



**Hipersensibilidad y resistencia a trastuzumab
en cáncer de mama HER2+:
Identificación de nuevos biomarcadores**

Tesis Doctoral

Laura Díaz Gil

**Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer
CSIC-Universidad de Salamanca**

Salamanca, 2021

D. Atanasio Pandiella Alonso, Profesor de Investigación del Consejo Superior de investigaciones Científicas (CSIC),

CERTIFICA

Que la presente Tesis Doctoral titulada “Hipersensibilidad y resistencia a trastuzumab en cáncer de mama HER2+: Identificación de nuevos biomarcadores” presentada por Dña. Laura Díaz Gil, graduada en Biotecnología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC), centro mixto de la Universidad de Salamanca y el CSIC, y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctora por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a efectos legales, expide y firma el presente certificado en Salamanca a 18 de junio de 2021.

Fdo.: Atanasio Pandiella Alonso

A mis padres

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	7
1. LOS RECEPTORES ERBB/HER.....	9
1.1. Estructura y activación de los receptores HER	9
1.2. Señalización a través de los receptores HER	12
1.3. Ligandos de los receptores HER	13
2. RECEPTORES HER Y CÁNCER.....	14
2.1. EGFR.....	15
2.2. HER2.....	16
2.3. HER3 y HER4.....	16
2.4. Ligandos de los receptores HER	17
3. TERAPIAS CONTRA HER2	18
3.1. Anticuerpos monoclonales	18
3.2. Inhibidores tirosina quinasa.....	22
4. CÁNCER DE MAMA	24
4.1. Clasificación del cáncer de mama	25
5. RESISTENCIA A TRASTUZUMAB.....	29
5.1. Mecanismos de resistencia a trastuzumab	29
5.2. Otros mecanismos de resistencia a trastuzumab	34
6. SENSIBILIDAD A TRASTUZUMAB.....	38
OBJETIVOS	43
MATERIALES Y MÉTODOS	47
1. MATERIALES, REACTIVOS Y ANTICUERPOS.....	49
2. CULTIVOS CELULARES	52
2.1. Líneas celulares	52
2.2. Mantenimiento de líneas celulares	53
2.3. Preservación de líneas celulares	54
2.4. Descongelación de líneas celulares	54
3. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA A TRASTUZUMAB <i>IN VIVO</i>	54
4. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR	55
4.1. Contajes celulares.....	55

4.2. Metabolización de MTT	55
5. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS	56
5.1. Western Blot (WB).....	56
5.2. Inmunofluorescencia (IF)	62
6. CITOMETRIA DE FLUJO	63
6.1. Entrada de células en fase S	63
6.2. Ciclo celular.....	64
6.3. Apoptosis.....	64
6.4. Marcaje de HER2 en superficie.....	65
6.5. Detección de trastuzumab acoplado a pHrodo™	66
7. ENSAYOS DE ACTIVIDAD CASPASA 3	67
8. SILENCIAMIENTO GÉNICO EN LÍNEAS CELULARES.....	67
9. ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA	69
9.1. Adhesión al sustrato	69
9.2. Migración celular.....	69
10. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE <i>MICROARRAYS</i>	70
10.1. Extracción y purificación de RNA	70
10.2. Cuantificación, análisis de pureza e hibridación	71
10.3. Análisis de datos.....	71
10.4. Identificación de genes diferencialmente expresados con “signo opuesto” ..	71
10.5. Análisis predictivos con datos de pacientes del ensayo clínico PAMELA ..	73
11. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR	73
11.1. Extracción y cuantificación de RNA.....	73
11.2. Retrotranscripción	74
11.3. PCR semicuantitativa	74
11.4. qRT-PCR	75
12. SECUENCIACIÓN DE RNA (RNAseq).....	78
12.1. Caracterización funcional.....	79
13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	79
RESULTADOS	81
1. EFECTO DE TRASTUZUMAB EN LÍNEAS CELULARES HER2+	83

2. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MODELOS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA HER2+, RESISTENTES E HIPERSENSIBLES A TRASTUZUMAB	85
3. EFECTO DE TRASTUZUMAB <i>IN VIVO</i> EN LOS CLONES RESISTENTES RT#1, RT#5 Y RT#10.....	88
4. EFECTO DE OTRAS TERAPIAS ANTI-HER2 EN LOS MODELOS CELULARES CON DISTINTA SENSIBILIDAD A TRASTUZUMAB	91
5. PAPEL DE HER2 EN LOS MODELOS CELULARES CON DISTINTA SENSIBILIDAD A TRASTUZUMAB.....	92
5.1. Expresión y la activación de HER2 total y en superficie	92
5.2. Efecto de la pérdida de HER2 en la supervivencia	94
6. MECANISMO DE ACCIÓN DE TRASTUZUMAB EN LOS MODELOS CELULARES CON DISTINTA SENSIBILIDAD.....	95
7. INTERNALIZACIÓN DE TRASTUZUMAB EN LOS DISTINTOS MODELOS CELULARES.....	103
7.1. Internalización de trastuzumab por IF	103
7.2. Internalización de trastuzumab acoplado a pHrodo	104
8. DEGRADACIÓN DE TRASTUZUMAB Y HER2.....	106
8.1. Colocalización de trastuzumab, HER2 y lisosomas	106
8.2. Vida media de HER2 tras el tratamiento con trastuzumab en las células BT474, BTRH y BTSH.....	107
9. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES EN LOS MODELOS CELULARES CON DISTINTA SENSIBILIDAD A TRASTUZUMAB.....	109
9.1. Citoquinas y quimioquinas.....	109
9.2. Proteasas e inhibidores de proteasas.	111
10. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL EN LOS MODELOS CELULARES CON DISTINTA SENSIBILIDAD A TRASTUZUMAB.....	113
10.1. Análisis de las proteínas solubles en los modelos celulares BT474, BTRH y BTSH.....	113
10.2. Análisis de enriquecimiento funcional entre las líneas BT474, BTRH y BTSH mediante GSEA.....	114
11. ADHESIÓN Y MIGRACIÓN CELULAR EN LOS MODELOS CELULARES CON DISTINTA SENSIBILIDAD A TRASTUZUMAB.....	115
12. VALIDACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS SOLUBLES DESREGULADAS EN LOS <i>ARRAYS</i> DE ANTICUERPOS.....	117

13. ESTUDIO DE LCN2 EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y LA RESPUESTA A TRASTUZUMAB EN LÍNEAS DE CÁNCER DE MAMA HER2+	118
13.1. Análisis de la expresión de LCN2 en líneas celulares de cáncer de mama HER2+.....	118
13.2. Efecto del silenciamiento de <i>LCN2</i> sobre la proliferación celular y la sensibilidad a trastuzumab en células BTRH	119
14. PERFILES TRANSCRIPTÓMICOS EN LAS LÍNEAS BT474, BTRH y BTSH MEDIANTE ARRAYS DE EXPRESIÓN GÉNICA	121
15. GENES CON VALOR PRONÓSTICO Y PREDICTIVO EN LOS MODELOS CELULARES CON DISTINTA SENSIBILIDAD A TRASTUZUMAB	124
15.1. Análisis de pronóstico con KM plotter.....	124
15.2. Análisis de respuesta a trastuzumab con ROC plotter.....	126
16. GENES PREDICTIVOS DE RESPUESTA A TRASTUZUMAB EN PACIENTES DEL ENSAYO PAMELA	130
17. PAPEL DE PIP EN LA RESPUESTA A TRASTUZUMAB	136
18. PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN MODELOS CELULARES RESISTENTES E HIPERSENSIBLES A TRASTUZUMAB MEDIANTE RNAseq	137
18.1. Caracterización funcional de los GDEs en los modelos celulares con distinta sensibilidad a trastuzumab.....	139
18.2. Expresión diferencial de genes implicados en la EMT en las células BTRH y BTSH.....	144
18.3. Análisis de expresión diferencial de genes implicados en la resistencia y la sensibilidad a trastuzumab en los modelos celulares resistentes e hipersensibles	144
DISCUSIÓN.....	147
CONCLUSIONES	171
BIBLIOGRAFÍA	175
FINANCIACIÓN.....	197
AGRADECIMIENTOS	201

ABREVIATURAS

ADC	Anticuerpo conjugado a droga
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
AREG	Anfiregulina
AUC	Área bajo la curva
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina de suero bovino
BTC	Betacelulina
BrdU	Bromodesoxiuridina
CDC	Citotoxicidad dependiente del Complemento
CDK	Quinasa dependiente de ciclina
CSCs	Células madre del cáncer
CTR	Carga tumoral residual
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
ECM	Matriz extracelular
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano
EMT	Transición epitelio-mesénquima
EPG	Epigen
EPR	Epiregulina
ER	Receptor de estrógenos
ER+	Positivo para el receptor de estrógenos
ER-	Negativo para el receptor de estrógenos
ES	Puntuación de enriquecimiento
FBS	Suero bovino fetal
FDA	U. S. Food and Drug Administration
FN	Fibronectina
GDEs	Genes diferencialmente expresados
HB-EGF	Factor de crecimiento epidérmico que se une a heparina
HER	Receptor de la familia HER

HER2-E	Subtipo intrínseco HER2- <i>enriched</i>
HER2+	Positivo para el receptor HER2
HER2-	Negativo para el receptor HER2
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HR	Receptores hormonales
HRP	Peroxidasa de rábano
IAP	Proteína inhibidora de la apoptosis
IF	Inmunofluorescencia
IGF-1R	Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1
IHQ	Inmunohistoquímica
IP	Inmunoprecipitación
ISH	Hibridación <i>in situ</i>
KM plotter	Kaplan Meier plotter
KRH	Tampón Krebs-Ringer-HEPES
LCN2	Lipocalina-2
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MC	Medio condicionado
MCC	Medio condicionado concentrado
MMP	Metaloproteasa de matriz
mTOR	Diana de rapamicina en mamíferos
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NES	Puntuación de enriquecimiento normalizada
NK	Natural Killer
NRG	Neuregulina
Oligo-dT	Oligonucleótidos de politimidinas
PBS++	PBS suplementado con 1 mM CaCl ₂ y 0,5 mM MgCl ₂
PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI	Yoduro de propidio
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PLCγ	Fosfolipasa C gamma

PR	Receptor de progesterona
PR+	Positivo para el receptor de progesterona
PR-	Negativo para el receptor de progesterona
qRT-PCR	PCR cuantitativa con transcriptasa inversa
RFS	Supervivencia libre de recaídas
RNaseq	Secuenciación de RNA
RPC	Respuesta patológica completa
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
RTK	Receptor tirosina quinasa
SDS	Docecilsulfato de sodio
SNP	Polimorfismos de un solo nucleótido
shRNA	<i>short hairpin</i> RNA
STAT	Proteína transductora de señales y activadora de la transcripción
T-DMI	Ado-trastuzumab emtansina
TGF	Factor de crecimiento y transformación
TNFα	Factor de necrosis tumoral de tipo α
TKI	Inhibidor tirosina quinasa
TNBC	Cáncer de mama triple negativo
uPAR	Receptor del plasminógeno tipo uroquinasa
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WB	Western Blot

INTRODUCCIÓN

1. LOS RECEPTORES ERBB/HER

Los receptores ERBB/HER pertenecen a la superfamilia de receptores tirosina quinasa (RTKs). Los RTKs son proteínas transmembrana de tipo I que actúan fosforilando residuos de tirosina en sus proteínas diana conduciendo a un cambio en sus capacidades de señalización (Ocana y Pandiella, 2013). Estos receptores tienen un papel esencial tanto en la embriogénesis como en el desarrollo (Olayioye *et al.*, 2000) y en la fisiología de los organismos adultos (Heldin, 1995; Olayioye *et al.*, 2000). La familia de receptores tirosina quinasa ErbB/HER está formada por 4 miembros: el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR), HER1 o ErbB1, HER2 o ErbB2, HER3 o ErbB3 y HER4 o ErbB4. Estos receptores están implicados en el desarrollo y mantenimiento de distintos tumores sólidos (Arteaga y Engelman, 2014; Heldin, 1995). Alteraciones en los receptores HER son indicativos de agresividad, mal pronóstico, resistencia a terapias y metástasis (Wang, 2017a). Por ello, se han desarrollado terapias específicas contra los receptores HER.

EGFR fue el primer receptor de la familia en ser secuenciado en el año 1984. Presentaba una secuencia muy similar a la del oncogén v-erb-B, del virus de la eritoblatosis aviar (Downward *et al.*, 1984). Más tarde, se comprobó que este último es un EGFR truncado (Coussens *et al.*, 1985; Downward *et al.*, 1984). Un año después, en 1985, se descubrió HER2, un receptor con actividad tirosina quinasa cuya secuencia era homóloga al oncogén Neu de rata y muy similar a la de EGFR. Por tanto, este receptor también es conocido como Neu. Años más tarde se purificaron los dos últimos miembros de la familia, HER3 en 1989 (Kraus *et al.*, 1989) y HER4 en 1993 (Plowman *et al.*, 1993), caracterizados por presentar una secuencia similar a los anteriores.

1.1. Estructura y activación de los receptores HER

Los receptores HER son glicoproteínas que presentan una región extracelular con dominios de unión a ligando (Coussens *et al.*, 1985), una región transmembrana hidrofóbica y una región intracelular que presenta un dominio tirosina quinasa y una

cola carboxiterminal con sitios de autofosforilación (Burgess *et al.*, 2003; Marmor *et al.*, 2004; Yarden y Sliwkowski, 2001) (Figura 1). La región extracelular está formada por 4 subdominios (I-IV) (Figura 1).

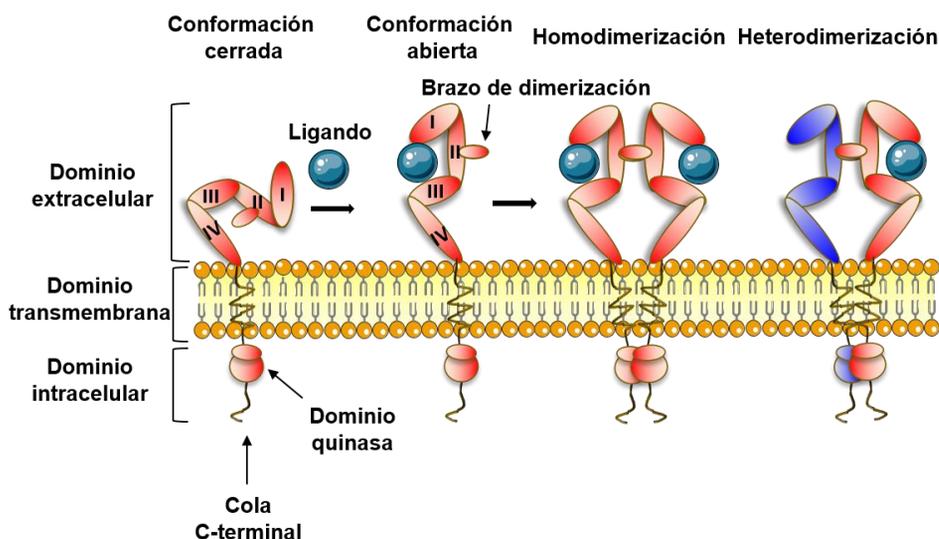


Figura 1. Estructura y activación de los receptores ERBB/HER. Los receptores ERBB/HER se caracterizan por estar formados por un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular. El dominio extracelular está formado, a su vez, por cuatro subdominios (I-IV) y el dominio intracelular presenta un dominio con actividad tirosina quinasa y una cola C-terminal con lugares de fosforilación. La activación del receptor tiene lugar cuando se une el ligando a través de los subdominios I y III, induciendo un cambio conformacional en el dominio extracelular, quedando el brazo de dimerización expuesto. Así, los receptores pueden dimerizar con otros receptores en conformación abierta a través del brazo de dimerización. La dimerización puede ser entre receptores idénticos (homodimerización) o diferentes (heterodimerización).

Los receptores se activan tras la unión del ligando de forma bivalente, a través de los subdominios I y III (Burgess *et al.*, 2003; Marmor *et al.*, 2004) (Figura 1). La unión del ligando causa un cambio conformacional que consiste en un reordenamiento de los subdominios resultando en una conformación abierta o activa, en la que los receptores son capaces de dimerizar con otro receptor en conformación activa (Burgess *et al.*, 2003; Marmor *et al.*, 2004) (Figura 1). El contacto entre ellos tiene lugar a través del brazo de dimerización, localizado en el subdominio II, que queda expuesto en la conformación abierta (Burgess *et al.*, 2003) (Figura 1). Además del brazo de dimerización, otras zonas de la región transmembrana y al dominio tirosina quinasa también están implicados en la dimerización y pueden estabilizar los

dímeros de receptores (Marmor *et al.*, 2004). La capacidad de los receptores no solo para homodimerizar (miembros idénticos) sino también para heterodimerizar (miembros diferentes de la misma familia) (Figura 1), amplifica y diversifica mucho la señalización a través de ellos (Olayioye *et al.*, 2000).

La dimerización desencadena la activación del dominio con actividad tirosina quinasa, de tal forma que los receptores se transfosforilan en residuos específicos de tirosina presentes en la región intracelular (Heldin, 1995; Olayioye *et al.*, 2000). Efectores intracelulares son capaces de unirse a los residuos de tirosina fosforilados, activando cascadas de señalización aguas abajo (Olayioye *et al.*, 2000). Los sitios de fosforilación y las proteínas de señalización reclutadas en estos sitios dependen de la identidad del ligando y los receptores que forman el dímero (Hynes y Lane, 2005; Marmor *et al.*, 2004; Olayioye *et al.*, 2000; Yarden y Sliwkowski, 2001).

Existen algunas peculiaridades de los receptores HER2 y HER3. El receptor HER2 es el único miembro de la familia que no presenta ligando conocido (Burgess *et al.*, 2003; Coussens *et al.*, 1985; Graus-Porta *et al.*, 1997; Marmor *et al.*, 2004). Sin embargo, su estructura difiere de la del resto de receptores en que se presenta en una conformación abierta de forma basal favoreciendo así la dimerización con otros receptores (Burgess *et al.*, 2003; Marmor *et al.*, 2004). De hecho, es el receptor preferido de los otros receptores HER para heterodimerizar (Burgess *et al.*, 2003; Coussens *et al.*, 1985; Graus-Porta *et al.*, 1997; Marmor *et al.*, 2004). El dominio tirosina quinasa del receptor HER3 es catalíticamente poco activo. Este receptor dimeriza con otros receptores con actividad quinasa eficiente, teniendo lugar la activación de cascadas de señalización que no podrían ser estimuladas si el receptor HER3 no hubiese sido activado tras la unión de su ligando (Burgess *et al.*, 2003; GuY *et al.*, 1994; Marmor *et al.*, 2004).

1.2. Señalización a través de los receptores HER

Los residuos fosforilados en las colas citoplasmáticas de los receptores HER activados tras la dimerización, son los lugares de acoplamiento de proteínas adaptadoras que se encargan de reclutar otras proteínas, activando así vías de señalización. Las principales vías de señalización activadas por los receptores HER son la de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y la de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/AKT (Hynes y Lane, 2005; Olayioye *et al.*, 2000; Wang, 2017a; Yarden y Sliwkowski, 2001) (Figura 2).

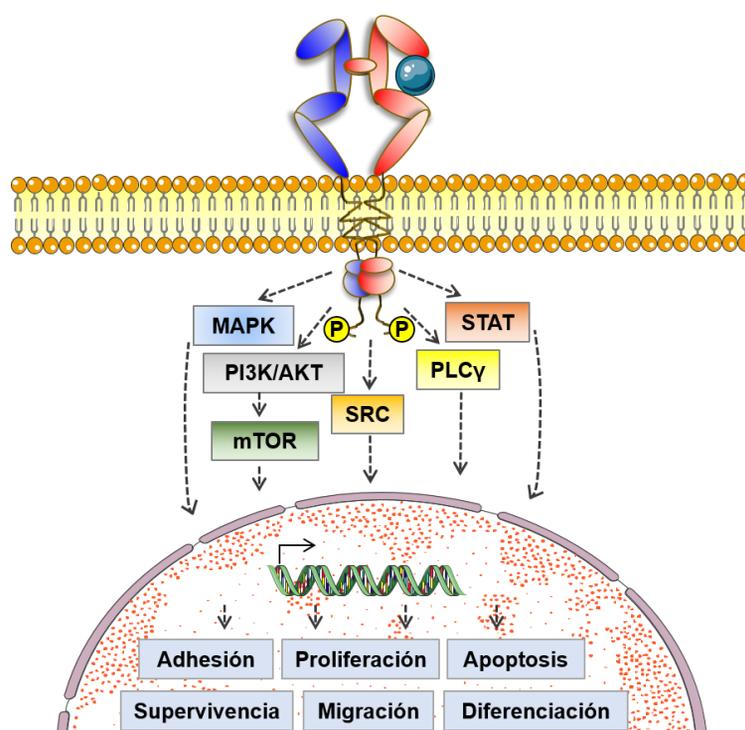


Figura 2. Señalización a través de los receptores HER. La fosforilación de residuos en las colas citoplasmáticas de los receptores desencadena la señalización a través de distintas vías que activan programas transcripcionales responsables de la inducción de respuestas biológicas. Se muestran las principales vías de señalización y respuestas biológicas activadas por los receptores HER.

Otras rutas importantes en la señalización son las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (STATs), la tirosina quinasa SRC y la vía de la fosfolipasa C gamma (PLC γ) (Hynes y Lane, 2005; Olayioye *et al.*, 2000; Wang, 2017a; Yarden y Sliwkowski, 2001) (Figura 2). Además, como efectores aguas abajo de la mayoría de los dímeros formados por los receptores HER encontramos a la

diana de rapamicina en mamíferos (mTOR) (Figura 2) y a la quinasa p70S6K, entre otros (Hynes y Lane, 2005; Olayioye *et al.*, 2000; Wang, 2017a; Yarden y Sliwkowski, 2001). En último lugar, en el núcleo se activan programas transcripcionales que conducen a la inducción de respuestas biológicas entre las que se incluyen la proliferación, la supervivencia, la diferenciación, la adhesión y la migración celular y la apoptosis (Marmor *et al.*, 2004; Wang, 2017a; Yarden y Sliwkowski, 2001) (Figura 2).

1.3. Ligandos de los receptores HER

Los ligandos de los receptores HER son de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF). La mayoría se sintetizan como precursores transmembrana que son procesados por proteasas y liberados en su forma soluble (Massagué y Pandiella, 1993). Pueden funcionar también anclados a membrana en señalización yuxtacrina. Todos ellos poseen un dominio EGF formado por unos 50 aminoácidos que contiene 6 residuos de cisteína espaciados formando 3 puentes disulfuro definiendo una estructura secundaria que es necesaria y suficiente para la unión a los receptores HER (Riese y Stern, 1998).

Los ligandos se clasifican en tres grupos de acuerdo a su especificidad para unirse a distintos receptores. El primer grupo está formado por el propio EGF, el factor de crecimiento y transformación de tipo α (TGF α), la anfiregulina (AREG) y el epigen (EPG) que se unen exclusivamente a EGFR (Figura 3). El segundo grupo está formado por neuregulinas (NRGs) que se unen a HER3 y HER4. Dentro de este grupo, tenemos dos subgrupos: las NRG1 y NRG2 que son capaces de unirse tanto a HER3 como a HER4 y las NRG3 y NRG4 que solo presentan afinidad por HER4 (Figura 3). Por último, el tercer grupo está formado por betacelulina (BTC), epiregulina (EPR) y el factor de crecimiento epidérmico que se une a heparina (HB-EGF), que se unen tanto a EGFR como a HER4 (Heldin, 1995; Hynes y Lane, 2005; Hynes y MacDonald, 2009; Riese y Stern, 1998) (Figura 3).

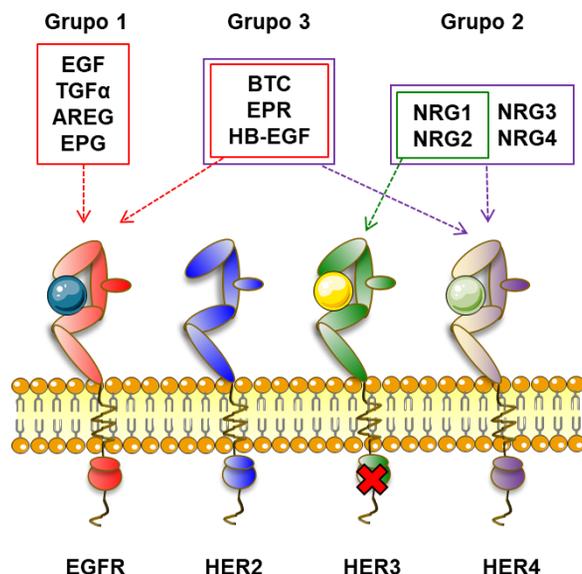
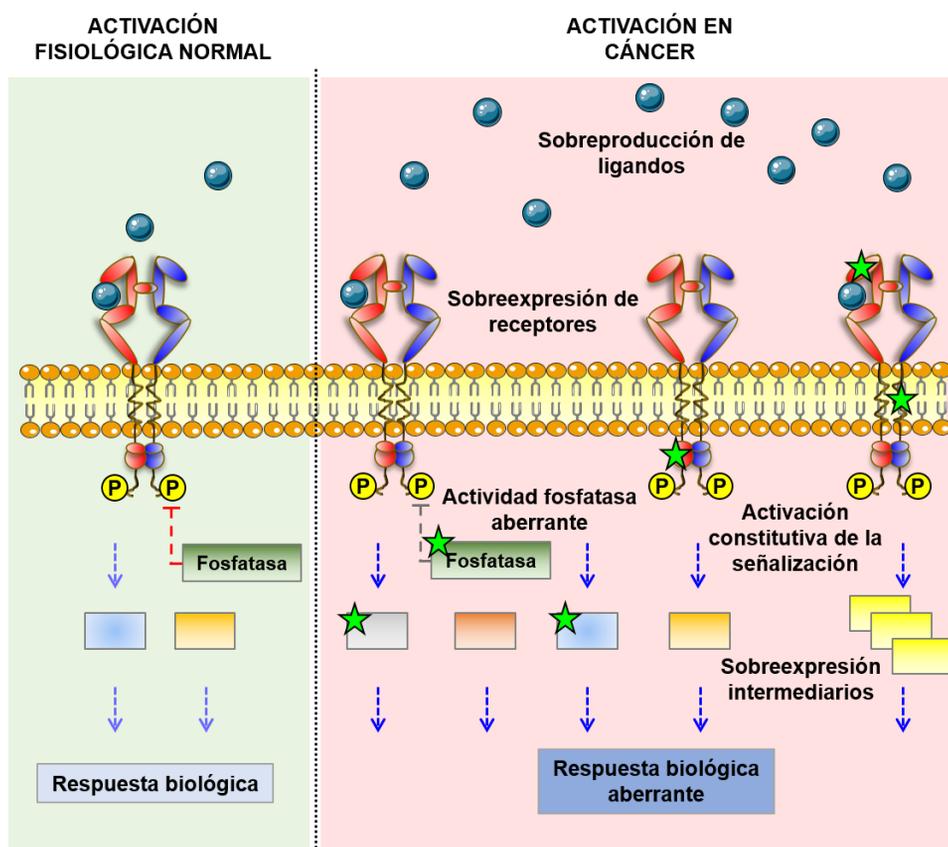


Figura 3. Familia de receptores HER y sus ligandos. La familia de los receptores HER está formada por cuatro miembros. Los ligandos de los receptores pertenecen a la familia del EGF y se unen de forma específica a los distintos receptores, clasificándose así en tres grupos. El grupo 1 está formado por ligandos que se unen exclusivamente a EGFR, el grupo 2 está formado por neuregulinas que se unen a HER3 y HER4 y el grupo 3 está formado por ligandos que se unen tanto a EGFR como a HER4. El receptor HER2 no presenta ligando conocido y el receptor HER3 carece de actividad tirosina quinasa eficiente.

2. RECEPTORES HER Y CÁNCER

En las células cancerígenas de distintos tipos de tumores, la vía de señalización a través de los receptores HER se encuentra hiperactivada por varios mecanismos, entre los que se incluyen la sobreproducción de ligandos, la sobreproducción de receptores o la activación constitutiva de los receptores (Hynes y MacDonald, 2009; Ocana y Pandiella, 2013; Yarden y Sliwkowski, 2001) (Figura 4). Es importante conocer el mecanismo responsable de la sobreactivación de la vía de señalización en cada tumor, que puede ser desencadenado por mutaciones, deleciones, sobreexpresión o amplificación de alguno de sus componentes (Hynes y MacDonald, 2009; Yarden y Sliwkowski, 2001), así como por una actividad fosfatasa aberrante (Ocana y Pandiella, 2013) (Figura 4). Esto aporta información acerca del pronóstico y el tratamiento de cada paciente (Yarden y Sliwkowski, 2001).



★ Mutaciones, deleciones, inserciones en receptores o intermediarios

Figura 4. Mecanismos de activación de los receptores HER en cáncer. En células tumorales, la señalización a través de los receptores HER se encuentra hiperactivada por distintos mecanismos desencadenando una respuesta fisiológica aberrante.

2.1. EGFR

La amplificación en *EGFR* ha sido encontrada en numerosos tipos de cáncer entre los que se encuentran mama, pulmón, cabeza y cuello, colorrectal, esófago y carcinoma de pulmón no microcítico (Arteaga y Engelman, 2014; Wang, 2017a; Yarden y Pines, 2012). Una deleción de los exones 2-7 que codifican el dominio extracelular de *EGFR*, llamada EGFRvIII, está presente en un 40% de glioblastomas con amplificación en *EGFR* (Sugawa *et al.*, 1990). EGFRvIII se encuentra en dimerización constitutiva presentando una actividad tirosina quinasa aberrante que resulta en un aumento de la tumorigenicidad. Esta mutación también fue encontrada en algunos tipos cáncer de mama, cabeza y cuello, ovario y próstata (Moscatello *et al.*, 1995).

En carcinoma de pulmón no microcítico se encontraron mutaciones somáticas activantes en *EGFR* (Lynch *et al.*, 2004; Paez *et al.*, 2004). Las mutaciones en *EGFR* se suelen localizar en dos puntos calientes del dominio quinasa: deleciones solapantes en el exón 19 y una sustitución de leucina por arginina en la posición 858 (L858R) (Lynch *et al.*, 2004; Paez *et al.*, 2004). Estos carcinomas de pulmón suelen ser adenocarcinomas y son característicos de pacientes no fumadores (Arteaga y Engelman, 2014). *EGFR* es importante en el crecimiento de cáncer colorrectal y de cabeza y cuello. Sin embargo, no se han encontrado alteraciones moleculares en ellos (Arteaga y Engelman, 2014).

2.2. HER2

HER2 está amplificado en varios tipos de tumores como los de mama, gástrico y de esófago (Arteaga y Engelman, 2014; Hynes y Lane, 2005; Wang, 2017a). La sobreexpresión de *HER2* fue descrita por primera vez en cáncer de mama y es indicativa de mal pronóstico (Slamon *et al.*, 1987). Además, se han encontrado mutaciones en *HER2* en distintos tipos de tumores sólidos (Cocco *et al.*, 2019; Hyman *et al.*, 2018; Subramanian *et al.*, 2019).

2.3. HER3 y HER4

El papel que juega *HER3* en cáncer se asocia a su heterodimerización con *HER2* y *EGFR* (Arteaga y Engelman, 2014). *HER3* está sobreexpresado en numerosos tipos de cáncer entre los que se encuentran mama y vejiga (Wang, 2017a). Sergina *et al.* demostraron que existía una asociación entre la expresión de *HER3* y la resistencia a inhibidores tirosina quinasa en líneas celulares de cáncer de mama *HER2* positivo (*HER2+*). Este hecho se debía a la transfosforilación de *HER3* por heterodimerización por otros miembros de la familia que resultaba en la activación de la señalización a través de *PI3K/AKT* (Sergina *et al.*, 2007). Se han encontrado mutaciones somáticas en *ERBB3* en tumores de mama y gástricos (Jaiswal *et al.*, 2013). La mayoría están localizadas en el dominio extracelular, parecen ser oncogénicas y la señalización tiene lugar a través de la heterodimerización con

HER2. Su activación suele ser independiente de la unión del ligando (Jaiswal *et al.*, 2013).

