



ARTÍCULO ORIGINAL

El factor de crecimiento epidérmico induce transición epitelio-mesénquima en cultivos primarios de cáncer de mama



Brizio Moreno-Jaime^a, José Esparza-López^b, Andrea Castro-Sánchez^b, Elizabeth Escobar-Arriaga^c, Heriberto Medina-Franco^d, Eucario León-Rodríguez^a y María de Jesús Ibarra-Sánchez^{b,*}

^a Unidad de Oncología Médica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México D.F., México

^b Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México D.F., México

^c Unidad de Oncología Médica, Hospital Ángeles Pedregal, México D.F., México

^d Departamento de Cirugía, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México D.F., México

Recibido el 15 de octubre de 2015; aceptado el 14 de enero de 2016

Disponible en Internet el 8 de marzo de 2016

PALABRAS CLAVE

Cáncer de mama;
Factor de crecimiento epidérmico;
Transición epitelio-mesénquima

Resumen

Antecedentes: La transición epitelio-mesénquima (TEM) es un proceso biológico en el que células epiteliales inmóviles y polarizadas se convierten en células mesenquimales con capacidad de migración. Este proceso produce cambios en el citoesqueleto de las células, siendo la pérdida de E-cadherina y la adquisición de N-cadherina, uno de los principales cambios bioquímicos que se dan en la TEM. En este estudio investigamos el papel del factor de crecimiento epidérmico (EGF) sobre la TEM inducida en líneas celulares y cultivos primarios de cáncer de mama.

Métodos: Para este estudio se empleó la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y los cultivos primarios MBCD25 y MBCDF. Se indujo la TEM mediante el tratamiento continuo con EGF. Se evaluó si las células habían sido inducidas a un fenotipo mesenquimatoso con EGF mediante la técnica de western blot, midiendo la fosforilación de STAT3, el nivel de STAT3, y la represión de los marcadores como E-cadherina, así como la expresión del factor de transcripción Snail.

Resultados: Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con EGF induce la fosforilación de STAT3 sin cambios en sus niveles totales en células MBCDF, MBCD25 y MCF-7. Asimismo, el tratamiento con EGF por 5 días induce una TEM, que se demostró por la pérdida de E-cadherina y la expresión de Snail.

* Autor para correspondencia. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Avenida Vasco de Quiroga No.15, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, Delegación Tlalpan C.P.14080, México D.F., México. Teléfono fijo: 5554870900; extensiones 2606 o 2254, fax: +54851760, Celular: 5547666748.

Correo electrónico: mary.ibarra@mail.mcgill.ca (M.d.J. Ibarra-Sánchez).

KEYWORDS

Breast cancer;
Epidermal growth
factor;
Epithelial-
mesenchymal
transition

Conclusión: En los cultivos primarios MBCD25 y MBCDF, así como en la línea celular MCF-7, el EGF es capaz de inducir TEM y en consecuencia producir un fenotipo más agresivo de las células de cáncer de mama.

© 2016 Sociedad Mexicana de Oncología. Publicado por Masson Doyma México S.A. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Epidermal growth factor induces epithelial-mesenchymal transition in primary breast cancer cell cultures

Abstract

Background: Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a biological process where immobile and polarised epithelial cells acquire mesenchymal characteristics with high migration. This process produces changes in the cytoskeleton of the tumour cells, with the loss of E-cadherin and the acquisition of N-cadherin being the main biochemical changes of the EMT. This study investigates the role of epidermal growth factor (EGF) on the EMT induction in breast cancer cell lines and primary cultures.

Methods: MCF-7 cell line and the primary cultures MBCDF and MBCD25 were used in this study. EMT was induced by continuous EGF treatment. Mesenchymal EGF-induced phenotype was evaluated by Western blot of the following markers: pSTAT3, STAT3, repression of E-cadherin, and expression of Snail.

