de Almeida, S.F., J.V. Fleming, J.E. Azevedo, M. Carmo-Fonseca, and M. de Sousa. 2007. Stimulation of an unfolded protein response impairs MHC class I expression. *J Immunol.* 178:3612-3619.
- de Brito, O.M., and L. Scorrano. 2008. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature.* 456:605-610.
- DeBerardinis, R.J., and T. Cheng. 2010. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene.* 29:313-324.
- DeBerardinis, R.J., A. Mancuso, E. Daikhin, I. Nissim, M. Yudkoff, S. Wehrli, and C.B. Thompson. 2007. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:19345-19350.

REFERÈNCIES

- Deberardinis, R.J., N. Sayed, D. Ditsworth, and C.B. Thompson. 2008. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev.* 18:54-61.
- DeBerardinis, R.J., and C.B. Thompson. 2012. Cellular metabolism and disease: what do metabolic outliers teach us? *Cell.* 148:1132-1144.
- Debnath, J. 2011. The multifaceted roles of autophagy in tumors-implications for breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 16:173-187.
- Degano, I.R., M. Vilalta, J.R. Bago, A.M. Matthies, J.A. Hubbell, H. Dimitriou, P. Bianco, N. Rubio, and J. Blanco. 2008. Bioluminescence imaging of calvarial bone repair using bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 29:427-437.
- Demaria, S., M.D. Volm, R.L. Shapiro, H.T. Yee, R. Oratz, S.C. Formenti, F. Muggia, and W.F. Symmans. 2001. Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 7:3025-3030.
- den Hartigh, L.J., J.E. Connolly-Rohrbach, S. Fore, T.R. Huser, and J.C. Rutledge. 2010. Fatty acids from very low-density lipoprotein lipolysis products induce lipid droplet accumulation in human monocytes. *J Immunol.* 184:3927-3936.
- DeNardo, D.G., P. Andreu, and L.M. Coussens. 2010. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* 29:309-316.
- Denkert, C., S. Loibl, A. Noske, M. Roller, B.M. Muller, M. Komor, J. Budczies, S. Darb-Esfahani, R. Kronenwett, C. Hanusch, C. von Torne, W. Weichert, K. Engels, C. Solbach, I. Schrader, M. Dietel, and G. von Minckwitz. 2010. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 28:105-113.
- Derksen, P.W., X. Liu, F. Saridin, H. van der Gulden, J. Zevenhoven, B. Evers, J.R. van Beijnum, A.W. Griffioen, J. Vink, P. Krimpenfort, J.L. Peterse, R.D. Cardiff, A. Berns, and J. Jonkers. 2006. Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis. *Cancer Cell.* 10:437-449.
- Diaz, G., M. Melis, B. Batetta, F. Angius, and A.M. Falchi. 2008. Hydrophobic characterization of intracellular lipids in situ by Nile Red red/yellow emission ratio. *Micron.* 39:819-824.
- Dick, T.P., N. Bangia, D.R. Peaper, and P. Cresswell. 2002. Disulfide bond isomerization and the assembly of MHC class I-peptide complexes. *Immunity.* 16:87-98.
- Dong, D., C. Stapleton, B. Luo, S. Xiong, W. Ye, Y. Zhang, N. Jhaveri, G. Zhu, R. Ye, Z. Liu, K.W. Bruhn, N. Craft, S. Groshen, F.M. Hofman, and A.S. Lee. 2011. A critical role for GRP78/BiP in the tumor microenvironment for neovascularization during tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* 71:2848-2857.
- Dong, G., P.A. Wearsch, D.R. Peaper, P. Cresswell, and K.M. Reinisch. 2009. Insights into MHC class I peptide loading from the structure of the tapasin-ERp57 thiol oxidoreductase heterodimer. *Immunity.* 30:21-32.
- Drasin, D.J., T.P. Robin, and H.L. Ford. 2011. Breast cancer epithelial-to-mesenchymal transition: examining the functional consequences of plasticity. *Breast Cancer Res.* 13:226.
- Driouch, K., T. Landemaine, S. Sin, S. Wang, and R. Lidereau. 2007. Gene arrays for diagnosis, prognosis and treatment of breast cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 24:575-585.

REFERÈNCIES

- Dunn, L.K., K.S. Mohammad, P.G. Fournier, C.R. McKenna, H.W. Davis, M. Niewolna, X.H. Peng, J.M. Chirgwin, and T.A. Guise. 2009. Hypoxia and TGF-beta drive breast cancer bone metastases through parallel signaling pathways in tumor cells and the bone microenvironment. *PLoS One*. 4:e6896.
- Duvel, K., J.L. Yecies, S. Menon, P. Raman, A.I. Lipovsky, A.L. Souza, E. Triantafellow, Q. Ma, R. Gorski, S. Cleaver, M.G. Vander Heiden, J.P. MacKeigan, P.M. Finan, C.B. Clish, L.O. Murphy, and B.D. Manning. 2010. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell*. 39:171-183.
- Dvorak, H.F. 1986. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*. 315:1650-1659.
- Eckhardt, B.L., P.A. Francis, B.S. Parker, and R.L. Anderson. 2012. Strategies for the discovery and development of therapies for metastatic breast cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 11:479-497.
- Eiro, N., L. Gonzalez, L.O. Gonzalez, B. Fernandez-Garcia, M.L. Lamelas, L. Marin, S. Gonzalez-Reyes, J.M. del Casar, and F.J. Vizoso. 2012. Relationship between the inflammatory molecular profile of breast carcinomas and distant metastasis development. *PLoS One*. 7:e49047.
- Elanchezian, R., P. Palsamy, C.J. Madson, M.L. Mulhern, D.W. Lynch, A.M. Troia, J. Usukura, and T. Shinohara. 2012. Low glucose under hypoxic conditions induces unfolded protein response and produces reactive oxygen species in lens epithelial cells. *Cell Death Dis*. 3:e301.
- Eldredge, H., A. DeNittis, J. FDuHadaway, R. Metz, and G. Prendergast. 2012. Whole-brain Radiation Therapy and Chloroquine in Patients With Brain Metastases: Outcomes and Response Related to IDO2 Gene Single-nucleotide Polymorphisms. *International Journal of Radiation Oncology*. 84.
- Eletto, D., A. Maganty, D. Dersh, C. Makarewich, C. Biswas, J.C. Paton, A.W. Paton, S. Doroudgar, C.C. Glembotski, and Y. Argon. 2012. Limitation of individual folding resources in the ER leads to outcomes distinct from the unfolded protein response. *J Cell Sci*. 125:4865-4875.
- Ellison, G., T. Klinowska, R.F. Westwood, E. Docter, T. French, and J.C. Fox. 2002. Further evidence to support the melanocytic origin of MDA-MB-435. *Mol Pathol*. 55:294-299.
- Eroles, P., A. Bosch, J.A. Perez-Fidalgo, and A. Lluch. 2012. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev*. 38:698-707.
- Escobar, P.F., R.J. Patrick, L.A. Rybicki, D.E. Weng, and J.P. Crowe. 2007. The 2003 revised TNM staging system for breast cancer: results of stage re-classification on survival and future comparisons among stage groups. *Ann Surg Oncol*. 14:143-147.
- Ewing, J. 1928. Neoplastic Diseases. Saunders.
- Falagas, M.E., and M. Kompoti. 2006. Obesity and infection. *Lancet Infect Dis*. 6:438-446.
- Fehm, T., V. Mueller, R. Marches, G. Klein, B. Gueckel, H. Neubauer, E. Solomayer, and S. Becker. 2008. Tumor cell dormancy: implications for the biology and treatment of breast cancer. *APMIS*. 116:742-753.
- Feldman, D.E., V. Chauhan, and A.C. Koong. 2005. The unfolded protein response: a novel component of the hypoxic stress response in tumors. *Mol Cancer Res*. 3:597-605.
- Felgenhauer, K. 1986. The blood-brain barrier redefined. *J Neurol*. 233:193-194.
- Fernandez, Y., L. Espana, S. Manas, A. Fabra, and A. Sierra. 2000. Bcl-xL promotes metastasis of breast cancer cells by induction of cytokines resistance. *Cell Death Differ*. 7:350-359.

REFERÈNCIES

- Feuerer, M., M. Rocha, L. Bai, V. Umansky, E.F. Solomayer, G. Bastert, I.J. Diel, and V. Schirmacher. 2001. Enrichment of memory T cells and other profound immunological changes in the bone marrow from untreated breast cancer patients. *Int J Cancer*. 92:96-105.
- Fidler, I.J. 2002. Critical determinants of metastasis. *Semin Cancer Biol*. 12:89-96.
- Fidler, I.J. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 3:453-458.
- Fidler, I.J. 2011. The role of the organ microenvironment in brain metastasis. *Semin Cancer Biol*. 21:107-112.
- Fidler, I.J., S. Yano, R.D. Zhang, T. Fujimaki, and C.D. Bucana. 2002. The seed and soil hypothesis: vascularisation and brain metastases. *Lancet Oncol*. 3:53-57.
- Flavin, R., S. Peluso, P.L. Nguyen, and M. Loda. 2010. Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncol*. 6:551-562.
- Foo, E.M., M.V. Boost, A.S. Wong, W.T. Loo, L.W. Chow, and C.Y. Chow. 2013. New developments in breast cancer prognosis: molecular predictors of treatment response and survival. *Int J Biol Markers*:0.
- Freudiger, C.W., W. Min, B.G. Saar, S. Lu, G.R. Holtom, C. He, J.C. Tsai, J.X. Kang, and X.S. Xie. 2008. Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy. *Science*. 322:1857-1861.
- Fu, Y., and A.S. Lee. 2006. Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy. *Cancer Biol Ther*. 5:741-744.
- Fujimaki, T., D. Fan, A. Staroselsky, K. Gohji, C. Bucana, and I. Fidler. 1993. Critical factors regulating site-specific brain metastasis of murine melanomas. *Int J Oncol*. 3:789-799.
- Gao, D., D.J. Nolan, A.S. Mellick, K. Bambino, K. McDonnell, and V. Mittal. 2008. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science*. 319:195-198.
- Garbi, N., S. Tanaka, F. Momburg, and G.J. Hammerling. 2006. Impaired assembly of the major histocompatibility complex class I peptide-loading complex in mice deficient in the oxidoreductase ERp57. *Nat Immunol*. 7:93-102.
- Garcia, T., A. Jackson, R. Bachelier, P. Clement-Lacroix, R. Baron, P. Clezardin, and P. Pujuguet. 2008. A convenient clinically relevant model of human breast cancer bone metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 25:33-42.
- Garcia-Garcia, J., E. Guney, R. Aragues, J. Planas-Iglesias, and B. Oliva. 2010. Biana: a software framework for compiling biological interactions and analyzing networks. *BMC Bioinformatics*. 11:56.
- Garcia-Olmo, D., D.C. Garcia-Olmo, J. Ontanon, and E. Martinez. 2000. Horizontal transfer of DNA and the "genometastasis hypothesis". *Blood*. 95:724-725.
- Garrido, F., T. Cabrera, R.S. Accolla, J.C. Bensa, W. Bodmer, G. Dohr, B. Drenou, M. Drouet, R. Fauchet, G.B. Ferrara, S. Ferrone, P. Giacomini, T. Kageshita, L. Koopman, M. Maio, F. Marincola, C. Mazzilli, P.A. Morel, A. Murray, C. Papasteriades, L. Salvaneschi, P.L. Stern, and B. Uchanska-Ziegler. 1997. HLA and cancer. In Charron D (ed): HLA, Genetic Diversity of HLA. Functional and Medical Implications.
- Garrido, F., T. Cabrera, A. Concha, S. Glew, F. Ruiz-Cabello, and P.L. Stern. 1993. Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol Today*. 14:491-499.
- Gasco, M., S. Shami, and T. Crook. 2002. The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 4:70-76.