En cuanto a *ERBB4*, se han identificado mutaciones en melanoma (NISC Comparative Sequencing Program *et al.*, 2009), adenocarcinoma de pulmón (Ding *et al.*, 2009) y meduloblastoma (Gilbertson *et al.*, 2001).

2.4. Ligandos de los receptores HER

La sobreproducción de ligandos es una forma de activación aberrante de los receptores HER (Arteaga y Engelman, 2014). La relación entre la expresión de ligandos de los receptores HER y el cáncer es compleja, ya que la producción de los ligandos puede estar inducida por los propios oncogenes (Yarden y Sliwkowski, 2001). Estos ligandos pueden ser producidos tanto por las células tumorales como por el estroma (Arteaga y Engelman, 2014; Yarden y Sliwkowski, 2001). Además, el ligando se puede expresar pero puede no ser procesado o ser secuestrado en su forma inactiva (Yarden y Sliwkowski, 2001). El procesamiento de los ligandos es una forma de regulación de su disponibilidad y por consiguiente, de la activación de los receptores (Hynes y Lane, 2005).

El papel que desempeña TGF α en cáncer es el más caracterizado de todos los ligandos de la familia (Yarden y Sliwkowski, 2001). La co-expresión de TGF α y EGFR en pulmón, colon, ovario y cabeza y cuello ha sido asociada con mal pronóstico en pacientes (Arteaga y Engelman, 2014; Salomon *et al.*, 1995; Yarden y Sliwkowski, 2001).

En algunos tipos de cáncer se ha demostrado que puede existir una asociación entre la sobreexpresión de ligandos y la respuesta a tratamientos (Arteaga y Engelman, 2014). En células y tumores de ovario que sobreexpresaban NRG1 y HER3, fue descrito un bucle autocrino que promovía la proliferación celular y dicho crecimiento tumoral se inhibió con un anticuerpo contra HER3 (Sheng *et al.*, 2010). Además, células de cáncer de cabeza y cuello con sobreexpresión de NRG1 y activación de HER3 (sin amplificación de *HER2*) son sensibles a algunas terapias

como lapatinib (Wilson *et al.*, 2011). Por último, en células de cáncer de pulmón no microcítico, la expresión de altos niveles de NRG1 y HER4 hacía que las células fuesen más resistentes a la quimioterapia (Hegde *et al.*, 2013).

3. TERAPIAS CONTRA HER2

La implicación de los receptores HER en el desarrollo, progresión y pronóstico de distintos tipos de cáncer, ha conducido al desarrollo de terapias dirigidas contra dichos receptores. Entre las terapias anti-HER2 que han sido aprobadas para su uso en clínica encontramos los anticuerpos monoclonales contra el dominio extracelular del receptor y los inhibidores tirosina quinasa (TKIs) (Figura 5).

3.1. Anticuerpos monoclonales

El mecanismo de acción de los anticuerpos contra los receptores HER engloba varios procesos (Ocana y Pandiella, 2013). Entre ellos se incluyen la inducción de la degradación del receptor, reduciendo así la señalización, la interferencia en el proceso de activación y dimerización, el arresto del ciclo celular, la inhibición de la angiogénesis y los mecanismos de reparación del DNA, así como la atracción de células inmunes efectoras a través de su unión con la región Fc del anticuerpo (Carvalho *et al.*, 2016; Ocana y Pandiella, 2013).

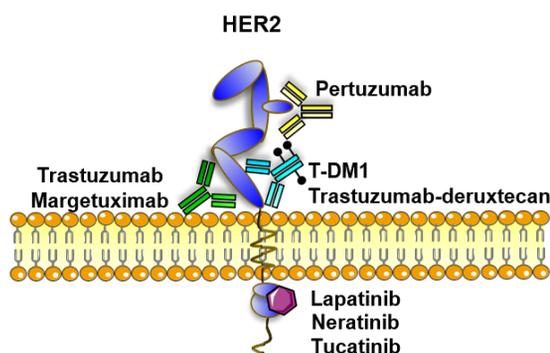


Figura 5. Terapias dirigidas contra el receptor HER2 aprobadas en la práctica clínica y diana sobre la que actúan.

3.1.1. Trastuzumab

Trastuzumab es una inmunoglobulina G1 humanizada que interacciona con el subdominio IV de HER2 (Carter *et al.*, 1992; Cho *et al.*, 2003; Pegram *et al.*, 2000) (Figura 5). Fue aprobado en 1998 por la U.S. Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama HER2+ metastásico. En comparación con la quimioterapia, el tratamiento con quimioterapia más trastuzumab aumentó la tasa y la duración de la respuesta global, así como la supervivencia libre de progresión (Slamon *et al.*, 2001). La supervivencia global aumentó en un valor medio de 5 meses. Además, se redujo el riesgo de muerte (Slamon *et al.*, 2001). Otros estudios posteriores también han demostrado la importante eficacia clínica de trastuzumab (Perez *et al.*, 2014; Piccart-Gebhart *et al.*, 2005; Robert *et al.*, 2006), de tal forma que su uso se ha extendido a terapia neoadyuvante y adyuvante en pacientes con cáncer de mama. Actualmente, las terapias basadas en trastuzumab son el tratamiento estándar para pacientes con cáncer de mama HER2+ localizado, ya sea combinado con quimioterapia o a través de un doble bloqueo de HER2 en combinación con pertuzumab (von Minckwitz *et al.*, 2017). Las pacientes con enfermedad avanzada, son tratadas en primera línea con trastuzumab más pertuzumab en combinación con quimioterapia (Bachelot *et al.*, 2019; Baselga *et al.*, 2012).

La actividad antitumoral conseguida con el tratamiento con trastuzumab se debe a una combinación de varios mecanismos, como la internalización del receptor HER2 (Cuello *et al.*, 2001; Scaltriti *et al.*, 2007), causando tanto una disminución del nivel total como de su fosforilación (Cuello *et al.*, 2001; Scaltriti *et al.*, 2007), que desencadena una inhibición de la señalización a través de PI3K/AKT (Yakes *et al.*, 2002). También se ha descrito que el tratamiento con trastuzumab aumenta la actividad del supresor tumoral PTEN, que actúa defosforilando rápidamente AKT y resulta en el bloqueo de la actividad de PI3K, contribuyendo a la inhibición de la proliferación celular (Nagata *et al.*, 2004). Además, trastuzumab induce el arresto del ciclo celular en G1 a través del aumento de la expresión de p27, que inactiva la quinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2) (Shin *et al.*, 2002; Yakes *et al.*, 2002). Por último, trastuzumab desencadena la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

(ADCC) (Clynes *et al.*, 2000). Las células tumorales sobreexpresoras de HER2 quedan rodeadas por trastuzumab en su superficie, esto genera la aparición de zonas que son identificadas por el sistema inmune como “zonas conflictivas” (Ocana y Pandiella, 2013). Las células inmunes citotóxicas interactúan a través de sus receptores Fcγ con los anticuerpos localizados en la superficie de la célula tumoral, eliminándola (Ocana y Pandiella, 2013). La relevancia de la respuesta inmune en el mecanismo de acción de trastuzumab fue demostrada en modelos animales. El tratamiento con trastuzumab en ratones cuyas células inmunes eran deficientes en el receptor FcγRIII, no redujo el crecimiento tumoral en comparación con los que ratones que sí expresaban el receptor (Clynes *et al.*, 2000). Así, se demostró que el receptor Fc es imprescindible para que se desencadene la ADCC causada por trastuzumab (Clynes *et al.*, 2000).

3.1.2. Pertuzumab

Pertuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une al subdominio II de HER2 (Figura 5) impidiendo tanto la homodimerización como la heterodimerización con otros receptores (Baselga *et al.*, 2017; Ocana y Pandiella, 2013; Pernas y Tolaney, 2019). Así, bloquea la formación de uno de los heterodímeros más potentes y relevantes en cáncer de mama HER2+, el formado por HER2/HER3, inhibiendo la señalización a través de PI3K y MAPK (Pernas y Tolaney, 2019). Fue aprobado por la FDA en 2012 en combinación con trastuzumab y docetaxel para el tratamiento en primera línea de pacientes con cáncer de mama HER2+ metastásico (Baselga *et al.*, 2012). Actualmente, se utiliza en primera línea junto con trastuzumab como terapia neoadyuvante (Gianni *et al.*, 2016) y adyuvante en pacientes con cáncer de mama HER2+ localizado avanzado (von Minckwitz *et al.*, 2017).

3.1.3. Margetuximab

Margetuximab es un anticuerpo monoclonal contra HER2 derivado de trastuzumab que se une al mismo epítipo de HER2 con afinidad similar a la de trastuzumab (Kreutzfeldt *et al.*, 2020; Tarantino *et al.*, 2021) (Figura 5). Se sustituyeron 5 aminoácidos de la región Fc para aumentar su afinidad por el receptor

estimulador FcγRIIIA de células Natural Killer (NK) y macrófagos y disminuir su afinidad por el receptor inhibitorio FcγRIIB (Kreutzfeldt *et al.*, 2020; Markham, 2021; Tarantino *et al.*, 2021), con el fin de aumentar la ADCC y conseguir un efecto antitumoral superior al de trastuzumab (Cesca *et al.*, 2020). En base a los resultados de la fase III del ensayo clínico SOPHIA (Rugo *et al.*, 2021), margetuximab ha sido aprobado en Estados Unidos en diciembre de 2020 en combinación con quimioterapia para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama HER2+ metastásico que hayan recibido previamente dos o más terapias contra HER2, al menos una de ellas para enfermedad metastática (Markham, 2021).

3.1.4. Anticuerpos conjugados a drogas

Los anticuerpos conjugados a drogas (ADCs) están formados por un anticuerpo monoclonal contra una diana específica (que idealmente se expresa más en tejido tumoral que en tejido sano), un agente citotóxico quimioterápico, que suele ser una molécula pequeña que se libera en el interior de la célula diana y un enlace químico que une covalentemente el anticuerpo con el citotóxico. El objetivo de los ADCs consiste en eliminar de forma específica las células que expresan el antígeno diana, disminuyendo así la exposición sistémica al agente citotóxico y optimizando la relación beneficio/riesgo (Vezina *et al.*, 2017). Una vez se une el ADC a su diana en la superficie celular, las células lo internalizan vía endocitosis y el ADC es finalmente conducido hasta los lisosomas (Kovtun y Goldmacher, 2007). En el interior del lisosoma, el agente citotóxico es liberado tras una digestión enzimática (Vezina *et al.*, 2017). La mayoría de agentes citotóxicos suelen causar daño al DNA o a los microtúbulos (Beck *et al.* 2017), induciendo muerte celular (Kovtun y Goldmacher, 2007).

3.1.4.1. T-DM1

El primer ADC aprobado para el tratamiento de tumores sólidos fue adotrastuzumab emtansina (T-DM1) (Figura 5). Está compuesto por trastuzumab unido covalentemente a DM1, un derivado de la maitansina que inhibe la polimerización de los microtúbulos a través de un enlace no procesable (García-Alonso *et al.*, 2020; Lewis Phillips *et al.*, 2008). T-DM1 fue aprobado en 2013 por la FDA para el

tratamiento de pacientes con cáncer de mama HER2+ metastásico (Verma *et al.*, 2012). En 2019, T-DM1 fue aprobado para tratar pacientes con cáncer de mama localizado que presentaban enfermedad residual invasiva tras ser tratados en primera línea con una terapia basada en trastuzumab (von Minckwitz *et al.*, 2019).

3.1.4.2. Trastuzumab-deruxtecan (DS-8201)

Trastuzumab-deruxtecan es un nuevo ADC que está formado por trastuzumab unido por un enlace covalente hidrolizable a un derivado del exatecan, un inhibidor de la topoisomerasa I (Keam, 2020; Modi *et al.*, 2020) (Figura 5). Debido a que el citotóxico está unido por un enlace escindible, produce un efecto *bystander* citotóxico en las células tumorales vecinas que no tengan sobreexpresión de HER2. Además, el derivado del exatecan es mucho más permeable que la maitansina, liberándose al espacio intercelular, contribuyendo al efecto *bystander* (Ogitani *et al.*, 2016). Este fármaco fue aprobado en diciembre de 2019 por la FDA, para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama HER2+ avanzado que ya hayan recibido con anterioridad dos o más terapias anti-HER2 (Modi *et al.*, 2020).

3.2. Inhibidores tirosina quinasa

Los TKIs son moléculas pequeñas que inactivan la actividad quinasa de los receptores HER tras su unión a su dominio quinasa (Zhang *et al.*, 2009). Estos bloquean la actividad de los receptores que presentan alteraciones moleculares en el dominio extracelular que impiden la acción de los anticuerpos monoclonales (Ocana y Pandiella, 2013). En general, actúan uniéndose al sitio de unión a ATP en el dominio quinasa, desplazándolo por presentar mayor afinidad (Arora y Scholar, 2005).

Los TKIs pueden clasificarse en 2 grupos: reversibles e irreversibles (Wu, 2015; Zhang *et al.*, 2009). Los reversibles se unen al sitio de unión a ATP y posteriormente, son liberados mientras que los irreversibles, se unen covalentemente al sitio de unión a ATP en el dominio quinasa del receptor e impiden su función incluso tras lavar la droga (Ocana y Pandiella, 2013; Wu, 2015). Los TKIs aprobados para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama HER2+ son lapatinib, neratinib y tucatinib (Deeks, 2017; Lee, 2020; Ryan *et al.*, 2008). Lapatinib y tucatinib son reversibles, mientras

que neratinib se une de forma irreversible al sitio de unión a ATP (Conlon *et al.*, 2021).

3.2.1. Lapatinib

Lapatinib es un TKI que se une reversiblemente tanto a EGFR como a HER2 (Conlon *et al.*, 2021; Pernas y Tolaney, 2019) (Figura 5). Fue aprobado por la FDA en 2007 en combinación con capecitabina para el tratamiento de cáncer de mama HER2+ metastásico que ha progresado tras ser tratado en primera y segunda línea (Geyer *et al.*, 2006; Saura *et al.*, 2019). Como inhibidor dual de los heterodímeros formados por EGFR/HER2, disminuye la señalización aguas abajo de las vías PI3K/AKT, MAPK, PLC γ y STAT (Kreutzfeldt *et al.*, 2020). El efecto de lapatinib parece ser independiente de la sobreexpresión de EGFR y es efectivo en tumores HER2+ resistentes a trastuzumab que expresan la forma truncada p95-HER2 (Kreutzfeldt *et al.*, 2020). Sin embargo, efectos secundarios como diarrea hacen que su uso sea limitado en la clínica.

3.2.2. Neratinib

Neratinib es un TKI que se une de forma irreversible a varios miembros de la familia de receptores HER, entre los que se incluyen EGFR, HER2 y HER4 (Figura 5). Fue aprobado en 2017 para el tratamiento adyuvante de pacientes con cáncer de mama HER2+ que habían sido tratados previamente con trastuzumab (Chan *et al.*, 2016; Martin *et al.*, 2017). Actúa inhibiendo la señalización a través de las vías de PI3K/AKT y MAPK (Kreutzfeldt *et al.*, 2020).

3.2.3. Tucatinib

Tucatinib es un TKI potente y reversible que se une específicamente a HER2 (Conlon *et al.*, 2021; Lee, 2020) (Figura 5). Bloquea la señalización de HER2, incluyendo los heterodímeros HER2/HER3 (Lee, 2020). Fue aprobado por la FDA en abril de 2020 en combinación con trastuzumab y capecitabina para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama HER2+ avanzado inoperable o metastásico, incluyendo las pacientes con metástasis cerebrales que hayan recibido una o más terapias basadas en HER2 en base a los resultados del ensayo clínico HER2CLIMB

(Murthy *et al.*, 2020; Shah *et al.*, 2021). En diciembre de 2020 ha sido aprobado por la Agencia Europea del Medicamento (Corti y Criscitiello, 2021).

4. CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es la enfermedad tumoral más frecuente en mujeres. Según los últimos datos publicados por la Sociedad Española de Oncología Médica, 32.953 mujeres fueron diagnosticadas con cáncer de mama en 2020, mientras que el número de mujeres que murieron a causa de esta enfermedad fue de 6.606 (SEOM, 2021). En los últimos años, la mortalidad por cáncer de mama ha descendido gracias a los programas de detección precoz y a la mejora de los tratamientos. Sin embargo, sigue siendo la primera causa de muerte por cáncer en mujeres. La edad de máxima incidencia está por encima de los 50 años pero aproximadamente un 10% de los casos se diagnostican en mujeres menores de 40 años (AECC, 2020). La prevalencia del cáncer de mama en España a 5 años fue de 144.233 casos en 2020 (SEOM, 2021). El estadio en el que se diagnostica influye en el pronóstico de la paciente. La supervivencia en estadio I es de más del 98% y en cambio, en estadio III la supervivencia disminuye a un 24% (AECC, 2020). A nivel mundial, según los datos publicados por The Global Cancer Observatory, se diagnosticaron 2.261.419 mujeres con cáncer de mama en 2020. Además, 684.996 murieron a causa de esta enfermedad. La incidencia global de cáncer de mama está aumentando anualmente en tasas de 3,1% y está previsto que esta tendencia continúe (GCO, 2021).

Desde el punto de vista molecular, los tumores de mama son muy heterogéneos (Harbeck *et al.*, 2019; Parker *et al.*, 2009; Sørli, 2004) y existen subtipos que presentan apariencia histológica de las células tumorales, así como una manifestación clínica y pronóstico diferentes (Sørli, 2004). Además, las pacientes responden de forma muy diversa a los tratamientos (Sørli, 2004). Esta diversidad desencadenó el reto de desarrollar clasificaciones tumorales que sean clínicamente útiles para predecir pronóstico y respuesta a tratamiento (Parker *et al.*, 2009). En los últimos 20 años, los tratamientos han evolucionado hasta tener en cuenta esta heterogeneidad. Se han desarrollado terapias dirigidas que permiten una desescalada

en los tratamientos que minimizan los efectos adversos (Harbeck *et al.*, 2019) y reducen los costes derivados de los mismos (Baselga *et al.*, 2017).

4.1. Clasificación del cáncer de mama

La emergencia del campo de la genómica y los avances en las técnicas de perfiles moleculares han revolucionado la genética del cáncer y como resultado, la práctica clínica (Sørлие, 2004). La tecnología de los *microarrays* empleada en el estudio de perfiles de DNA, RNA y proteínas, así como de cambios epigenéticos, se utilizó para detallar los fenotipos tumorales (Sørлие, 2004). La caracterización de los tumores desde un punto de vista genómico puede ser relacionada con información clínica para poder entender las causas de la aparición y la progresión tumoral, así como descubrir nuevos biomarcadores moleculares y nuevas opciones terapéuticas, más allá de las clasificaciones utilizadas de forma clásica (Parker *et al.*, 2009; Sørлие, 2004). Estos avances han contribuido a la mejora y a la personalización de los tratamientos.

4.1.1. Clasificación por subtipo intrínseco

Los *microarrays* de expresión génica permitieron llevar a cabo el análisis de expresión de miles de genes de forma simultánea en un único experimento con el fin de generar el perfil molecular de un tumor. La información cuantitativa de la expresión de múltiples genes es más precisa para la caracterización biológica que la ofrecida por los estudios histopatológicos que se utilizan para el diagnóstico. En el año 2000, Perou *et al.* publicaron la primera clasificación de cuatro subtipos intrínsecos (*basal-like*, *HER2+*, *normal breast-like*, *luminal epithelial/ER+*) de tumores de mama basados en perfiles de expresión génica (Perou *et al.*, 2000). Estos “retratos moleculares” de los tumores, revelaron similitudes o diferencias en expresión génica que además, fueron asociadas a interpretaciones biológicas como variaciones en la tasa de proliferación, señalización por determinadas vías y composición celular (Perou *et al.*, 2000). No todos los genes utilizados en esta primera clasificación eran necesarios para establecer el subtipo molecular, por lo que

se reordenaron los grupos de genes para conseguir el grupo óptimo que permitiese clasificar los tumores en base a su perfil de expresión génica (Perou *et al.*, 2000).

En 2001, Sorlie *et al.* publicaron que existía una correlación entre los perfiles de expresión génica de los tumores y parámetros clínicos, de manera que la clasificación por subtipo intrínseco podía ser utilizada como marcador de pronóstico de supervivencia global y supervivencia libre de recaídas (RFS). También se dividió el subtipo luminal en dos subgrupos con expresión génica y pronóstico diferentes (Sorlie *et al.*, 2001).

Estos primeros datos junto con las numerosas contribuciones de otros autores durante los últimos 20 años han cambiado la forma de entender, clasificar, diagnosticar, tratar y estudiar el cáncer de mama. Se han caracterizado cinco subtipos: Luminal A, Luminal B, *HER2-enriched*, *Basal-like* y *Claudin-low*, además de un grupo *normal breast-like*.

- **Subtipo Luminal: Luminal A y Luminal B**

Estos tumores se caracterizan por una expresión elevada del receptor de estrógenos (ER) (Hoadley *et al.*, 2014; Perou *et al.*, 2000) y de otros genes luminales como *GATA3*, *XBPI* y *FOXA1* (Hoadley *et al.*, 2014; Sørлие, 2004). Más tarde se dividieron en dos subgrupos: Luminal A y Luminal B (Sorlie *et al.*, 2001). Los tumores luminal A son de bajo grado con gran diferenciación morfológica (Hoadley *et al.*, 2014). Se caracterizan por una mayor expresión de ER, así como del resto de genes luminales, una tasa de proliferación baja y pronóstico favorable (Hoadley *et al.*, 2014; Sørлие, 2004). Estos tumores presentan mutaciones recurrentes en muchos genes como *PIK3CA*, *CDH1*, *MAP3K1*, *GATA3*, *MAP2K4*, *FOXA1*, *TP53*, *RUNX1*, *CBFB*, *NBL1*, *CTCF*, *NCOR1*, *PTEN*, *CDKN1B*, *AKT1*, *TBX3*, *ARID1A* y *NF1* (Hoadley *et al.*, 2014). Sin embargo, el número total tanto de mutaciones como alteraciones en el número de copias por tumor es el más bajo en comparación con otros subtipos, de manera que estas alteraciones suelen ser *driver* (Hoadley *et al.*, 2014).

Por el contrario, en los tumores luminal B, tanto la expresión de *ER* como la de otros genes luminales es más moderada y son más proliferativos que los anteriores

ya que expresan genes relacionados con la proliferación celular, como Ki67 (Hoadley *et al.*, 2014; Sørli, 2004). En cuanto a pronóstico, son de peor pronóstico y presentan mutaciones recurrentes en *PIK3CA*, *GATA3*, *PTEN* y *TP53* (Hoadley *et al.*, 2014). Un 24% de los tumores luminal B son HER2+ (Hoadley *et al.*, 2014).

- **Subtipo *HER2-enriched* (HER2-E)**

Estos tumores se caracterizan por la sobreexpresión de *HER2* y otros genes que se encuentran dentro del mismo amplicon en el 17q22.24 como *GRB7* (Harbeck *et al.*, 2019; Sørli, 2004). Además, también pueden expresar genes luminales. La expresión de HER2 es un factor pronóstico en sí mismo y está asociado con baja supervivencia en cáncer de mama (Slamon *et al.*, 1987). Son tumores de alto grado, presentan la mayor tasa de mutaciones puntuales y mutaciones recurrentes en *TP53* y *PIK3CA* (Harbeck *et al.*, 2019; Hoadley *et al.*, 2014).

- **Subtipo *Basal-like***

Estos tumores se caracterizan por la expresión de genes basales como *KRT5/6A*, *ID4* y *FOXC1* (Hoadley *et al.*, 2014) y son negativos para ER (ER-) y otros genes luminales (Sørli, 2004). Son de alto grado (Harbeck *et al.*, 2019) y mal pronóstico (Hoadley *et al.*, 2014; Sørli, 2004), con alta tasa de metástasis y están asociados a mujeres jóvenes con mutaciones germinales en *BRCA1* (Harbeck *et al.*, 2019; Hoadley *et al.*, 2014; Sørli, 2004). Además, presentan mutaciones recurrentes en *TP53* (Harbeck *et al.*, 2019; Hoadley *et al.*, 2014).

- **Subtipo *Claudin low***

Fue el último subtipo en ser identificado (Herschkowitz *et al.*, 2007). La mayoría de estos tumores no expresan ER, receptor de progesterona (PR) ni HER2 y tienen mal pronóstico. Son más parecidos a los tumores de tipo *basal-like*, con baja expresión de genes luminales y del amplicón de *HER2*. Algunos expresan receptores hormonales (HR) (Prat y Perou, 2011). Suelen ser de alto grado (Prat y Perou, 2011). Tienen características de células iniciadoras de tumores, expresan genes relacionados con transición epitelio mesénquima, la respuesta inmune y la matriz extracelular

(Herschkowitz *et al.*, 2007; Prat y Perou, 2011). Este subtipo se caracteriza por baja expresión de genes relacionados con uniones estrechas y uniones célula-célula e implicados en proliferación (Herschkowitz *et al.*, 2007; Prat y Perou, 2011).

- **Subtipo *normal breast-like***

Estos tumores expresan los mismos genes que los componentes normales de la mama debido a que presentan un número bajo de células tumorales (Harbeck *et al.*, 2019). Se caracterizan por una expresión de genes característicos de las células del tejido adiposo y de otros tipos celulares no epiteliales (Sørli, 2004). También tienen expresión elevada de genes basales pero baja de genes luminales (Perou *et al.*, 2000; Sørli, 2004). Estos tumores son negativos para la expresión de genes relacionados con la proliferación celular (Sørli, 2004).

4.1.2. Clasificación utilizada en la práctica clínica

La clasificación utilizada de forma rutinaria en la práctica clínica (Tabla 1) para estratificar las pacientes y seleccionar el tratamiento, se basa en la expresión histológica e inmunohistoquímica de proteínas clave: ER, PR, HER2 y el marcador de proliferación, Ki67. Los tumores que expresan ER y/o PR son los tumores hormonales, los que expresan HER2, los llamados HER2+ y los que no expresan ni ER, ni PR ni HER2 son conocidos como triple negativos (TNBC) (Harbeck *et al.*, 2019; Hoadley *et al.*, 2014). Existe una correlación entre estos marcadores y los subtipos intrínsecos. Sin embargo, aunque existe esta correlación, los subtipos intrínsecos no pueden ser identificados utilizando solo los marcadores empleados en la práctica clínica (Hoadley *et al.*, 2014).

Tabla 1. Clasificación del cáncer de mama utilizada en la clínica.

Subtipo	Expresión de proteínas clave	Proliferación (índice Ki67)	Pronóstico	Terapia
Luminal A (60-70%)	ER+, PR+, HER2-	Bajo	Bueno	Hormonal
Luminal B (10-20%)	ER+, PR+, HER2-	Alto	Intermedio	Hormonal
HER2+ (13-15%)	1.HER2-E no luminales (ER-, PR-, HER2+) 2.Luminal B HER2+	Alto	Intermedio	Dirigida contra HER2
TNBC (10-15%)	ER-, PR-, HER2+	Alto	Malo	Quimioterapia

5. RESISTENCIA A TRASTUZUMAB

Las terapias basadas en trastuzumab son el tratamiento estándar de pacientes con cáncer de mama HER2+. Sin embargo, existen pacientes que presentan resistencia primaria o adquirida a dicho anticuerpo. La resistencia primaria hace referencia a tumores que no responden al tratamiento desde el inicio, mientras que la adquirida se desarrolla después de una respuesta clínica inicial que suele ser duradera (Arteaga y Engelman, 2014). En la figura 6 se representan los mecanismos de resistencia a trastuzumab que se han descrito.

5.1. Mecanismos de resistencia a trastuzumab

5.1.1. Activación constitutiva de la vía de PI3K

La activación mutacional de la vía de PI3K ha sido asociada a resistencias a terapias contra los receptores HER, como trastuzumab (Arteaga y Engelman, 2014). La activación constitutiva de PI3K ocurre por dos mecanismos: mutaciones activantes en el gen que codifica para la subunidad catalítica de PI3K (*PIK3CA*) y pérdida de función de PTEN (Hennessy *et al.*, 2005). Se han encontrado mutaciones de ganancia

de función en *PIK3CA* en tumores HER2+ resistentes a trastuzumab (Berns *et al.*, 2007; Esteva *et al.*, 2010). Además, la pérdida de expresión de la fosfatasa PTEN, un regulador negativo de la vía de PI3K conduce a la señalización constitutiva a través de dicha vía y previene del arresto en la proliferación celular mediado por trastuzumab (Gajria y Chandarlapaty, 2011). Líneas celulares de cáncer de mama HER2+ con expresión de *PTEN* silenciada presentaron resistencia a trastuzumab tanto *in vitro* como al ser inyectadas en modelos animales (Nagata *et al.* 2004). Además, pacientes con tumores deficientes en PTEN presentaron tasas de respuesta a terapias basadas en trastuzumab inferiores que las de pacientes cuyos tumores expresaban PTEN (Nagata *et al.*, 2004).

5.1.2. Alteraciones moleculares en HER2

Algunos mecanismos de resistencia a trastuzumab se basan en alteraciones en la capacidad de unión del fármaco al propio receptor (Arteaga y Engelman, 2014). La acumulación de formas truncadas de HER2 puede conducir a la resistencia a trastuzumab (Ocana y Pandiella, 2013). Estas formas truncadas pueden carecer de subdominio IV, impidiendo la unión de trastuzumab, como es el caso de la forma truncada del receptor p95-HER2. La forma p95 es una quinasa constitutivamente activa que dimeriza con otros miembros de la familia HER y activa vías de señalización aguas abajo (Anido *et al.*, 2006). La tasa de respuesta a trastuzumab de pacientes con cáncer de mama avanzado que expresaban la forma p95-HER2 fue muy baja en comparación con los pacientes que no la expresaban (Scaltriti *et al.*, 2007). Otra forma de HER2 que carece del exón 16 en el dominio extracelular por *splicing* alterativo también ha sido asociada a resistencia a trastuzumab en líneas celulares. En este caso no se eliminó el sitio de unión a trastuzumab pero se estabilizaron los homodímeros de HER2 y no tuvo lugar su disrupción tras la unión del anticuerpo (Mitra *et al.*, 2009). Sin embargo, no hay evidencias clínicas de la asociación entre HER2- Δ 16 y resistencia a trastuzumab. Otro mecanismo que puede conducir al mismo efecto y que está relacionado con una menor respuesta a trastuzumab es la pérdida de expresión de HER2 (Ocana y Pandiella, 2013). En una cohorte de pacientes HER2+ que recibieron trastuzumab combinado con quimioterapia como

neoadyuvante, se reanalizó la expresión de HER2 en las pacientes que presentaban enfermedad residual después del tratamiento. Un tercio de estas pacientes habían perdido la expresión de HER2. Las pacientes que sí retuvieron la expresión tenían una tasa de RFS significativamente superior que las pacientes que la habían perdido (Mittendorf *et al.*, 2009). Además, mutaciones en *HER2* también se han relacionado con la resistencia a trastuzumab. Se evaluó la viabilidad celular en presencia de trastuzumab en células Ba/F3 que expresaban 54 mutaciones diferentes en *HER2*. La mayoría de las mutaciones en el dominio extracelular, transmembrana y en la cola C-terminal de *HER2* respondieron al tratamiento con trastuzumab mientras que las mutaciones en el dominio tirosina quinasa de *HER2* no respondieron al tratamiento con el anticuerpo. Entre las mutaciones en *HER2* que promovieron resistencia a trastuzumab se encontraban L755P/S, D769Y, E770_A771insAYVM, A775_G776insYVMA, G766S/V, V777L, L841V, V842I, N857S, T862A y D962N (Nagano *et al.*, 2018). Además, la presencia de mutaciones en *HER2* limitó la sensibilidad a trastuzumab y lapatinib en pacientes con cáncer de mama HER2+ (Cocco *et al.*, 2019). En pacientes HER2+ que habían sido tratadas con trastuzumab en primera línea, la supervivencia libre de progresión se redujo en una media de 6,3 meses en las que además de sobreexpresar HER2, el receptor estaba mutado (Yi *et al.*, 2020).