Results: Our results demonstrate that EGF treatment induced STAT3 phosphorylation without changes in STAT3 in MBCDF, MBCD25 and MCF-7. Additionally, EGF treatment induced EMT, as shown by the loss of E-cadherin and Snail expression after 5 days.

Conclusion: EGF was able to induce EMT in primary breast cancer cell cultures, MBCDF, MBCD25, as well as MCF-7 cell line. These results suggest that EGF produces a putative aggressive phenotype.

© 2016 Sociedad Mexicana de Oncología. Published by Masson Doyma México S.A. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

En México, desde el 2006, el cáncer de mama ocupa el primer lugar como causa de muerte en mujeres por neoplasias malignas, desplazando de esta posición al cáncer cérvico-uterino. De acuerdo a las estadísticas de GLOBOCAN, aproximadamente el 60% de los casos se diagnostica en etapas avanzadas, para el año 2030, 24,326 mujeres serán diagnosticadas con cáncer de mama en México y 9,778 morirán debido a esta enfermedad^{1,2}. Mediante ensayos genéticos el cáncer de mama ha sido clasificado en al menos 4 subtipos moleculares: luminal A, se caracteriza por la presencia de receptores estrogénicos (RE) y de progesterona (RP), ausencia de sobreexpresión de HER2 y un índice de proliferación Ki67 < 14%, se presenta en aproximadamente el 40% de los casos, estas pacientes por lo general tienen un buen pronóstico con una razón de riesgo para muerte de 1.16 (IC 95%: 0.47-2.85). Luminal B con un 20% de los casos y un pronóstico intermedio, se caracteriza por RE+, RP+, HER2- y Ki67 > 14% o cualquier Ki67 y HER2 sobreexpresado. Los catalogados como HER2 positivos con RE y RP negativos representan entre 10-15% de los casos y se considera de mal pronóstico. Basaloide, con una frecuencia del 15-20%, RE-, RP-, HER2-, expresión alta de Ki67, EGFR+, citoqueratina 5/6, 14 y 17 positivas, este último con un pronóstico desfavorable con una razón de riesgo para muerte

de 12.41 (IC 95%: 5.82-26.49)^{3,4}. A pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento, la recurrencia y la formación de metástasis son la principal causa de muerte en las pacientes con cáncer de mama. Los mecanismos responsables de la invasión y metástasis no están completamente entendidos; sin embargo, está claro que los carcinomas derivados de tejidos epiteliales progresan a grados patológicos más avanzados de malignidad con una invasión local y metástasis a distancia más frecuentemente^{4,5}.

La metástasis es un proceso de múltiples etapas que pueden ser clasificadas en al menos 5 pasos secuenciales: 1) El desprendimiento y la migración de las células tumorales al tejido adyacente, 2) la invasión de las células tumorales en el torrente sanguíneo y el tejido linfático (intravasación), 3) la supervivencia en la circulación (resistencia a la anoikis), 4) la invasión y la penetración de las células tumorales fuera de la circulación sanguínea y linfática (extravasación) y 5) la colonización, proliferación y neovascularización de las células tumorales en sitios distantes⁶. En el fenómeno complejo de la diseminación de las células tumorales, uno de los primeros eventos importantes es la pérdida de la mayoría de las características epiteliales, a través de cambios drásticos en el citoesqueleto. Esta serie de eventos se conoce como transición epitelio-mesénquima (TEM), el cual es un proceso en el que las células epiteliales sufren cambios bioquímicos para transformarse en células mesenquimatosas, se pierden