REFERÈNCIES

- Gegg, M.E., J.M. Cooper, K.Y. Chau, M. Rojo, A.H. Schapira, and J.W. Taanman. 2010. Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet.* 19:4861-4870.
- Geiger, T.R., and D.S. Peeper. 2009. Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 1796:293-308.
- Gewirtz, D.A. 2009. Autophagy, senescence and tumor dormancy in cancer therapy. *Autophagy.* 5:1232-1234.
- Gillies, R.J., I. Robey, and R.A. Gatenby. 2008. Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers. *J Nucl Med.* 49 Suppl 2:24S-42S.
- Gonzalez-Angulo, A.M., J. Ferrer-Lozano, K. Stemke-Hale, A. Sahin, S. Liu, J.A. Barrera, O. Burgues, A.M. Lluch, H. Chen, G.N. Hortobagyi, G.B. Mills, and F. Meric-Bernstam. 2011. PI3K pathway mutations and PTEN levels in primary and metastatic breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 10:1093-1101.
- Gonzalez-Angulo, A.M., B.T. Hennessy, and G.B. Mills. 2010. Future of personalized medicine in oncology: a systems biology approach. *J Clin Oncol.* 28:2777-2783.
- Goss, P.E., and A.F. Chambers. 2010. Does tumour dormancy offer a therapeutic target? *Nat Rev Cancer.* 10:871-877.
- Granados, D.P., P.L. Tanguay, M.P. Hardy, E. Caron, D. de Verteuil, S. Meloche, and C. Perreault. 2009. ER stress affects processing of MHC class I-associated peptides. *BMC Immunol.* 10:10.
- Grandemange, S., S. Herzig, and J.C. Martinou. 2009. Mitochondrial dynamics and cancer. *Semin Cancer Biol.* 19:50-56.
- Granville, D.J., and R.A. Gottlieb. 2003. The mitochondrial voltage-dependent anion channel (VDAC) as a therapeutic target for initiating cell death. *Curr Med Chem.* 10:1527-1533.
- Greenspan, P., E.P. Mayer, and S.D. Fowler. 1985. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol.* 100:965-973.
- Grillo, C., C. D'Ambrosio, A. Scaloni, M. Maceroni, S. Merluzzi, C. Turano, and F. Altieri. 2006. Cooperative activity of Ref-1/APE and ERp57 in reductive activation of transcription factors. *Free Radic Biol Med.* 41:1113-1123.
- Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 140:883-899.
- Guo, G.G., K. Patel, V. Kumar, M. Shah, V.A. Fried, J.D. Etlinger, and P.B. Sehgal. 2002. Association of the chaperone glucose-regulated protein 58 (GRP58/ER-60/ERp57) with Stat3 in cytosol and plasma membrane complexes. *J Interferon Cytokine Res.* 22:555-563.
- Gupta, G.P., and J. Massague. 2006. Cancer metastasis: building a framework. *Cell.* 127:679-695.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100:57-70.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144:646-674.
- Hansen, T.H., and M. Bouvier. 2009. MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies. *Nat Rev Immunol.* 9:503-513.
- Hardy, K.M., B.W. Booth, M.J. Hendrix, D.S. Salomon, and L. Strizzi. 2010. ErbB/EGF signaling and EMT in mammary development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 15:191-199.

REFERÈNCIES

- Harrell, J.C., A. Prat, J.S. Parker, C. Fan, X. He, L. Carey, C. Anders, M. Ewend, and C.M. Perou. 2012. Genomic analysis identifies unique signatures predictive of brain, lung, and liver relapse. *Breast Cancer Res Treat.* 132:523-535.
- Hassall, D.G., and A. Graham. 1995. Changes in free cholesterol content, measured by filipin fluorescence and flow cytometry, correlate with changes in cholesterol biosynthesis in THP-1 macrophages. *Cytometry.* 21:352-362.
- Hedley, B.D., K.S. Vaidya, P. Phadke, L. MacKenzie, D.W. Dales, C.O. Postenka, I.C. MacDonald, and A.F. Chambers. 2008. BRMS1 suppresses breast cancer metastasis in multiple experimental models of metastasis by reducing solitary cell survival and inhibiting growth initiation. *Clin Exp Metastasis.* 25:727-740.
- Hennessy, B.T., A.M. Gonzalez-Angulo, K. Stemke-Hale, M.Z. Gilcrease, S. Krishnamurthy, J.S. Lee, J. Fridlyand, A. Sahin, R. Agarwal, C. Joy, W. Liu, D. Stivers, K. Baggerly, M. Carey, A. Lluch, C. Monteagudo, X. He, V. Weigman, C. Fan, J. Palazzo, G.N. Hortobagyi, L.K. Nolden, N.J. Wang, V. Valero, J.W. Gray, C.M. Perou, and G.B. Mills. 2009. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res.* 69:4116-4124.
- Hill, R.P., A.F. Chambers, V. Ling, and J.F. Harris. 1984. Dynamic heterogeneity: rapid generation of metastatic variants in mouse B16 melanoma cells. *Science.* 224:998-1001.
- Hirano, N., F. Shibasaki, R. Sakai, T. Tanaka, J. Nishida, Y. Yazaki, T. Takenawa, and H. Hirai. 1995. Molecular cloning of the human glucose-regulated protein ERp57/GRP58, a thiol-dependent reductase. Identification of its secretory form and inducible expression by the oncogenic transformation. *Eur J Biochem.* 234:336-342.
- Hiratsuka, S., K. Nakamura, S. Iwai, M. Murakami, T. Itoh, H. Kijima, J.M. Shipley, R.M. Senior, and M. Shibuya. 2002. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell.* 2:289-300.
- Hirayama, A., K. Kami, M. Sugimoto, M. Sugawara, N. Toki, H. Onozuka, T. Kinoshita, N. Saito, A. Ochiai, M. Tomita, H. Esumi, and T. Soga. 2009. Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Res.* 69:4918-4925.
- Hirsch, H.A., D. Iliopoulos, A. Joshi, Y. Zhang, S.A. Jaeger, M. Bulyk, P.N. Tschlis, X. Shirley Liu, and K. Struhl. 2010. A transcriptional signature and common gene networks link cancer with lipid metabolism and diverse human diseases. *Cancer Cell.* 17:348-361.
- Hollien, J., and J.S. Weissman. 2006. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science.* 313:104-107.
- Holzer, R.G., E.J. Park, N. Li, H. Tran, M. Chen, C. Choi, G. Solinas, and M. Karin. 2011. Saturated fatty acids induce c-Src clustering within membrane subdomains, leading to JNK activation. *Cell.* 147:173-184.
- Howlett, A.R., O.W. Petersen, P.S. Steeg, and M.J. Bissell. 1994. A novel function for the nm23-H1 gene: overexpression in human breast carcinoma cells leads to the formation of basement membrane and growth arrest. *J Natl Cancer Inst.* 86:1838-1844.
- Hsieh, A.C., Y. Liu, M.P. Edlind, N.T. Ingolia, M.R. Janes, A. Sher, E.Y. Shi, C.R. Stumpf, C. Christensen, M.J. Bonham, S. Wang, P. Ren, M. Martin, K. Jessen, M.E. Feldman, J.S. Weissman, K.M. Shokat, C. Rommel, and D. Ruggero. 2012. The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature.* 485:55-61.