5.1.3. Activación de la señalización por otros receptores

La señalización a través de otros receptores pertenecientes o no a la familia HER ha sido relacionada con resistencia a trastuzumab (Arteaga y Engelman, 2014). Como se ha descrito anteriormente, trastuzumab no es capaz de interrumpir los heterodímeros de HER2 formados tras la unión de ligandos a los receptores HER (Agus *et al.*, 2002). Por tanto, la formación de heterodímeros HER2/HER3 y HER2/EGFR, desencadenados por alta expresión tanto de los receptores como de los ligandos, han sido identificados como mecanismos de resistencia a trastuzumab (Huang *et al.*, 2010; Ritter *et al.*, 2007; Sergina *et al.*, 2007; Xia *et al.*, 2004). Además de los receptores de la familia HER, otros receptores como IGF-1R, MET, EphA2 y el receptor del factor de crecimiento y transformación de tipo β (TGF β) también han

sido relacionados con la resistencia a trastuzumab. Una expresión elevada de IGF-1R en líneas celulares sobreexpresoras de HER2 fue relacionada con una respuesta a trastuzumab limitada (Lu *et al.*, 2001). De hecho, la formación de heterodímeros IGF-1R/HER2 activó la señalización a través de PI3K confiriendo resistencia a trastuzumab en modelos celulares (Huang *et al.*, 2010). Además, la inhibición de la señalización a través de IGF-1R bloqueó la fosforilación de HER2, recuperándose así la sensibilidad a trastuzumab (Nahta *et al.*, 2005). En cuanto a MET, se ha demostrado que la señalización inducida por el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) a través de MET escapaba de la acción de trastuzumab (Shattuck *et al.*, 2008). Además, pacientes HER2+ con amplificación de *MET* y *HGF* no respondieron a terapias basadas en trastuzumab (Minuti *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha demostrado que la expresión del receptor EphA2 confería resistencia a trastuzumab en líneas celulares y era indicativo de mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama HER2+ (Zhuang *et al.*, 2010). Por último, la activación de receptores de TGF β aumentó la producción de ligandos de los receptores HER conduciendo a la activación de HER3 y desencadenando resistencia a trastuzumab (Wang *et al.*, 2008). Por tanto, una firma génica ligada a la actividad de TGF β se relacionó con resistencia a trastuzumab y mal pronóstico en pacientes (Wang *et al.*, 2008).

5.1.4. Defectos en el control del ciclo celular y la apoptosis

Uno de los mecanismos de acción de trastuzumab consiste en el arresto del ciclo celular (Shin *et al.*, 2002; Yakes *et al.*, 2002). Por tanto, alteraciones en este proceso puede resultar en resistencias a trastuzumab. Un aumento en el número de copias del gen que codifica para la ciclina E (*CCNE1*) fue encontrado en líneas celulares resistentes a trastuzumab. Se demostró que dicha amplificación era la responsable de la resistencia a trastuzumab tanto *in vitro* como en xenoinjertos (Scaltriti *et al.*, 2011). Además, la amplificación de *CCNE1* en una cohorte de pacientes tratadas con terapias basadas en trastuzumab fue asociada a menor beneficio clínico y menor tasa de supervivencia libre de enfermedad cuando se comparó con las pacientes que no presentaban dicha amplificación (Scaltriti *et al.*, 2011). Por otro lado, se ha asociado la infraexpresión de p27 con resistencia a trastuzumab. Se ha

demostrado que líneas celulares resistentes a trastuzumab presentaban bajos niveles de p27 y dicha infraexpresión estaba ligada a un aumento de la actividad de CDK2, conduciendo a un aumento en la tasa de proliferación celular (Nahta *et al.*, 2004a).

Recientemente, se ha descrito un mecanismo responsable de la resistencia a trastuzumab mediado por la sobreexpresión de ciclina E (Decker *et al.*, 2020). Durante la regulación del ciclo celular, se forma un complejo entre ciclina E y CDK2 para inducir la transición de fase G1 a S. En este punto, la fosforilación no canónica de SMAD3 mediada por ciclina E/CDK2 ha sido asociada a la progresión en el ciclo celular, a la migración celular y además, contribuye a la resistencia a trastuzumab en células de cáncer de mama HER2+. Dicha resistencia podría ser abordada terapéuticamente con inhibidores de CDK2 (Decker *et al.*, 2020).

Por otro lado, la survivina, un miembro de la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) que inhibe la actividad de caspasas, es el punto donde convergen distintas vías de señalización que conducen a la resistencia a terapias contra HER2 (Arteaga y Engelman, 2014). En líneas celulares HER2+, el tratamiento con trastuzumab inhibía la expresión de survivina, efecto que no se encontró en líneas resistentes a trastuzumab (Chakrabarty *et al.*, 2013). Además, el análisis de tumores de pacientes antes y después del tratamiento con trastuzumab y quimioterapia en neoadyuvancia, demostró que los niveles de survivina se reducían. Además, las pacientes que no respondieron al tratamiento presentaban niveles de survivina superiores (Dave *et al.*, 2011).

5.1.5. Inducción respuesta inmune

Algunos factores intrínsecos del tumor pueden afectar a la acción inmunomoduladora de trastuzumab, desencadenando resistencia. En ratones que no expresaban FcγRIII y, por lo tanto, eran deficientes en células NK y macrófagos capaces de unirse a la región Fc de trastuzumab, el efecto del anticuerpo fue muy reducido (Clynes *et al.*, 2000). Además, polimorfismos en el gen que codifica FcγRIII fueron asociados a resistencia a trastuzumab en pacientes con cáncer de mama HER2+ metastásico (Musolino *et al.*, 2008).

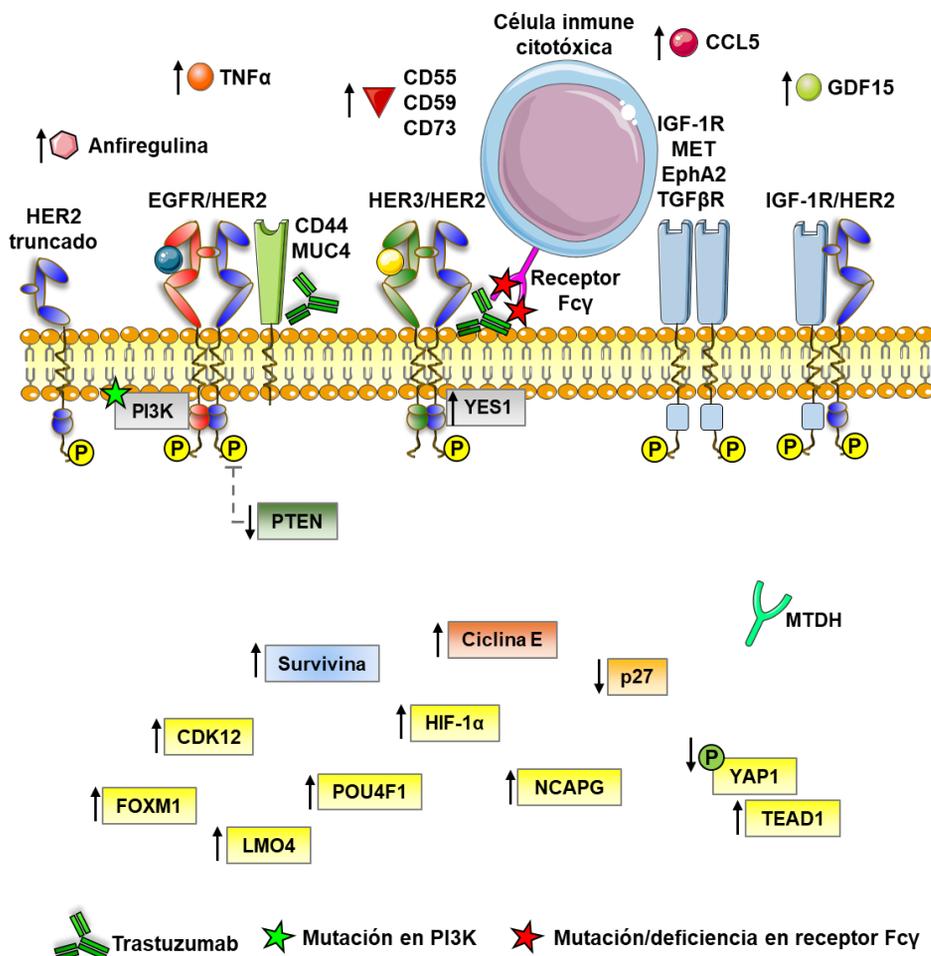


Figura 6. Mecanismos de resistencia a trastuzumab. Esquema que resume los mecanismos implicados en la resistencia a trastuzumab que se describen en los apartados 5.1. y 5.2. Las flechas con la punta hacia arriba indican aumento de la expresión; las flechas con la punta hacia abajo indican disminución de la expresión. La estrella en verde indica mutación activante en PI3K; las estrellas en rojo indican mutación o deficiencia en la expresión del receptor Fcγ.

5.2. Otros mecanismos de resistencia a trastuzumab

Los mecanismos que se han descrito anteriormente como responsables de la resistencia a trastuzumab en cáncer de mama HER2+ son los que han sido reconocidos clásicamente (Figura 6). Sin embargo, en los últimos años se han descrito una gran cantidad de genes y mecanismos responsables de la resistencia a trastuzumab (Figura 6), que podrían ser potencialmente utilizados como biomarcadores de pronóstico y de respuesta a trastuzumab en cáncer de mama

HER2+. Además, podrían ser nuevas dianas contra las que actuar para abordar la resistencia a trastuzumab.

En un modelo celular de SKBR3 con resistencia adquirida a trastuzumab, se describió que la vía de HIF-1 α /STAT3 promovía la resistencia a trastuzumab (Aghazadeh y Yazdanparast, 2017). Dicho modelo presentó un aumento de la fosforilación de STAT3 que inducía la expresión de HIF-1 α , provocando así una bajada en los niveles de PTEN (Aghazadeh y Yazdanparast, 2017). Del mismo modo, otros grupos han descrito un aumento de la expresión de CD44 y LMO4 en líneas SKBR3 y BT474 con resistencia adquirida a trastuzumab (Boulbes *et al.*, 2015; Ding *et al.*, 2018). El silenciamiento de *CD44* revirtió tanto las propiedades invasivas como la resistencia al anticuerpo en estas líneas (Boulbes *et al.*, 2015). Por su parte, el silenciamiento de *LMO4* condujo a la recuperación de la sensibilidad a trastuzumab, así como su sobreexpresión aumentó la resistencia a trastuzumab de la línea parental *in vitro* e *in vivo* (Ding *et al.*, 2018). En 2014, Du *et al.* demostraron que la sobreexpresión de MTDH en una línea SKBR3 con resistencia a trastuzumab, era la responsable de mediar la resistencia a dicho fármaco a través de la inhibición de PTEN por la vía NF κ B (Du *et al.*, 2014). El silenciamiento de *MTDH* en dichas células revirtió la resistencia a trastuzumab tanto *in vivo* como *in vitro*, así como el silenciamiento de *PTEN* (Du *et al.*, 2014). Recientemente, se ha descrito que células BT474 con resistencia adquirida a trastuzumab presentaban alteraciones en la vía de señalización Hippo, como la defosforilación de YAP1 y sobreexpresión de TEAD1 y TEAD2 (González-Alonso *et al.*, 2020). Se demostró que estas alteraciones eran responsables de la resistencia a trastuzumab y que podían abordarse con una nueva estrategia terapéutica que consistía en el doble bloqueo de HER2 y de los efectores de la vía Hippo (González-Alonso *et al.*, 2020). Se ha descrito la implicación de la AREG en el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama HER2+ metastásico tratadas con trastuzumab y taxanos (Kim *et al.*, 2016). Altos niveles de AREG en el suero de las pacientes se correlacionaron con una tasa de supervivencia libre de progresión baja, ya que la AREG promovía la resistencia a trastuzumab a través de AKT/ERK en células de cáncer de mama HER2+ (Kim *et al.*, 2016).

La citoquina CCL5, la proteína tirosina quinasa YES1 de la familia SRC y POU4F1 estaban sobreexpresadas en distintos modelos celulares de resistencia adquirida a trastuzumab (Takeda *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2020a; Zazo *et al.*, 2020). En todos los casos, el silenciamiento de forma genética o farmacológica aumentó la sensibilidad a trastuzumab en los modelos celulares. En pacientes con cáncer de mama HER2+ localizado, baja expresión de CCL5 era indicativo de respuesta a trastuzumab (Zazo *et al.*, 2020). La expresión de POU4F1 en los tumores de pacientes se relacionó con resistencia a trastuzumab y por tanto, mal pronóstico (Wu *et al.*, 2020a).

En 2020, Jiang *et al.* encontraron que la proteína NCAPG estaba sobreexpresada significativamente en tumores resistentes a trastuzumab y se asoció a baja supervivencia y mayor riesgo de recaída (Jiang *et al.*, 2020a). En líneas celulares, la sobreexpresión de NCAPG aumentó la proliferación celular en presencia de trastuzumab a través de la vía de SRC/STAT3, mientras que su silenciamiento resensibilizó las células a dicho anticuerpo (Jiang *et al.*, 2020a). Otra proteína implicada en la resistencia a trastuzumab fue el factor de necrosis tumoral de tipo α (TNF α) cuya sobreexpresión transformó líneas celulares y tumores sensibles a trastuzumab en resistentes (Mercogliano *et al.*, 2017). TNF α desencadenó la sobreexpresión de MUC4 y se formaron focos de mucina en los tumores. Esto redujo la capacidad de unión de trastuzumab a HER2 impidiendo que tuviese lugar la ADCC. El silenciamiento de MUC4, aumentó la unión de trastuzumab y por tanto, su acción antiproliferativa. Anticuerpos contra TNF α , disminuyeron la expresión de MUC4 y resensibilizaron las células y los tumores a trastuzumab (Mercogliano *et al.*, 2017).

En 2011, se demostró que la fosforilación de HER2 mediada por GDF15 reducía la sensibilidad de las líneas celulares HER2+ a trastuzumab (Joshi *et al.*, 2011). Lo que sucedía es que GDF15 activaba el receptor de TGF β , que desencadenó la activación de SRC y esta última, indujo la fosforilación de HER2, inhibiendo así los efectos antiproliferativos de trastuzumab en las líneas resistentes sobreexpresoras de GDF15. Con la acción de un TKI como lapatinib, se bloqueó la señalización a

través de HER2 devolviendo así la sensibilidad a trastuzumab (Joshi *et al.*, 2011). Años más tarde, este mismo grupo describió que la sobreexpresión de GDF15 estimulaba la fosforilación de p38 y ésta era la responsable del fenotipo pro-invasivo y la resistencia a trastuzumab causada por GDF15 (Donnelly *et al.*, 2013). Li *et al.* demostraron que una deficiencia en la expresión de EPHA5 mediaba la resistencia a trastuzumab en pacientes HER2+ (Li *et al.*, 2019). La inhibición de EPHA5 promovió un fenotipo típico de las células madre del cáncer (CSCs) que condujo a la activación de NOTCH1 y la señalización a través de PI3K/AKT, consiguiendo que los tumores fuesen más malignos y no respondiesen a trastuzumab (Li *et al.*, 2019). Estudios en los que se ha investigado FOXM1 como una diana aguas abajo en la señalización de HER2, demostraron que existía una correlación entre los niveles de FOXM1 y HER2 en pacientes HER2+ (Peake y Nahta, 2014). La sobreexpresión de FOXM1 en líneas celulares con amplificación en *HER2*, disminuyó su sensibilidad a trastuzumab mientras que su silenciamiento aumentó la respuesta a dicho anticuerpo, demostrando que FOXM1 estaba implicado en la resistencia a trastuzumab (Peake y Nahta, 2014).

La proteína HSP27 regula la función de distintas proteínas implicadas en la resistencia a trastuzumab (Hwang *et al.*, 2020). Se comprobó que la fosforilación en S15 de la HSP27 promovía la fosforilación en S78. Esta modificación estimulaba la interacción entre otros mediadores que incrementaron la estabilidad de HER2, la activación de AKT y la expresión de ciclina D1, desencadenando la resistencia a trastuzumab. La administración conjunta de trastuzumab con un inhibidor funcional de HSP27 redujo la fosforilación de HSP27 en S15/78, que disminuyó la señalización a través de HER2, sensibilizando las células a trastuzumab (Hwang *et al.*, 2020).

Una expresión elevada de CDK12 inducida por la amplificación conjunta de *CDK12* y *HER2* ha sido asociada a mal pronóstico y recurrencia en pacientes (Choi *et al.*, 2019). CDK12 promovía la renovación de CSCs, aumentaba la capacidad de iniciar tumores y reducía la susceptibilidad a trastuzumab ya que la actividad catalítica de CDK12 era necesaria para la expresión de genes que participan en la vía de HER2 y su señalización a través de PI3K/AKT o WNT. El uso de inhibidores de

CDK12 podría ser una terapia efectiva contra la resistencia a trastuzumab (Choi *et al.*, 2019).

La ADCC y la citotoxicidad dependiente del Complemento (CDC) son mecanismos de respuesta inmune innata que participan en la destrucción de las células tumorales y median los efectos terapéuticos de los anticuerpos monoclonales en el tratamiento del cáncer (Scott *et al.*, 2012). Algunas pacientes HER2+ no experimentaron respuesta al tratamiento a trastuzumab debido a la falta de activación de la CDC. Las proteínas CD55 y CD59 fueron implicadas en el bloqueo de la CDC inducida por trastuzumab y por tanto, promovieron la resistencia a trastuzumab (Wang *et al.*, 2017b). Además, en modelos de ratones inmunocompetentes de cáncer de mama HER2+, la expresión de CD73 por las células tumorales suprimió la respuesta inmune mediada por el tratamiento con trastuzumab y aumentó la formación espontánea de otros tumores, así como el desarrollo de metástasis (Turcotte *et al.*, 2017).

En células resistentes a trastuzumab sobreexpresoras de HER2, se han encontrado niveles muy elevados del transcrito *MALATI* (Wu *et al.*, 2020b). Su silenciamiento revirtió el fenotipo mesenquimal, la invasividad de las células y aumentó la respuesta a trastuzumab (Wu *et al.*, 2020b).

6. SENSIBILIDAD A TRASTUZUMAB

A menudo, los tratamientos solo producen respuestas significativas en pequeños grupos de pacientes, los llamados “respondedores excepcionales”. Sin embargo, las bases moleculares que están detrás de este suceso no han sido investigadas de forma sistemática. Estudios realizados recientemente han indicado que el análisis genético de los tumores conduce a la obtención de información acerca de los procesos oncológicos que influyen en la respuesta al tratamiento (Wheeler *et al.*, 2021).

En cáncer, los respondedores excepcionales son raros y por tanto, las alteraciones genéticas que desencadenan las respuestas también se espera que sean

raras. Los eventos genéticos que confieren respuesta terapéutica se agrupan en dos categorías: adicción oncogénica (Weinstein, 2002) y letalidad sintética (Hartwell *et al.* 1997).

En un estudio publicado recientemente por el National Cancer Institute, se analizaron 111 tumores de pacientes que habían respondido de forma excepcional a los tratamientos, con el objetivo de encontrar las bases moleculares que desencadenaron dichas respuestas (Wheeler *et al.*, 2021). En el análisis se incluyeron múltiples técnicas genómicas para detectar mutaciones, alteraciones en el número de copias, reordenamientos génicos, metilaciones aberrantes, valores atípicos en expresión génica y poblaciones celulares del microambiente tumoral. El análisis conjunto de todos los datos condujo a la propuesta de mecanismos de “nivel 1” que podrían estar detrás de las respuestas en 26 tumores. Los mecanismos propuestos se dividieron en cuatro categorías: respuesta al daño al DNA, vía de señalización intracelular, genética de pronóstico y compromiso inmunológico. En la mayoría de los casos, dos o más mecanismos estaban implicados en la respuesta al tratamiento (Wheeler 2021). Una paciente con cáncer de mama HER2+ metastático con respuesta patológica completa (RPC) a la combinación de trastuzumab, carboplatino y docetaxel durante los últimos 7 años presentaba una delección en homocigosis en *BRCA1*, así como mutaciones somáticas inactivantes en *BRCA2* y *BRIP1* y amplificación y sobreexpresión de *HER2*. La proteína BRIP1 interacciona físicamente con *BRCA1* y ambas, junto con *BRCA2* promueven la recombinación homóloga y la resolución de las horquillas de replicación retenidas durante el estrés replicativo. La respuesta excepcional de este tumor se debía a la deficiencia triple en la vía de BRCA tratada con carboplatino y a la amplificación de *HER2* abordada con trastuzumab (Wheeler 2021).

En 2020, se identificaron un grupo de proteínas entre las que se incluyen PERP, GNAS2, GNA13, ITB1 y RAB10 cuya expresión se asoció con respuesta a trastuzumab, tanto en líneas celulares como en pacientes con cáncer de mama HER2+ metastático (Drucker *et al.*, 2020). Se evaluó la expresión de estas proteínas en las vesículas extracelulares presentes en la sangre de una cohorte de pacientes con cáncer

de mama HER2+ metastásico. Estas proteínas estaban aumentadas en pacientes que se beneficiaban de la terapia pero no en las que no respondieron (Drucker *et al.*, 2020).

En los últimos años, se han publicado ensayos clínicos y otros estudios en los que se demostró que las pacientes HER2+ con tumores HER2-E eran más sensibles al tratamiento con terapias basadas en trastuzumab (Carey *et al.*, 2016; Llombart-Cussac *et al.*, 2017; Prat *et al.*, 2014, 2020). Prat *et al.* observaron que las pacientes del ensayo clínico NOAH con tumores HER2-E mostraron una mayor tasa de RPC al tratamiento con trastuzumab combinado con quimioterapia que las que tenían tumores con otros subtipos (Prat *et al.*, 2014). Lo mismo sucedió en el ensayo clínico CALGB 40601, en el que la tasa de RPC fue mayor en pacientes HER2-E en las tres combinaciones de tratamiento evaluadas: paclitaxel con trastuzumab y lapatinib; paclitaxel con trastuzumab; paclitaxel con lapatinib, independientemente de la expresión de HR. Por el contrario, los tumores de las pacientes con enfermedad residual tenían subtipo luminal A (Carey *et al.*, 2016). En el ensayo clínico PAMELA, se demostró que PAM50 predecía sensibilidad al doble bloqueo de HER2 con trastuzumab y lapatinib (sin quimioterapia) en pacientes HER2+ (Llombart-Cussac *et al.*, 2017). Una mayor tasa de RPC fue observada en los tumores HER2-E en comparación a los pertenecientes a otros subtipos (Llombart-Cussac *et al.*, 2017). En 2020, se publicó un trabajo en el que se analizó la capacidad combinada de dos biomarcadores: subtipo intrínseco HER2-E y alta expresión de HER2 para predecir respuesta a terapias anti-HER2 sin quimioterapia en pacientes con cáncer de mama HER2+ (Prat *et al.*, 2020). Ambos biomarcadores proporcionaban información complementaria, ya que dentro de los tumores HER2+ se encontraron distintos subtipos moleculares y un 35% de los tumores HER2-E no expresaban HER2 (según el criterio de la Sociedad Americana de Oncología Clínica). Un perfil molecular HER2-E proporciona información sobre la activación de las vías de señalización aguas abajo de HER2 y/o EGFR, mientras que el nivel de expresión de HER2 determina la cantidad de diana presente en las células tumorales. En ese trabajo se demostró que los tumores que cumplían ambos requisitos HER2-E/HER2^{elevada} eran más adictos a HER2 y por tanto, presentaban mayor sensibilidad a terapias anti-HER2

(Prat *et al.*, 2020). Por último, Pernas *et al.* analizaron la relación entre la expresión de PAM50 y otros 105 genes relacionados con cáncer y la RPC en una cohorte de 150 pacientes HER2+ tratadas con trastuzumab y quimioterapia en neoadyuvancia en el Instituto Catalán de Oncología. La expresión de 14 genes fue asociada significativamente con RPC. Entre ellos se incluyen *HER2*, *CCNE1*, genes implicados en invasión, supervivencia y migración celular (*FGFR4* y *GRB7*), y genes relacionados con reparación del DNA y replicación (*EXO1*, *ORC6L* y *RRM2*) (Pernas *et al.*, 2019).

OBJETIVOS

El receptor tirosina quinasa HER2 está sobreexpresado en un 15-25% de las pacientes con cáncer de mama y su expresión se correlacionó con un crecimiento tumoral agresivo y mal pronóstico. Este hecho impulsó el desarrollo de agentes contra HER2 con fines terapéuticos. El primer fármaco que fue aprobado para su uso en el ámbito clínico fue trastuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el dominio extracelular de HER2. Actualmente, las terapias basadas en trastuzumab son el tratamiento estándar para pacientes con cáncer de mama HER2+. La sobreexpresión de HER2 es el único criterio que se utiliza para elegir a las pacientes que van a ser tratadas con trastuzumab y otras terapias contra HER2. Sin embargo, dichas pacientes experimentan tasas de respuesta a trastuzumab variables, siendo algunas de ellas resistentes al fármaco. Este hecho sugiere que deben existir factores adicionales, además de la amplificación de *HER2* que dicten sensibilidad a las terapias basadas a trastuzumab.

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta estos precedentes, la presente Tesis Doctoral se desarrolló en base a los siguientes objetivos:

1. Generación y caracterización de modelos celulares resistentes e hipersensibles a trastuzumab.
2. Identificación de genes que pudieran predecir pronóstico y respuesta a trastuzumab en pacientes con cáncer de mama HER2+.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES, REACTIVOS Y ANTICUERPOS

Los medios de cultivo, el suero bovino fetal (FBS), la tripsina-EDTA, los antibióticos, el material plástico de cultivos celulares, la sulfo-NHS-Biotina, la estreptavidina-HRP y los oligonucleótidos fueron comprados a Thermo Fisher Scientific (Waltham, Estados Unidos). El dimetilsulfóxido (DMSO), el glicerol, el NaCl, el Tris, el HCl, el docecilsulfato de sodio (SDS), el cloroformo, el etanol, los filtros Amicon® Ultra de 3 ó 10K, los filtros de 0,45 µm y la membrana Inmobilon®-P de PVDF de 0,45 µm de tamaño de poro fueron comprados a Merck (Darmstadt, Alemania). El bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), el Nonidet™ P-40, el β-glicerolfosfato, el fluoruro sódico, el ortovanado sódico, el azul de bromofenol, el β-mercaptoetanol, la albúmina de suero bovino (BSA), el Tween® 20, el luminol, el p-iodofenol, el H₂O₂, el imidazol, el NaBO₃·H₂O, el paraformaldehído, el tritón X100, el DAPI, la sacarosa, el CHAPS, el HEPES, la RNasa libre de DNasa, la fibronectina, el cristal violeta, la mitomicina C, el bromuro de etidio, el polibreno y la puromicina son de Sigma-Aldrich (San Luis, Estados Unidos). El isopropanol fue comprado a Honeywell (Morris Plains, Estados Unidos) y el BlueSafe a NZYTech (Lisboa, Portugal).

Los fármacos utilizados fueron adquiridos a través de una farmacia local, donados por hospitales o comprados a la propia casa comercial. El trastuzumab, el T-DM1 y el pertuzumab son de Roche (Basilea, Suiza). El lapatinib y el neratinib son de Selleckchem (Houston, Estados Unidos).

La proteína A-Sefarosa® CL4B es de GE Healthcare (Chicago, Estados Unidos). La leupeptina, la aprotinina, la pepstatina, el PMSF y el EDTA fueron comprados a USB (Cleveland, Estados Unidos). El matrigel es de Corning (Corning, Estados Unidos). La anexina V-FITC y el sustrato fluorogénico Ac-DEVD-AFC son de BD Biosciences (Palo Alto, Estados Unidos). El SYBR Green Master Mix y las placas de 96 pocillos iCycler® iQ™ son de Bio-Rad Laboratories (Hercules, Estados Unidos). El PTZ-343 es de BOC Sciences (Nueva York, Estados Unidos). Las

películas Agfa CP-BU NEW son de Agfa-Gevaert (Mortsel, Bélgica). El mowiol fue comprado a Hoechst (Frankfurt, Alemania).

El JetPEI® y el NaCl proporcionado junto con el JetPEI® son de Polyplus-transfection (Illkirch, Francia) y los plásmidos utilizados en el silenciamiento génico fueron comprados a GE Dharmacon (Lafayette, Estados Unidos). El inserto de silicona utilizado en los ensayos de cierre de herida es de Ibidi (Múnich, Alemania). El ISOTON® es de Beckman Coulter Life Sciences (Idianápolis, Estados Unidos).

El TRIZOL™, la retrotranscriptasa M-MLV junto con su tampón de reacción 5X, los oligonucleótidos de politimidinas (oligo-dT), el DTT, la enzima Taq polimerasa y su tampón de PCR 10X fueron comprados a Invitrogen (Carlsbad, Estados Unidos). Los desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) son de Biotools (Madrid, España), el inhibidor de RNasas RNasin® es de Promega (Madison, Estados Unidos) y la agarosa de Laboratorios Conda (Madrid, España).

Los anticuerpos utilizados en este trabajo y su procedencia se especifican en la tabla 2.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en inmunodetección.