las uniones intercelulares y por lo tanto se vuelven alargadas y no polarizadas, lo que les permite moverse a través de la matriz extracelular, con lo cual generan un nuevo tejido con una polaridad diferente al epitelio que le dio origen^{7,8}. La TEM no es un proceso exclusivo de las células tumorales, se ha descrito en 3 diferentes escenarios biológicos: la TEM tipo 1 está involucrada en la implantación del embrión, la embriogénesis y la organogénesis. La TEM tipo 2 está asociada a la cicatrización de heridas, regeneración tisular y fibrosis en órganos como el riñón; y la TEM tipo 3 es la que se encuentra implicada en la tumorigénesis, explicando la progresión de un carcinoma *in situ* a uno invasivo⁹, también se ha asociado con la resistencia a la apoptosis y a fármacos de quimioterapia¹⁰. El papel de la TEM en cáncer ya está bien establecido, y se asume que es un componente indispensable para la metástasis¹¹. Una vez que las células tumorales alcanzaron el sitio de metástasis distante, retoman el fenotipo del tumor primario a través de un proceso llamado transición mesénquima-epitelio. Por lo tanto, los pasos de la TEM parecen ser reversibles, indicando la existencia de componentes dinámicos en la progresión tumoral¹².

Se han descrito diversos marcadores implicados en la TEM; uno de los más estudiados es la disminución de la expresión de E-cadherina, proteína involucrada en uniones célula-célula, la cual baja sus niveles al mínimo, con un intercambio por N-cadherina. Existen otros marcadores que son regulados positivamente en la TEM como son: la vimentina, fibronectina, actina de músculo liso; factores de transcripción como Snail, Twist, Slug y ZEB; además de factores de crecimiento como el factor derivado de plaquetas (PDGF, del inglés, platelet-derived growth factor)¹³⁻¹⁶. Otras moléculas de adhesión célula-célula como las claudinas 3, 4, 7, α -catenina, γ -catenina y ocludinas son reguladas negativamente en células con fenotipo mesenquimatoso^{14,16}. La pérdida de E-cadherina es uno de los marcadores principales de la TEM y cabe hacer notar que el gen de *e-cadherina* no sufre deleciones o mutaciones, solo se han encontrado cambios epigenéticos y transcripcionales que silencian la expresión de E-cadherina, lo cual le permite reexpresarse tanto en el tumor primario como en metástasis¹⁷. La TEM es un proceso dinámico que es activado por diversos estímulos del microambiente tumoral que incluyen factores de crecimiento, interacciones célula tumoral-estroma e hipoxia¹⁸. Dentro de las señales que activan la TEM se encuentran factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante β , el factor de crecimiento de los hepatocitos, el factor de crecimiento de fibroblastos, los factores de crecimiento similares a la insulina 1 y 2 y el factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés epidermal growth factor)¹⁹.

Existe evidencia acerca de un supuesto papel del EGF y su receptor (EGFR) en procesos de metástasis en diferentes tumores²⁰⁻²². La unión de EGF a su receptor induce diversas vías de señalización como son la activación de la proteína cinasa C-delta, las cinasas activadas por mitógenos, y fosfolipasa C- γ ; estas vías facilitan la migración celular^{23,24}. También se ha demostrado que la activación de EGFR induce la producción de metaloproteína 9, posiblemente a través de la vía de PI3K, que conduce a la migración celular^{25,26}. Se ha demostrado que el tratamiento crónico con EGF en diversas líneas celulares de cáncer de mama, de pulmón de células no pequeñas y de próstata induce

una regulación negativa de la E-cadherina y de las uniones de adhesión célula-célula^{27,28}. La hiperactivación de EGFR también ha sido reportada en múltiples tumores como el de colon, mama, próstata, cabeza y cuello²⁹. En modelos murinos de cáncer de mama *in situ*, se ha demostrado que la sobreexpresión de EGFR es suficiente para inducir la transformación celular de un epitelio mamario normal y puede volverse metastásico una vez que terminaron la TEM, la cual depende de la habilidad de EGFR de fosforilar al transductor de señales y activador de transcripción 3 (STAT3, del inglés, signal transducer and activator of transcription 3)³⁰. Por otra parte, está ampliamente demostrado que el EGF induce la pérdida de E-cadherina en diversas líneas celulares de tumores de ovario, pulmón, y cabeza y cuello^{28,31-35}.