REFERÈNCIES

- Hsu, P.P., and D.M. Sabatini. 2008. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*. 134:703-707.
- Hurst, D.R., and D.R. Welch. 2011. Unraveling the enigmatic complexities of BRMS1-mediated metastasis suppression. *FEBS Lett*. 585:3185-3190.
- Irmisch, A., and J. Huelsken. 2013. Metastasis: New insights into organ-specific extravasation and metastatic niches. *Exp Cell Res*.
- Jackson, J.E. 1991. A user's guide to principal components. Wiley, New York.
- Jackson, S.P., and J. Bartek. 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 461:1071-1078.
- Jaggupilli, A., and E. Elkord. 2012. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. *Clin Dev Immunol*. 2012:708036.
- Jemal, A., F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 61:69-90.
- Jin, Q., L.X. Yuan, D. Boulbes, J.M. Baek, Y.N. Wang, D. Gomez-Cabello, D.H. Hawke, S.C. Yeung, M.H. Lee, G.N. Hortobagyi, M.C. Hung, and F.J. Esteva. 2010. Fatty acid synthase phosphorylation: a novel therapeutic target in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Breast Cancer Res*. 12:R96.
- Joyce, J.A., and J.W. Pollard. 2009. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. 9:239-252.
- Kan, Z., B.S. Jaiswal, J. Stinson, V. Janakiraman, D. Bhatt, H.M. Stern, P. Yue, P.M. Haverty, R. Bourgon, J. Zheng, M. Moorhead, S. Chaudhuri, L.P. Tomsho, B.A. Peters, K. Pujara, S. Cordes, D.P. Davis, V.E. Carlton, W. Yuan, L. Li, W. Wang, C. Eigenbrot, J.S. Kaminker, D.A. Eberhard, P. Waring, S.C. Schuster, Z. Modrusan, Z. Zhang, D. Stokoe, F.J. de Sauvage, M. Faham, and S. Seshagiri. 2010. Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature*. 466:869-873.
- Kang, Y. 2006. New tricks against an old foe: molecular dissection of metastasis tissue tropism in breast cancer. *Breast Dis*. 26:129-138.
- Kang, Y., P.M. Siegel, W. Shu, M. Drobnjak, S.M. Kakonen, C. Cordon-Cardo, T.A. Guise, and J. Massague. 2003. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*. 3:537-549.
- Kaplan, R.N., R.D. Riba, S. Zacharoulis, A.H. Bramley, L. Vincent, C. Costa, D.D. MacDonald, D.K. Jin, K. Shido, S.A. Kerns, Z. Zhu, D. Hicklin, Y. Wu, J.L. Port, N. Altorki, E.R. Port, D. Ruggero, S.V. Shmelkov, K.K. Jensen, S. Rafii, and D. Lyden. 2005. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. 438:820-827.
- Kar, G., A. Gursoy, and O. Keskin. 2009. Human cancer protein-protein interaction network: a structural perspective. *PLoS Comput Biol*. 5:e1000601.
- Kasper, M., V. Jaks, M. Fiaschi, and R. Toftgard. 2009. Hedgehog signalling in breast cancer. *Carcinogenesis*. 30:903-911.
- Kauraniemi, P., M. Barlund, O. Monni, and A. Kallioniemi. 2001. New amplified and highly expressed genes discovered in the ERBB2 amplicon in breast cancer by cDNA microarrays. *Cancer Res*. 61:8235-8240.
- Kenific, C.M., A. Thorburn, and J. Debnath. 2010. Autophagy and metastasis: another double-edged sword. *Curr Opin Cell Biol*. 22:241-245.
- Kennecke, H., R. Yerushalmi, R. Woods, M.C. Cheang, D. Voduc, C.H. Speers, T.O. Nielsen, and K. Gelmon. 2010. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 28:3271-3277.

REFERÈNCIES

- Kerbel, R.S., C. Waghorne, B. Korczak, A. Lagarde, and M.L. Breitman. 1988. Clonal dominance of primary tumours by metastatic cells: genetic analysis and biological implications. *Cancer Surv.* 7:597-629.
- Key, T.J., P.K. Verkasalo, and E. Banks. 2001. Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol.* 2:133-140.
- Kim, M.Y., T. Oskarsson, S. Acharyya, D.X. Nguyen, X.H. Zhang, L. Norton, and J. Massague. 2009. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell.* 139:1315-1326.
- Kim, R., M. Emi, and K. Tanabe. 2007. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology.* 121:1-14.
- Kim, R., M. Emi, K. Tanabe, and K. Arihiro. 2006. Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res.* 66:5527-5536.
- Kim, Y.N., K.H. Koo, J.Y. Sung, U.J. Yun, and H. Kim. 2012. Anoikis resistance: an essential prerequisite for tumor metastasis. *Int J Cell Biol.* 2012:306879.
- King, C.R., M.H. Kraus, and S.A. Aaronson. 1985. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science.* 229:974-976.
- Kirkby, B., N. Roman, B. Kobe, S. Kellie, and J.K. Forwood. 2010. Functional and structural properties of mammalian acyl-coenzyme A thioesterases. *Prog Lipid Res.* 49:366-377.
- Kischel, P., F. Guillonneau, B. Dumont, A. Bellahcene, V. Stresing, P. Clezardin, E.A. De Pauw, and V. Castronovo. 2008. Cell membrane proteomic analysis identifies proteins differentially expressed in osteotropic human breast cancer cells. *Neoplasia.* 10:1014-1020.
- Klein, A., C. Olendrowitz, R. Schmutzler, J. Hampl, P.M. Schlag, N. Maass, N. Arnold, R. Wessel, J. Ramser, A. Meindl, S. Scherneck, and S. Seitz. 2009. Identification of brain- and bone-specific breast cancer metastasis genes. *Cancer Lett.* 276:212-220.
- Klionsky, D.J., F.C. Abdalla, H. Abeliovich, R.T. Abraham, A. Acevedo-Arozena, K. Adeli, L. Agholme, M. Agnello, P. Agostinis, J.A. Aguirre-Ghiso, H.J. Ahn, O. Ait-Mohamed, S. Ait-Si-Ali, T. Akematsu, S. Akira, H.M. Al-Younes, M.A. Al-Zeer, M.L. Albert, R.L. Albin, J. Alegre-Abarrategui, M.F. Aleo, M. Alirezai, A. Almasan, M. Almonte-Becerril, A. Amano, R. Amaravadi, S. Amarnath, A.O. Amer, N. Andrieu-Abadie, V. Anantharam, D.K. Ann, S. Anoopkumar-Dukie, H. Aoki, N. Apostolova, G. Arancia, J.P. Aris, K. Asanuma, N.Y. Asare, H. Ashida, V. Askanas, D.S. Askew, P. Auberger, M. Baba, S.K. Backues, E.H. Baehrecke, B.A. Bahr, X.Y. Bai, Y. Bailly, R. Baiocchi, G. Baldini, W. Balduini, A. Ballabio, B.A. Bamber, E.T. Bampton, G. Banhegyi, C.R. Bartholomew, D.C. Bassham, R.C. Bast, Jr., H. Batoko, B.H. Bay, I. Beau, D.M. Bechet, T.J. Begley, C. Behl, C. Behrends, S. Bekri, B. Bellaire, L.J. Bendall, L. Benetti, L. Berliocchi, H. Bernardi, F. Bernassola, S. Besteiro, I. Bhatia-Kissova, X. Bi, M. Biard-Piechaczyk, J.S. Blum, L.H. Boise, P. Bonaldo, D.L. Boone, B.C. Bornhauser, K.R. Bortoluci, I. Bossis, F. Bost, J.P. Bourquin, P. Boya, M. Boyer-Guittaut, P.V. Bozhkov, N.R. Brady, C. Brancolini, A. Brech, J.E. Brenman, A. Brennand, E.H. Bresnick, P. Brest, D. Bridges, M.L. Bristol, P.S. Brookes, E.J. Brown, J.H. Brumell, et al. 2012. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy.* 8:445-544.
- Klymkowsky, M.W., and P. Savagner. 2009. Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am J Pathol.* 174:1588-1593.
- Knappskog, S., and P.E. Lonning. 2012. P53 and its molecular basis to chemoresistance in breast cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 16 Suppl 1:S23-30.

REFERÈNCIES

- Kodack, D.P., E. Chung, H. Yamashita, J. Incio, A.M. Duyverman, Y. Song, C.T. Farrar, Y. Huang, E. Ager, W. Kamoun, S. Goel, M. Snuderl, A. Lussiez, L. Hiddingh, S. Mahmood, B.A. Tannous, A.F. Eichler, D. Fukumura, J.A. Engelman, and R.K. Jain. 2012. Combined targeting of HER2 and VEGFR2 for effective treatment of HER2-amplified breast cancer brain metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:E3119-3127.
- Kohli, L., and K.A. Roth. 2010. Autophagy: cerebral home cooking. *Am J Pathol*. 176:1065-1071.
- Komatsu, M., S. Waguri, T. Chiba, S. Murata, J. Iwata, I. Tanida, T. Ueno, M. Koike, Y. Uchiyama, E. Kominami, and K. Tanaka. 2006. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*. 441:880-884.
- Kourtidis, A., R. Srinivasaiah, R.D. Carkner, M.J. Brosnan, and D.S. Conklin. 2009. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma protects ERBB2-positive breast cancer cells from palmitate toxicity. *Breast Cancer Res*. 11:R16.
- Kraljevic Pavelic, S., M. Sedic, H. Bosnjak, S. Spaventi, and K. Pavelic. 2011. Metastasis: new perspectives on an old problem. *Mol Cancer*. 10:22.
- Kroemer, G., and J. Pouyssegur. 2008. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*. 13:472-482.
- Krycer, J.R., and A.J. Brown. 2013. Cholesterol accumulation in prostate cancer: a classic observation from a modern perspective. *Biochim Biophys Acta*. 1835:219-229.
- Kuhajda, F.P., K. Jenner, F.D. Wood, R.A. Hennigar, L.B. Jacobs, J.D. Dick, and G.R. Pasternack. 1994. Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:6379-6383.
- Kuma, A., M. Hatano, M. Matsui, A. Yamamoto, H. Nakaya, T. Yoshimori, Y. Ohsumi, T. Tokuhisa, and N. Mizushima. 2004. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*. 432:1032-1036.
- Lacroix, M. 2006. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 13:1033-1067.
- Lacroix, M., R.A. Toillon, and G. Leclercq. 2006. p53 and breast cancer, an update. *Endocr Relat Cancer*. 13:293-325.
- Landemaine, T., A. Jackson, A. Bellahcene, N. Rucci, S. Sin, B.M. Abad, A. Sierra, A. Boudinet, J.M. Guinebretiere, E. Ricevuto, C. Nogues, M. Briffod, I. Bieche, P. Cherel, T. Garcia, V. Castronovo, A. Teti, R. Lidereau, and K. Driouch. 2008. A six-gene signature predicting breast cancer lung metastasis. *Cancer Res*. 68:6092-6099.
- Langley, R.R., and I.J. Fidler. 2007. Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis. *Endocr Rev*. 28:297-321.
- Laplante, M., and D.M. Sabatini. 2012. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 149:274-293.
- Lee, A.S. 1981. The accumulation of three specific proteins related to glucose-regulated proteins in a temperature-sensitive hamster mutant cell line K12. *J Cell Physiol*. 106:119-125.
- Lee, A.S. 2001. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci*. 26:504-510.
- Lee, A.S. 2007. GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer Res*. 67:3496-3499.
- Lee, J.H., and D.R. Welch. 1997a. Identification of highly expressed genes in metastasis-suppressed chromosome 6/human malignant melanoma hybrid cells using subtractive hybridization and differential display. *Int J Cancer*. 71:1035-1044.