Anticuerpo	Aplicación	Dilución	Especie	Procedencia y referencia
Anti-calnexina	WB	1:40.000	Conejo	Stressgen Bioreagents Corporation (British Columbia, Canadá) SPA-860
Anti-calnexina	WB	1:40.000	Ratón	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Estados Unidos) sc-46669
Anti-caspasa 3	WB	1:10.000	Ratón	BD Biosciences 610323
Anti-caspasa 3 procesada	WB	1:1.000	Conejo	Cell Signaling Technologies #9664
Anti-caspasa 7	WB	1:1.000	Conejo	Cell Signaling Technologies #9492
Anti-caspasa 8	WB	1:1.000	Ratón	Cell Signaling Technologies #9746
Anti-caspasa 9	WB	1:1.000	Conejo	Cell Signaling Technologies #9502

Anti-GAPDH	WB	1:10.000	Ratón	Santa Cruz Biotechnology sc-166574
Anti-GAPDH	WB	1:20.000	Conejo	Santa Cruz Biotechnology sc-25778
Anti-HER2 (Ab3)	WB	1:10.000	Ratón	Calbiochem (La Joya, Estados Unidos) OP15
Anti-HER2 (29D8)	IF	1:1.000	Conejo	Cell Signaling Technologies #2165
Anti-HER2 (3B5)	IF	1:1.000	Ratón	Santa Cruz Biotechnology sc-33684
Anti-LAMP1	IF	1:100	Conejo	Cell Signaling Technologies #9091
Anti-LCN2	WB	1:10.000	Conejo	Cell Signaling Technologies #44058
Anti-MCL1	WB	1:2.000	Conejo	Santa Cruz Biotechnology sc-819
Anti-PARP	WB	1:5.000	Ratón	Santa Cruz Biotechnology sc-8007
Anti-PIP	WB	1:1.000	Ratón	Santa Cruz Biotechnology sc-59545
Anti-pTyr- HRP PY20	WB	1:10.000	Ratón	BD Biosciences 610012
Anti-pTyr PY99	WB	1:10.000	Ratón	Santa Cruz Biotechnology sc-7020
Anti-p21	WB	1:2000	Conejo	Cell Signaling Technologies #2947
Anti-p27	WB	1:5.000	Conejo	Cell Signaling Technologies #3686
Anti-Serpina E1	WB	1:10.000	Conejo	Cell Signaling Technologies #11907
Trastuzumab	IP/Cit	2 µg/ 10 nM	AcM	Roche
Anti-uPAR	WB	1:2.000	Conejo	Cell Signaling Technologies #12863
Anti-IgG de conejo-Cy3*	IF	1:1.000	Alpaca	Jackson Immunoresearch (West Grove, Estados Unidos) 611-165-215
Anti-IgG de conejo-HRP	WB	1:20.000	Cabra	Bio-Rad Laboratories 170-6515

Anti-IgG humana-Alexa Fluor™ 488*	IF	1:500	Alpaca	Jackson Immunoresearch 609-545-213
Anti-IgG humana-Cy3	Cit	1:80	Cabra	Jackson Immunoresearch 109-165-003
Anti-IgG humana-HRP	WB	1:50.000	Cabra	Jackson Immunoresearch 109-035-088
Anti-IgG de ratón-Cy5	IF	1:2.000	Cabra	Jackson Immunoresearch 115-175-166
Anti-IgG de ratón-HRP	WB	1:10.000	Oveja	GE Healthcare NA931

WB: Western Blot; IP: inmunoprecipitación; Cit: citometría de flujo; AcM: anticuerpo monoclonal; *Reacción cruzada mínima

2. CULTIVOS CELULARES

2.1. Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo son de origen humano y se detallan en la tabla 3. La línea celular BT474-RH, a la que nos referimos como BTRH, fue generada previamente en el laboratorio a partir de la línea parental BT474 mediante exposición continuada a trastuzumab (Díaz-Rodríguez *et al.* 2019). En un intento de aislar células muy sensibles a trastuzumab, se utilizaron dos estrategias. En primer lugar, se aislaron clones de la línea BT474 y se analizó su respuesta a trastuzumab 50 nM. En este proceso se aisló un clon hipersensible a trastuzumab, el BT474-SH, al que nos referimos como BTSH. Por otro lado, las células BT474 fueron sembradas a baja densidad en placas de 150 mm y se trataron con trastuzumab 50 nM durante dos meses. Se aislaron un total de 54 clones y se analizó su proliferación en presencia de trastuzumab 50 nM. Se seleccionaron tres clones muy resistentes: BT474-RT#1, BT474-RT#5 y BT474-RT#10, nombrados en este trabajo como RT#1, RT#5 y RT#10, respectivamente y un clon muy sensible a trastuzumab, el BT474-ST#35, al que llamaremos ST#35.

Tabla 3. Líneas celulares.

Línea celular	Tejido	Expresión de HER2	Sensibilidad a trastuzumab
BT474	Carcinoma ductal de mama	+	Sensible
BT474-RH (BTRH)	Carcinoma ductal de mama	+	Resistencia adquirida
BT474-RT#1	Carcinoma ductal de mama	+	Resistencia adquirida
BT474-RT#5	Carcinoma ductal de mama	+	Resistencia adquirida
BT474-RT#10	Carcinoma ductal de mama	+	Resistencia adquirida
BT474-SH (BTSH)	Carcinoma ductal de mama	+	Hipersensible
BT474-ST#35	Carcinoma ductal de mama	+	Hipersensible
SKBR3	Adenocarcinoma de mama	+	Sensible
HCC1419	Carcinoma ductal de mama	+	Resistencia primaria
HCC1569	Carcinoma de mama	+	Resistencia primaria
HCC1954	Carcinoma ductal de mama	+	Resistencia primaria
HCC2218	Carcinoma ductal de mama	+	Resistencia primaria
HEK293T	Riñón embrionario	-	-

2.2. Mantenimiento de líneas celulares

Las líneas celulares se cultivaron en placas de cultivo estériles en un incubador a 37°C con atmósfera húmeda al 5% de CO₂. Los medios de cultivo utilizados fueron Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con D-Glucosa 4,5 g/L, L-Glutamina 4 mM y piruvato sódico 5 mM o medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1610 con L-Glutamina 2 mM, ambos suplementados con FBS 10% y antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml). Las células BT474 (y las generadas a partir de ella), SKBR3 y HEK293T se cultivaron en DMEM mientras que las HCCs en RPMI. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80-90% se procedió a su subcultivo. Para ello, se lavaron con PBS (NaCl 137 mM; Na₂HPO₄ 7,98 mM; KCl 2,68 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM) estéril y se incubaron a

temperatura ambiente durante 2-5 minutos con 0,25% de tripsina-EDTA en PBS. Una vez despegadas, se neutralizó la acción de la tripsina con medio fresco suplementado con FBS y se hizo una dilución acorde con la tasa de proliferación de cada línea celular en una placa de cultivo nueva.

2.3. Preservación de líneas celulares

Las células fueron congeladas a partir de cultivos celulares en fase exponencial. Para ello, las células fueron despegadas de la placa siguiendo el protocolo descrito previamente y se transfirieron a un tubo de 15 ml. Se centrifugaron a 1.200 rpm (revoluciones por minuto) durante 3 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga Eppendorf 5810 R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). El pellet de células se resuspendió en 1,2 ml de medio de congelación (DMEM o RPMI con FBS 10% antibióticos 5% y DMSO 10% y fue transferido a un criovial. Los crioviales se mantuvieron a -80°C durante 24 horas, y posteriormente se pasaron a un tanque de nitrógeno líquido donde las células permanecieron almacenadas.

2.4. Descongelación de líneas celulares

Se descongelaron los crioviales de células procedentes del nitrógeno líquido en un baño termostático Grant SUB14 (Grant Instruments, Shepreth, Inglaterra) a 37°C. Se transfirió el contenido a un tubo de 15 ml con medio de cultivo fresco y se centrifugó como se ha descrito en el apartado anterior. El precipitado de células se resuspendió en medio de cultivo y se transfirió a una placa de cultivo estéril.

3. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA A TRASTUZUMAB *IN VIVO*

Se analizó la respuesta a trastuzumab *in vivo* en tumores generados por los modelos celulares resistentes a trastuzumab, BTRH, RT#1, RT#5 y RT#10, así como de la línea parental BT474 como control. Se inyectaron 5 millones de células por tumor en un volumen de 100 µl: 50 µl de matrigel y 50 µl de medio de cultivo. La inyección fue subcutánea haciéndola coincidir con la línea mamaria del ratón. En cada ratón se realizaron dos inyecciones, una en el lado derecho y otra en el

izquierdo. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 500 mm³, fueron tratados con trastuzumab 30 mg/kg semanalmente. Se monitorizó el crecimiento de los tumores dos veces a la semana. El volumen del tumor se calculó utilizando la fórmula: volumen = ancho² x longitud/2.

El experimento se realizó en la zona libre de patógenos del Animalario de la Universidad de Salamanca. Se utilizaron hembras de ratón BALB/c *nu/nu* de unas siete semanas de edad y peso en torno a 20 gramos de Charles River Laboratories (Wilmington, Estados Unidos).

4. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR

4.1. Contajes celulares

Las células se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos. La densidad celular de siembra varió desde 30.000 hasta 250.000 células por pocillo dependiendo de las condiciones experimentales (la línea celular, el fármaco y el número de días de tratamiento). Las células se incubaron durante 24 horas y una vez adheridas, se trataron con el fármaco correspondiente. Una vez finalizado el tratamiento, se tripsinizaron, se resuspendieron y se disgregaron en medio de cultivo suplementado con FBS. Las células se diluyeron (1:10) en ISOTON® y se realizó el recuento celular en un contador de partículas Z1 Coulter Particle Counter (Beckman Coulter) utilizando los vasos que proporciona el propio equipo. El contador detectó las partículas con un tamaño comprendido entre 8 y 24 µm. Se hicieron 3 réplicas de cada condición de tratamiento en cada experimento y se calculó el número de células como la media de los triplicados multiplicada por el factor de dilución.

4.2. Metabolización de MTT

Las células BT474, BTRH y BTSH se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 30.000 células. Tras 72 horas de incubación, se determinó la proliferación celular mediante metabolización de MMT. El MTT es un compuesto amarillo y soluble en agua que es metabolizado y reducido por las mitocondrias de las células vivas transformándolo en formazán, un compuesto insoluble en agua y de

color violeta (Mosmann 1983). Se adicionó MTT al medio de cultivo a una concentración final de 500 µg/ml y se incubó durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se aspiró el medio y se disolvieron los cristales de formazán añadiendo 500 µl de DMSO por pocillo. Las placas se incubaron en agitación y oscuridad durante 10 minutos y se leyó la absorbancia a 570 nm en el lector de placas automático Ultra Evolution 1536 (Tecan, Männedorf, Suiza).

5. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

5.1. Western Blot (WB)

5.1.1. Extracción y cuantificación de proteínas

El proceso de extracción de proteínas se realizó sobre hielo. Se descartó el sobrenadante y se lavaron las células adheridas con PBS frío dos veces. Se retiró el exceso de PBS y se añadió el tampón de lisis frío (1 % de Nonidet™ P-40; 10 % de glicerol; EDTA 5 mM; NaCl 140 mM; Tris-HCl 20 mM, pH 7,0; aprotinina 1 µg/ml; leupeptina 1 µg/ml; pepstatina 1 µM; PMSF 1 mM; β-glicerofosfato 25 mM; fluoruro sódico 10 mM; ortovanadato sódico 1 mM). Las células se incubaron durante unos 15 minutos con el tampón de lisis y se disgregaron mecánicamente de la placa con la ayuda de un raspador de células. El lisado se recogió en tubos de microcentrífuga y se centrifugaron a 13.000 rpm a 4°C durante 10 minutos en una centrífuga accuSpin Micro 17R (Thermo Fisher Scientific). El sobrenadante se recogió en un tubo nuevo y se cuantificó la concentración de proteínas utilizando el Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Este kit se basa en la reducción del cobre (Cu^{2+} a Cu^{1+}) por reacción con las proteínas con la posterior detección colorimétrica de Cu^{1+} por el ácido bicinconínico (BCA) (Smith *et al.*, 1985). Se detectó la absorbancia a 570 nm en el lector de placas Ultra Evolution 1536 y se calculó la concentración de proteínas extrapolando los valores medios de absorbancia a los obtenidos con una recta patrón de BSA.

Para el análisis de proteínas implicadas en la apoptosis o ciclo celular, se recogieron las células no adheridas que se encontraban en el sobrenadante celular y fueron lisadas junto a las adheridas a la placa.

5.1.2. Inmunoprecipitación (IP)

Las proteínas fueron inmunoprecipitadas utilizando distintas cantidades de extracto, desde 50 µg hasta 1 mg, dependiendo de las condiciones experimentales. El extracto se llevó a un volumen final de 1 ml con tampón de lisis frío, al que se añadieron 60 µl de proteína A-Sefarosa® CL4B junto con el anticuerpo correspondiente. Esta mezcla se mantuvo en agitación a 4°C durante al menos 2 horas para favorecer la formación de los inmunocomplejos. Posteriormente, los complejos se precipitaron mediante centrifugación en accuSpin Micro 17 (Thermo Fisher Scientific) durante 15 segundos y se lavaron tres veces con tampón de lisis frío. Finalmente, los inmunocomplejos se resuspendieron en 30 µl de tampón de carga 2X (azul de bromofenol 0,05%; SDS 4%; glicerol 20%; β-mercaptoetanol 2%; Tris-HCl 100 mM, pH 6,8).

5.1.2.1. Inmunoprecipitación de HER2 de superficie

Las líneas BT474, BTRH y BTSH se sembraron en placas de 100 mm. Una vez adheridas, se trataron con trastuzumab 10 nM durante 1 hora a 4°C en tampón Krebs-Ringer-HEPES (KRH; NaCl 140 mM; KCl 5 mM; MgSO₄ 5 mM; KH₂PO₄ 1,2 mM; glucosa 6 mM; HEPES 50 mM, pH 7,4). Trascurrido el tiempo de incubación, las placas fueron lavadas dos veces con PBS frío y las células se lisaron siguiendo el protocolo estándar. Se inmunoprecipitaron 100 µg de extracto con proteína A-sefarosa® y se detectó HER2 total y HER2 fosforilado mediante WB.

5.1.3. Detección y concentración de proteínas secretadas al medio de cultivo

La cantidad de LCN2, serpina E1, uPAR y PIP secretada en el sobrenadante celular fue analizada mediante WB. Para ello, las células fueron serodeprivadas durante 24 horas. Se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 1.200 rpm en una Eppendorf 5810 R durante 3 minutos para precipitar y descartar los restos celulares.

Además, las células fueron lisadas y el extracto celular se cuantificó siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Una vez conocida la concentración de proteínas en el lisado, se utilizó este dato para calcular la cantidad de sobrenadante necesario para que fuese proporcional a la cantidad de células que lo habían secretado (la cantidad de células se determinó como concentración de proteínas en el extracto). La detección de las proteínas secretadas se realizó directamente en el medio condicionado (MC) si la proteína era muy abundante. Sin embargo, para proteínas menos abundantes fue necesario concentrar el medio condicionado de una o varias placas de células. Para ello, se utilizaron filtros Amicon® Ultra de 3 ó 10K hasta dejar las proteínas secretadas en un volumen final entre 250 y 500 µl, dependiendo del experimento. El volumen de MC o medio condicionado concentrado (MCC) de interés se mezcló con el mismo volumen de tampón de carga 2X y se cargaron en geles de poliacrilamida, siguiendo el mismo protocolo que en el caso de los extractos de proteínas.

5.1.4. Electroforesis y WB

La separación de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). El porcentaje de poliacrilamida de los geles se eligió de acuerdo al peso molecular de la proteína a detectar. Las muestras se desnaturizaron durante 7 minutos a 100°C en un termobloque. Los geles de poliacrilamida se montaron en una cubeta de electroforesis pequeña Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Estados Unidos) o en una grande de tipo Sturdier. Las proteínas fueron separadas con un tampón de electroforesis (SDS 0,1%; glicina 192 mM; Tris 25 mM) y se sometieron a un voltaje de 100-150 V en caso de los geles pequeños o de 150-200 V en los geles grandes.

Una vez finalizada la electroforesis, la transferencia de las proteínas se realizó de dos formas:

1. Transferencia húmeda. Se utilizó una membrana Immobilon®-P de PVDF de 0,45 µm de tamaño de poro con el sistema de transferencia Trans-Blot® Cell (Bio-Rad Laboratories). La transferencia tuvo lugar a 500 mA durante un

tiempo de acuerdo al porcentaje de poliacrilamida y las dimensiones del gel o a un voltaje constante de 20 V durante 14 horas utilizando el tampón de transferencia (Glicina 192 mM; Tris 25 mM).

2. Transferencia semiseca. Se utilizó el sistema de transferencia rápida TransBlot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad Laboratories) y los kits Trans Blot Turbo Mini 0,2 µm PVDF Transfer Packs (Bio-Rad Laboratories), siguiendo las instrucciones de voltaje, amperaje y tiempo indicadas por el fabricante de acuerdo al porcentaje de poliacrilamida del gel.

A continuación, las membranas se bloquearon con tampón de bloqueo (BSA 1% en TBS-T (Tween® 20 0,1%; NaCl 150 mM; Tris-HCl 20 mM, pH 7,5)) durante al menos 1 hora a temperatura ambiente. Una vez bloqueadas las uniones inespecíficas, se incubó el anticuerpo primario diluído en TBS-T, tampón de bloqueo o leche al 5% en TBS-T (dependiendo del anticuerpo) durante al menos 2 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. Las membranas se lavaron tres veces con TBS-T durante 7 minutos en un agitador Orbital Boeco OS-20 y se incubó el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) diluído en TBS-T o en leche al 5% durante 30 minutos a temperatura ambiente. De nuevo, se realizaron tres lavados con TBS-T. Las incubaciones del tampón de bloqueo como de los anticuerpos se realizaron en un balancín Boekel Rocker II (Boekel Scientific, Feasterville-Treose, Estados Unidos). Las membranas se incubaron durante 1 minuto en solución de revelado convencional (luminol 0,08%; p-iodofenol 0,02%; Tris-HCl 0,1 M, pH 9,35) a la que se le añadió H₂O₂ 0,44M o durante 5 minutos en solución de revelado más sensible, añadiendo el mismo volumen de la solución A (Tris-HCl 0,3 M pH 8,9; luminol 10 mM; PTZ-343 6 mM; Imidazol 1mM) y la solución B (Tampón acetato 50 mM pH 5; NaBO₃·H₂O 8 mM).

La detección de proteínas se realizó con películas Agfa CP-BU NEW o en el equipo ChemiDoc MP System (Bio-Rad Laboratories). La cuantificación de bandas se realizó con los softwares ImageJ o Image Lab (Bio-Rad Laboratories).

5.1.5. Arrays de proteínas

5.1.5.1. Array de citoquinas y array de proteasas e inhibidores de proteasas

Un total de 105 proteínas solubles (citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento) secretadas por las células BT474, BTRH y BTSH fue determinada de forma simultánea utilizando el *array* de anticuerpos Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit (R&D Systems, Mineápolis, Estados Unidos). Las células fueron sembradas en placas de 100 mm y crecidas hasta llegar a confluencia. En este momento, las células fueron serodeprivadas y tras 24 horas, se recogieron los sobrenadantes celulares y se lisaron las células siguiendo el protocolo previamente descrito. Se determinó la concentración de proteínas en el extracto e incubamos en el *array* de anticuerpos la cantidad de medio condicionado proporcional a la concentración de proteínas en el extracto. Con esto se consiguió incubar la misma cantidad total de proteínas secretadas al medio. El experimento se desarrolló siguiendo los pasos indicados por el fabricante. De la misma manera, se determinó la cantidad de proteasas e inhibidores de proteasas secretados por las células BT474 y BTRH utilizando el *array* de anticuerpos Proteome Profiler Human Protease/Protease Inhibitor Array Kit (R&D Systems). Los sobrenadantes celulares fueron recogidos de forma independiente en ambos experimentos, La cuantificación de los *dotblots* se realizó con el programa Image Studio Lite 3 (LI-COR Biosciences, Lincoln, Estados Unidos).

La caracterización funcional de los genes que codifican las proteínas solubles diferencialmente expresadas entre BT474, BTRH y BTSH fue realizado con la herramienta web Enrichr (Chen 2013, Kuleshov 2016). Los procesos biológicos en los que participaban los genes se obtuvieron con los datos recogidos en Reactome.

5.1.5.2. Array de apoptosis

Las células fueron sembradas en placas de 100 mm e incubadas en ausencia (control) o presencia de trastuzumab 50 nM durante 6 días. Transcurrido este tiempo, se recogieron los sobrenadantes celulares y se centrifugaron para bajar las células no

adheridas y lisarlas de forma convencional junto con las adheridas a la placa de cultivo. Los extractos de proteínas fueron cuantificados y se detectó la expresión de 35 proteínas relacionadas con la apoptosis utilizando el *array* Proteome Profiler Human Apoptosis Array Kit (R&D Systems), siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación de los *dotblots* se realizó con el programa Image Lab.

5.1.6. Análisis de la vida media de HER2 tras el tratamiento con trastuzumab

Las células BT474, BTRH y BTSH fueron sembradas a una densidad de un millón de células en placas de 60 mm. Una vez adheridas, se lavaron dos veces con PBS suplementado con 1 mM CaCl₂ y 0,5 mM MgCl₂ (PBS++) frío y se marcaron con sulfo-NHS-biotina a 0,25 mg/ml durante 30 minutos a 4°C. A continuación, se realizaron dos lavados con PBS++ y se incubaron durante 10 minutos con NH₄Cl 50 mM a 4°C para neutralizar la biotina no unida. Se realizaron otros dos lavados con PBS++ y las células fueron incubadas con medio fresco con o sin trastuzumab 50 nM a 37 °C durante 24 y 48 horas, respectivamente. Una vez transcurridos los tiempos de incubación indicados, las células se lisaron y se precipitaron 50 µg de extracto con 30 µl de pertuzumab-Affi-Gel10. Se detectó HER2 biotinilado con estreptavidina-HRP (1:50.000).

5.1.7. Detección de HER2 en superficie tras el tratamiento con trastuzumab

Las células BT474, BTRH y BTSH fueron sembradas en placas de 60 mm y una vez adheridas fueron incubadas en ausencia o presencia de trastuzumab 50 nM durante 48 horas. Una vez finalizado el tratamiento, las células se marcaron con sulfo-NHS-biotina como se describe en el apartado anterior. Así, las proteínas que se encontraban en la superficie celular fueron biotiniladas. Las células se lisaron de forma convencional y se precipitaron 50 µg de extracto con 30 µl estreptavidina-sefarosa. Se detectó HER2 con el anticuerpo anti-HER2 (Ab3) y el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón-HRP.

5.2. Inmunofluorescencia (IF)

La detección de proteínas mediante IF se realizó siguiendo el protocolo que se describe a continuación con pequeñas modificaciones de acuerdo con el experimento. Las células se sembraron sobre cubres en placas de cultivo y se incubaron a 37°C. Posteriormente, fueron lavadas con PBS++ y fijadas con paraformaldehído al 2% durante 30 minutos. A continuación, las células fueron lavadas dos veces con PBS++ para retirar el exceso de paraformaldehído y se realizó una neutralización con NH₄Cl 50 mM durante 10 minutos. Seguidamente, las células fueron permeabilizadas con tritón X100 al 0,1% en PBS++ mediante tres incubaciones de 10 minutos. Las uniones inespecíficas fueron bloqueadas mediante dos lavados de 15 minutos con BSA al 0,2% en PBS++. Se incubó el anticuerpo primario diluído en tampón de bloqueo durante al menos 1 hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. A continuación, se hicieron tres lavados de 10 minutos con tampón de bloqueo para retirar el exceso de anticuerpo primario y las células se incubaron con el anticuerpo secundario diluído en tampón de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el exceso de anticuerpo secundario mediante tres lavados con tampón de bloqueo y los núcleos fueron teñidos con DAPI 1 µg/ml durante 10 segundos. Finalmente, los cubres se montaron sobre los portaobjetos con gelvatol (mowiol 12%; glicerol 30%; Tris 0,12 M pH 8,5).

Las imágenes fueron adquiridas en el microscopio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

5.2.1. Detección de HER2 en superficie

Las líneas celulares BT474, BTRH y BTSH fueron sembradas en cubres. Una vez adheridas, se trataron con trastuzumab 10 nM durante 1 hora a 4°C en KRH y se siguió el protocolo de IF estándar. En este caso, el tratamiento con el anticuerpo primario tuvo lugar *in vivo* y se utilizó el anticuerpo secundario anti-IgG humana-Alexa Fluor™ 488.

5.2.2. Detección de trastuzumab, HER2 y marcaje de lisosomas

Las células BT474, BTRH, BTSH, RT#10 y ST#35 fueron sembradas sobre cubres y una vez adheridas fueron tratadas con trastuzumab 10 nM durante 15 minutos a 37°C. Se retiró el exceso de trastuzumab, las células fueron lavadas dos veces con PBS y se añadió medio de cultivo fresco atemperado. Las células fueron incubadas durante 1, 3, 6, 24 y 48 horas a 37°C para permitir la internalización de trastuzumab. El tiempo cero de internalización se realizó incubando trastuzumab a 4°C durante 1h en KRH. A continuación, se siguió el protocolo estándar de IF. Trastuzumab se detectó con anti-IgG humana-Alexa Fluor™ 488, HER2 con anti-HER2 (3B5) y anti-IgG de ratón-Cy5 y los lisosomas con anti-LAMP1 y anti-IgG de conejo-Cy3.

Los estudios de colocalización de trastuzumab con LAMP1, trastuzumab con HER2 y HER2 con LAMP1 se realizaron con el programa Fiji-ImageJ, utilizando Coloc 2 y se determinó el coeficiente de correlación de Pearson.

6. CITOMETRIA DE FLUJO

6.1. Entrada de células en fase S

Para analizar el efecto de trastuzumab sobre la entrada de las células en fase S, se sembraron 80.000 células BTRH y SKBR3 y 100.000 células BT474 y BTSH en placas de 60 mm y fueron incubadas durante 120 horas a 37°C en ausencia (control) o presencia de trastuzumab 50 nM. Se añadió un pulso de bromodesoxiuridina (BrdU) 10 µM 12 horas antes de la finalización del tratamiento. Las células fueron tripsinizadas y procesadas utilizando el FITC-BrdU Flow Kit (BD Biosciences), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Durante este proceso, las células se fijaron y permeabilizaron y fueron tratadas con DNasa 300 µg/ml para exponer la BrdU incorporada. A continuación, se incubaron con el anticuerpo anti-BrdU-FITC y 7-aminoactinomicina D. Finalmente, las células fueron resuspendidas en PBS con FBS 3% y se adquirieron 50.000 eventos en el citómetro Accuri™ C6 (BD Biosciences). Se analizó el porcentaje de células en fase S utilizando el programa del propio equipo C6 Analysis software (BD Biosciences).

6.2. Ciclo celular

El análisis del efecto de trastuzumab sobre la progresión en el ciclo celular se realizó mediante una tinción convencional con yoduro de propidio (PI), un agente que se intercala en el DNA. Las células BT474, BTRH y BTSH fueron sembradas en placas de 60 mm e incubadas en ausencia o presencia de trastuzumab 50 nM durante 6 días a 37°C. Una vez finalizado el tratamiento, se recogieron los sobrenadantes celulares con las células no adheridas y se tripsinizaron las células adheridas. Se realizaron dos lavados con PBS frío para retirar los restos de medio de cultivo y posteriormente, las células fueron fijadas y permeabilizadas, resuspendiéndolas en 1 ml de etanol 70% frío con la ayuda de un vórtex en agitación suave. Se almacenaron a -20°C durante 24 horas. Al día siguiente, se retiraron los restos de etanol y las células se lavaron dos veces con PBS. Las células se resuspendieron en 400 µl de PBS con 500 µg/mL de RNasa libre de DNasa y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. A continuación, se añadió PI (5 µg/ml) y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se adquirieron 50.000 eventos de cada muestra en el citómetro BD AccuriTM C6 y se utilizó el mismo software para el análisis de los datos. Se determinaron los porcentajes de células en las fases G0/G1 y S + G2/M del ciclo celular. El experimento fue repetido en tres ocasiones.

6.3. Apoptosis

El análisis de la muerte celular por apoptosis se realizó marcando a las células con PI y Anexina V conjugada a FITC. Las células BT474 y SKBR3 fueron sembradas en placas de 60 mm. Una vez adheridas, se incubaron en ausencia (control) o presencia de trastuzumab 50 nM durante 96 horas a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, se recogieron los sobrenadantes celulares y se tripsinizaron las células adheridas. Se realizaron dos lavados con PBS para eliminar los restos de medio de cultivo y las células se resuspendieron en 200 µl de tampón de unión frío (CaCl₂ 2,5 mM; NaCl 140 mM; HEPES 10 mM, pH 7,4). Las células se marcaron con 5 µl de PI (50 mg/ml) y 5 µl de Anexina V-FITC. Las muestras se mezclaron suavemente y se incubaron durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se adquirieron 50.000 eventos de cada muestra en el

citómetro BD Accuri™ C6. El análisis de datos se realizó con el programa C6 Analysis Software y se calculó el porcentaje de células viables y no viables para cada condición. Se incluyeron controles de células sin marcar y células marcadas solo con PI o Anexina V.

El análisis de apoptosis en las células hipersensibles BTSH y ST#35 se realizó de forma similar a lo descrito anteriormente. En este caso, las células fueron sembradas en placas de 100 mm e incubadas durante 6 días a 37°C en ausencia (control) o presencia de trastuzumab 50 nM. En estos experimentos también fueron incluidas las células BT474 y BTRH.

6.4. Marcaje de HER2 en superficie

Las células BT474, BTRH y BTSH fueron sembradas en placas de 100 mm. En este caso, las células se lavaron con PBS y se tripsinizaron con tripsina-EDTA al 0,05% para evitar dañar las proteínas de membrana. Se resuspendieron en medio de cultivo para bloquear la acción de la tripsina y se centrifugaron durante 3 minutos a 1.200 rpm en una Eppendorf 5810 R.

A continuación, se resuspendieron en PBS suplementado con FBS al 1% y se incubaron con trastuzumab 10 nM durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Las células se centrifugaron para retirar el anticuerpo primario y se lavaron dos veces con PBS con FBS al 1%. Las células se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG humana-Cy3 durante 30 minutos en agitación y oscuridad. Seguidamente, se repitieron los pasos de centrifugación y lavado del anticuerpo secundario. Finalmente, las células se resuspendieron en PBS y se detectaron los niveles de HER2 en superficie en el citómetro BD Accuri™ C6. El procesamiento de los datos se realizó con el mismo software. Este experimento fue repetido dos veces. Para cada línea celular, se utilizó un control sin marcar y un control al que solo se le añadió el anticuerpo secundario.

6.5. Detección de trastuzumab acoplado a pHrodo™

Para analizar la internalización de trastuzumab y su llegada a los lisosomas, se conjugó dicho anticuerpo al reactivo pHrodo™ utilizando el pHrodo™ Red Microscale Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific). El pHrodo es un colorante fluorogénico que no emite fluorescencia cuando el pH es neutro pero sí cuando el pH es ácido (Nath *et al.*, 2016). De esta manera, podemos saber si trastuzumab internaliza y llega a compartimentos ácidos en el interior de la célula como son los lisosomas, donde tiene lugar su degradación. El acoplamiento de trastuzumab a pHrodo™ se realizó siguiendo las instrucciones indicadas en el kit. Se conjugaron 100 µg de trastuzumab con 0,65 µl de pHrodo™ que habían sido resuspendidos en 10 µl de DMSO justo antes de su uso. La reacción de conjugación tuvo lugar durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se separó el trastuzumab conjugado a pHrodo™ del exceso de reactivo no conjugado utilizando columnas de centrifugación que contenían una resina. La mezcla de reacción se precipitó sobre el centro del lecho de la resina y se centrifugó a 1.000 g durante 5 minutos. El exceso de reactivo que no se unió a trastuzumab quedó retenido en la resina y el conjugado purificado quedó en el tubo colector. Para cuantificar la concentración del conjugado se cargaron concentraciones conocidas de trastuzumab (100 ng, 1 µg) y concentraciones equivalentes del conjugado en un gel de poliacrilamida al 12%. Una vez finalizada la electroforesis, el gel fue teñido con BlueSafe y las bandas fueron detectadas por colorimetría con el equipo ChemiDoc. Las bandas fueron cuantificadas con Image Lab y se extrapoló la concentración de trastuzumab para determinar la del conjugado.

Se sembraron 200.000 células BT474, BTRH, BTSH, RT#10 y ST#35 en placas de 35 mm y fueron tratadas con trastuzumab-pHrodo 10 nM durante 6, 12, 24 y 48 horas a 37°C. Transcurridos los tiempos de incubación, las células se tripsinizaron y se analizó el porcentaje de células marcadas (FL2+) mediante el citómetro Accuri C6. Los datos fueron analizados en el software del propio citómetro. Como control se utilizaron células correspondientes a cada línea celular que no habían sido tratadas.