Investigaciones recientes han establecido que STAT3 se encuentra constitutivamente activado en diversos tipos de cáncer y que desempeña un papel importante tanto en el desarrollo del tumor como en la metástasis³⁶. STAT3 es un factor de transcripción que originalmente fue descrito como un transductor que llevaba las señales desde los receptores en la membrana de las células hasta el núcleo³⁶. STAT3 se encuentra latente en el citoplasma y es activado mediante fosforilación en el residuo de tirosina 705 (Y705), lo que induce su dimerización y posterior translocación al núcleo, donde se une a secuencias específicas del ADN, con la consecuente transcripción de sus genes blanco^{36,37}. La fosforilación de STAT3 está mediada por diversos receptores con actividad de tirosina cinasa intrínseca como son EGFR, VEGFR y PDGFR, y algunas cinasa de tirosina no receptores como c-Src, Abl; y receptores de citocinas como el IL-6R, el cual se encuentra asociado con la subunidad gp130 que está unida con las cinasas Janus, siendo esta última la que lleva a cabo la fosforilación de STAT3^{36,38}. La activación constitutiva de STAT3 es necesaria para mantener el fenotipo transformado en la mayoría de los tumores de mama, ovario, próstata, páncreas, tiroides, cabeza y cuello, melanoma, carcinoma hepático, renal, mieloma, linfomas y leucemias³⁹. Se ha demostrado que STAT3 participa activamente en diversos procesos biológicos como es la proliferación celular, la migración, la angiogénesis, la invasión y la metástasis³⁶. En años recientes, se ha visto que STAT3 es un importante inductor de la TEM mediada por factores como la IL-6 y el EGF^{32,34,40-42}. Una de las principales funciones de STAT3 en la TEM es inducir la transcripción de los factores de transcripción (Snail, Slug, Twist, Zeb1/2) necesarios para la represión de los marcadores epiteliales como la E-cadherina y la inducción de los marcadores mesenquimales como la vimentina y la N-cadherina⁴⁰.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la metástasis es una de las principales causas de muerte de las pacientes con cáncer de mama, por lo cual, en los últimos años se ha intensificado la investigación acerca de los mecanismos de señalización de la TEM; un mejor entendimiento de este proceso permitirá el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que puedan inhibir la transformación celular y el proceso de metástasis. Es de particular importancia reconocer el contexto fisiológico y la naturaleza dinámica del proceso de TEM para el desarrollo de nuevos fármacos que interfieran con esta.

Conocer los mecanismos moleculares responsables de la TEM permitirá tener posibles blancos terapéuticos que puedan inhibir dicho proceso; este es un abordaje atractivo que

podría inhibir el crecimiento tumoral, reducir las metástasis y atenuar la resistencia a fármacos. Por lo cual, en el presente trabajo se estudió el papel del EGF sobre la TEM en un modelo de cultivos primarios de cáncer de mama (MBCDF y MBCD25) y la línea celular MCF-7, donde se estableció un modelo TEM inducida por EGF. Se midieron los efectos sobre la expresión de E-cadherina y el factor de transcripción Snail. Los resultados demuestran que en cultivos primarios y en la línea MCF-7 se induce la pérdida de E-cadherina.

Materiales y métodos

Reactivos

El EGF fue obtenido de PeproTech (Rocky Hill, NJ, EE. UU.). Se utilizaron los anticuerpos primarios contra E-cadherina, tubulina, p-STAT3 (Tyr705) y STAT3 de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, CA, EE. UU.), anti-Snail de Cell Signalling Technology (Cambridge, MA, EE. UU.). Anticuerpo secundario antirrátón o anticonejo se adquirieron de Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, EE. UU.).

Cultivo celular

La línea celular humana MCF-7 se obtuvo de la ATCC®. Se utilizaron los cultivos primarios de cáncer de mama MBCDF y MBCD25 obtenidas a partir de biopsias de pacientes con cáncer de mama del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (protocolo aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, ref. 1549, BQO-008-06/9-1). Todos los cultivos fueron mantenidos en medio RPMI-1640 suplementado con un 10% de suero fetal bovino, antibiótico y antimicótico (Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, EE. UU.) a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂.