REFERÈNCIES

- Lee, J.H., and D.R. Welch. 1997b. Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Res.* 57:2384-2387.
- Legros, F., A. Lombes, P. Frachon, and M. Rojo. 2002. Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell.* 13:4343-4354.
- Lehmann, B.D., J.A. Bauer, X. Chen, M.E. Sanders, A.B. Chakravarthy, Y. Shyr, and J.A. Pietenpol. 2011. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 121:2750-2767.
- Lemasters, J.J., and E. Holmuhamedov. 2006. Voltage-dependent anion channel (VDAC) as mitochondrial governor--thinking outside the box. *Biochim Biophys Acta.* 1762:181-190.
- Leone, A., U. Flatow, K. VanHoutte, and P.S. Steeg. 1993. Transfection of human nm23-H1 into the human MDA-MB-435 breast carcinoma cell line: effects on tumor metastatic potential, colonization and enzymatic activity. *Oncogene.* 8:2325-2333.
- Leong, K.G., K. Niessen, I. Kulic, A. Raouf, C. Eaves, I. Pollet, and A. Karsan. 2007. Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin. *J Exp Med.* 204:2935-2948.
- Leong, S.P., E.K. Nakakura, R. Pollock, M.A. Choti, D.L. Morton, W.D. Henner, A. Lal, R. Pillai, O.H. Clark, and B. Cady. 2011. Unique patterns of metastases in common and rare types of malignancy. *J Surg Oncol.* 103:607-614.
- Levine, B., and G. Kroemer. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 132:27-42.
- Lewis, J.W., and T. Elliott. 1998. Evidence for successive peptide binding and quality control stages during MHC class I assembly. *Curr Biol.* 8:717-720.
- Leys, C.M., S. Nomura, B.J. LaFleur, S. Ferrone, M. Kaminishi, E. Montgomery, and J.R. Goldenring. 2007. Expression and prognostic significance of prothymosin-alpha and ERp57 in human gastric cancer. *Surgery.* 141:41-50.
- Li, F., B. Tiede, J. Massague, and Y. Kang. 2007. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res.* 17:3-14.
- Li, G., K. Satyamoorthy, and M. Herlyn. 2001. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res.* 61:3819-3825.
- Li, J., and A.S. Lee. 2006. Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. *Curr Mol Med.* 6:45-54.
- Li, X., M.T. Lewis, J. Huang, C. Gutierrez, C.K. Osborne, M.F. Wu, S.G. Hilsenbeck, A. Pavlick, X. Zhang, G.C. Chamness, H. Wong, J. Rosen, and J.C. Chang. 2008. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 100:672-679.
- Liang, X.H., S. Jackson, M. Seaman, K. Brown, B. Kempkes, H. Hibshoosh, and B. Levine. 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature.* 402:672-676.
- Liao, C.J., T.I. Wu, Y.H. Huang, T.C. Chang, C.S. Wang, M.M. Tsai, C.H. Lai, Y. Liang, S.M. Jung, and K.H. Lin. 2011. Glucose-regulated protein 58 modulates cell invasiveness and serves as a prognostic marker for cervical cancer. *Cancer Sci.* 102:2255-2263.
- Lieber, C.A., H.E. Nethercott, and M.H. Kabeer. 2010. Cancer field effects in normal tissues revealed by Raman spectroscopy. *Biomed Opt Express.* 1:975-982.
- Liesa, M., M. Palacin, and A. Zorzano. 2009. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev.* 89:799-845.

REFERÈNCIES

- Lim, E., F. Vaillant, D. Wu, N.C. Forrest, B. Pal, A.H. Hart, M.L. Asselin-Labat, D.E. Gyorki, T. Ward, A. Partanen, F. Feleppa, L.I. Huschtscha, H.J. Thorne, kConFab, S.B. Fox, M. Yan, J.D. French, M.A. Brown, G.K. Smyth, J.E. Visvader, and G.J. Lindeman. 2009. Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med.* 15:907-913.
- Lin, E.Y., A.V. Nguyen, R.G. Russell, and J.W. Pollard. 2001. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med.* 193:727-740.
- Lin, Q., K. Balasubramanian, D. Fan, S.J. Kim, L. Guo, H. Wang, M. Bar-Eli, K.D. Aldape, and I.J. Fidler. 2010. Reactive astrocytes protect melanoma cells from chemotherapy by sequestering intracellular calcium through gap junction communication channels. *Neoplasia.* 12:748-754.
- Liu, K., and M.J. Czaja. 2013. Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy. *Cell Death Differ.* 20:3-11.
- Liu, Y. 2006. Fatty acid oxidation is a dominant bioenergetic pathway in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 9:230-234.
- Liu, Y., A. Kosaka, M. Ikeura, G. Kohanbash, W. Fellows-Mayle, L.A. Snyder, and H. Okada. 2013. Premetastatic soil and prevention of breast cancer brain metastasis. *Neuro Oncol.*
- Lorusso, G., and C. Rugg. 2012. New insights into the mechanisms of organ-specific breast cancer metastasis. *Semin Cancer Biol.* 22:226-233.
- Lowell, B.B. 1999. PPARgamma: an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function. *Cell.* 99:239-242.
- Lu, X., and Y. Kang. 2007. Organotropism of breast cancer metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 12:153-162.
- Lum, J.J., T. Bui, M. Gruber, J.D. Gordan, R.J. DeBerardinis, K.L. Covelto, M.C. Simon, and C.B. Thompson. 2007. The transcription factor HIF-1alpha plays a critical role in the growth factor-dependent regulation of both aerobic and anaerobic glycolysis. *Genes Dev.* 21:1037-1049.
- Luo, J., N.L. Solimini, and S.J. Elledge. 2009. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell.* 136:823-837.
- Luo, J.L., S. Maeda, L.C. Hsu, H. Yagita, and M. Karin. 2004. Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell.* 6:297-305.
- Maattanen, P., G. Kozlov, K. Gehring, and D.Y. Thomas. 2006. ERp57 and PDI: multifunctional protein disulfide isomerases with similar domain architectures but differing substrate-partner associations. *Biochem Cell Biol.* 84:881-889.
- MacDonald, N.J., J.M. Freije, M.L. Stracke, R.E. Manrow, and P.S. Steeg. 1996. Site-directed mutagenesis of nm23-H1. Mutation of proline 96 or serine 120 abrogates its motility inhibitory activity upon transfection into human breast carcinoma cells. *J Biol Chem.* 271:25107-25116.
- Maldonado, E.N., K.L. Sheldon, D.N. Dehart, J. Patnaik, Y. Manevich, D.M. Townsend, S.M. Bezrukov, T.K. Rostovtseva, and J.J. Lemasters. 2013. Voltage-dependent Anion Channels Modulate Mitochondrial Metabolism in Cancer Cells: REGULATION BY FREE TUBULIN AND ERASTIN. *J Biol Chem.* 288:11920-11929.
- Malik, F.A., A.J. Sanders, A.D. Jones, R.E. Mansel, and W.G. Jiang. 2009. Transcriptional and translational modulation of KAI1 expression in ductal carcinoma of the breast and the prognostic significance. *Int J Mol Med.* 23:273-278.

REFERÈNCIES

- Mallon, E., P. Osin, N. Nasiri, I. Blain, B. Howard, and B. Gusterson. 2000. The basic pathology of human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 5:139-163.
- Mani, S.A., W. Guo, M.J. Liao, E.N. Eaton, A. Ayyanan, A.Y. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C.C. Zhang, M. Shipitsin, L.L. Campbell, K. Polyak, C. Brisken, J. Yang, and R.A. Weinberg. 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 133:704-715.
- Mantovani, A. 2010. Molecular pathways linking inflammation and cancer. *Curr Mol Med*. 10:369-373.
- Marin-Valencia, I., S.K. Cho, D. Rakheja, K.J. Hatanpaa, P. Kapur, T. Mashimo, A. Jindal, V. Vemireddy, L.B. Good, J. Raisanen, X. Sun, B. Mickey, C. Choi, M. Takahashi, O. Togao, J.M. Pascual, R.J. Deberardinis, E.A. Maher, C.R. Malloy, and R.M. Bachoo. 2012. Glucose metabolism via the pentose phosphate pathway, glycolysis and Krebs cycle in an orthotopic mouse model of human brain tumors. *NMR Biomed*. 25:1177-1186.
- Martin, B., R. Aragues, R. Sanz, B. Oliva, S. Boluda, A. Martinez, and A. Sierra. 2008a. Biological pathways contributing to organ-specific phenotype of brain metastatic cells. *J Proteome Res*. 7:908-920.
- Martin, B., R. Sanz, R. Aragues, B. Oliva, and A. Sierra. 2008b. Functional clustering of metastasis proteins describes plastic adaptation resources of breast-cancer cells to new microenvironments. *J Proteome Res*. 7:3242-3253.
- Martin, T.A., G. Watkins, and W.G. Jiang. 2005. KiSS-1 expression in human breast cancer. *Clin Exp Metastasis*. 22:503-511.
- Martinez-Aranda, A., V. Hernandez, C. Picon, I. Modolell, and A. Sierra. 2013. Development of a preclinical therapeutic model of human brain metastasis with chemoradiotherapy. *Int J Mol Sci*. 14:8306-8327.
- Mathew, R., V. Karantza-Wadsworth, and E. White. 2007. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*. 7:961-967.
- Mathew, R., and E. White. 2011. Autophagy, stress, and cancer metabolism: what doesn't kill you makes you stronger. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 76:389-396.
- Maxwell, K.N., R.E. Soccio, E.M. Duncan, E. Sehayek, and J.L. Breslow. 2003. Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice. *J Lipid Res*. 44:2109-2119.
- Medes, G., A. Thomas, and S. Weinhouse. 1953. Metabolism of neoplastic tissue. IV. A study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices in vitro. *Cancer Res*. 13:27-29.
- Mendez, O., Y. Fernandez, M.A. Peinado, V. Moreno, and A. Sierra. 2005. Anti-apoptotic proteins induce non-random genetic alterations that result in selecting breast cancer metastatic cells. *Clin Exp Metastasis*. 22:297-307.
- Menendez, J.A., and R. Lupu. 2007. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 7:763-777.
- Menendez, J.A., R. Lupu, and R. Colomer. 2004. Inhibition of tumor-associated fatty acid synthase hyperactivity induces synergistic chemosensitization of HER -2/ neu - overexpressing human breast cancer cells to docetaxel (taxotere). *Breast Cancer Res Treat*. 84:183-195.
- Meunier, L., Y.K. Usherwood, K.T. Chung, and L.M. Hendershot. 2002. A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol Biol Cell*. 13:4456-4469.