7. ENSAYOS DE ACTIVIDAD CASPASA 3

Los lisados celulares correspondientes a las células BT474, BTRH y BTSH se obtuvieron como se describe en el *array* de apoptosis (apartado 5.1.5.2.). Para medir la actividad caspasa 3 se utilizó el sustrato fluorogénico Ac-DEVD-AFC. En una placa de 96 pocillos opaca con fondo plano, se añadieron 50 µg de extracto proteico que se llevaron hasta un volumen de 200 µl con el tampón de actividad caspasa (EDTA 1 mM; NaCl 150 mM; sacarosa 10%; CHAPS 0,1%; HEPES 25 mM, pH 7,4) suplementado con ditioneitol 20 mM y con el sustrato Ac-DEVD-AFC 10 mM. La placa se agitó lentamente en un agitador orbital y se incubó durante 1 hora a 37°C. La lectura de fluorescencia se realizó en un lector de placas Synergy™ 4 (BioTek Instruments, Winooski, Estados Unidos) que contiene el programa Gene5 Data Analysis de la misma casa comercial. La longitud de onda de excitación fue 400 nm y la de emisión de 505 nm.

Se incluyó un control negativo de la reacción que no contenía extracto de proteínas, solo 200 µl del tampón de actividad caspasa. La actividad caspasa 3 fue determinada restando a cada muestra la actividad del control negativo. Cada reacción se llevó a cabo por triplicado.

8. SILENCIAMIENTO GÉNICO EN LÍNEAS CELULARES

Los experimentos de silenciamiento génico se realizaron mediante la transducción con lentivirus de las células diana: BT474, BTRH y BTSH en el caso de *HER2* y BT474, BTRH y HCC1569 en el de *LCN2*. Para la producción de lentivirus se utilizaron las células HEK293T que fueron sembradas a una densidad de 2,5 millones en placas de 100 mm. Tras 24 horas, las células HEK293T fueron transfectadas con 4 plásmidos:

- 1) Plásmido lentiviral (4 µg). Plásmido pLKO.1 con resistencia a puromicina que contiene un shRNA (*short hairpin* RNA) no codificante (shControl) o un shRNA contra el gen de interés (shHER2 o shLCN2).

- 2) pMD2.G-VSV-G (8 µg). Contiene el gen *vsv-g*, para la formación de la envuelta del virus.
- 3) pMDL-RRE (8 µg). Contiene los genes *gag* y *pol*, que codifican proteínas estructurales y enzimas para empaquetar el RNA y la región RRE, sitio de unión de la proteína Rev.
- 4) pRSV-Rev (8 µg). Contiene el gen *rev*, que codifica la proteína que permite la exportación del núcleo al citoplasma de RNA que contienen RRE.

La co-transfección de estos plásmidos se realizó utilizando JetPEI®, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Se mezclaron los cuatro plásmidos en un tubo y se llevaron a un volumen final de 250 µl de NaCl 150 mM. En otro tubo, se mezclaron 40 µl de JetPEI® con 210 µl de NaCl 150 mM. A continuación, se añadió el contenido del segundo tubo al que contenía los plásmidos. La mezcla se incubó durante 25-30 minutos a temperatura ambiente, para favorecer la formación de los complejos. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron los 500 µl sobre las células HEK293T, gota a gota con una pipeta. A las 24 horas de la transfección, se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco. Pasadas 48 horas desde la transfección, se recogió el sobrenadante de las células HEK293T que contenía los lentivirus producidos y se filtró con filtros de 0,45 µm de tamaño de poro para retener las células. A este sobrenadante se le añadió polibreno a 6 µg/ml para aumentar la eficiencia de la transducción y se infectaron las células diana con los lentivirus. El proceso de transducción celular se repitió pasadas 8-9 horas. Transcurridas 24 horas de la primera transducción, se retiró el medio con los lentivirus y se cambió por medio de cultivo fresco. Transcurridas 48-72 horas, las células que habían sido infectadas se seleccionaron con puromicina 3 µg/ml durante 48 horas, ya que el plásmido pLKO.1 contiene el gen de resistencia a puromicina. Una vez seleccionadas, las células fueron lisadas y se analizó por WB la eficiencia del silenciamiento génico. Además, las células se plaquearon para realizar los ensayos de proliferación celular.

Se probaron cinco secuencias diferentes de shRNA contra *HER2* o *LCN2* y se seleccionaron las dos que produjeron un mayor silenciamiento génico.

9. ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

9.1. Adhesión al sustrato

El ensayo de adhesión a sustrato se realizó utilizando la proteína fibronectina (FN). En primer lugar, las placas de 35 mm fueron tratadas con FN 20 µg/ml en PBS durante 1 hora a 37°C. Se retiró el exceso de FN y se realizaron dos lavados con PBS. Las placas se dejaron en hielo hasta que las células fueron sembradas. Durante el pretratamiento de la placa, se preparó una suspensión celular para plaquear un total de 250.000 células BT474, BTRH y BTSH en cada placa. Las células fueron sembradas e incubadas durante 30 minutos, 1 y 2 horas a 37°C. Transcurridos los tiempos de incubación, el medio de cultivo fue retirado y se realizaron dos lavados con PBS para retirar las células no adheridas. Las células adheridas fueron fijadas con paraformaldehído al 2% durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas dos veces con PBS para retirar el exceso de paraformaldehído y las células fijadas se tiñeron con cristal violeta 5 mg/ml en agua durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se retiró el cristal violeta y se lavó el exceso del colorante con abundante agua.

Para cuantificar el número de células adheridas se hicieron fotos de varios campos representativos de cada placa con el microscopio EVOS Fluid Cell Imaging Station (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos). Se calculó finalmente la media del número de células adheridas por área. Las células fueron contadas con ayuda del programa ImageJ.

9.2. Migración celular

La capacidad migratoria de las células fue evaluada mediante experimentos de cierre de herida en placa. Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos que contenían un inserto de silicona que contiene 3 áreas separadas por una herida de 500 µm. Se sembraron 5 millones de células BT474, 4,5 millones de BTRH y 6 millones de BTSH. Pasadas 24 horas, cuando las células llegaron a confluencia, la silicona fue retirada con la ayuda de unas pinzas estériles y se añadió medio fresco con mitomicina C a 2,5 µg/ml. El cierre de la herida fue monitorizado a través de la

captura de imágenes cada 2 horas de distintas heridas durante 48 horas. Se utilizó el microscopio Nikon Eclipse TE2000-E con un objetivo 10X. Se utilizó el programa MetaMorph® Microscopy Automation and Image Analysis Software (Molecular Devices, Sunnyvale, Estados Unidos) para la toma de imágenes. El área de la herida a tiempo cero y a tiempo final fue calculada utilizando el programa ImageJ. Los datos se representaron como el área de la herida respecto al área inicial al que se le asignó el valor de 100%.

10. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE MICROARRAYS

10.1. Extracción y purificación de RNA

Las células BT474, BTRH y BTSH fueron sembradas en placas de 100 mm hasta que llegaron a una confluencia del 80%. Se retiró el sobrenadante y se lavaron las células dos veces con PBS frío. A continuación, se retiró el exceso de PBS y se añadió 1 ml de TRIZOL™. Las células se recogieron con la ayuda de un raspador. Tras el lisado de las células con TRIZOL™, se añadieron 200 µl de cloroformo por muestra, se agitó manualmente con fuerza durante 15 segundos y se incubaron durante 3 minutos. Las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm en una centrífuga Eppendorf 5417R a 4°C durante 15 minutos. El resultado de esta centrifugación fue la obtención de 3 fases: 1) fase superior acuosa que contenía el RNA; 2) fase intermedia blanca que contenía el DNA; 3) fase inferior de color rosa que contenía las proteínas. Se recogió la fase superior, a la que se añadieron 500 µl de isopropanol con el objetivo de precipitar el RNA. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 10 minutos a 12.000 rpm a 4°C. El RNA precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 75% y se centrifugó a 7.500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se retiró el exceso de etanol y se dejó secar durante 10 minutos. Finalmente, el RNA se resuspendió en agua libre de RNasas. El RNA se purificó utilizando el RNeasy mini Kit de Qiagen (Hilden, Alemania), siguiendo el protocolo indicado en el propio kit. El RNA se conservó a -80°C hasta su uso. Cada muestra se obtuvo por triplicado en días diferentes.

10.2. Cuantificación, análisis de pureza e hibridación

La cuantificación y el análisis de pureza del RNA se hicieron en un equipo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos). Se sintetizó el cDNA y se hibridó en los *microarrays* HuGene 2.0. ST de Affymetrix (Santa Clara, Estados Unidos). Esta metodología fue realizada en el Servicio de Genómica del Centro de Investigación del Cáncer.

10.3. Análisis de datos

Los datos de la hibridación se obtuvieron como archivos raw.CEL que se normalizaron utilizando el programa Expression Console 1.4 (Affymetrix). Seguidamente, el análisis de genes diferencialmente expresados (GDEs) entre las líneas BT474, BTRH y BTSH y el análisis de componentes principales se realizaron con el programa Transcription Analysis Console 4.0 (Affymetrix). Los genes se identificaron como GDEs cuando su tasa de cambio era ≥ 2 ó ≤ -2 y p -valor $\leq 0,05$.

10.4. Identificación de genes diferencialmente expresados con “signo opuesto”

Se identificaron los genes significativos cuya tasa de cambio tenía “signo opuesto” entre las células BTRH y BTSH respecto a la línea parental BT474. Es decir, los genes que estaban sobreexpresados en BTRH e infraexpresados, a su vez, en BTSH respecto a la línea parental y al contrario (sobreexpresados en BTSH e infraexpresados en BTRH).

10.4.1. Análisis de pronóstico con Kaplan Meier Plotter

Se evaluó la capacidad de los genes seleccionados para predecir pronóstico utilizando la herramienta bioinformática Kaplan Meier Plotter (KM plotter) (Györfy *et al.*, 2010). Las pacientes se dividieron en expresión alta y baja por los cuartiles uno y cuatro y se analizó el valor pronóstico de los genes utilizando la RFS, restringiendo el análisis a pacientes HER2+. Se seleccionaron los genes significativos (logrank $p < 0,05$) y que, en nuestro caso particular, su sobreexpresión o infraexpresión fuese coherente con los datos de expresión génica de nuestros modelos celulares. Es decir,

que genes sobreexpresados en la línea BTSH fuesen indicativos de mejor pronóstico en pacientes y al contrario con los que estaban altamente expresados en BTRH. En el caso de la firma génica, se seleccionó la herramienta de clasificación multigénica para analizar la expresión génica combinada de los cuatro genes indicados.

10.4.2. Análisis predictivos con ROC plotter

Se evaluó si los genes seleccionados podían predecir respuesta a trastuzumab utilizando la herramienta ROC plotter (Fekete y Gyórfy, 2019). Se analizó si la expresión de los genes predecía respuesta patológica completa en pacientes con cáncer de mama HER2+ que hubiesen sido tratadas con trastuzumab. Se seleccionaron los genes cuya área bajo la curva (AUC) fuese mayor a 0,6, ya que por debajo de este valor su efecto es pequeño para que pueda ser utilizado como biomarcador en la clínica, p -valor de la curva ROC $< 0,05$. El p -valor del test U de Mann Whitney $< 0,05$ indicaba que las diferencias en expresión génica entre respondedoras y no respondedoras eran significativas. En el caso de las firmas génicas, se seleccionó la opción “Signature”.

10.4.3. Caracterización funcional con GSEA

Se realizó un análisis funcional de enriquecimiento génico con los datos de expresión génica de los *microarrays* con el programa GSEA (Mootha *et al.*, 2003; Subramanian *et al.*, 2005). Este programa permite identificar conjuntos de genes pertenecientes a una categoría funcional que presentan diferencias de expresión significativas entre dos líneas celulares. En el programa se introdujeron los datos de *microarrays* normalizados en formato TXT. Se seleccionaron firmas moleculares relacionadas con los procesos de adhesión, transición epitelio mesénquima y migración celular y el número de permutaciones realizadas fue de 1.000. El análisis reporta una puntuación de enriquecimiento normalizada (NES), que era positiva si la firma estaba enriquecida en BTRH o BTSH y negativa si estaba enriquecida en BT474. Se seleccionaron como significativas las firmas cuyo FDR q -valor $< 25\%$ ya que la propia herramienta indica que estos datos generan hipótesis interesantes.

10.5. Análisis predictivos con datos de pacientes del ensayo clínico PAMELA

Se evaluó si los GDEs entre BTRH o BTSH respecto a la línea parental predecían respuesta a trastuzumab utilizando los datos de expresión génica de tumores de pacientes con cáncer de mama HER2+ pertenecientes al ensayo clínico PAMELA (Llombart-Cussac *et al.*, 2017). Con este fin, se generó una firma génica de resistencia y otra de hipersensibilidad a trastuzumab, solapando los GDEs en las células BTRH y BTSH respecto a la línea parental que habían sido identificados en los *microarrays*, con el panel de 560 genes obtenidos con la plataforma nCounter utilizada para obtener los datos de expresión génica de los tumores de las pacientes (Brasó-Maristany *et al.*, 2020; Llombart-Cussac *et al.*, 2017).

En el ensayo clínico PAMELA, 151 pacientes con cáncer de mama HER2+ fueron tratadas con lapatinib y trastuzumab. Las muestras tumorales se recogieron en el inicio del tratamiento, a día 14 y en la cirugía. Los resultados principales del ensayo clínico PAMELA se describen en (Llombart-Cussac *et al.*, 2017).

Las firmas génicas de resistencia e hipersensibilidad a trastuzumab fueron evaluadas en las muestras tumorales del ensayo clínico PAMELA como la suma de la media de los genes sobreexpresados o infraexpresados. Las firmas de expresión génica fueron evaluadas en las muestras tumorales al inicio del tratamiento y se determinó su asociación con el subtipo *normal-like* (determinado con PAM50) a día 14, RPC y carga tumoral residual (CTR) en la cirugía. El análisis se realizó en todas las muestras tumorales al inicio del tratamiento (n=151).

11. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR

11.1. Extracción y cuantificación de RNA

Las células BT474, BTRH y BTSH se sembraron en placas de 100 mm y se dejaron crecer hasta llegar a una fase de crecimiento exponencial, momento en el que se procedió a la extracción de RNA. Se retiró el sobrenadante celular y las células se lavaron dos veces con PBS frío. La extracción de RNA se realizó con el kit

PureLink™ RNA Mini Kit (Life Technologies), siguiendo el protocolo indicado en el mismo. La cantidad y la pureza del RNA se midió en un Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). El RNA se almacenó a -80°C hasta su uso.

11.2. Retrotranscripción

La síntesis de cDNA se realizó utilizando la transcriptasa reversa M-MLV. Para retrotranscribir 2 µg de RNA total, se utilizaron 0,5 µl de oligo-dT como cebadores y 1 µl de una mezcla de dNTPs 10 mM que se llevaron a un volumen de 12 µl con agua milli-Q®. A continuación, las muestras se incubaron a 65°C durante 5 minutos y seguidamente, se dio un choque térmico en hielo. Se añadió 4 µl de tampón de reacción 5X específico de la enzima, 2 µl de DTT 0,1 M y 1 µl de inhibidor de RNAsas RNasin® y se incubó la mezcla a 37°C durante 2 minutos. Por último, se añadió 1 µl de la enzima M-MLV (200 unidades). La reacción transcurrió a 37°C durante 50 minutos y posteriormente, se elevó la temperatura a 70°C durante 15 minutos más para que tuviese lugar la inactivación de la retrotranscriptasa. La reacción se realizó en el termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Waltham, Estados Unidos). El cDNA se almacenó a -20°C hasta su uso.

11.3. PCR semicuantitativa

Los oligonucleótidos que posteriormente se utilizaron para realizar la qRT-PCR se diseñaron mediante el programa Primer3 Input versión 0.4.0. Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con transcriptasa inversa para comprobar el correcto funcionamiento de los oligonucleótidos seleccionados (Tabla 4), siguiendo el protocolo que se describe a continuación. Se realizó una mezcla que contenía 5 µl de tampón de PCR 10X, 1 µl de dNTPs 10 mM, 1,5 µl de oligonucleótido sentido 10 µM, 1,5 µl de oligonucleótido antisentido 10 µM, 2 µl de cDNA sin diluir (0,1 µg), 38 µl de agua Milli-Q® y 1 µl de la DNA polimerasa Taq (1 unidad). La reacción tuvo lugar en el mismo termociclador que la retrotranscripción. El programa de PCR constaba de las siguientes etapas: 1) desnaturalización a 94°C durante 5 minutos; 2) 30 ciclos que consisten en desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, anillamiento de

los oligonucleótidos a 56°C durante 1 minuto y extensión a 72°C durante 30 segundos; 3) extensión adicional a 72°C durante 7 minutos.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% en TAE (EDTA 1 mM; ácido acético 20 mM; Tris-HCl 40 mM pH 8,0) con bromuro de etidio 2 µg/ml. Utilizamos el marcador de peso molecular de 100 pares de bases. Las bandas correspondientes a los genes amplificados se visualizaron en el transiluminador de luz ultravioleta GelDoc 2000 (Bio-Rad Laboratories).

11.4. qRT-PCR

La cuantificación de la expresión de los genes de interés se realizó mediante PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (qRT-PCR). Se realizó una mezcla en un volumen final de 25 µl que contenía 5 µl de cDNA diluído 1:25 (0,02 µg), 12,5 µl de SYBR Green Master Mix y cada oligonucleótido (sentido y antisentido) a 160 nM. Se utilizaron placas de 96 pocillos iCycler® iQ™ y la reacción se llevó a cabo en un termociclador iCycler® iQ™5 Multicolor Real Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories). La amplificación tuvo lugar en un programa con las siguientes etapas: 1) desnaturalización a 95°C durante 5 minutos; 2) 40 ciclos que consisten en desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, anillamiento de los oligonucleótidos a 60°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos; 3) extensión adicional a 72°C durante 1 minuto.

Mediante esta técnica se cuantificó la expresión de los genes que se indican en la tabla 4 en las células BT474, BTRH y BTSH. Cada reacción se realizó por duplicado y los experimentos fueron repetidos tres veces. Además, para cada gen analizado se incluyó un control negativo en el que la mezcla contenía todos los componentes excepto cDNA, que se sustituyó por agua Milli-Q®.

La expresión relativa de cada gen en las líneas BTRH y BTSH se normalizó con respecto a los valores de expresión de GAPDH y se relativizó respecto a la expresión del gen en la línea parental BT474 utilizando la fórmula $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la qRT-PCR.

Gen	Cebador	Secuencia
<i>STC1</i>	Sentido	5'- CTCAGGGAAAAGCATTCGTC -3'
	Antisentido	5'-AGCTGGACGACCTCAGTGAT-3'
<i>SCGB2A2</i>	Sentido	5'-GCTGCCCCTTATTGGAGAAT-3'
	Antisentido	5'-TGCTCAGAGTTTCATCCGTTT-3'
<i>BRINP2</i>	Sentido	5'-GGCTGCAGCAACTATGACAA-3'
	Antisentido	5'-TTGCACCAGCAGTCATTCTC-3'
<i>PTPRM</i>	Sentido	5'-GGCAAGTCAAGTCCAAGAGC-3'
	Antisentido	5'-CTGTTTGCACCATGTTACC-3'
<i>GRIK3</i>	Sentido	5'-CACCACAGATGACCGTGAAC-3'
	Antisentido	5'-TTTCAGGCTGATGATGTCCA-3'
<i>DTNA</i>	Sentido	5'-GTTCCCAGATCAGCCTGAGA-3'
	Antisentido	5'-GGACTTCCTGAGGAGGGAAC-3'
<i>LRP1B</i>	Sentido	5'-TGGATATGCGATGGTCAGAA-3'
	Antisentido	5'-TATGGCACCACAAATGCTGT-3'
<i>PDE7B</i>	Sentido	5'-TTGCCAAAGGAAATGACACA-3'
	Antisentido	5'-CACACTTCAAGGCGATCTGA-3'
<i>IL20RA</i>	Sentido	5'-CTGTTGTCCTGACAGCTCCA-3'
	Antisentido	5'-AGTCCTGGCACACTGCTTCT-3'
<i>FBXL7</i>	Sentido	5'-TGTGTCTCATGCTGGAAACC-3'
	Antisentido	5'-CAGATTAGGGCAGAGGGACA-3'
<i>TXNIP</i>	Sentido	5'-GCCCACTTACCTTGCCAAT-3'
	Antisentido	5'-GTTGCAGCCCAGGATAGAAG-3'
<i>ATXN3</i>	Sentido	5'-ATTGCGAAGCTGACCAACTC-3'
	Antisentido	5'-ATTCCTGAGCCATCATTTGC-3'
<i>CXCL17</i>	Sentido	5'-GCCAAGAATGTGAGTGCAAA-3'
	Antisentido	5'-TGCTTGTTTGGCTTTCTGTG-3'
<i>IFI6</i>	Sentido	5'-GGTGGAGGCAGGTAAGAAAA-3'
	Antisentido	5'-ATCGCAGACCAGCTCATCA-3'

NPNT	Sentido	5'-TACACCAAAGCCAACACCAA-3'
	Antisentido	5'-TGGGTTTCTGAGGGTCTGTC-3'
ELMO1	Sentido	5'-GGAGAAACGCAAGTCCATGT-3'
	Antisentido	5'-CAATCCGGATGTAGGCATCT-3'
GRIK2	Sentido	5'-TCAGACGTGGTGGAAAACAA-3'
	Antisentido	5'-ACTGTCAGAAAGGCGGCTAA-3'
UPK1A	Sentido	5'-TGGTAGCCAGTTTTGGTGTG-3'
	Antisentido	5'-AAGGTCAGCATCTGCTTGGT-3'
PPP1R3C	Sentido	5'-ACCATGCTAATGGGCAAGTC-3'
	Antisentido	5'-AGGAGACGTCTGGTGGAAATG-3'
HMGCS2	Sentido	5'-CCAGCAGTGACACACAAACC-3'
	Antisentido	5'-CCCATTGTGAGTGGAGAGGT-3'
CEACAM7	Sentido	5'-GAACCCTGCTGATCCAGAAC-3'
	Antisentido	5'-CTCCACCGGATTGAAGTTGT-3'
PIP	Sentido	5'-CGTCCAAATGACGAAGTCAC-3'
	Antisentido	5'-GGGGATTACAGCAGCATCAT-3'
LUZP2	Sentido	5'-TTGAGAGTCACAGGCAGTGG-3'
	Antisentido	5'-TTGAGAGTCACAGGCAGTGG-3'
IL1R1	Sentido	5'-TGTGATTGTGAGCCCAGCTA-3'
	Antisentido	5'-TGTTTGCAGGATTTTCCACA-3'
CEACAM5	Sentido	5'-TATTACCGTCCAGGGGTGAA-3'
	Antisentido	5'-TTGGCCTGGCAGGTATAGAG-3'
ABCA5	Sentido	5'-GGACCCCTGTTCTCGACATA-3'
	Antisentido	5'-CCGATCCCCATTTACTTTT-3'
SCGN	Sentido	5'-TTTGCACAAGGTGAAACAGC-3'
	Antisentido	5'-GCGCCAAATCTGCATAAACT-3'
SPINK8	Sentido	5'-GACGCCATCCTTGTCTAGC-3'
	Antisentido	5'-TAACCTGGTCACTGCCACAA-3'
CYSLTR1	Sentido	5'-TGACCGCTGCCTTTTTAGTC-3'
	Antisentido	5'-ATGCAGCCAGAGACAAGGTT-3'

GAPDH	Sentido	5'-GAGTCAACGGATTGGTCGT-3'
	Antisentido	5'-GATCTCGCTCCTGGAAGATG-3'

12. SECUENCIACIÓN DE RNA (RNAseq)

La extracción de RNA total en las células BT474, BTRH, BTSH, RT#10 y ST#35 se realizó por triplicado en tres días distintos, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 11.1. Los RNAs se enviaron a Macrogen (Seúl, Corea del Sur), donde se realizó la secuenciación del RNA. La integridad del RNA se determinó en base al valor del número de integridad del RNA (RIN). La integridad se analizó con el equipo Agilent 2100, en todas las muestras el valor RIN > 8,8 (a partir de 7 se considera válido). Las librerías de cDNA se prepararon con TruSeq Stranded LT Sample Prep Kit (Illumina, San Diego, Estados Unidos). La secuenciación del mRNA se realizó con el sistema Novaseq 6000 (Illumina), generando 40 millones de lecturas por muestra (2x150 pares de bases, lectura tipo *paired-end*).

El procesamiento de los datos se realizó con la plataforma Galaxy (Afgan *et al.*, 2018). Se realizó un control de calidad de los datos crudos con fastQC (Andrews, 2021). A continuación, se eliminó el contenido de secuencias técnicas presentes en las lecturas con Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) y se identificaron las lecturas duplicadas con MarkDuplicates (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). Las lecturas se alinearon contra el genoma de referencia humano (hg38) con HISAT2 (Kim *et al.*, 2015). La expresión génica se midió con featureCounts (Liao *et al.*, 2014) y el análisis de expresión diferencial se realizó con DESeq2 (Love *et al.*, 2014). Finalmente, se utilizó Ensembl GRCH37 (<http://grch37.ensembl.org/downloads.html>) para la anotación funcional. El análisis de componentes principales (PCA) fue generado con Babelomics 5.0 (Alonso *et al.*, 2015). Los genes se identificaron como GDEs cuando su tasa de cambio era ≥ 2 ó ≤ -2 y su FDR *p*-valor ajustado $\leq 0,05$.

12.1. Caracterización funcional

Se realizó una anotación funcional de los GDEs entre los modelos celulares con distinta sensibilidad a trastuzumab y BT474 respecto a una base de datos de referencia. Los listados de genes significativamente sobreexpresados o infraexpresados fueron introducidos en las bases de datos públicas DAVID (Huang *et al.*, 2009a, 2009b) y la función ToppFun de ToppGene Suite (Chen *et al.*, 2009). Se introdujo el listado de genes en DAVID, se seleccionó la especie *Homo sapiens* y la herramienta “Functional Annotation Clustering”. Se seleccionaron los clústeres con mayor puntuación de enriquecimiento (ES) formados por categorías de anotación con p -valor $< 0,05$. En ToppFun, se evaluaron categorías de ontología génica (función molecular, proceso biológico y compartimento celular) y la vía de señalización. Se aplicó una tasa de corte de FDR p -valor ajustado $< 0,05$.

13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

El análisis estadístico de los datos experimentales de este trabajo se realizó con el programa GraphPad Prism 8 (San Diego, Estados Unidos). La comparación de las variables continuas entre dos grupos se realizó utilizando el test t de Student de dos colas. Las comparaciones entre firmas de resistencia e hipersensibilidad y los valores clínicos y biológicos de los datos del ensayo PAMELA se realizaron en R 4.0.3. Se utilizaron el test t de Student de dos colas o ANOVA de una vía. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con un p -valor $< 0,05$.

Los análisis estadísticos de los datos de KM plotter, ROC plotter y GSEA fueron proporcionados por las propias herramientas.

RESULTADOS

1. EFECTO DE TRASTUZUMAB EN LÍNEAS CELULARES HER2+

La estrategia para identificar genes que pudiesen ser usados para predecir respuesta a trastuzumab en cáncer de mama HER2+ comenzó por crear modelos de sensibilidad y resistencia utilizando la línea celular BT474. Esta línea ha sido muy utilizada como modelo para el análisis del papel fisiopatológico de HER2 en cáncer de mama incluyendo estudios del efecto antitumoral de fármacos como trastuzumab (Baselga y Albanell, 2001; Brockhoff *et al.*, 2007; Nahta *et al.*, 2004b). En experimentos de proliferación celular, el tratamiento de las células BT474 con trastuzumab resultó en una reducción en el número de células en comparación con células no tratadas (Figura 7A). Estos datos sugirieron la presencia de una población de células sensibles que estaban afectadas por trastuzumab, así como una población de células a las que el anticuerpo afectó menos o que incluso eran resistentes.

Se realizaron experimentos para determinar si la reducción en el número de células causada por trastuzumab se debía principalmente a la inducción de la muerte celular, al arresto del ciclo celular o una combinación de ambos efectos. La evaluación por citometría de flujo de la muerte celular con tinción con Anexina V y PI, mostró un aumento pequeño pero reproducible en una población de células no viables tratadas con trastuzumab (Figura 7B y 7C). Por otro lado, se analizó la incorporación de BrdU para analizar la entrada de células en fase S. Estos análisis demostraron que trastuzumab reducía la incorporación de BrdU en células BT474 (Figura 7D).

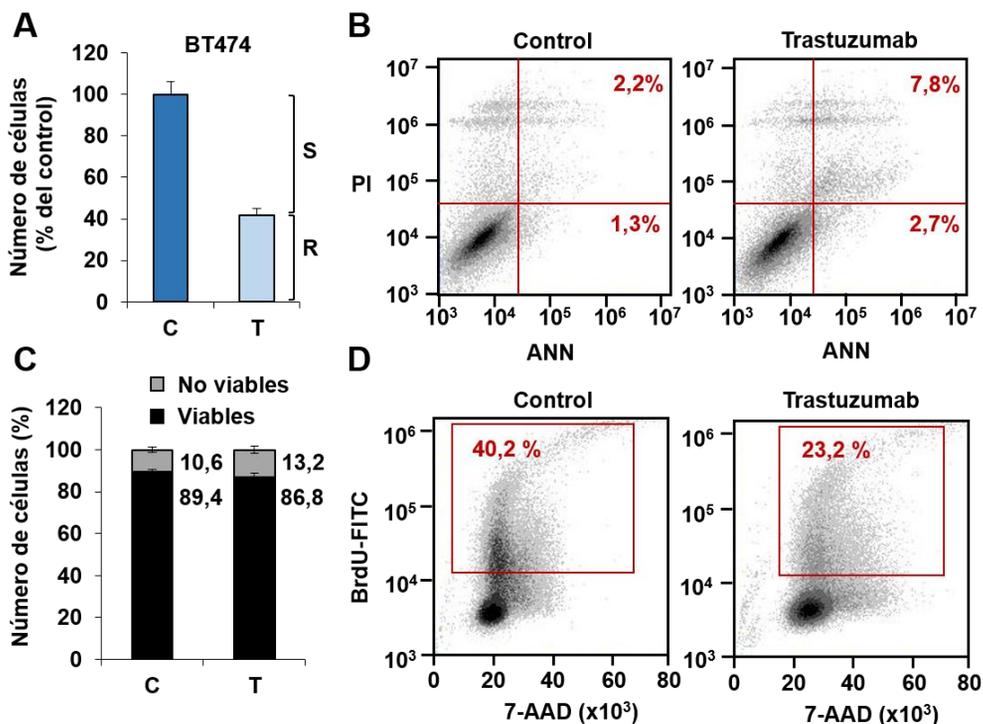


Figura 7. Estudio de la de acción de trastuzumab en la línea celular BT474. (A) Las células BT474 fueron tratadas con trastuzumab durante 7 días y se determinó el número de células mediante conteo. Los datos se representan como la media \pm SD, relativo al control de dos experimentos. C: Control; T: Trastuzumab 50 nM; S: sensibles; R: resistentes. (B) y (C) Las células BT474 se trataron con trastuzumab durante 96 horas. (B) Los datos muestran el porcentaje de células en los cuadrantes indicados. Se muestra un experimento representativo que se repitió dos veces. (C) Los datos muestran el porcentaje de células no viables (ANN+/PI-, ANN+/PI+ y ANN-/PI+) y viables (ANN-/PI-). Los datos han sido representados como la media \pm SD de dos experimentos independientes (D). Las células BT474 fueron tratadas con trastuzumab durante 120 horas y recibieron un pulso de BrdU de 12 horas. Los resultados muestran el porcentaje de células en fase S. Se muestra un experimento representativo que fue repetido en dos ocasiones.

Para verificar si trastuzumab inducía estos efectos en otras líneas de cáncer de mama HER2+, se utilizó la línea celular SKBR3 como un segundo modelo. Estas células fueron sensibles a trastuzumab de forma análoga a las BT474 (Figura 8A). Además, se observaron efectos similares en SKBR3 tanto en muerte celular como en entrada de células en fase S tras el tratamiento con trastuzumab (Figura 8B-D).