Estimulación celular

Para los ensayos de fosforilación de STAT3, las células MBCDF, MBCD25 y MCF-7 se sembraron a una densidad de 35,000 células/cm² en platos de cultivo de 60 mm mantenidas en medio RPMI-1640 suplementado con un 0.1% de suero fetal bovino durante 24 h, las células se estimularon con EGF 10 ng/ml por los siguientes tiempos: 0, 5, 15, 30 y 60 min.

Para los ensayos de inducción de TEM, las células MBCD25, MBCDF y MCF-7 se sembraron a una densidad de 150,000 células/plato de cultivo de 60 mm (Corning®) y se estimularon con EGF 10 ng/ml, al día 3 se readicionó EGF a la misma concentración. Se obtuvieron botones celulares los días 0, 1, 3 y 5.

Ensayo de inmunoblot (western blot)

Las células fueron lisadas en un buffer que contiene HEPES 50 mM (pH 7.4), EDTA 1 mM, NaCl 250 mM, nonidato P-40 1%, NaF 10 mM, vanadato de sodio 1 mM e inhibidores de proteasas (Complete, EDTA-free, Roche, Mannheim, Germany).; 25 µg de proteína se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) y fueron transferidos a membrana Immobilon-P PVDF (Millipore Corp. Bedford, MA, EE. UU.). Las membranas fueron bloqueadas durante 60 min con leche al 5% en PBS-Tween 0.05%. Posteriormente fueron incubadas con los correspondientes anticuerpos primarios tubulina, pSTAT3, STAT3, E-cadherina y Snail durante toda la noche a 4°C en agitación. Al día siguiente se incubaron por 60 min con el anticuerpo secundario conjugado a HRP. La señal fue visualizada mediante quimioluminiscencia utilizando el kit Super Signal West Pico (Thermo, Rockford, IL, EE. UU.) y se expuso a una película radiográfica (Kodak, Rochester, NY, EE. UU.).

Resultados

El factor de crecimiento epidérmico induce fosforilación de STAT3 en la Y705 en células de cáncer de mama

Se ha demostrado que la unión del EGF a su receptor induce la activación de STAT3⁴⁰. Para analizar si la estimulación con EGF induce la activación de STAT3 en células de cáncer de mama, estimulamos las células MBCDF, MBCD25 y MCF7 con este factor. La fosforilación de STAT3 (Y705) fue analizada por western blot (fig. 1). Nuestros resultados muestran que el tratamiento con EGF indujo la fosforilación de STAT3 con respecto al tiempo. Las células MBCDF, MBCD25 tienen un pico de activación a los 5 min, mientras que en las MCF-7 se observó el máximo de activación a los 15 min (fig. 1, panel superior). El tratamiento con EGF a estos tiempos no provocó cambios en la cantidad de STAT3 total (fig. 1, panel medio).

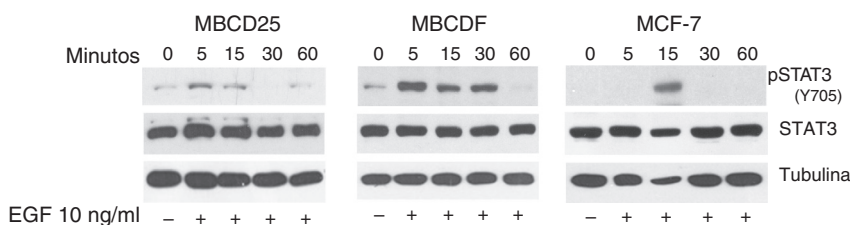


Figura 1 EGF induce fosforilación de STAT3 en las células de cáncer de mama MBCDF, MBCD25 y MCF-7. Las células de cáncer de mama MBCD25, MBCDF, y MCF-7 se trataron con EGF 10 ng/ml a los tiempos 0, 5, 15, 30 y 60 min. Se realizó western blot para analizar la fosforilación de pSTAT3 (Y705) usando anticuerpos fosfoespecíficos (panel superior). La cantidad total de STAT3 se analizó usando un anticuerpo anti-STAT3 (panel medio). Se utilizó un anticuerpo anti- α -tubulina como control de carga de la proteína total (panel inferior).