REFERÈNCIES

- Micalizzi, D.S., S.M. Farabaugh, and H.L. Ford. 2010. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 15:117-134.
- Mikhailyuk, I., and A. Razzhivin. 2003. Background subtraction in experimental data arrays illustrated by the example of Raman spectra and fluorescent gel electrophoresis patterns. *Instr. Exp. Tech* 46:765-769.
- Milani, M., T. Rzymiski, H.R. Mellor, L. Pike, A. Bottini, D. Generali, and A.L. Harris. 2009. The role of ATF4 stabilization and autophagy in resistance of breast cancer cells treated with Bortezomib. *Cancer Res*. 69:4415-4423.
- Miles, D.W., A. Chan, L.Y. Dirix, J. Cortes, X. Pivot, P. Tomczak, T. Delozier, J.H. Sohn, L. Provencher, F. Puglisi, N. Harbeck, G.G. Steger, A. Schneeweiss, A.M. Wardley, A. Chlistalla, and G. Romieu. 2010. Phase III study of bevacizumab plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel for the first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 28:3239-3247.
- Miller, K., M. Wang, J. Gralow, M. Dickler, M. Cobleigh, E.A. Perez, T. Shenkier, D. Cella, and N.E. Davidson. 2007. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 357:2666-2676.
- Min, W., C.W. Freudiger, S. Lu, and X.S. Xie. 2011. Coherent nonlinear optical imaging: beyond fluorescence microscopy. *Annu Rev Phys Chem*. 62:507-530.
- Minn, A.J., G.P. Gupta, P.M. Siegel, P.D. Bos, W. Shu, D.D. Giri, A. Viale, A.B. Olshen, W.L. Gerald, and J. Massague. 2005. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*. 436:518-524.
- Mizushima, N. 2007. Autophagy: process and function. *Genes Dev*. 21:2861-2873.
- Mizushima, N., and M. Komatsu. 2011. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 147:728-741.
- Morel, A.P., M. Lievre, C. Thomas, G. Hinkal, S. Ansieau, and A. Puisieux. 2008. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*. 3:e2888.
- Moremen, K.W., and M. Molinari. 2006. N-linked glycan recognition and processing: the molecular basis of endoplasmic reticulum quality control. *Curr Opin Struct Biol*. 16:592-599.
- Moreno-Sanchez, R., S. Rodriguez-Enriquez, A. Marin-Hernandez, and E. Saavedra. 2007. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J*. 274:1393-1418.
- Mueller, M.M., and N.E. Fusenig. 2004. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*. 4:839-849.
- Nguyen, D.X., P.D. Bos, and J. Massague. 2009. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*. 9:274-284.
- Nguyen, D.X., and J. Massague. 2007. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet*. 8:341-352.
- Nieva, C., M. Marro, N. Santana-Codina, S. Rao, D. Petrov, and A. Sierra. 2012. The lipid phenotype of breast cancer cells characterized by Raman microspectroscopy: towards a stratification of malignancy. *PLoS One*. 7:e46456.
- Noel, A.C., A. Calle, H.P. Emonard, B.V. Nusgens, L. Simar, J. Foidart, C.M. Lapiere, and J.M. Foidart. 1991. Invasion of reconstituted basement membrane matrix is not correlated to the malignant metastatic cell phenotype. *Cancer Res*. 51:405-414.

REFERÈNCIES

- Nunnari, J., and A. Suomalainen. 2012. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*. 148:1145-1159.
- Nyfeler, B., O. Nufer, T. Matsui, K. Mori, and H.P. Hauri. 2003. The cargo receptor ERGIC-53 is a target of the unfolded protein response. *Biochem Biophys Res Commun*. 304:599-604.
- O'Connor, P.M., J. Jackman, I. Bae, T.G. Myers, S. Fan, M. Mutoh, D.A. Scudiero, A. Monks, E.A. Sausville, J.N. Weinstein, S. Friend, A.J. Fornace, Jr., and K.W. Kohn. 1997. Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res*. 57:4285-4300.
- O'Shaughnessy, J., D. Miles, R.J. Gray, V. Dieras, E. A. Perez, R. Zon, J. Cortes, X. Zhou, S. Phan, and K. Miller. 2010. A meta-analysis of overall survival data from three randomized trials of bevacizumab (BV) and first-line chemotherapy as treatment for patients with metastatic breast cancer (MBC). *In ASCO Annual Meeting. J Clin Oncol* 28:15s, 2010 (suppl; abstr 1005).
- O'Shaughnessy, J., G. Romieu, V. Diéras, M. Byrtek, A.-A. Duenne, and D. Miles. 2011. Meta-analysis of patients with triple-negative breast cancer (TNBC) from three randomized trials of first-line bevacizumab (BV) and chemotherapy treatment for metastatic breast cancer (MBC). Vol. 70. *Cancer Res*
- Obeid, E., R. Nanda, Y.X. Fu, and O.I. Olopade. 2013. The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (Review). *Int J Oncol*. 43:5-12.
- Obeid, M. 2008. ERP57 membrane translocation dictates the immunogenicity of tumor cell death by controlling the membrane translocation of calreticulin. *J Immunol*. 181:2533-2543.
- Ogino, T., H. Shigyo, H. Ishii, A. Katayama, N. Miyokawa, Y. Harabuchi, and S. Ferrone. 2006. HLA class I antigen down-regulation in primary laryngeal squamous cell carcinoma lesions as a poor prognostic marker. *Cancer Res*. 66:9281-9289.
- Okazaki, H., J.L. Goldstein, M.S. Brown, and G. Liang. 2010. LXR-SREBP-1c-phospholipid transfer protein axis controls very low density lipoprotein (VLDL) particle size. *J Biol Chem*. 285:6801-6810.
- Olson, E.M., M. Abdel-Rasoul, J. Maly, C.S. Wu, N.U. Lin, and C.L. Shapiro. 2013. Incidence and risk of central nervous system metastases as site of first recurrence in patients with HER2-positive breast cancer treated with adjuvant trastuzumab. *Ann Oncol*. 24:1526-1533.
- Onder, T.T., P.B. Gupta, S.A. Mani, J. Yang, E.S. Lander, and R.A. Weinberg. 2008. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res*. 68:3645-3654.
- Orimo, A., P.B. Gupta, D.C. Sgroi, F. Arenzana-Seisdedos, T. Delaunay, R. Naeem, V.J. Carey, A.L. Richardson, and R.A. Weinberg. 2005. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 121:335-348.
- Otera, H., and K. Mihara. 2012. Mitochondrial dynamics: functional link with apoptosis. *Int J Cell Biol*. 2012:821676.
- Paget, S. 1989. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*. 8:98-101.
- Paik, S., S. Shak, G. Tang, C. Kim, J. Baker, M. Cronin, F.L. Baehner, M.G. Walker, D. Watson, T. Park, W. Hiller, E.R. Fisher, D.L. Wickerham, J. Bryant, and N. Wolmark. 2004. A

REFERÈNCIES

- multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 351:2817-2826.
- Palmieri, D., A.F. Chambers, B. Felding-Habermann, S. Huang, and P.S. Steeg. 2007. The biology of metastasis to a sanctuary site. *Clin Cancer Res.* 13:1656-1662.
- Pan, J.G., and T.W. Mak. 2007. Metabolic targeting as an anticancer strategy: dawn of a new era? *Sci STKE.* 2007:pe14.
- Pandey, P.R., F. Xing, S. Sharma, M. Watabe, S.K. Pai, M. Iizumi-Gairani, K. Fukuda, S. Hirota, Y.Y. Mo, and K. Watabe. 2012. Elevated lipogenesis in epithelial stem-like cell confers survival advantage in ductal carcinoma in situ of breast cancer. *Oncogene.*
- Papachristou, D.J., E.K. Basdra, and A.G. Papavassiliou. 2012. Bone metastases: molecular mechanisms and novel therapeutic interventions. *Med Res Rev.* 32:611-636.
- Paulsson, K.M., M.J. Kleijmeer, J. Griffith, M. Jevon, S. Chen, P.O. Anderson, H.O. Sjogren, S. Li, and P. Wang. 2002. Association of tapasin and COPI provides a mechanism for the retrograde transport of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 277:18266-18271.
- Paumen, M.B., Y. Ishida, M. Muramatsu, M. Yamamoto, and T. Honjo. 1997. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 272:3324-3329.
- Pe'er, D., and N. Hacohen. 2011. Principles and strategies for developing network models in cancer. *Cell.* 144:864-873.
- Peaper, D.R., and P. Cresswell. 2008. The redox activity of ERp57 is not essential for its functions in MHC class I peptide loading. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:10477-10482.
- Peaper, D.R., P.A. Wearsch, and P. Cresswell. 2005. Tapasin and ERp57 form a stable disulfide-linked dimer within the MHC class I peptide-loading complex. *EMBO J.* 24:3613-3623.
- Peyruchaud, O., B. Winding, I. Pecheur, C.M. Serre, P. Delmas, and P. Clezardin. 2001. Early detection of bone metastases in a murine model using fluorescent human breast cancer cells: application to the use of the bisphosphonate zoledronic acid in the treatment of osteolytic lesions. *J Bone Miner Res.* 16:2027-2034.
- Pichardo-Molina, J.L., C. Frausto-Reyes, O. Barbosa-Garcia, R. Huerta-Franco, J.L. Gonzalez-Trujillo, C.A. Ramirez-Alvarado, G. Gutierrez-Juarez, and C. Medina-Gutierrez. 2007. Raman spectroscopy and multivariate analysis of serum samples from breast cancer patients. *Lasers Med Sci.* 22:229-236.
- Pike, L.J. 2009. The challenge of lipid rafts. *J Lipid Res.* 50 Suppl:S323-328.
- Pike, L.S., A.L. Smift, N.J. Croteau, D.A. Ferrick, and M. Wu. 2011. Inhibition of fatty acid oxidation by etomoxir impairs NADPH production and increases reactive oxygen species resulting in ATP depletion and cell death in human glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta.* 1807:726-734.
- Pineau, L., J. Colas, S. Dupont, L. Beney, P. Fleurat-Lessard, J.M. Berjeaud, T. Berges, and T. Ferreira. 2009. Lipid-induced ER stress: synergistic effects of sterols and saturated fatty acids. *Traffic.* 10:673-690.
- Polyak, K., and R.A. Weinberg. 2009. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer.* 9:265-273.
- Popp, J., K. Krafft, and T. Mayerhöfer. 2011. Modern Raman spectroscopy for biomedical applications. A variety of Raman spectroscopical techniques on the threshold of biomedical applications. *Optik and Photonik.* 6:24-28.