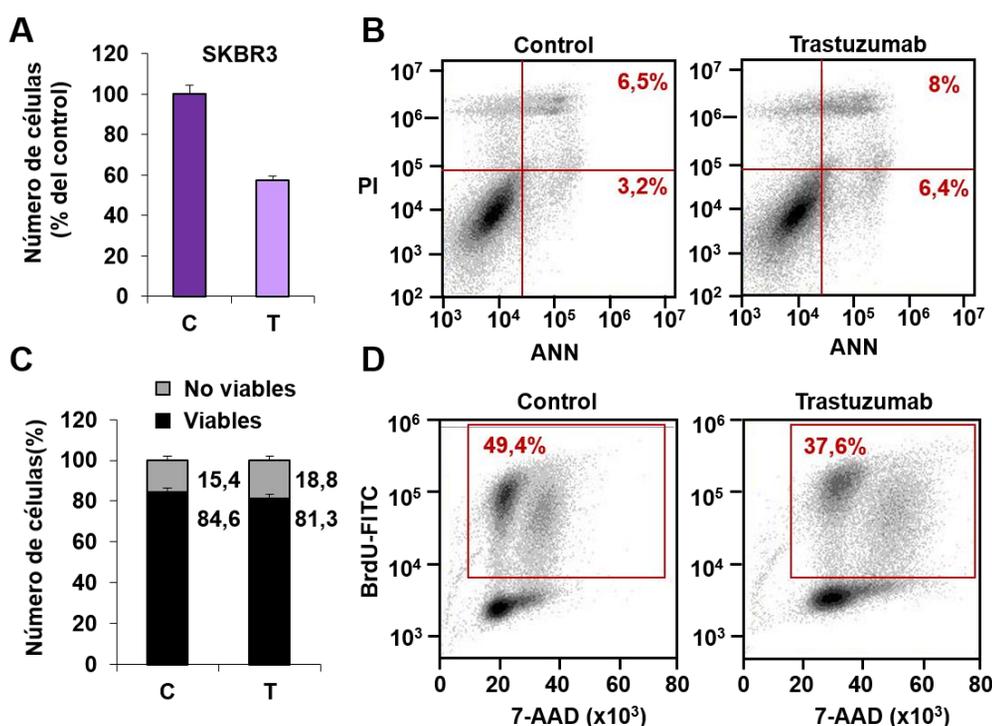


Figura 8. Estudio de la acción de trastuzumab en la línea celular SKBR3. Estos experimentos se realizaron de forma análoga a lo descrito en la figura 7, utilizando la línea SKBR3. Se determinó la proliferación celular (A), la apoptosis (B) y (C) y el porcentaje de células en fase S (D) en presencia de trastuzumab. Los datos se representan como la media \pm SD, relativo al control de dos experimentos (A) y (B). Se muestra un experimento representativo que fue repetido en dos ocasiones (B) y (D).

2. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MODELOS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA HER2+, RESISTENTES E HIPERSENSIBLES A TRASTUZUMAB

En un intento de aislar células muy sensibles a trastuzumab se utilizaron dos estrategias en paralelo. En la primera, se picaron clones de células BT474 y se testó su sensibilidad a trastuzumab. Este análisis resultó en el aislamiento de un clon llamado BTSH (células BT474 Sensibles a Herceptina™) que mostró una respuesta a trastuzumab muy elevada en comparación con la línea parental BT474 (Figura 9).

En paralelo también se utilizó un modelo celular de resistencia a trastuzumab, las células BTRH (células BT474 Resistentes a Herceptina™), que consiste en un *pool* de células que habían sido generadas previamente tratando las células BT474

con trastuzumab 50 nM durante seis meses (Díaz-Rodríguez *et al.*, 2019). El efecto de trastuzumab en la proliferación celular era sustancialmente menor que en caso de la línea parental (Figura 9).

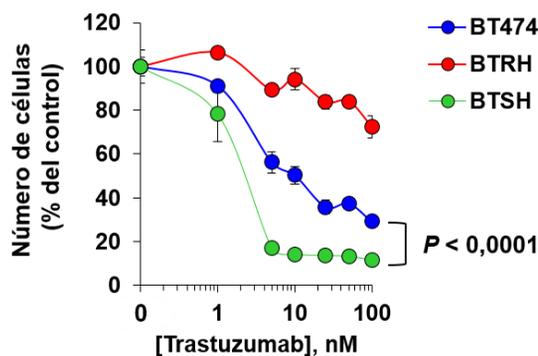
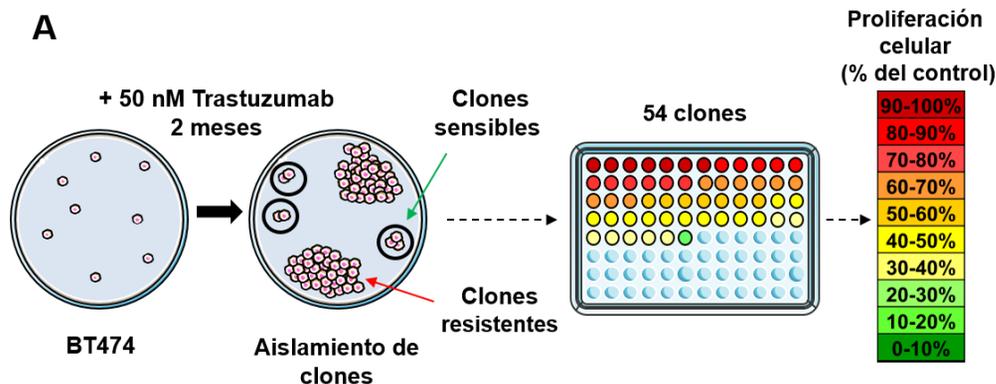


Figura 9. Análisis de dosis-respuesta a trastuzumab en los modelos celulares BT474, BTRH y BTSH. Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de trastuzumab (1-100 nM) durante 7 días y se determinó el número de células mediante conteo. Los datos se representan como el porcentaje de la media \pm SD respecto al control. Se muestra un experimento representativo que fue repetido dos veces.

En la segunda estrategia, las células BT474 fueron sembradas a baja densidad y tratadas con trastuzumab 50 nM durante dos meses para aislar colonias individualizadas (Figura 10A). Se esperaron dos escenarios diferentes: uno representando las células resistentes a trastuzumab, caracterizadas por clones que proliferaban a una tasa similar a las células que no habían sido tratadas y una segunda situación en la que los clones muy sensibles proliferaban mucho menos y generasen colonias con menor número de células.



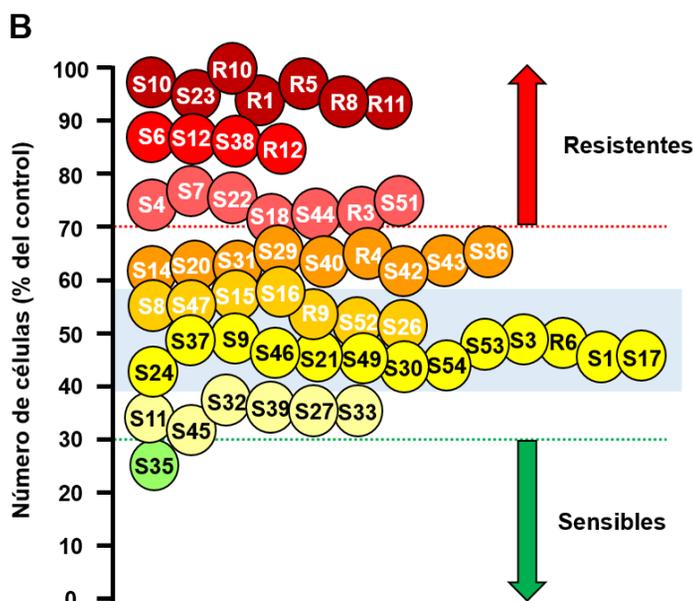


Figura 10. Generación de clones hipersensibles y resistentes a trastuzumab. (A) Representación esquemática del proceso de generación de clones. Las células BT474 fueron sembradas a densidad baja y se trataron durante 2 meses con trastuzumab. Las células que proliferaron correctamente en presencia de trastuzumab se aislaron como clones resistentes y las que apenas proliferaron se aislaron como clones sensibles. (B) Se analizó la proliferación celular de los 54 clones aislados en presencia de trastuzumab durante 7 días mediante conteo. El gráfico muestra la media del número de células tras el tratamiento con trastuzumab normalizado al control sin tratar. El cuadro azul indica el rango de respuesta a trastuzumab en las células BT474. Clones cuya proliferación fue superior al 70% (respecto al control) fueron considerados resistentes a trastuzumab (flecha roja) mientras que clones cuya proliferación estaba por debajo de 30% fueron considerados hipersensibles (flecha verde).

Se aislaron un total de 54 clones y se analizó su respuesta a una dosis saturante de trastuzumab (Figura 10B y Figura 11). Veinte de los clones aislados presentaron una sensibilidad a trastuzumab similar a la línea parental (Figura 10 y Figura 11). Diecinueve clones fueron más resistentes a trastuzumab que la línea parental BT474, mientras que solo obtuvimos un clon hipersensible a trastuzumab, llamado ST#35 (Figura 10 y Figura 11). Estos resultados demostraron que la respuesta a trastuzumab en un cultivo de células BT474 era heterogénea, debido a la presencia de clones con distinta sensibilidad a trastuzumab.

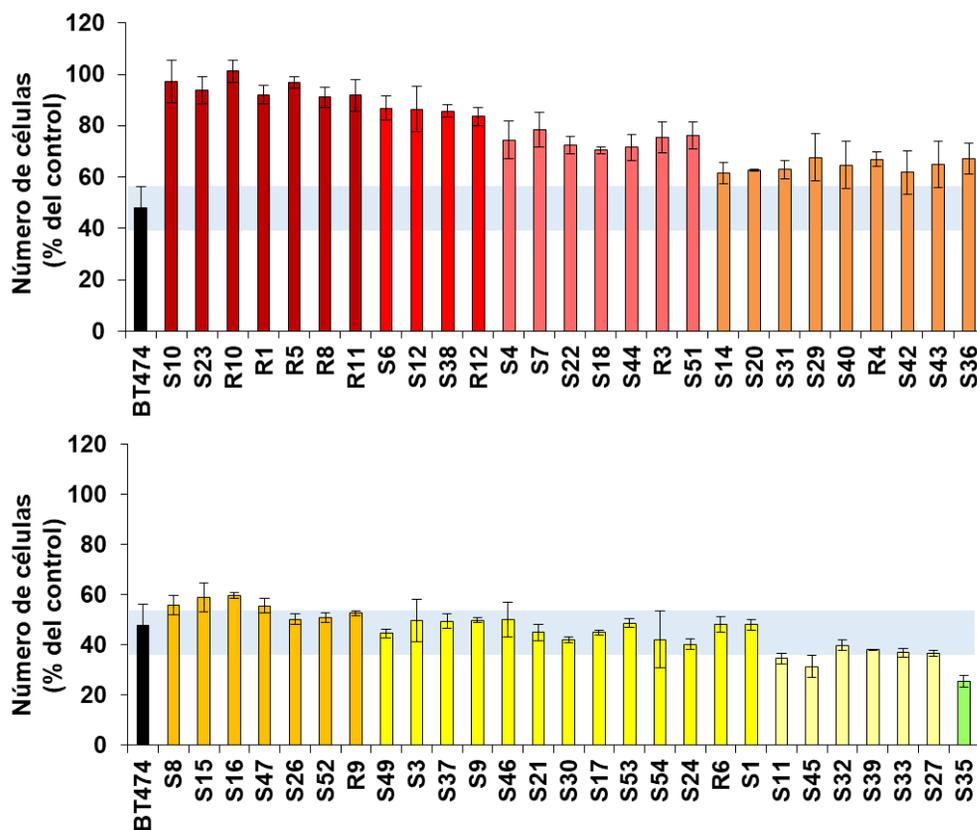


Figura 11. Respuesta a trastuzumab en los 54 clones aislados. El experimento fue realizado como se describe en la figura 10B. El gráfico muestra la media \pm SD del número de células tras el tratamiento con trastuzumab relativo al control sin tratar. El cuadro azul el rango de respuesta a trastuzumab en la línea parental BT474.

3. EFECTO DE TRASTUZUMAB *IN VIVO* EN LOS CLONES RESISTENTES RT#1, RT#5 Y RT#10

Experimentos que habían sido desarrollados en el laboratorio demostraron que la línea BTRH no generaba tumores resistentes a trastuzumab *in vivo*. Por lo tanto, se evaluó la capacidad de los clones resistentes a trastuzumab para generar tumores resistentes a trastuzumab. Se inyectaron células de los clones RT#1, RT#5 y RT#10 en ratones desnudos. Se monitorizó el crecimiento del tumor y los ratones fueron tratados semanalmente con trastuzumab una vez habían alcanzado un volumen de 500 mm³. En el caso del clon RT#1, los tumores R1TD, R2TD, R3TD y R3TI (Ratón 1 (R1), 2 (R2) y 3 (R3); tumor derecho (TD) y tumor izquierdo (TI)) respondieron

inicialmente al tratamiento, aunque el tamaño del tumor no disminuyó sustancialmente. Sin embargo, tras unos dos meses de tratamiento, su tamaño volvió a aumentar, siendo resistentes a trastuzumab (Figura 12).

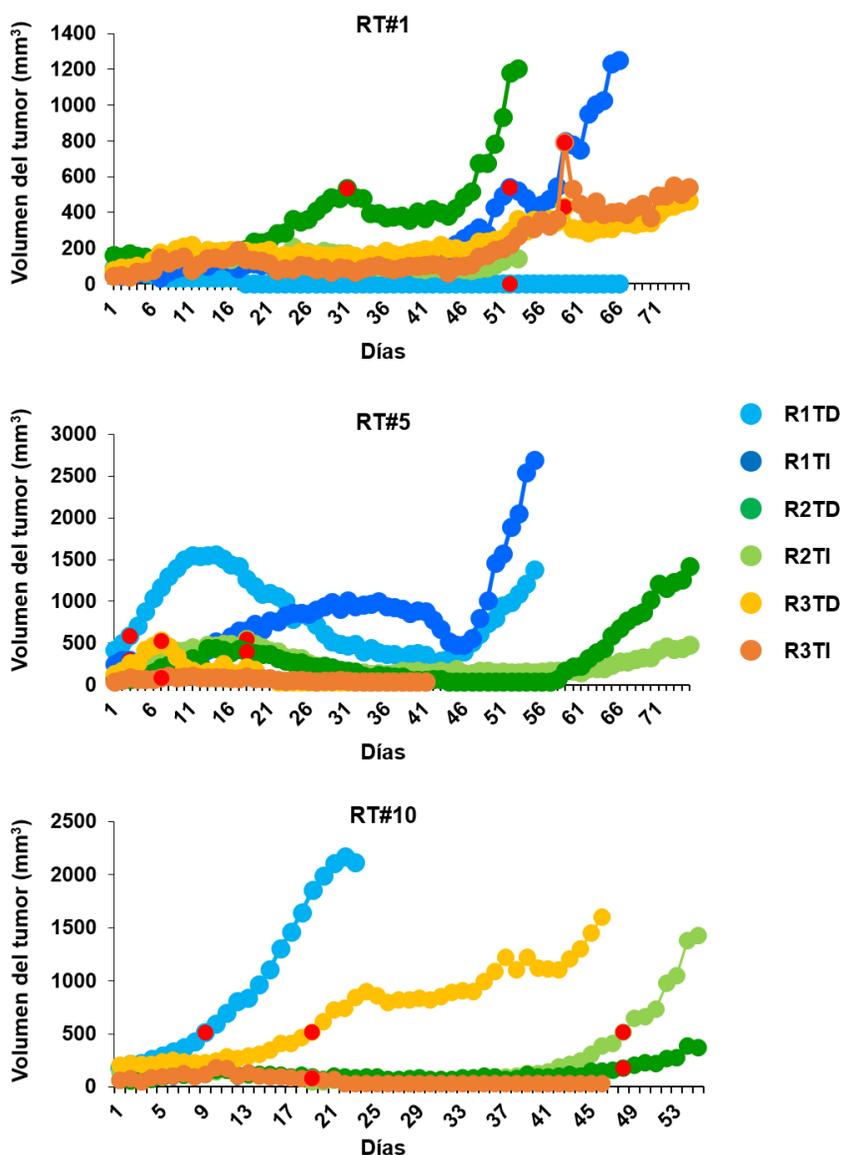


Figura 12. Efecto de trastuzumab en tumores generados por los clones resistentes RT#1, RT#5 y RT#10 en ratones desnudos. El volumen tumoral fue medido dos veces por semana y cuando alcanzaron los 500 mm³, se administró trastuzumab semanalmente. Las gráficas muestran las curvas de crecimiento de los tumores generados por las células RT#1, RT#5 y RT#10, respectivamente. Se trata de un experimento preliminar. El punto rojo hace referencia al momento de inicio del tratamiento. R1: ratón 1, R2: Ratón 2, R3: Ratón 3; TD: tumor derecho, TI: tumor izquierdo.

En cuanto a los tumores RT#5, tres de los cuatro tumores que crecieron respondieron inicialmente al tratamiento: R2TD, R2TI y R3TD. Dos tumores, R2TD y R2TI pertenecientes al mismo ratón, volvieron a crecer tras 9 meses de tratamiento (Figura 12), pudiendo tratarse de una resistencia adquirida. Además, el tumor R1TD no respondió al tratamiento hasta pasado un mes. Su tamaño disminuyó, pero no desapareció y volvió a crecer (Figura 12). Por último, el otro tumor que tenía este último ratón, R1TI, creció durante el tratamiento con trastuzumab (Figura 12). Finalmente, no hubo ningún tumor RT#10 que respondiera al tratamiento con trastuzumab (Figura 12), sugiriendo que éste era un buen modelo de resistencia a trastuzumab *in vivo*.

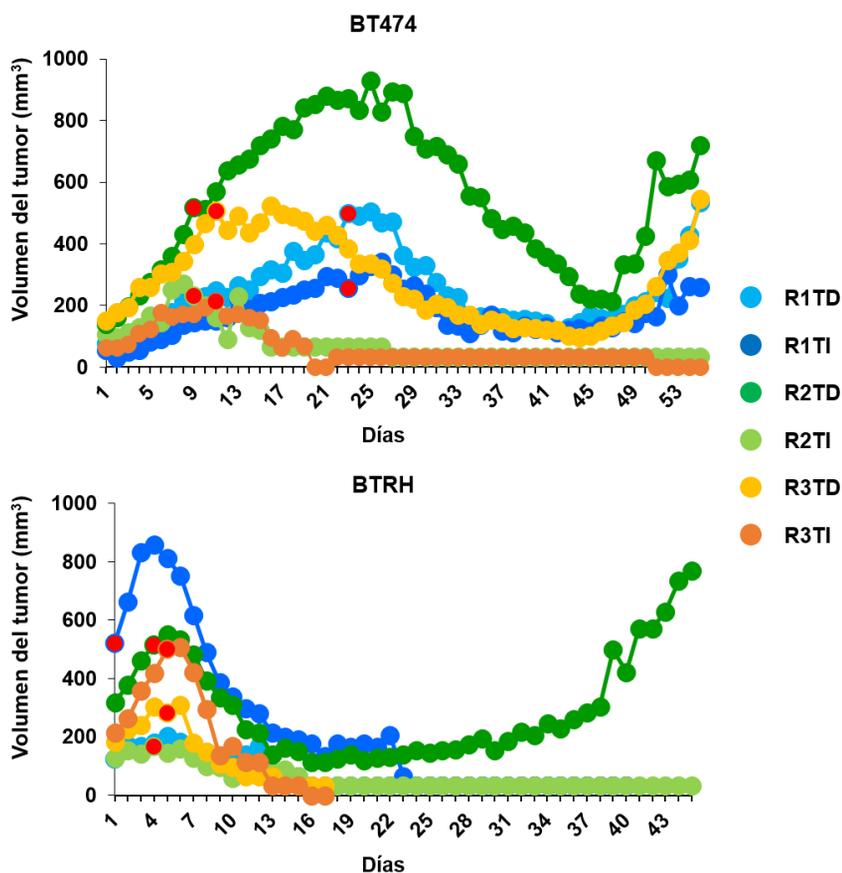


Figura 13. Efecto de trastuzumab en tumores generados por las células BT474 y BTRH en ratones desnudos. El experimento fue realizado como se describe en la figura 12. Las gráficas muestran las curvas de crecimiento de los tumores generados por las células BT474 y BTRH.

Como control del experimento anterior, también se analizó en paralelo la respuesta a trastuzumab en los tumores generados por las líneas BT474 y BTRH. En estos casos, el tamaño de los tumores disminuyó tras el tratamiento con trastuzumab (Figura 13). Sin embargo, los tumores R1TD, R1TI, R2TD y R3TD en BT474 y el R2TD en BTRH, desarrollaron resistencia a trastuzumab tras la exposición continuada a dicho anticuerpo (Figura 13).

4. EFECTO DE OTRAS TERAPIAS ANTI-HER2 EN LOS MODELOS CELULARES CON DISTINTA SENSIBILIDAD A TRASTUZUMAB

Para explorar la relación que existe entre la respuesta a trastuzumab y la sensibilidad a otras terapias anti-HER2 se realizaron ensayos dosis-respuesta. Estos estudios mostraron que T-DM1 tenía un efecto similar en BT474 y BTRH pero reducía drásticamente el número de células BTSH (Figura 14A). Por tanto, la hipersensibilidad a trastuzumab de las células BTSH es compartida con su derivado T-DM1. Los TKIs, lapatinib y neratinib, afectaron a la supervivencia de las células BTSH y BT474 de forma similar. Sin embargo, las células BTRH fueron más resistentes a la acción de dichos fármacos (Figura 14C y 14D), de acuerdo a lo que había sido previamente publicado por nuestro grupo (Ríos-Luci *et al.*, 2020). No se observó ningún efecto sobre la proliferación celular cuando las células fueron tratadas con pertuzumab (Figura 14B), a pesar de ser tratamiento en primera línea junto con trastuzumab en pacientes con cáncer de mama HER2+.

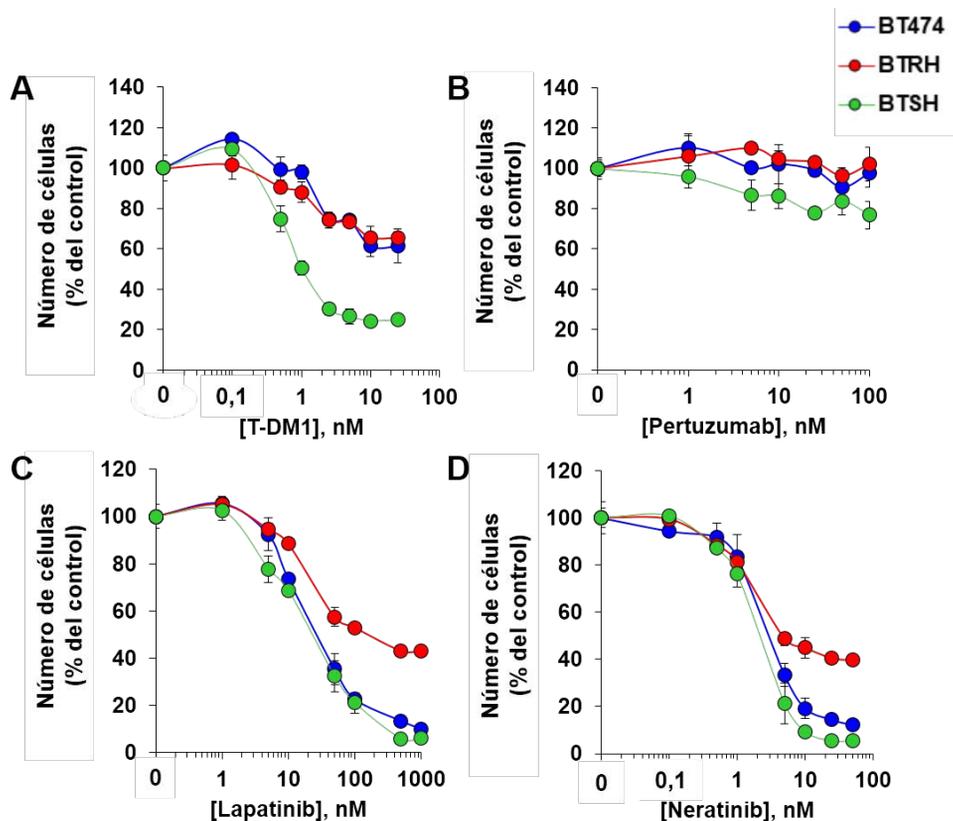


Figura 14. Acción de otras terapias anti-HER2 en los modelos celulares con distinta sensibilidad a trastuzumab. Las células fueron sembradas y tratadas con concentraciones crecientes de los respectivos fármacos. El número de células fue determinado mediante conteo. Los resultados representan el porcentaje de la media \pm SD respecto al control. Se muestra un experimento representativo que fue repetido dos veces. (A) Dosis-respuesta a T-DM1 (desde 0,1 nM hasta 50 nM) durante 72 horas. (B) Dosis-respuesta a pertuzumab (desde 1 hasta 100 nM) durante 7 días. (C) Dosis-respuesta a lapatinib (desde 1 nM hasta 1 μ M) durante 72 horas. (D) Dosis-respuesta a neratinib (desde 0,1 hasta 50 nM) durante 72 horas.

5. PAPEL DE HER2 EN LOS MODELOS CELULARES CON DISTINTA SENSIBILIDAD A TRASTUZUMAB

5.1. Expresión y la activación de HER2 total y en superficie

Como se ha descrito anteriormente, las alteraciones moleculares, así como la pérdida de expresión de HER2, son mecanismos implicados en la resistencia a trastuzumab (Arteaga and Engelman, 2014; Mitra *et al.*, 2009; Mittendorf *et al.*, 2009; Ocana y Pandiella, 2013; Scaltriti *et al.*, 2007). Por ello, se realizaron experimentos para comprobar si la diferencia en la respuesta a trastuzumab se debía a

la pérdida de expresión o activación de HER2. Se analizó la expresión de HER2 total mediante WB e IF. El análisis por IF mostró que los niveles y la distribución de HER2 total eran similares en las las tres líneas (Figura 15A).

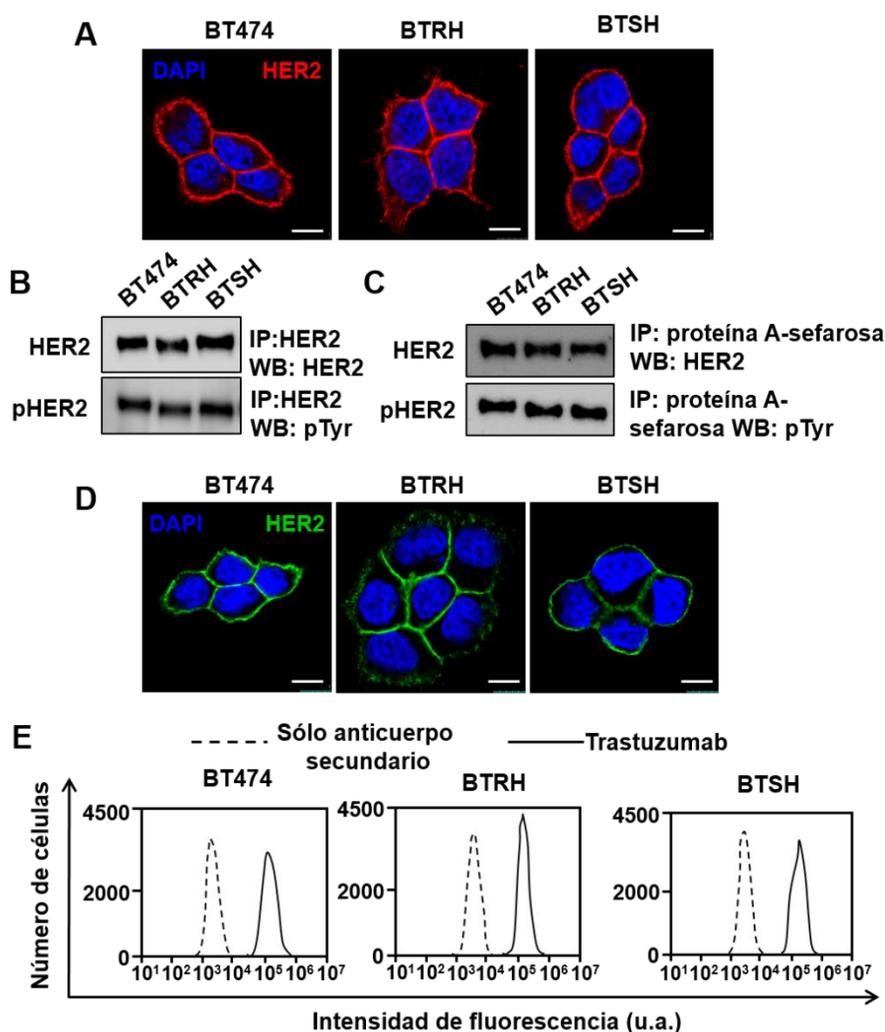


Figura 15. Análisis de la expresión de HER2 total y en superficie y su activación basal en las líneas BT474, BTRH y BTSH. (A) Detección de HER2 total por IF. Las células fueron fijadas, permeabilizadas y marcadas con anti-HER2. (B) Expresión de HER2 total o su activación mediante WB. Los extractos celulares fueron IP con trastuzumab. Se detectó HER2 con un anti-HER2 y su activación con anti-pTyr. (C), (D) y (E) Expresión de HER2 en superficie. Las células fueron tratadas con trastuzumab 10 nM durante 1 hora en frío y se detectó HER2 mediante WB con un anticuerpo anti-HER2 y su activación con anti-pTyr (C), por IF con el anticuerpo anti-IgG humana-Alexa Fluor™ 488 (D) y por citometría con anti-IgG humana-Cy3 como anticuerpo secundario. Los resultados muestran la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias (u.a.). Escala: 10 μ m en (A) y (D); DAPI: marcaje de DNA.

La detección de HER2 total mediante WB confirmó que no existían diferencias apreciables en la expresión de HER2 entre las células BT474, BTRH y BTSH (Figura 15B). Además, se evaluó la expresión de HER2 en superficie mediante WB, IF y citometría de flujo. De la misma forma, las tres líneas celulares expresaron niveles indistinguibles de HER2 en superficie (Figura 15C, 15D y 15E). Por último, la activación de HER2 evaluada por la cantidad de receptor fosforilado por WB era similar en los modelos de distinta sensibilidad a trastuzumab (Figura 15B y 15C). Estos datos sugirieron que las diferencias de sensibilidad a trastuzumab entre BT474, BTRH y BTSH no se debían a cambios en la cantidad total o en superficie de HER2 o a su activación basal.

5.2. Efecto de la pérdida de HER2 en la supervivencia

Sabiendo que todos los modelos celulares presentaban niveles similares en cuanto a la activación y a la expresión de HER2, se decidió evaluar el papel que juega este receptor en la supervivencia de la línea parental y de los modelos BTRH y BTSH con el fin de esclarecer si la diferencia en la respuesta a trastuzumab se debía a diferencias en la adicción de las células a la señalización a través de HER2. Para ello, se silenció *HER2* utilizando secuencias de shRNA (Figura 16A) y se analizó su efecto sobre la proliferación celular mediante MTT. Los resultados mostraron que una disminución en la expresión del receptor afectaba drásticamente a la proliferación celular en las tres líneas celulares (Figura 16B). En el caso de BT474 y BTSH, la expresión de HER2 era imprescindible para su proliferación y supervivencia. Sin embargo, las células BTRH continuaban dividiéndose aunque su tasa de proliferación era muy reducida respecto al control.