Se utilizó un anticuerpo anti α -tubulina como control de carga (fig. 1, panel inferior). Estos resultados demuestran que la cinética de fosforilación de STAT3 (Y705) inducida por EGF es diferente para cada una de las células de cáncer de mama con un intervalo de 5-15 min tanto en cultivos primarios como en líneas celulares de cáncer de mama.

El factor de crecimiento epidérmico induce transición epitelio-mesénquima *in vitro* en células de cáncer de mama

Una vez que demostramos que EGF fosforila a STAT3 en las células de cáncer de mama, analizamos si el tratamiento con EGF induce la TEM en las células MBCD25 y MBCDF. La TEM fue evaluada como la pérdida de E-cadherina mediante western blot. Nuestros resultados muestran que el tratamiento continuo con EGF por 5 días indujo una disminución de la expresión de E-cadherina con respecto al tiempo de tratamiento, siendo indetectable por este método al día 5 (fig. 2A, panel superior izquierdo y derecho). Un anticuerpo anti α -tubulina se utilizó como control de carga (fig. 2A, panel inferior izquierdo y derecho). Se realizó un experimento similar con la línea celular MCF-7, en el cual también se observa la pérdida de E-cadherina al día 5 (fig. 2B, panel superior). En estas células también se analizó el comportamiento del factor de transcripción Snail, el cual aumentó su expresión con respecto al tiempo de tratamiento con EGF (fig. 2B, panel medio). La α -tubulina se usó como control de carga (fig. 2B, panel inferior). Estos resultados muestran que el tratamiento con EGF induce la pérdida de E-cadherina en las células de cáncer de mama, por lo cual se considera que realizaron la TEM. Esto se ve mejor sustentado en las células MCF-7 en donde, además de la pérdida de E-cadherina mediada por EGF, hay un incremento de Snail que es el encargado de reprimir la expresión de E-cadherina.

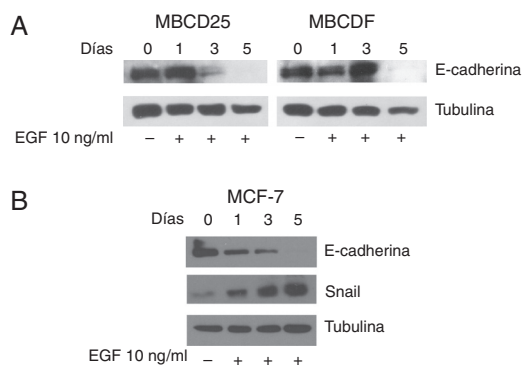


Figura 2 EGF induce la pérdida de expresión de E-cadherina y aumento de la expresión de Snail en células MBCDF, MBCD25 y MCF-7. A. Las células de cáncer de mama MBCD25 y MBCDF se trataron con EGF 10 ng/ml a los días 0 y 3. Se realizó western blot para analizar la expresión de E-cadherina (panel superior). Un anticuerpo anti α -tubulina fue utilizado como control de carga de la proteína total (panel inferior). B. La línea celular MCF-7 se trató con EGF 10 ng/ml los días 0 y 3. Se realizó western blot para analizar la expresión de E-cadherina (panel superior) así como para analizar la expresión de Snail (panel medio). El anticuerpo anti- α -tubulina fue utilizado como control de carga de la proteína total (panel inferior).