REFERÈNCIES

- Prat, A., J.S. Parker, O. Karginova, C. Fan, C. Livasy, J.I. Herschkowitz, X. He, and C.M. Perou. 2010. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 12:R68.
- Pusztai, L., C. Mazouni, K. Anderson, Y. Wu, and W.F. Symmans. 2006. Molecular classification of breast cancer: limitations and potential. *Oncologist.* 11:868-877.
- Qian, B.Z., and J.W. Pollard. 2010. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell.* 141:39-51.
- Qian, B.Z., and J.W. Pollard. 2012. New tricks for metastasis-associated macrophages. *Breast Cancer Res.* 14:316.
- Rabinowitz, J.D., and E. White. 2010. Autophagy and metabolism. *Science.* 330:1344-1348.
- Rae, J.M., C.J. Creighton, J.M. Meck, B.R. Haddad, and M.D. Johnson. 2007. MDA-MB-435 cells are derived from M14 melanoma cells--a loss for breast cancer, but a boon for melanoma research. *Breast Cancer Res Treat.* 104:13-19.
- Raghu, H., P.K. Sodadasu, R.R. Malla, C.S. Gondi, N. Estes, and J.S. Rao. 2010. Localization of uPAR and MMP-9 in lipid rafts is critical for migration, invasion and angiogenesis in human breast cancer cells. *BMC Cancer.* 10:647.
- Ramirez-Rangel, I., I. Bracho-Valdes, A. Vazquez-Macias, J. Carretero-Ortega, G. Reyes-Cruz, and J. Vazquez-Prado. 2011. Regulation of mTORC1 complex assembly and signaling by GRp58/ERp57. *Mol Cell Biol.* 31:1657-1671.
- Ramsay, R.G., D. Ciznadija, T. Mantamadiotis, R. Anderson, and R. Pearson. 2005. Expression of stress response protein glucose regulated protein-78 mediated by c-Myb. *Int J Biochem Cell Biol.* 37:1254-1268.
- Ranganathan, A.C., A.P. Adam, L. Zhang, and J.A. Aguirre-Ghiso. 2006. Tumor cell dormancy induced by p38SAPK and ER-stress signaling: an adaptive advantage for metastatic cells? *Cancer Biol Ther.* 5:729-735.
- Reeves, G.A., D. Talavera, and J.M. Thornton. 2009. Genome and proteome annotation: organization, interpretation and integration. *J R Soc Interface.* 6:129-147.
- Rego, A.C., and C.R. Oliveira. 2003. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem Res.* 28:1563-1574.
- Rehman, J., H.J. Zhang, P.T. Toth, Y. Zhang, G. Marsboom, Z. Hong, R. Salgia, A.N. Husain, C. Wietholt, and S.L. Archer. 2012. Inhibition of mitochondrial fission prevents cell cycle progression in lung cancer. *FASEB J.* 26:2175-2186.
- Robert, N.J., V. Dieras, J. Glaspy, A.M. Brufsky, I. Bondarenko, O.N. Lipatov, E.A. Perez, D.A. Yardley, S.Y. Chan, X. Zhou, S.C. Phan, and J. O'Shaughnessy. 2011. RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 29:1252-1260.
- Roberts, N., B. Kloos, M. Cassella, S. Podgrabinska, K. Persaud, Y. Wu, B. Pytowski, and M. Skobe. 2006. Inhibition of VEGFR-3 activation with the antagonistic antibody more potently suppresses lymph node and distant metastases than inactivation of VEGFR-2. *Cancer Res.* 66:2650-2657.
- Rodriguez, T., N. Aptsiauri, R. Mendez, P. Jimenez, F. Ruiz-Cabello, and F. Garrido. 2007. Different mechanisms can lead to the same altered HLA class I phenotype in tumors. *Tissue Antigens.* 69 Suppl 1:259-263.

REFERÈNCIES

- Rodriguez-Navarro, J.A., and A.M. Cuervo. 2010. Autophagy and lipids: tightening the knot. *Semin Immunopathol.* 32:343-353.
- Romero, J.M., P. Jimenez, T. Cabrera, J.M. Cozar, S. Pedrinaci, M. Tallada, F. Garrido, and F. Ruiz-Cabello. 2005. Coordinated downregulation of the antigen presentation machinery and HLA class I/beta2-microglobulin complex is responsible for HLA-ABC loss in bladder cancer. *Int J Cancer.* 113:605-610.
- Ross, D.T., U. Scherf, M.B. Eisen, C.M. Perou, C. Rees, P. Spellman, V. Iyer, S.S. Jeffrey, M. Van de Rijn, M. Waltham, A. Pergamenschikov, J.C. Lee, D. Lashkari, D. Shalon, T.G. Myers, J.N. Weinstein, D. Botstein, and P.O. Brown. 2000. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet.* 24:227-235.
- Ross, J.S., C. Hatzis, W.F. Symmans, L. Pusztai, and G.N. Hortobagyi. 2008. Commercialized multigene predictors of clinical outcome for breast cancer. *Oncologist.* 13:477-493.
- Roy, V., and E.A. Perez. 2009. Beyond trastuzumab: small molecule tyrosine kinase inhibitors in HER-2-positive breast cancer. *Oncologist.* 14:1061-1069.
- Russell, R.L., A.N. Pedersen, J. Kantor, K. Geisinger, R. Long, N. Zbieranski, A. Townsend, B. Shelton, N. Brunner, and T.E. Kute. 1998. Relationship of nm23 to proteolytic factors, proliferation and motility in breast cancer tissues and cell lines. *Br J Cancer.* 78:710-717.
- Rutkevich, L.A., M.F. Cohen-Doyle, U. Brockmeier, and D.B. Williams. 2010. Functional relationship between protein disulfide isomerase family members during the oxidative folding of human secretory proteins. *Mol Biol Cell.* 21:3093-3105.
- Rysman, E., K. Brusselmans, K. Scheys, L. Timmermans, R. Derua, S. Munck, P.P. Van Veldhoven, D. Waltregny, V.W. Daniels, J. Machiels, F. Vanderhoydonc, K. Smans, E. Waelkens, G. Verhoeven, and J.V. Swinnen. 2010. De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. *Cancer Res.* 70:8117-8126.
- Sabapathy, K., and S.Y. Nam. 2008. Defective MHC class I antigen surface expression promotes cellular survival through elevated ER stress and modulation of p53 function. *Cell Death Differ.* 15:1364-1374.
- Samudio, I., R. Harmancey, M. Fiegl, H. Kantarjian, M. Konopleva, B. Korchin, K. Kaluarachchi, W. Bornmann, S. Duvvuri, H. Taegtmeier, and M. Andreeff. 2010. Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J Clin Invest.* 120:142-156.
- Samuels, Y., Z. Wang, A. Bardelli, N. Silliman, J. Ptak, S. Szabo, H. Yan, A. Gazdar, S.M. Powell, G.J. Riggins, J.K. Willson, S. Markowitz, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, and V.E. Velculescu. 2004. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science.* 304:554.
- Santana-Codina, N., R. Carretero, R. Sanz-Pamplona, T. Cabrera, E. Guney, B. Oliva, P. Clezardin, O.E. Olarte, P. Loza-Alvarez, A. Mendez-Lucas, J.C. Perales, and A. Sierra. 2013. A transcriptome-proteome integrated network identifies ERp57 as a hub that mediates bone metastasis. *Mol Cell Proteomics.*
- Sanz-Pamplona, R., R. Aragues, K. Driouch, B. Martin, B. Oliva, M. Gil, S. Boluda, P.L. Fernandez, A. Martinez, V. Moreno, J.J. Acebes, R. Lidereau, F. Reyat, M.J. Van de Vijver, and A. Sierra. 2011. Expression of endoplasmic reticulum stress proteins is a candidate marker of brain metastasis in both ErbB-2+ and ErbB-2- primary breast tumors. *Am J Pathol.* 179:564-579.