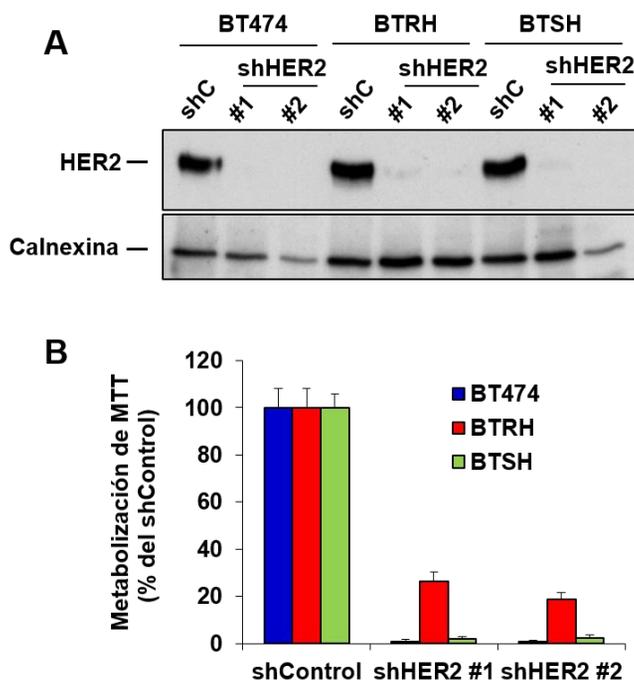


Figura 16. Efecto del silenciamiento de *HER2* en las líneas BT474, BTRH, BTSH. (A) Análisis de la expresión de *HER2* mediante WB en las líneas transducidas con shRNA contra *HER2*. La calnexina se utilizó como control de carga. shC: shControl, no codificante. **(B)** Efecto del silenciamiento de *HER2* sobre la proliferación celular de las líneas transducidas. Las células fueron sembradas y se determinó la proliferación celular mediante MTT a las 72 horas. Los resultados muestran el porcentaje de la media \pm SD relativo al shControl. Se muestra un experimento representativo que se repitió dos veces.

6. MECANISMO DE ACCIÓN DE TRASTUZUMAB EN LOS MODELOS CELULARES CON DISTINTA SENSIBILIDAD

Entre los mecanismos de acción de trastuzumab previamente descritos se encuentra el arresto del ciclo celular en fase G1, provocando un aumento de la proteína p27 (Shin *et al.*, 2002; Yakes *et al.*, 2002). Por ello, se evaluó cómo afectaba el tratamiento con trastuzumab a la progresión en el ciclo celular en nuestros modelos celulares con distinta sensibilidad mediante tinción con PI. El análisis del ciclo mostró que trastuzumab aumentaba el número de células BT474 y BTSH en fase G1 (Figura 17A), así como la expresión de p27 (Figura 17B). Por el contrario, el número de células en G1 y la expresión de p27 en las células BTRH no se vieron modificados tras la acción de trastuzumab.

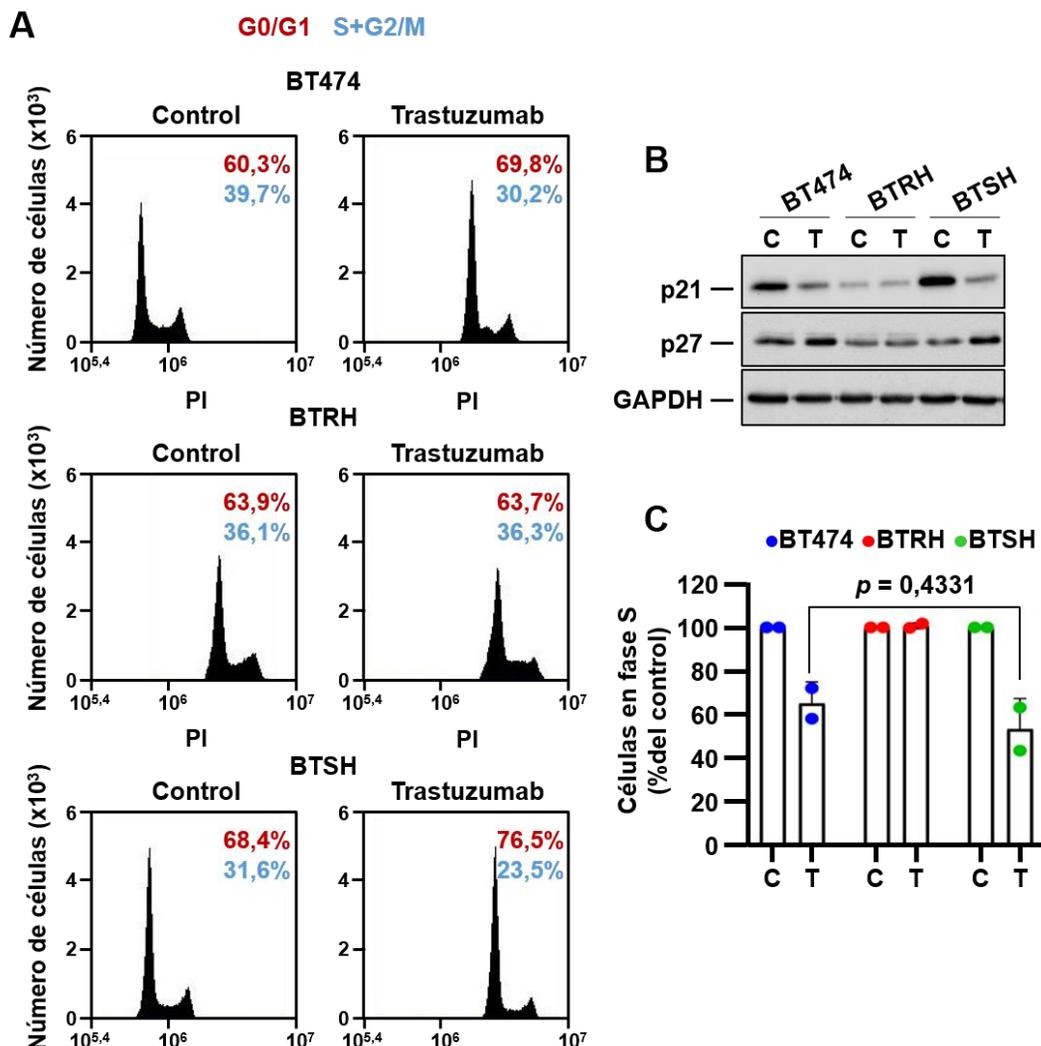


Figura 17. Efecto de trastuzumab sobre la progresión en el ciclo celular de las células BT474, BTRH y BTSH. (A) Distribución de células (en porcentaje) en las fases G0/G1 (en rojo) y S + G2/M (en azul) del ciclo celular en la situación control y tras el tratamiento con trastuzumab. Las células fueron tratadas con trastuzumab durante 6 días, teñidas con PI y analizadas por citometría de flujo. Se muestran los datos de un experimento representativo que se repitió tres veces. **(B)** Expresión de p21 y p27 mediante WB. Los niveles de GAPDH se utilizaron como control de carga. **(C)** Análisis de la entrada en fase S tras el tratamiento con trastuzumab. Las células fueron tratadas con trastuzumab durante 120 horas y recibieron un pulso de BrdU durante 12 horas y la incorporación de BrdU fue determinada por citometría de flujo. Los datos se representan como la media \pm SD, normalizada al control sin tratar de dos experimentos independientes

Además, trastuzumab disminuyó la expresión de p21 en BT474 y BTSH. En las células BTRH, los niveles de p21 eran inferiores y no se veían modificados por la acción de trastuzumab. El análisis de la incorporación de BrdU demostró que el tratamiento provocaba una disminución del número de células en fase S de forma

similar en BT474 y BTSH (Figura 17C). De acuerdo con los datos de tinción con PI, no se observaron diferencias en la incorporación de BrdU en las células BTRH tratadas con trastuzumab.

Debido a que los análisis de ciclo celular no explicaron las diferencias en la respuesta a trastuzumab entre las células BT474 y BTSH, sumados al hecho de que experimentos previos demostraron que trastuzumab inducía un ligero aumento en el número de células no viables en las células BT474 (Figura 7B y 7C), se decidió analizar la muerte celular tanto en el modelo hipersensible como en el resistente a trastuzumab. El análisis de la apoptosis mediante doble tinción con anexina V y PI demostró que trastuzumab causaba una importante disminución de la viabilidad celular en las células BTSH (Figura 18A).

La apoptosis fue acompañada de un aumento de la actividad de la proteína caspasa 3, involucrada en la activación de la cascada de caspasas que ejecutan la apoptosis (Jiang *et al.*, 2020b) (Figura 18B). En el caso de la línea BT474, el pequeño aumento en el número de células no viables (Figura 18A) no causó activación de caspasa 3 (Figura 18B). Por último, trastuzumab no causó ningún efecto en las células BTRH (Figura 18A y 18B).

La inducción de la apoptosis causada por trastuzumab no era exclusiva de las células BTSH, también se observó dicho efecto en el otro clon hipersensible a trastuzumab (ST#35) que habíamos aislado durante el proceso de generación de clones (Figura 18C).

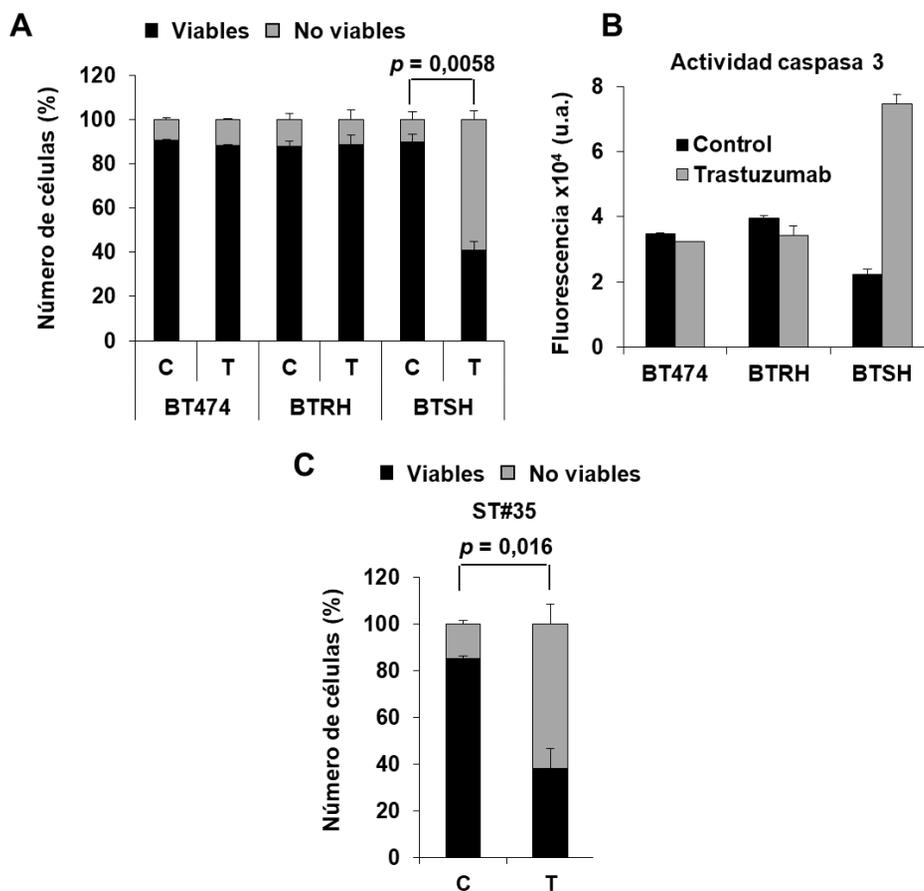


Figura 18. Efecto de trastuzumab sobre la muerte celular y la activación de caspasa 3 en células con distinta sensibilidad. Las células fueron tratadas con trastuzumab durante 6 días y se determinó la apoptosis (A) y (C) o se lisaron para determinar la actividad caspasa 3 (B). (A) y (C) Las células se tiñeron con anexina V-FITC y PI y fueron analizadas mediante citometría de flujo. Los datos muestran el porcentaje \pm SD de células viables y no viables de dos experimentos independientes. (B) 50 μ g de extracto celular correspondientes a cada condición fueron tratados con el sustrato fluorogénico Ac-DEVD-AFC durante 1 hora a 37°C. La gráfica representa la actividad media \pm SD de un experimento representativo que se repitió tres veces.

A continuación, se analizó mediante WB la expresión de proteínas que participaban en el proceso de muerte celular por apoptosis. Los resultados mostraron procesamiento de caspasa 3, caspasa 7 y PARP en las células BTSH tratadas con trastuzumab (Figura 19).

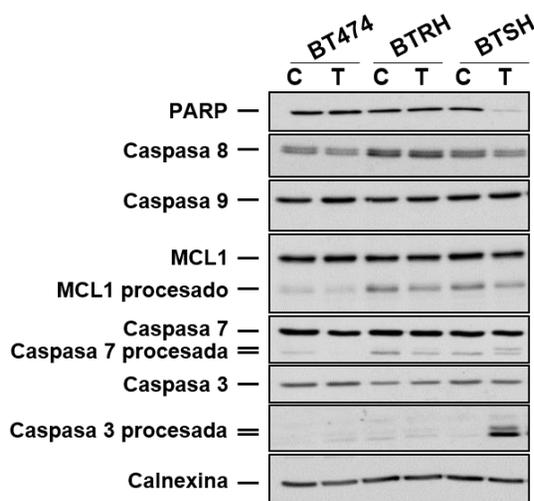


Figura 19. Análisis del efecto de trastuzumab sobre la expresión y el procesamiento de proteínas implicadas en la activación de la muerte celular. Las células se trataron como se describe en la figura 18 y la expresión de las proteínas se analizó mediante WB.

Estos resultados sugirieron que el aumento de la sensibilidad en las células BT474 y BTSH se debía a una mayor sensibilidad al efecto proapoptótico inducido por trastuzumab.

Con el fin de profundizar en la inducción de apoptosis, se decidió analizar la expresión de un número mayor de proteínas implicadas en este proceso. Para ello se utilizó el Proteome Profiler Human Apoptosis Array Kit. Se analizó la expresión de proteínas en los lisados de las células BT474, BTRH, BTSH y ST#35 en estado basal y tras el tratamiento con trastuzumab. Los resultados demostraron que todas las líneas expresaban niveles similares de la gran mayoría de las proteínas en estado basal (sin tratamiento) (Figura 20).

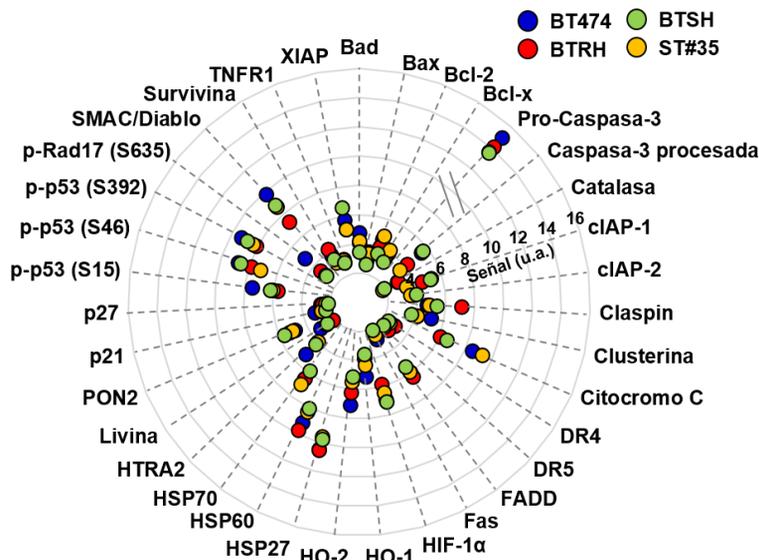
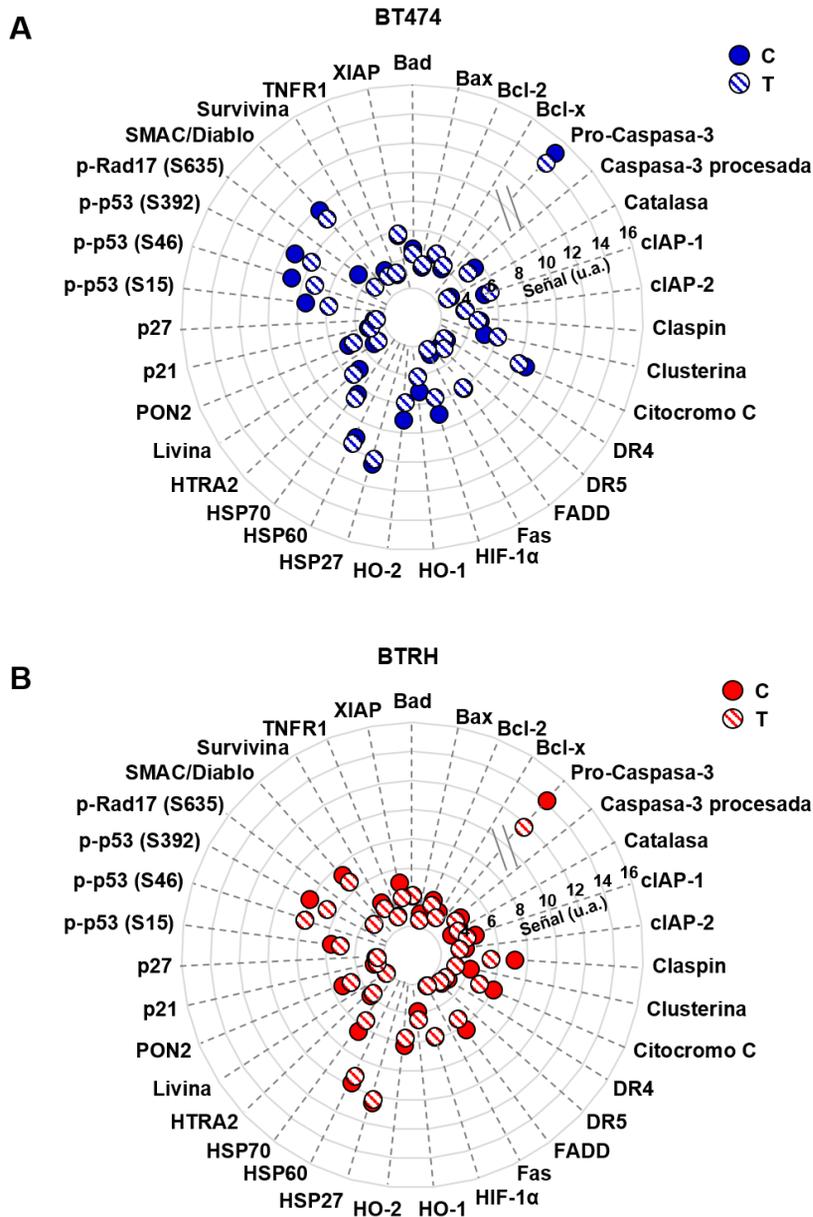


Figura 20. Análisis de la expresión de proteínas apoptóticas en las células BT474, BTRH, BTSH y ST#35. Los lisados celulares correspondientes a la condición control (sin tratar) fueron incubados con membranas de anticuerpos siguiendo el protocolo indicado en el kit. Cada círculo representa la media de la señal obtenida en los duplicados para cada proteína del *array* (en unidades arbitrarias). La intensidad de la señal aumenta a medida que el círculo se acerca hacia los rótulos de las proteínas, siendo el centro del gráfico señal nula.

En primer lugar, la expresión de pro-caspasa 3 era ligeramente superior en la línea BT474, seguida de BTRH y los clones hipersensibles (Figura 20). Los niveles de citocromo C fueron ligeramente más elevados en las células BT474 y ST#35, así como la proteína claspin estaba más expresada en las células BTRH (Figura 20). Por último, las células BT474 expresaban mayores niveles de la proteína SMAC/Diablo que el resto de líneas celulares, especialmente que BTRH. Los niveles de SMAC/Diablo en BTSH y ST#35 eran iguales e intermedios entre BT474 y BTRH (Figura 20).

A continuación, se comparó la expresión de las proteínas en la condición control y tras el tratamiento con trastuzumab en cada línea celular (Figura 21). En rasgos generales, no se encontraron diferencias importantes en la expresión de proteínas en ninguna línea celular. La proteína pro-caspasa-3 disminuyó ligeramente su expresión en las células resistentes tras el tratamiento con trastuzumab, al igual que claspin (Figura 21B). En las células BTSH, el tratamiento con trastuzumab aumentó la expresión de caspasa 3 procesada, como habíamos visto mediante WB (Figura 19)

y provocó una pequeña disminución de los niveles de citocromo C y Bcl-x (Figura 21C). Por último, el tratamiento con trastuzumab desencadenó una bajada en los niveles de pro-caspasa-3, HIF-1 α y claspin en el clon hipersensible ST#35 (Figura 21D). Por el contrario, la expresión de caspasa-3 procesada y HSP60 se encontró ligeramente aumentada tras el tratamiento con trastuzumab (Figura 21D).



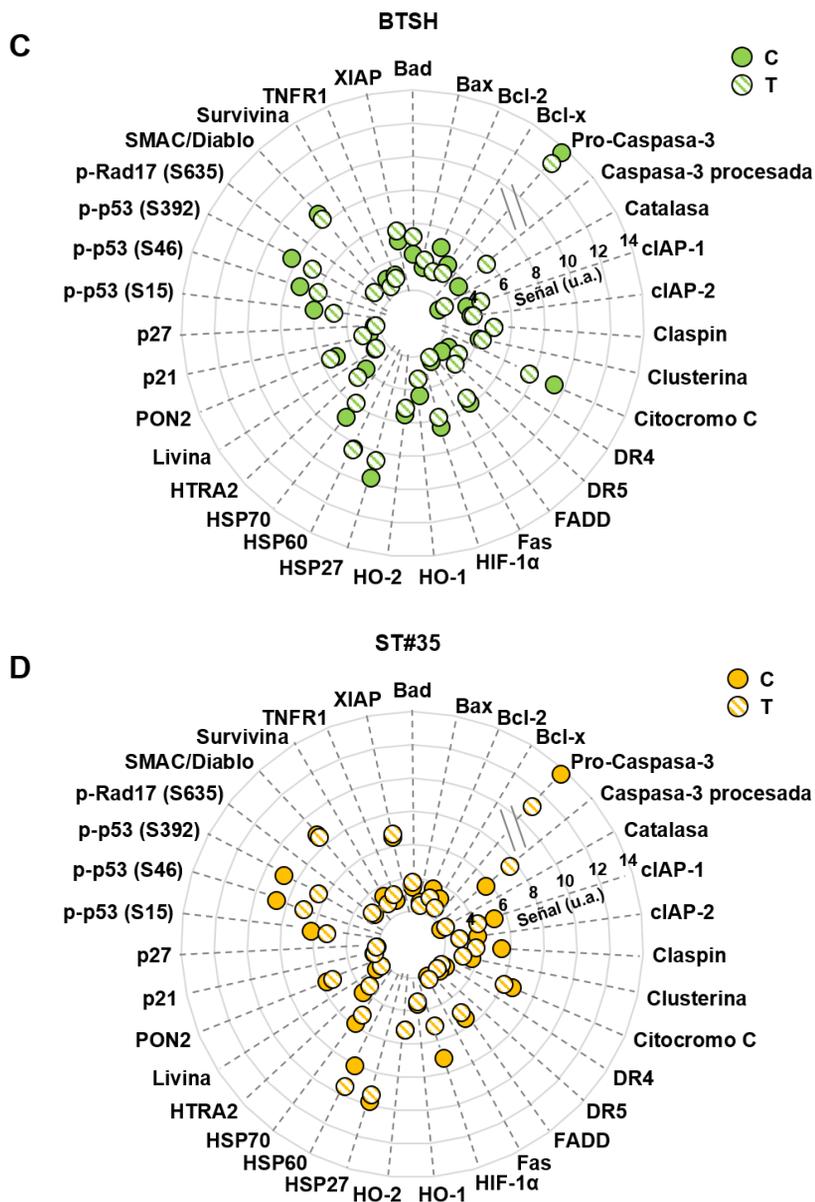


Figura 21. Análisis de la expresión de proteínas apoptóticas en las células BT474, BTRH, BTSH y ST#35 tras el tratamiento con trastuzumab. Las células BT474 (A), BTRH (B), BTSH (C) y ST#35 (D), fueron tratadas con trastuzumab durante 6 días y el experimento se realizó como se describe en la figura 20. En cada gráfico se muestra la expresión de las proteínas implicadas en apoptosis en la condición control y tras el tratamiento con trastuzumab de las respectivas líneas celulares.

7. INTERNALIZACIÓN DE TRASTUZUMAB EN LOS DISTINTOS MODELOS CELULARES

7.1. Internalización de trastuzumab por IF

Se estudió la internalización de trastuzumab en las células BT474, BTRH, BTSH, RT#10 y ST#35. Las células recibieron un pulso de trastuzumab y se permitió su internalización durante distintos tiempos. A tiempo cero, trastuzumab se encontró en la membrana plasmática en todas las líneas celulares (Figura 22). Tras 3 y 6 horas de incubación, aunque el fármaco continuaba estando mayoritariamente en la superficie celular, se observaron algunas acumulaciones intracelulares de trastuzumab en todas las líneas celulares. Tras 24 horas, la acumulación intracelular de trastuzumab aumentó mientras que la tinción de membrana no desapareció, pero se hizo menos intensa. En BT474 y BTSH se observó una mayor cantidad de trastuzumab internalizado que en el resto de los modelos celulares. A las 48 horas de incubación, la acumulación intracelular de trastuzumab aumentó en el caso del clon ST#35, que además mantenía la tinción de membrana. En el caso de BT474 y BTSH, trastuzumab había desaparecido de la membrana y todavía se observaron acumulaciones intracelulares. Estos resultados sugirieron que la internalización de trastuzumab era mayor en las células BT474, BTSH y ST#35 en comparación con los modelos celulares resistentes. En el caso de ST#35, el proceso de internalización parecía ser más lento que en BT474 y BTSH.

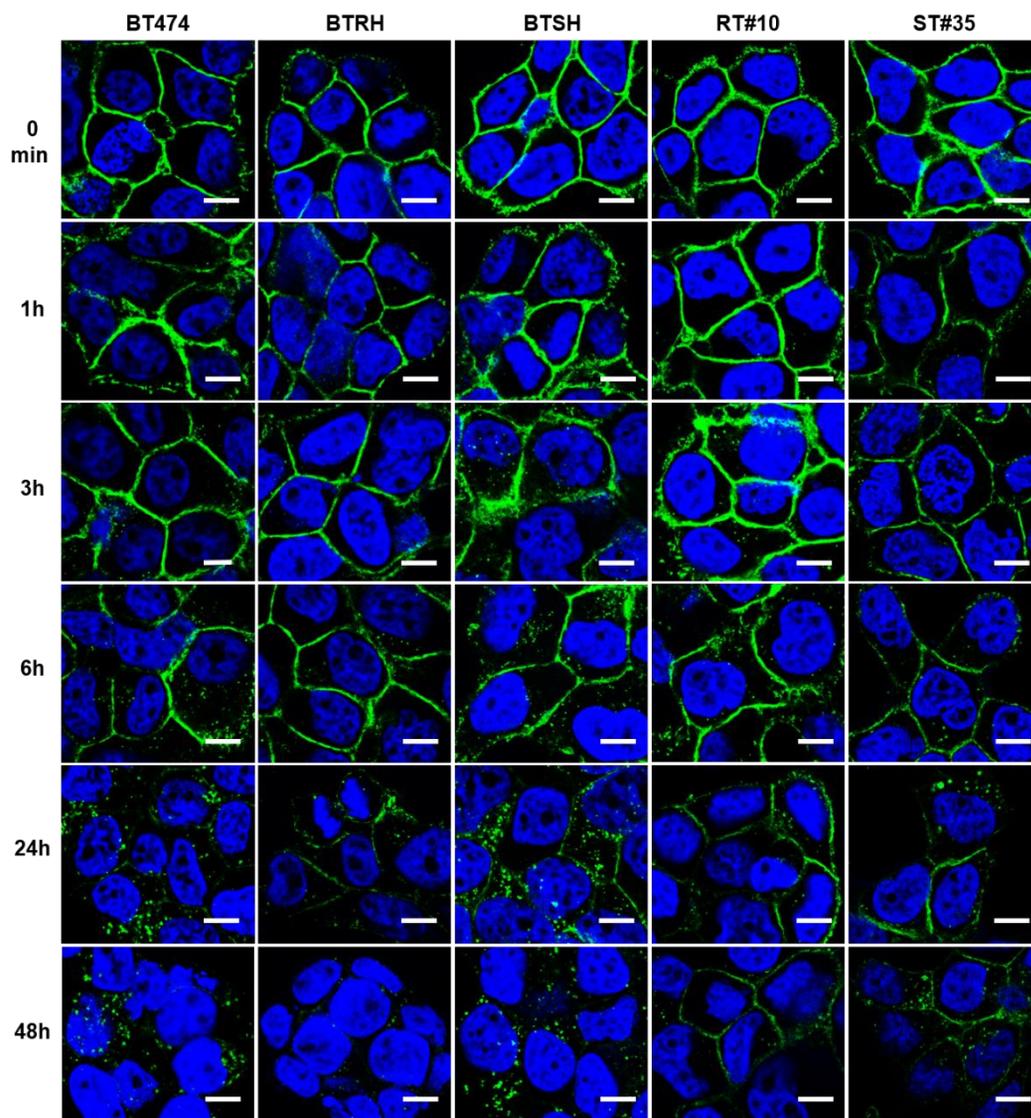


Figura 22. Internalización de trastuzumab en las células BT474, BTRH, BTSH, RT#10 y ST#35 por IF. Las células fueron tratadas con un pulso de trastuzumab 10 nM durante 15 minutos y fueron incubadas durante los tiempos indicados a 37°C. Para el tiempo cero, las células recibieron el pulso de trastuzumab en KRH a 4°C. A continuación, se fijaron y se marcó trastuzumab en verde. Escala: 9 μ m.

7.2. Internalización de trastuzumab acoplado a pHrodo

En línea con los experimentos anteriores, se analizó la llegada de trastuzumab a los lisosomas. Con este fin, trastuzumab fue acoplado a pHrodo rojo, un fluorocromo que es capaz de emitir fluorescencia en ambientes ácidos como los lisosomas, pero que no es fluorescente a pH neutro (Nath *et al.*, 2016) (Figura 23).

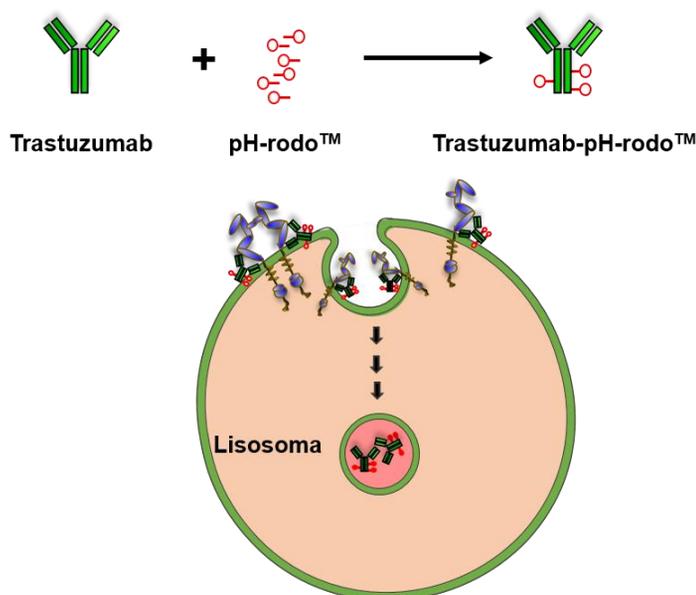


Figura 23. Esquema que representa el marcaje de trastuzumab con pHrodo y su internalización hasta llegar al lisosoma, donde emite fluorescencia al alcanzar un pH ácido.