Discusión y conclusiones

En el presente trabajo estudiamos el papel del EGF sobre la TEM en líneas celulares y cultivos primarios de cáncer de mama. En primer lugar analizamos la activación de STAT3 mediada por EGF en células de cáncer de mama MBCD25, MBCDF y MCF-7. Nuestros datos mostraron que en las células de cáncer de mama STAT3 se activa con cinéticas diferentes para cada tipo de cultivo celular utilizado. Posteriormente, en el mismo panel de células se estudió la inhibición de la expresión de E-cadherina, así como la inducción del factor de transcripción Snail mediada por EGF. Los resultados mostraron que el EGF induce la pérdida de E-cadherina con un concomitante aumento de Snail, lo que indica que las células se indujeron a una TEM.

La TEM se caracteriza por cambios bioquímicos en el citoesqueleto de las células y uno de los principales marcadores de la TEM es la pérdida de E-cadherina, un marcador epitelial, que funciona para mantener la adhesión célula-célula en los tejidos epiteliales. Una vez que las células perdieron la E-cadherina, este es un evento que indica que las células experimentaron una TEM. En nuestro modelo, el EGF induce una pérdida de E-cadherina como ya está previamente reportado tanto para el cáncer de mama como para otros tipos de cáncer^{28,31-35}. La pérdida de E-cadherina está mediada por una acción represora de factores de transcripción como Snail, Twist y Slug, los cuales son inducidos por la acción de STAT3^{40,42}. En nuestro sistema, Snail incrementó sus niveles por acción de EGF, y como ya habíamos demostrado, el EGF activó a STAT3, lo cual probablemente indujo la transcripción de Snail y este a su vez reprimió la expresión de E-cadherina. Estos resultados indican que el EGF induce un fenotipo más agresivo en cultivos primarios y líneas celulares de cáncer de mama. Los datos del presente trabajo implican que en el microambiente tumoral del cáncer de mama con presencia de EGF se puede inducir la TEM, lo que se traduciría en un mayor potencial de metástasis.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Referencias

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136:E359-86.
2. Chavarri-Guerra Y, Villarreal-Garza C, Liedke PE, et al. Breast cancer in Mexico: A growing challenge to health and the health system. *Lancet Oncol*. 2012;13:e335-43.
3. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*. 2011;5:5-23.
4. Von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2012;30:1796-804.
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144:646-74.
6. Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: The biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res*. 2010;70:5649-69.