REFERÈNCIES

- Sato, M., K. Sato, and A. Nakano. 2002. Evidence for the intimate relationship between vesicle budding from the ER and the unfolded protein response. *Biochem Biophys Res Commun.* 296:560-567.
- Savinov, A.Y., F.S. Wong, A.C. Stonebraker, and A.V. Chervonsky. 2003. Presentation of antigen by endothelial cells and chemoattraction are required for homing of insulin-specific CD8⁺ T cells. *J Exp Med.* 197:643-656.
- Schackert, G., and I.J. Fidler. 1988. Development of in vivo models for studies of brain metastasis. *Int J Cancer.* 41:589-594.
- Schafer, M., and S. Werner. 2008. Cancer as an overheating wound: an old hypothesis revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:628-638.
- Schug, Z.T., C. Frezza, L.C. Galbraith, and E. Gottlieb. 2012. The music of lipids: how lipid composition orchestrates cellular behaviour. *Acta Oncol.* 51:301-310.
- Schulenburg, A., K. Bramswig, H. Herrmann, H. Karlic, I. Mirkina, R. Hubmann, S. Laffer, B. Marian, M. Shehata, C. Krepler, H. Pehamberger, T. Grunt, U. Jager, C.C. Zielinski, and P. Valent. 2010. Neoplastic stem cells: current concepts and clinical perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol.* 76:79-98.
- Scott, K.E., F.B. Wheeler, A.L. Davis, M.J. Thomas, J.M. Ntambi, D.F. Seals, and S.J. Kridel. 2012. Metabolic regulation of invadopodia and invasion by acetyl-CoA carboxylase 1 and de novo lipogenesis. *PLoS One.* 7:e29761.
- Scully, O.J., B.H. Bay, G. Yip, and Y. Yu. 2012. Breast cancer metastasis. *Cancer Genomics Proteomics.* 9:311-320.
- Sebastian, D., M.I. Hernandez-Alvarez, J. Segales, E. Sorianello, J.P. Munoz, D. Sala, A. Waget, M. Liesa, J.C. Paz, P. Gopalacharyulu, M. Oresic, S. Pich, R. Burcelin, M. Palacin, and A. Zorzano. 2012. Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:5523-5528.
- Sellappan, S., R. Grijalva, X. Zhou, W. Yang, M.B. Eli, G.B. Mills, and D. Yu. 2004. Lineage infidelity of MDA-MB-435 cells: expression of melanocyte proteins in a breast cancer cell line. *Cancer Res.* 64:3479-3485.
- Semenza, G.L. 2012. Molecular mechanisms mediating metastasis of hypoxic breast cancer cells. *Trends Mol Med.* 18:534-543.
- Semenza, G.L., P.H. Roth, H.M. Fang, and G.L. Wang. 1994. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 269:23757-23763.
- Sethi, N., and Y. Kang. 2011. Unravelling the complexity of metastasis - molecular understanding and targeted therapies. *Nat Rev Cancer.* 11:735-748.
- Shaikh, S.R., D. Mitchell, E. Carroll, M. Li, J. Schneck, and M. Edidin. 2008. Differential effects of a saturated and a monounsaturated fatty acid on MHC class I antigen presentation. *Scand J Immunol.* 68:30-42.
- Shapiro, W.R., and J.R. Shapiro. 1986. Principles of brain tumor chemotherapy. *Semin Oncol.* 13:56-69.
- Shaw, R.J. 2006. Glucose metabolism and cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 18:598-608.
- Shaw, R.J., and L.C. Cantley. 2012. Decoding key nodes in the metabolism of cancer cells: sugar & spice and all things nice. *F1000 Biol Rep.* 4:2.
- Shoshan-Barmatz, V., and D. Mizrahi. 2012. VDAC1: from structure to cancer therapy. *Front Oncol.* 2:164.

REFERÈNCIES

- Siegel, P.M., W. Shu, R.D. Cardiff, W.J. Muller, and J. Massague. 2003. Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:8430-8435.
- Singh, B., K. Tai, S. Madan, M.R. Raythatha, A.M. Cady, M. Braunlin, L.R. Irving, A. Bajaj, and A. Lucci. 2012. Selection of metastatic breast cancer cells based on adaptability of their metabolic state. *PLoS One*. 7:e36510.
- Singh, R., and A.M. Cuervo. 2012. Lipophagy: connecting autophagy and lipid metabolism. *Int J Cell Biol*. 2012:282041.
- Singh, R., S. Kaushik, Y. Wang, Y. Xiang, I. Novak, M. Komatsu, K. Tanaka, A.M. Cuervo, and M.J. Czaja. 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*. 458:1131-1135.
- Singhi, A.D., A. Cimino-Mathews, R.B. Jenkins, F. Lan, S.R. Fink, H. Nassar, R. Vang, J.H. Fetting, J. Hicks, S. Sukumar, A.M. De Marzo, and P. Argani. 2012. MYC gene amplification is often acquired in lethal distant breast cancer metastases of unamplified primary tumors. *Mod Pathol*. 25:378-387.
- Sjoblom, T., S. Jones, L.D. Wood, D.W. Parsons, J. Lin, T.D. Barber, D. Mandelker, R.J. Leary, J. Ptak, N. Silliman, S. Szabo, P. Buckhaults, C. Farrell, P. Meeh, S.D. Markowitz, J. Willis, D. Dawson, J.K. Willson, A.F. Gazdar, J. Hartigan, L. Wu, C. Liu, G. Parmigiani, B.H. Park, K.E. Bachman, N. Papadopoulos, B. Vogelstein, K.W. Kinzler, and V.E. Velculescu. 2006. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*. 314:268-274.
- Sleeman, J.P. 2012. The metastatic niche and stromal progression. *Cancer Metastasis Rev*. 31:429-440.
- Smyth, M.J., G.P. Dunn, and R.D. Schreiber. 2006. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol*. 90:1-50.
- Sobin, L.H. 2003. TNM: evolution and relation to other prognostic factors. *Semin Surg Oncol*. 21:3-7.
- Soliman, H. 2013. Immunotherapy strategies in the treatment of breast cancer. *Cancer Control*. 20:17-21.
- Song, W., B. Bossy, O.J. Martin, A. Hicks, S. Lubitz, A.B. Knott, and E. Bossy-Wetzel. 2008. Assessing mitochondrial morphology and dynamics using fluorescence wide-field microscopy and 3D image processing. *Methods*. 46:295-303.
- Sorlie, T., C.M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, S. Geisler, H. Johnsen, T. Hastie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, T. Thorsen, H. Quist, J.C. Matese, P.O. Brown, D. Botstein, P.E. Lonning, and A.L. Borresen-Dale. 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:10869-10874.
- Sotgia, F., D. Whitaker-Menezes, U.E. Martinez-Outschoorn, N. Flomenberg, R.C. Birbe, A.K. Witkiewicz, A. Howell, N.J. Philp, R.G. Pestell, and M.P. Lisanti. 2012. Mitochondrial metabolism in cancer metastasis: visualizing tumor cell mitochondria and the "reverse Warburg effect" in positive lymph node tissue. *Cell Cycle*. 11:1445-1454.
- Sparano, J.A., and S. Paik. 2008. Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol*. 26:721-728.
- Spitz, D.R., J.E. Sim, L.A. Ridnour, S.S. Galoforo, and Y.J. Lee. 2000. Glucose deprivation-induced oxidative stress in human tumor cells. A fundamental defect in metabolism? *Ann N Y Acad Sci*. 899:349-362.

REFERÈNCIES

- Stafford, L.J., K.S. Vaidya, and D.R. Welch. 2008. Metastasis suppressors genes in cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 40:874-891.
- Staubach, S., and F.G. Hanisch. 2011. Lipid rafts: signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer. *Expert Rev Proteomics.* 8:263-277.
- Steeg, P.S., T. Ouatas, D. Halverson, D. Palmieri, and M. Salerno. 2003. Metastasis suppressor genes: basic biology and potential clinical use. *Clin Breast Cancer.* 4:51-62.
- Stresing, V., E. Baltziskueta, N. Rubio, J. Blanco, M. Arriba, J. Valls, M. Janier, P. Clezardin, R. Sanz-Pamplona, C. Nieva, M. Marro, P. Dmitri, and A. Sierra. 2012. Peroxiredoxin 2 specifically regulates the oxidative and metabolic stress response of human metastatic breast cancer cells in lungs. *Oncogene.*
- Sun, Y.F., X.R. Yang, J. Zhou, S.J. Qiu, J. Fan, and Y. Xu. 2011. Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance. *J Cancer Res Clin Oncol.* 137:1151-1173.
- Swarbrick, C., N. Roman, and J.K. Forwood. 2011. Role of ACOT7 in Arachidonic Acid Production and Inflammation *In Inflammatory Diseases - A Modern Perspective.* A. Nagal, editor. In-Tech.
- Swinnen, J.V., K. Brusselmans, and G. Verhoeven. 2006. Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 9:358-365.
- Takeda, K., Y. Hayakawa, M.J. Smyth, N. Kayagaki, N. Yamaguchi, S. Kakuta, Y. Iwakura, H. Yagita, and K. Okumura. 2001. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat Med.* 7:94-100.
- Talmadge, J.E., and I.J. Fidler. 2010. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.* 70:5649-5669.
- Tanaka, K., T. Tsuchikawa, M. Miyamoto, T. Maki, M. Ichinokawa, K.C. Kubota, T. Shichinohe, S. Hirano, S. Ferrone, H. Dosaka-Akita, Y. Matsuno, and S. Kondo. 2012. Down-regulation of Human Leukocyte Antigen class I heavy chain in tumors is associated with a poor prognosis in advanced esophageal cancer patients. *Int J Oncol.* 40:965-974.
- Tavassoli, F.A., and P. Devilee. 2003. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press, Lyon.
- Taylor, M.A., J.G. Parvani, and W.P. Schiemann. 2010. The pathophysiology of epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor-beta in normal and malignant mammary epithelial cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 15:169-190.
- Teng, M.W., J.B. Swann, C.M. Koebel, R.D. Schreiber, and M.J. Smyth. 2008. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J Leukoc Biol.* 84:988-993.
- Terasaki-Fukuzawa, Y., H. Kijima, A. Suto, T. Takeshita, K. Iezumi, S. Sato, H. Yoshida, T. Sato, M. Shimbori, and Y. Shiina. 2002. Decreased nm23 expression, but not Ki-67 labeling index, is significantly correlated with lymph node metastasis of breast invasive ductal carcinoma. *Int J Mol Med.* 9:25-29.
- Teschendorff, A.E., A. Miremadi, S.E. Pinder, I.O. Ellis, and C. Caldas. 2007. An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer. *Genome Biol.* 8:R157.
- Thupari, J.N., M.L. Pinn, and F.P. Kuhajda. 2001. Fatty acid synthase inhibition in human breast cancer cells leads to malonyl-CoA-induced inhibition of fatty acid oxidation and cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 285:217-223.

REFERÈNCIES

- Thyssel, E., I. Surowiec, E. Hornberg, S. Crnalic, A. Widmark, A.I. Johansson, P. Stattin, A. Bergh, T. Moritz, H. Antti, and P. Wikstrom. 2010. Metabolomic characterization of human prostate cancer bone metastases reveals increased levels of cholesterol. *PLoS One*. 5:e14175.
- Trape, A.P., and A.M. Gonzalez-Angulo. 2012. Breast cancer and metastasis: on the way toward individualized therapy. *Cancer Genomics Proteomics*. 9:297-310.
- Tsuda, H. 2008. Individualization of breast cancer based on histopathological features and molecular alterations. *Breast Cancer*. 15:121-132.
- Turano, C., E. Gaucci, C. Grillo, and S. Chichiarelli. 2011. ERp57/GRP58: a protein with multiple functions. *Cell Mol Biol Lett*. 16:539-563.
- Twig, G., A. Elorza, A.J. Molina, H. Mohamed, J.D. Wikstrom, G. Walzer, L. Stiles, S.E. Haigh, S. Katz, G. Las, J. Alroy, M. Wu, B.F. Py, J. Yuan, J.T. Deeney, B.E. Corkey, and O.S. Shirihai. 2008. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J*. 27:433-446.
- Ulasov, I.V., N.V. Kaverina, P. Pytel, B. Thaci, F. Liu, D.R. Hurst, D.R. Welch, H.A. Sattar, O.I. Olopade, A.Y. Baryshnikov, Z.G. Kadagidze, and M.S. Lesniak. 2012. Clinical significance of KISS1 protein expression for brain invasion and metastasis. *Cancer*. 118:2096-2105.
- Usary, J., V. Llaca, G. Karaca, S. Presswala, M. Karaca, X. He, A. Langerod, R. Karsen, D.S. Oh, L.G. Dressler, P.E. Lonning, R.L. Strausberg, S. Chanock, A.L. Borresen-Dale, and C.M. Perou. 2004. Mutation of GATA3 in human breast tumors. *Oncogene*. 23:7669-7678.
- Valastyan, S., and R.A. Weinberg. 2011. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*. 147:275-292.
- van 't Veer, L.J., H. Dai, M.J. van de Vijver, Y.D. He, A.A. Hart, M. Mao, H.L. Peterse, K. van der Kooy, M.J. Marton, A.T. Witteveen, G.J. Schreiber, R.M. Kerkhoven, C. Roberts, P.S. Linsley, R. Bernards, and S.H. Friend. 2002. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 415:530-536.
- van de Vijver, M.J., Y.D. He, L.J. van't Veer, H. Dai, A.A. Hart, D.W. Voskuil, G.J. Schreiber, J.L. Peterse, C. Roberts, M.J. Marton, M. Parrish, D. Atsma, A. Witteveen, A. Glas, L. Delahaye, T. van der Velde, H. Bartelink, S. Rodenhuis, E.T. Rutgers, S.H. Friend, and R. Bernards. 2002. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 347:1999-2009.
- Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 324:1029-1033.
- Vazquez-Martin, A., R. Colomer, J. Brunet, R. Lupu, and J.A. Menendez. 2008. Overexpression of fatty acid synthase gene activates HER1/HER2 tyrosine kinase receptors in human breast epithelial cells. *Cell Prolif*. 41:59-85.
- Vazquez-Martin, A., R. Colomer, J. Brunet, and J.A. Menendez. 2007. Pharmacological blockade of fatty acid synthase (FASN) reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin by transcriptionally inhibiting 'HER2 super-expression' occurring in high-dose trastuzumab-conditioned SKBR3/Tzb100 breast cancer cells. *Int J Oncol*. 31:769-776.
- Vazquez-Martin, A., C. Oliveras-Ferreros, and J.A. Menendez. 2009. Autophagy facilitates the development of breast cancer resistance to the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab. *PLoS One*. 4:e6251.
- Virk, M.S., and J.R. Lieberman. 2007. Tumor metastasis to bone. *Arthritis Res Ther*. 9 Suppl 1:S5.

REFERÈNCIES

- Wallace, D.C. 2012. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer*. 12:685-698.
- Wan, X., B. Harkavy, N. Shen, P. Grohar, and L.J. Helman. 2007. Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. *Oncogene*. 26:1932-1940.
- Wang, M., S. Wey, Y. Zhang, R. Ye, and A.S. Lee. 2009. Role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in development, cancer, and neurological disorders. *Antioxid Redox Signal*. 11:2307-2316.
- Warburg, O. 1956. On the origin of cancer cells. *Science*. 123:309-314.
- Ward, P.S., and C.B. Thompson. 2012a. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell*. 21:297-308.
- Ward, P.S., and C.B. Thompson. 2012b. Signaling in control of cell growth and metabolism. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 4:a006783.
- Warmoes, M., J.E. Jaspers, G. Xu, B.K. Sampadi, T.V. Pham, J.C. Knol, S.R. Piersma, E. Boven, J. Jonkers, S. Rottenberg, and C.R. Jimenez. 2013. Proteomics of genetically engineered mouse mammary tumors identifies fatty acid metabolism members as predictive markers for cisplatin resistance. *Mol Cell Proteomics*.
- Watson, N.F., J.M. Ramage, Z. Madjd, I. Spendlove, I.O. Ellis, J.H. Scholefield, and L.G. Durrant. 2006. Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis. *Int J Cancer*. 118:6-10.
- Wearsch, P.A., and P. Cresswell. 2007. Selective loading of high-affinity peptides onto major histocompatibility complex class I molecules by the tapasin-ERp57 heterodimer. *Nat Immunol*. 8:873-881.
- Wearsch, P.A., and P. Cresswell. 2008. The quality control of MHC class I peptide loading. *Curr Opin Cell Biol*. 20:624-631.
- Weigelt, B., A.M. Glas, L.F. Wessels, A.T. Witteveen, J.L. Peterse, and L.J. van't Veer. 2003. Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:15901-15905.
- Weigelt, B., J.L. Peterse, and L.J. van 't Veer. 2005. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer*. 5:591-602.
- Weil, R.J., D.C. Palmieri, J.L. Bronder, A.M. Stark, and P.S. Steeg. 2005. Breast cancer metastasis to the central nervous system. *Am J Pathol*. 167:913-920.
- Weiss, L. 2000. Metastasis of cancer: a conceptual history from antiquity to the 1990s. *Cancer Metastasis Rev*. 19:I-XI, 193-383.
- Welch, D.R. 2006. Do we need to redefine a cancer metastasis and staging definitions? *Breast Dis*. 26:3-12.
- Werner, H., and I. Bruchim. 2012. IGF-1 and BRCA1 signalling pathways in familial cancer. *Lancet Oncol*. 13:e537-544.
- White, E. 2012. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*. 12:401-410.
- White, E., and R.S. DiPaola. 2009. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res*. 15:5308-5316.
- Wild, P., and I. Dikic. 2010. Mitochondria get a Parkin' ticket. *Nat Cell Biol*. 12:104-106.
- Wise, D.R., and C.B. Thompson. 2010. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci*. 35:427-433.
- Witkiewicz, A.K., D. Whitaker-Menezes, A. Dasgupta, N.J. Philp, Z. Lin, R. Gandara, S. Sneddon, U.E. Martinez-Outschoorn, F. Sotgia, and M.P. Lisanti. 2012. Using the

REFERÈNCIES

- "reverse Warburg effect" to identify high-risk breast cancer patients: stromal MCT4 predicts poor clinical outcome in triple-negative breast cancers. *Cell Cycle*. 11:1108-1117.
- Wolfer, A., B.S. Wittner, D. Irimia, R.J. Flavin, M. Lupien, R.N. Gunawardane, C.A. Meyer, E.S. Lightcap, P. Tamayo, J.P. Mesirov, X.S. Liu, T. Shioda, M. Toner, M. Loda, M. Brown, J.S. Brugge, and S. Ramaswamy. 2010. MYC regulation of a "poor-prognosis" metastatic cancer cell state. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:3698-3703.
- Wong, C.C., D.M. Gilkes, H. Zhang, J. Chen, H. Wei, P. Chaturvedi, S.I. Fraley, C.M. Wong, U.S. Khoo, I.O. Ng, D. Wirtz, and G.L. Semenza. 2011. Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:16369-16374.
- Wong, J.H., B. Aguero, R.K. Gupta, and D.L. Morton. 1988. Recovery of a cell surface fetal antigen from circulating immune complexes of melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother*. 27:142-146.
- Xu, D., R.E. Perez, M.H. Rezaiekhaligh, M. Bourdi, and W.E. Truog. 2009. Knockdown of ERp57 increases BiP/GRP78 induction and protects against hyperoxia and tunicamycin-induced apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 297:L44-51.
- Yamamoto, A., Y. Tagawa, T. Yoshimori, Y. Moriyama, R. Masaki, and Y. Tashiro. 1998. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct*. 23:33-42.
- Yamashita, Y., T. Kumabe, Y.Y. Cho, M. Watanabe, J. Kawagishi, T. Yoshimoto, T. Fujino, M.J. Kang, and T.T. Yamamoto. 2000. Fatty acid induced glioma cell growth is mediated by the acyl-CoA synthetase 5 gene located on chromosome 10q25.1-q25.2, a region frequently deleted in malignant gliomas. *Oncogene*. 19:5919-5925.
- Yang, Y., and Z. Li. 2005. Roles of heat shock protein gp96 in the ER quality control: redundant or unique function? *Mol Cells*. 20:173-182.
- Yarden, Y., and M.X. Sliwkowski. 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:127-137.
- Yook, J.I., X.Y. Li, I. Ota, C. Hu, H.S. Kim, N.H. Kim, S.Y. Cha, J.K. Ryu, Y.J. Choi, J. Kim, E.R. Fearon, and S.J. Weiss. 2006. A Wnt-Axin2-GSK3beta cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nat Cell Biol*. 8:1398-1406.
- Yoshimoto, M., G. Sakamoto, and Y. Ohashi. 1993. Time dependency of the influence of prognostic factors on relapse in breast cancer. *Cancer*. 72:2993-3001.
- Zeisberg, M., and E.G. Neilson. 2009. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest*. 119:1429-1437.
- Zhang, F., and G. Du. 2012. Dysregulated lipid metabolism in cancer. *World J Biol Chem*. 3:167-174.
- Zhao, J., J. Zhang, M. Yu, Y. Xie, Y. Huang, D.W. Wolff, P.W. Abel, and Y. Tu. 2012. Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene*.
- Zhao, Y., E.B. Butler, and M. Tan. 2013. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell Death Dis*. 4:e532.
- Zoncu, R., A. Efeyan, and D.M. Sabatini. 2011. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 12:21-35.

REFERÈNCIES

Zorzano, A., M. Liesa, D. Sebastian, J. Segales, and M. Palacin. 2010. Mitochondrial fusion proteins: dual regulators of morphology and metabolism. *Semin Cell Dev Biol.* 21:566-574.