7. Nantajit D, Lin D, Li JJ. The network of epithelial-mesenchymal transition: Potential new targets for tumor resistance. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015;141:1697–713.
8. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:131–42.
9. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119:1420–8.
10. Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: Parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2010;15:117–34.
11. Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res*. 2006;66:8319–26.
12. Hugo H, Ackland ML, Blick T, et al. Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol*. 2007;213:374–83.
13. Sethi S, Macoska J, Chen W, Sarkar FH. Molecular signature of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human prostate cancer bone metastasis. *Am J Transl Res*. 2010;3:90–9.
14. Gurzu S, Turdean S, Kovacs A, Contac AO, Jung I. Epithelial-mesenchymal, mesenchymal-epithelial, and endothelial-mesenchymal transitions in malignant tumors: An update. *World J Clin Cases*. 2015;3:393–404.
15. Wu ZQ, Li XY, Hu CY, Ford M, Kleer CG, Weiss SJ. Canonical Wnt signaling regulates Slug activity and links epithelial-mesenchymal transition with epigenetic Breast Cancer 1. Early Onset (BRCA1) repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:16654–9.
16. Rito M, Schmitt F, Pinto AE, Andre S. Fibromatosis-like metaplastic carcinoma of the breast has a claudin-low immunohistochemical phenotype. *Virchows Arch*. 2014;465:185–91.
17. Yates CC, Shepard CR, Stolz DB, Wells A. Co-culturing human prostate carcinoma cells with hepatocytes leads to increased expression of E-cadherin. *Br J Cancer*. 2007;96:1246–52.
18. Wang Y, Zhou BP. Epithelial-mesenchymal transition—A hallmark of breast cancer metastasis. *Cancer Hallm*. 2013;1:38–49.
19. Foroni C, Broggin M, Generali D, Damia G. Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer: Role, molecular mechanisms and clinical impact. *Cancer Treat Rev*. 2012;38:689–97.
20. Verbeek BS, Adriaansen-Slot SS, Vroom TM, Beckers T, Rijksen G. Overexpression of EGFR and c-erbB2 causes enhanced cell migration in human breast cancer cells and NIH3T3 fibroblasts. *FEBS Lett*. 1998;425:145–50.
21. Matsuo M, Sakurai H, Saiki I. ZD1839, a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, shows antimetastatic activity using a hepatocellular carcinoma model. *Mol Cancer Ther*. 2003;2:557–61.
22. Weber KL, Doucet M, Price JE, Baker C, Kim SJ, Fidler IJ. Blockade of epidermal growth factor receptor signaling leads to inhibition of renal cell carcinoma growth in the bone of nude mice. *Cancer Res*. 2003;63:2940–7.
23. Kruger JS, Reddy KB. Distinct mechanisms mediate the initial and sustained phases of cell migration in epidermal growth factor receptor-overexpressing cells. *Mol Cancer Res*. 2003;1:801–9.
24. Thomas SM, Coppelli FM, Wells A, et al. Epidermal growth factor receptor-stimulated activation of phospholipase Cgamma-1 promotes invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2003;63:5629–35.
25. Ellerbroek SM, Halbleib JM, Benavidez M, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase activity in epidermal growth factor-stimulated matrix metalloproteinase-9 production and cell surface association. *Cancer Res*. 2001;61:1855–61.
26. Kondapaka SB, Fridman R, Reddy KB. Epidermal growth factor and amphiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells. *Int J Cancer*. 1997;70:722–6.
27. Lu Z, Ghosh S, Wang Z, Hunter T. Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell*. 2003;4:499–515.
28. Ackland ML, Newgreen DF, Fridman M, et al. Epidermal growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition in human breast carcinoma cells. *Lab Invest*. 2003;83:435–48.
29. Normanno N, de Luca A, Bianco C, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*. 2006;366:2–16.
30. Wendt MK, Smith JA, Schiemann WP. Transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition facilitates epidermal growth factor-dependent breast cancer progression. *Oncogene*. 2010;29:6485–98.
31. Nickel A, Stadler SC. Role of epigenetic mechanisms in epithelial-to-mesenchymal transition of breast cancer cells. *Transl Res*. 2015;165:126–42.
32. Lo HW, Hsu SC, Xia W, et al. Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer Res*. 2007;67:9066–76.
33. Davis FM, Azimi I, Faville RA, et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent. *Oncogene*. 2014;33:2307–16.
34. Yue P, Zhang X, Paladino D, et al. Hyperactive EGF receptor. Jaks and Stat3 signaling promote enhanced colony-forming ability, motility and migration of cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Oncogene*. 2012;31:2309–22.
35. Scheel C, Eaton EN, Li SH, et al. Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell*. 2011;145:926–40.
36. Kamran MZ, Patil P, Gude RP. Role of STAT3 in cancer metastasis and translational advances. *BioMed Res Int*. 2013;421821, 2013.
37. Akira S, Nishio Y, Inoue M, et al. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell*. 1994;77:63–71.
38. You L, Wang Z, Li H, et al. The role of STAT3 in autophagy. *Autophagy*. 2015;11:729–39.
39. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, et al. Stat3 as an oncogene. *Cell*. 1999;98:295–303.
40. Wendt MK, Balanis N, Carlin CR, Schiemann WP. STAT3 and epithelial-mesenchymal transitions in carcinomas. *Jak-Stat*. 2014;3:e28975.
41. Sullivan NJ, Sasser AK, Axel AE, et al. Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene*. 2009;28:2940–7.
42. Colomiere M, Ward AC, Riley C, et al. Cross talk of signals between EGFR and IL-6R through JAK2/STAT3 mediate epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinomas. *Br J Cancer*. 2009;100:134–44.