Se trataron los modelos celulares BT474, BTRH, BTSH, RT#10 y ST#35 con trastuzumab acoplado a pHrodo durante 6, 12, 24 y 48 horas. Se quería determinar si existían diferencias en la llegada de trastuzumab a los lisosomas y, por ende, en el proceso de internalización o degradación, que pudiesen explicar las diferencias de sensibilidad entre los modelos celulares.

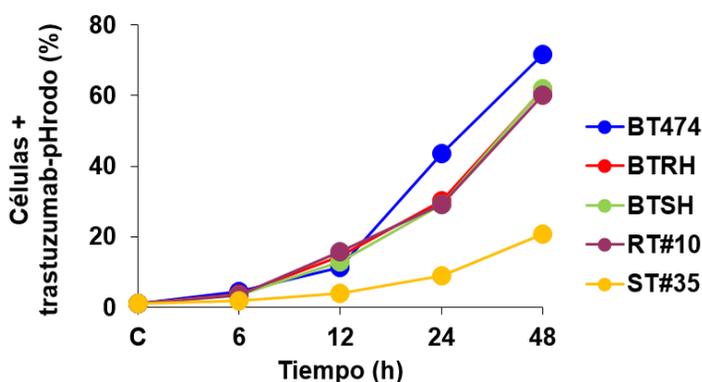


Figura 24. Marcaje de los modelos celulares con distinta sensibilidad a trastuzumab con trastuzumab-pHrodo. Las líneas celulares se incubaron con trastuzumab acoplado a pHrodo durante los tiempos indicados a 37°C y se determinó el porcentaje de células positivas mediante citometría de flujo. Los resultados muestran un experimento representativo que se repitió dos veces.

Se analizó el número de células fluorescentes mediante citometría de flujo. Los resultados mostraron que el número de células positivas incrementaba a lo largo del tiempo de incubación con trastuzumab-pHrodo con un perfil similar en todas las líneas, excepto en el caso del clon hipersensible a trastuzumab ST#35 cuyo número de células positivas fue mucho menor en todos los tiempos (Figura 24).

8. DEGRADACIÓN DE TRASTUZUMAB Y HER2

8.1. Colocalización de trastuzumab, HER2 y lisosomas

Una vez analizada la internalización de trastuzumab en los modelos celulares con distinta sensibilidad a dicho fármaco, se evaluó su degradación, así como la de HER2 mediante IF, analizando la colocalización de trastuzumab y HER2 con el marcador de lisosomas LAMP1. Las células BT474, BTRH, BTSH, RT#10 y ST#35 recibieron un pulso de trastuzumab y se incubaron durante 1, 3, 6, 24 y 48 horas para permitir su internalización. Los resultados mostraron que la colocalización entre trastuzumab y LAMP1 aumentaba progresivamente en todos los modelos celulares de acuerdo al tiempo de incubación (Figura 25). En el caso de BT474 y BTSH, el porcentaje de colocalización era más elevado que en el resto de los modelos celulares tras 24 y 48 horas de tratamiento, de acuerdo con la mayor acumulación intracelular de trastuzumab que se había observado anteriormente. En cuanto a HER2, no se observó una tendencia que indicase que HER2 se estuviese degradando en el lisosoma junto con trastuzumab, ya que la colocalización entre HER2 y LAMP1 no aumentaba de forma clara (Figura 25). En el caso del clon ST#35, el porcentaje de colocalización entre trastuzumab y HER2 parecía aumentar ligeramente de acuerdo al tiempo de tratamiento.

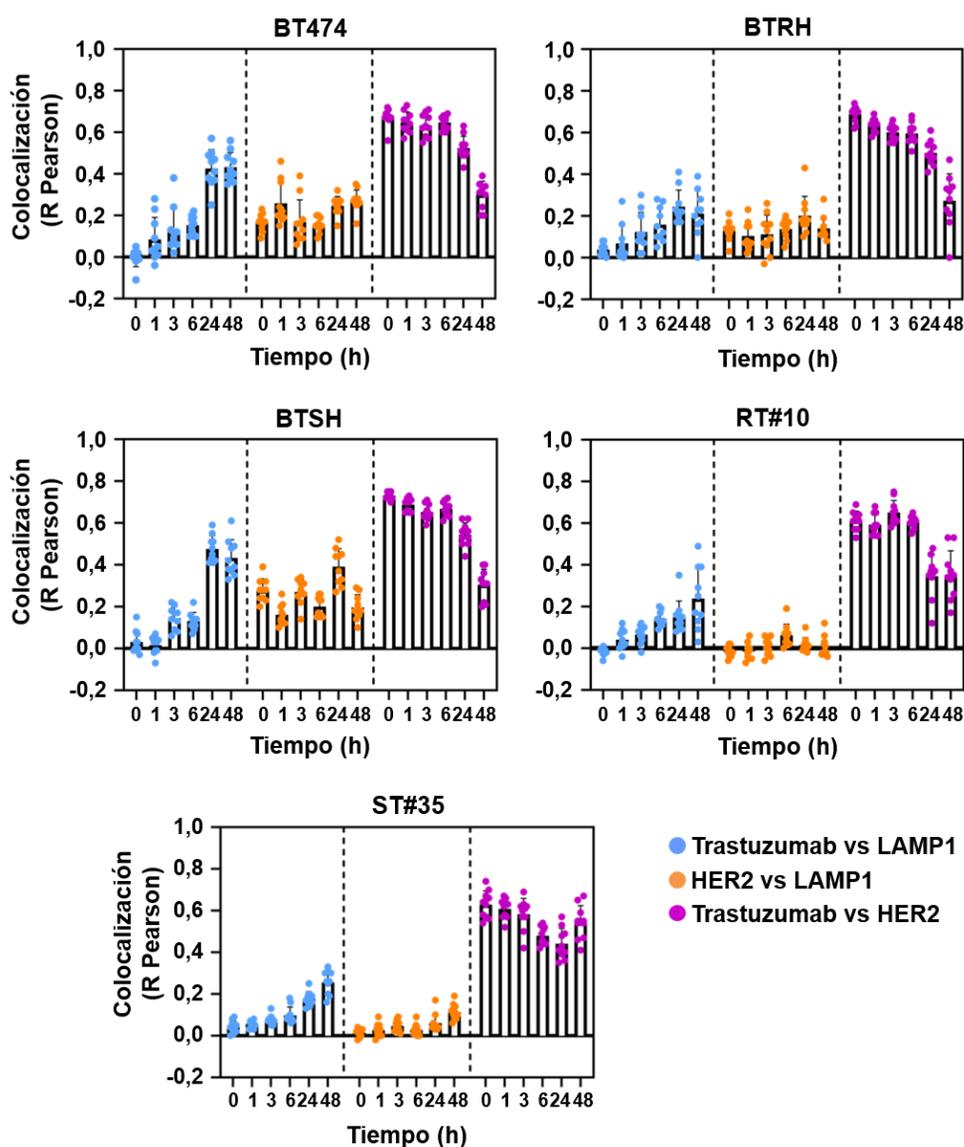


Figura 25. Colocalización de trastuzumab y LAMP1, HER2 y LAMP1 y trastuzumab y HER2 en las células BT474, BTRH, BTSH, RT#10 y ST#35 tras el tratamiento con trastuzumab. El experimento se realizó como se describe en la figura 22. En este caso, se marcaron trastuzumab, HER2 y los lisosomas. La colocalización se determinó mediante el coeficiente de correlación (R) de Pearson, utilizando la herramienta Coloc 2 de FIJI-ImageJ. Cada punto representa el valor de R en un campo. Los datos se muestran como la media \pm SD de 10 campos representativos.

8.2. Vida media de HER2 tras el tratamiento con trastuzumab

Para determinar si el tratamiento con trastuzumab causaba la degradación de HER2, se analizó la vida media de HER2 en superficie tras el tratamiento con

trastuzumab. Para ello, las células BT474, BTRH y BTSH fueron tratadas con sulfo-NHS-biotina para biotilinar las proteínas de superficie y se incubaron durante 24 y 48 horas para permitir la internalización de trastuzumab y HER2. Los resultados mostraron que el tratamiento con trastuzumab provocaba la degradación de HER2 en los tres modelos celulares con distinta sensibilidad a trastuzumab (Figura 26A). Por otro lado, a pesar de que trastuzumab causaba la degradación de HER2, el nivel de HER2 en superficie quedaba prácticamente inalterado (Figura 26B), lo que puede explicarse por su continua síntesis y degradación.

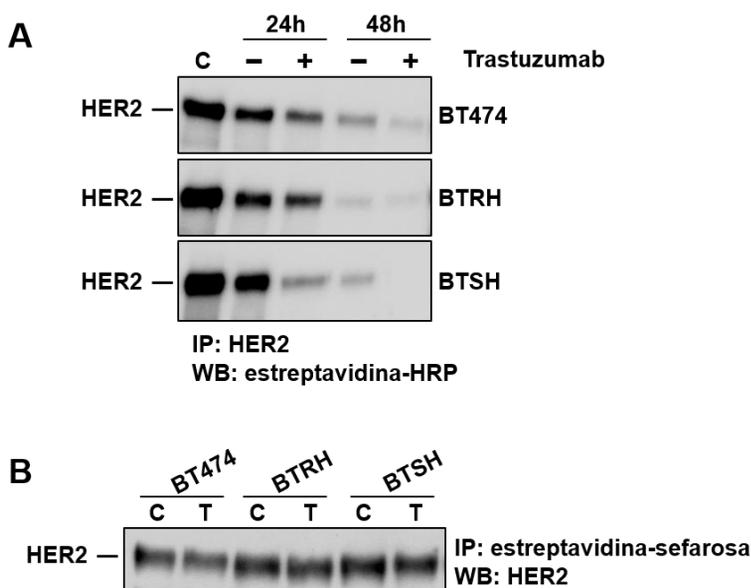


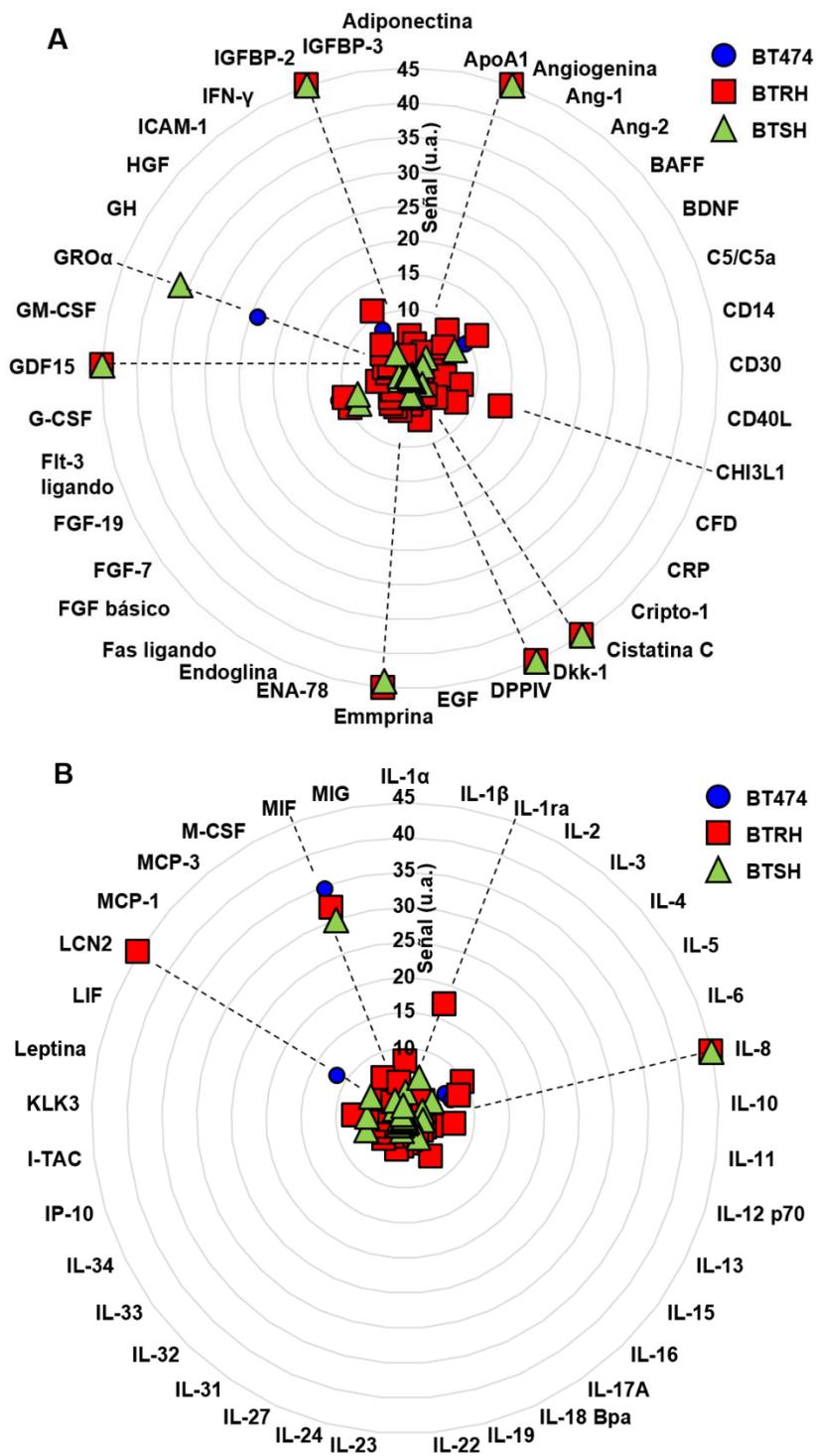
Figura 26. Degradación de HER2 tras el tratamiento con trastuzumab en BT474, BTRH y BTSH. **(A)** Las proteínas de membrana fueron marcadas con sulfo-NHS-biotina y las células se incubaron durante 24 y 48 horas en presencia o ausencia de trastuzumab. HER2 fue inmunoprecipitado con pertuzumab-affi-Gel10 y se detectó HER2 biotilado con estreptavidina-HRP. **(B)** Las células fueron incubadas en presencia o ausencia de trastuzumab durante 48 horas, y posteriormente fueron biotiladas con sulfo-NHS-biotina. Se inmunoprecipitaron las proteínas de la superficie que habían sido biotiladas con estreptavidina-sefarosa y se detectó HER2 con un anti-HER2.

9. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES EN LOS MODELOS CELULARES CON DISTINTA SENSIBILIDAD A TRASTUZUMAB

En experimentos rutinarios desarrollados en el laboratorio se observó que existían diferencias en el tiempo que tardaban las células BT474, BTRH y BTSH en adherirse a la placa de cultivo. Este hecho nos condujo a analizar la expresión de proteínas solubles que pudiesen ser las responsables de dicho efecto.

9.1. Citoquinas y quimioquinas

Se evaluó la expresión de 105 proteínas solubles en los sobrenadantes de las líneas BT474, BTRH y BTSH utilizando el *array* de anticuerpos Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit. Los resultados mostraron que todas las líneas expresaban una cantidad muy elevada de angiogenina, cistatina C, Dkk-1, emmprina (CD147), GDF-15, IGFBP-2, IL-8, MIF, PDGF-AA, TFF3, trombospondina-1 (THBS1) y VEGF (Figura 27A, 27B y 27C). En cuanto a las diferencias de expresión entre las líneas, se encontró que la proteína 1 similar a la quitinasa 3 (CHI3L1) (Figura 27A), el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra) (Figura 27B), la lipocalina-2 (LCN2) (Figura 27B), la serpina E1 (Figura 27C) y el receptor de plasminógeno tipo uroquinasa (uPAR) (Figura 27C) estaban más expresados en el MC de las células BTRH. Por su parte, GRO α (Figura 27A) y MIP-3 α (Figura 27C) estaban sobreexpresadas en las células hipersensibles a trastuzumab. Mientras que los niveles de GRO α estaban a su vez más expresados en la línea parental que en la resistente, la expresión de MIP-3 α era similar en las células BT474 y BTRH. Por último, la cantidad de PDGF-AA/AB liberada al medio fue superior en los dos modelos celulares sensibles a trastuzumab, BT474 y BTSH (Figura 27C). Los niveles del resto de quimioquinas y citoquinas estudiadas en los respectivos sobrenadantes de las líneas no fueron muy elevados ni se encontraron diferencias que pudiesen llegar a ser relevantes entre ellas.



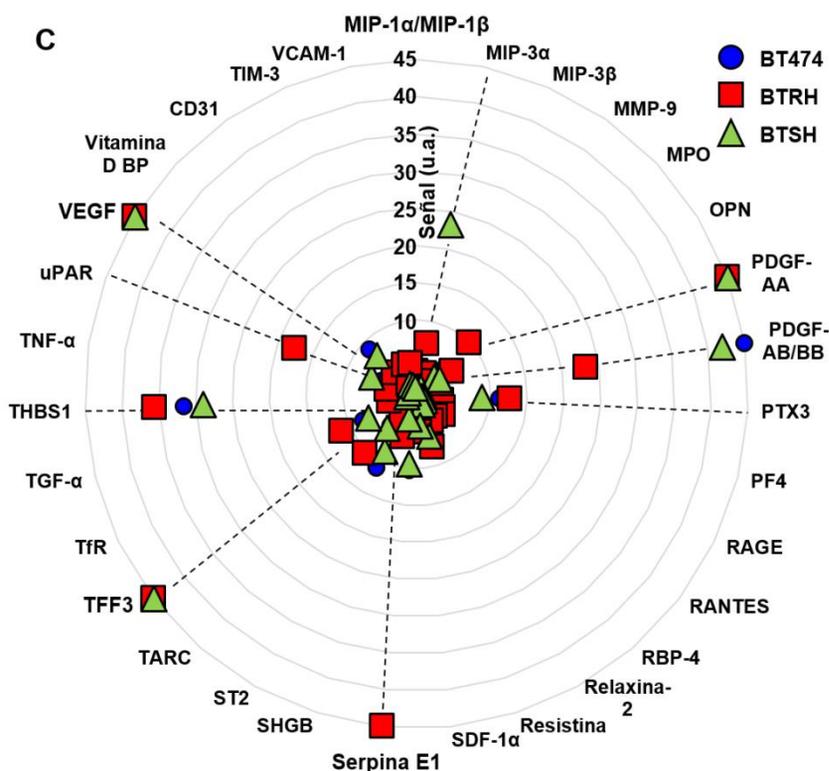


Figura 27. Análisis de la expresión de proteínas solubles liberadas por las células BT474, BTRH y BTSH. Las células fueron privadas de suero durante 24 horas y el medio condicionado se incubó con las membranas de anticuerpos siguiendo el protocolo indicado en el kit. El gráfico muestra la cuantificación de la expresión de las proteínas del *array*. Los datos se muestran como la señal media de los duplicados en unidades arbitrarias. Los resultados han sido divididos en tres gráficos de araña (A), (B) y (C).

9.2. Proteasas e inhibidores de proteasas.

Para complementar los resultados del *array* de citoquinas, se evaluó la expresión de proteasas e inhibidores de proteasas entre las líneas BT474 y BTRH. En este caso, se decidió no incluir la línea hipersensible ya que las diferencias de expresión más sustanciales habían sido encontradas en el modelo resistente, mientras que la expresión de proteínas entre BT474 y BTSH era más parecida. Se detectó la expresión de proteasas e inhibidores de proteasas en el MC de las líneas BT474 y BTRH utilizando el *array* de anticuerpos Proteome Profiler Human Protease / Protease Inhibitor Array Kit. Los resultados indicaron niveles muy elevados de las proteasas catepsina A, catepsina D y catepsina X/Z/P (CTSA, CTSD y CTSX, respectivamente) en BT474 y BTRH (Figura 28). En cuanto a los inhibidores de

proteasas, se encontraron niveles similares y muy elevados en las proteínas APP, cistatina B (CSTB) y cistatina C (CSTC), emmprina, HAI-1 y HAI-2 y el inhibidor tisular de metaloproteasas 2 (TIMP-2) (Figura 29).

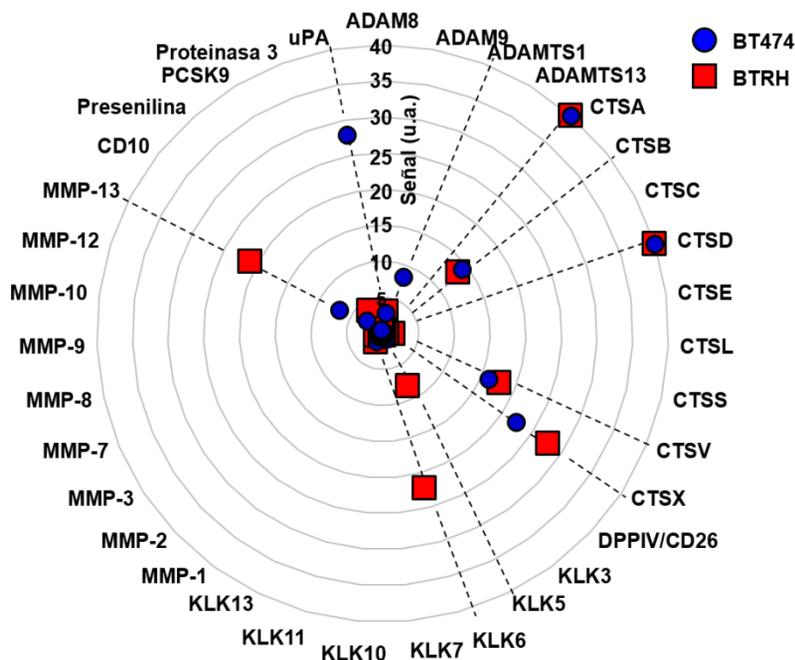


Figura 28. Análisis de la expresión de proteasas liberadas por las células BT474 y BTRH. El experimento se realizó como se indica en la figura 27. El gráfico muestra la cuantificación de la expresión de las proteínas del *array*. Los datos se muestran como la señal media de los duplicados en unidades arbitrarias.

En cuanto a las diferencias de expresión, los resultados demostraron que las kalikreínas 5 (KLK5) y 6 (KLK6) y la metaloproteasa 13 (MMP-13) estaban sobreexpresadas en BTRH, mientras las células parentales secretaron una mayor cantidad de ADAMTS1 y del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) en comparación con las células resistentes a trastuzumab (Figura 28). Entre los inhibidores de proteasas con mayor expresión en las células BTRH se encontraron la cistatina A (CSTA), HE4, latexina, LCN2, serpinina A5, B5 y serpinina E1, los inhibidores de la vía del factor tisular (TFPI) y por último, del inhibidor tisular de metaloproteasas 1 (TIMP-1) (Figura 29). Por el contrario, el TFPI-2 estaba más expresado en el sobrenadante de las células BT474 (Figura 29).

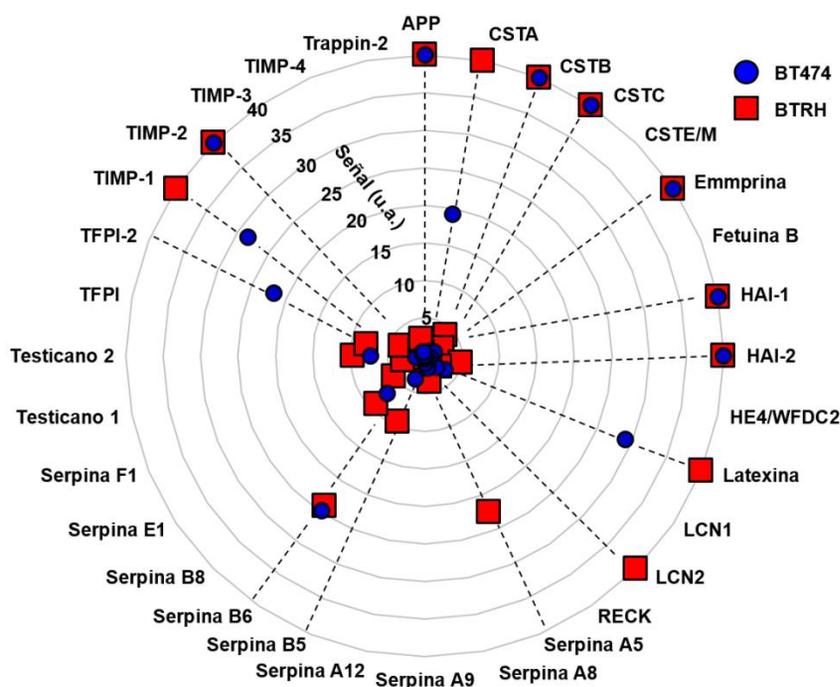


Figura 29. Análisis de la expresión de inhibidores de proteasas liberadas por las células BT474 y BTRH. El experimento se realizó como se indica en la figura 27. El gráfico muestra la cuantificación de la expresión de las proteínas del *array*. Los datos se muestran como la señal media de los duplicados en unidades arbitrarias.

10. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL EN LOS MODELOS CELULARES CON DISTINTA SENSIBILIDAD A TRASTUZUMAB

10.1. Análisis de las proteínas solubles en los modelos celulares BT474, BTRH y BTSH

Con la herramienta web Enrichr (Chen *et al.*, 2013; Kuleshov *et al.*, 2016), se estudiaron las vías en las que estaban implicadas las proteínas solubles que se expresaban de forma diferencial en las distintas líneas celulares. Enrichr mostró que dichas proteínas participaban en procesos relacionados con la organización y degradación de la matriz extracelular (ECM), la formación y disolución de coágulos de fibrina, la activación de metaloproteasas de matriz (MMPs) y la interacción entre proteínas de membrana no integrinas con la ECM (Figura 30).

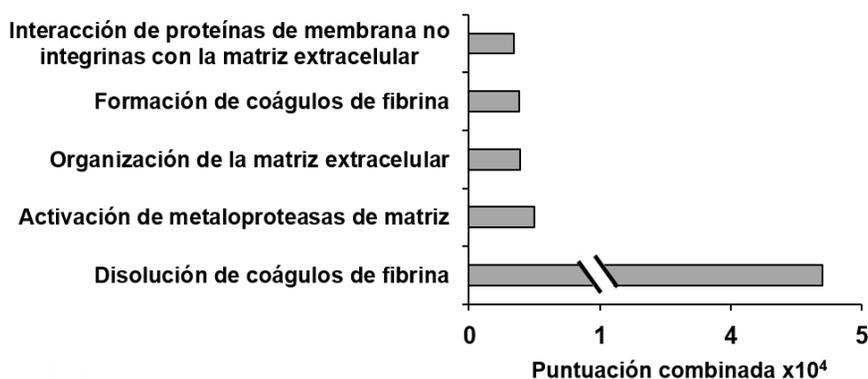


Figura 30. Análisis de enriquecimiento funcional de las proteínas solubles desreguladas entre BT474, BTRH y BTSH. Los genes que codifican las proteínas cuya expresión se encontró alterada en los *arrays* de las figuras 27, 28 y 29 fueron introducidos en la plataforma Enrichr. El resultado se muestra como la puntuación combinada (p -valor ajustado $< 0,05$ en todos los casos).

10.2. Análisis de enriquecimiento funcional entre las líneas BT474, BTRH y BTSH mediante GSEA

Las vías que habían sido identificadas con Enrichr estaban relacionadas directamente con procesos de adhesión, transición epitelio mesénquima (EMT) y migración. Por lo tanto, se decidió estudiar dichos procesos en los modelos celulares BT474, BTRH y BTSH utilizando los datos de expresión génica obtenidos de los *microarrays* (que serán descritos en el apartado 14) utilizando el programa GSEA (Mootha *et al.*, 2003; Subramanian *et al.*, 2005). Este programa identifica si existen diferencias de expresión significativas de grupos de genes que están relacionados entre sí, entre dos condiciones experimentales. En nuestro caso, dos líneas celulares con distinta sensibilidad a trastuzumab. Los resultados demostraron que los procesos de adhesión celular, EMT y migración estaban enriquecidos significativamente en las células BTRH en comparación con la línea parental (Figura 31). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas entre las células hipersensibles y la línea parental.

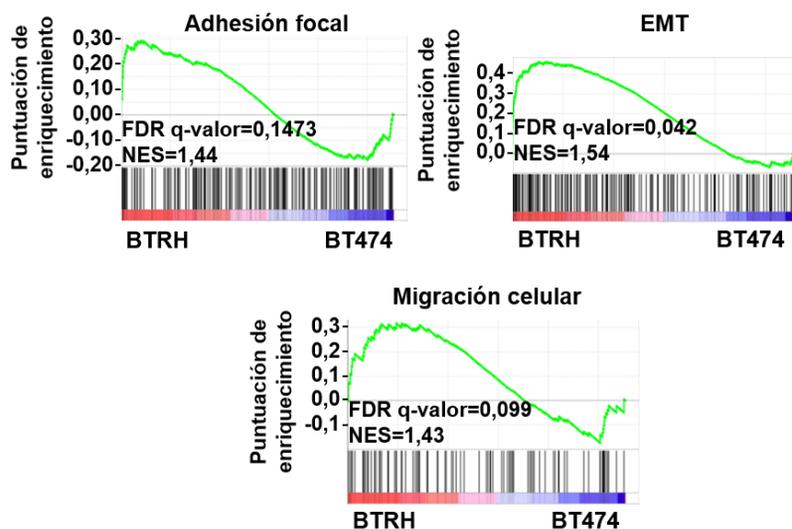


Figura 31. Análisis de enriquecimiento funcional con GSEA. Se estudiaron los perfiles de enriquecimiento de los procesos biológicos indicados en las células BT474 y BTRH. Cada línea del código de barras representa un gen del conjunto analizado. Los genes que se encuentran en el extremo rojo están sobreexpresados en BTRH mientras que los del extremo en azul en BT474. La línea verde representa la puntuación de enriquecimiento. Las comparaciones entre los dos grupos se realizaron con el test estadístico de GSEA. Valores de FDR q-valor < 0,25 se consideran significativos. NES: puntuación de enriquecimiento normalizada.

11. ADHESIÓN Y MIGRACIÓN CELULAR EN LOS MODELOS CELULARES CON DISTINTA SENSIBILIDAD A TRASTUZUMAB

Con el fin de validar funcionalmente los datos proporcionados por GSEA, se estudiaron los procesos de adhesión y migración celular en las líneas BT474, BTRH y BTSH. Para ello, las placas fueron previamente tratadas con FN y se cuantificó el número de células adheridas a los 30 minutos, 1 y 2 horas de incubación. Los resultados validaron los datos de enriquecimiento génico, encontrando que las células BTRH se adherían más rápidamente que BT474 y BTSH (Figura 32). Además, se observó que no existían diferencias en la adhesión entre la línea parental y el modelo hipersensible (Figura 32).

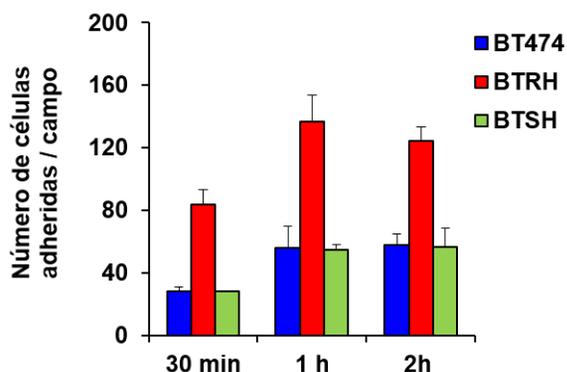


Figura 32. Análisis del proceso de adhesión al sustrato en las células BT474, BTRH y BTSH. Las células se sembraron en placas pretratadas con FN durante los tiempos indicados. Los datos se presentan como la media del número de células adheridas por campo \pm SD de un experimento representativo que se repitió en tres ocasiones.

Por último, se estudió el proceso de migración mediante ensayos de cierre de herida en placa. Se monitorizó la migración celular durante 48 horas.

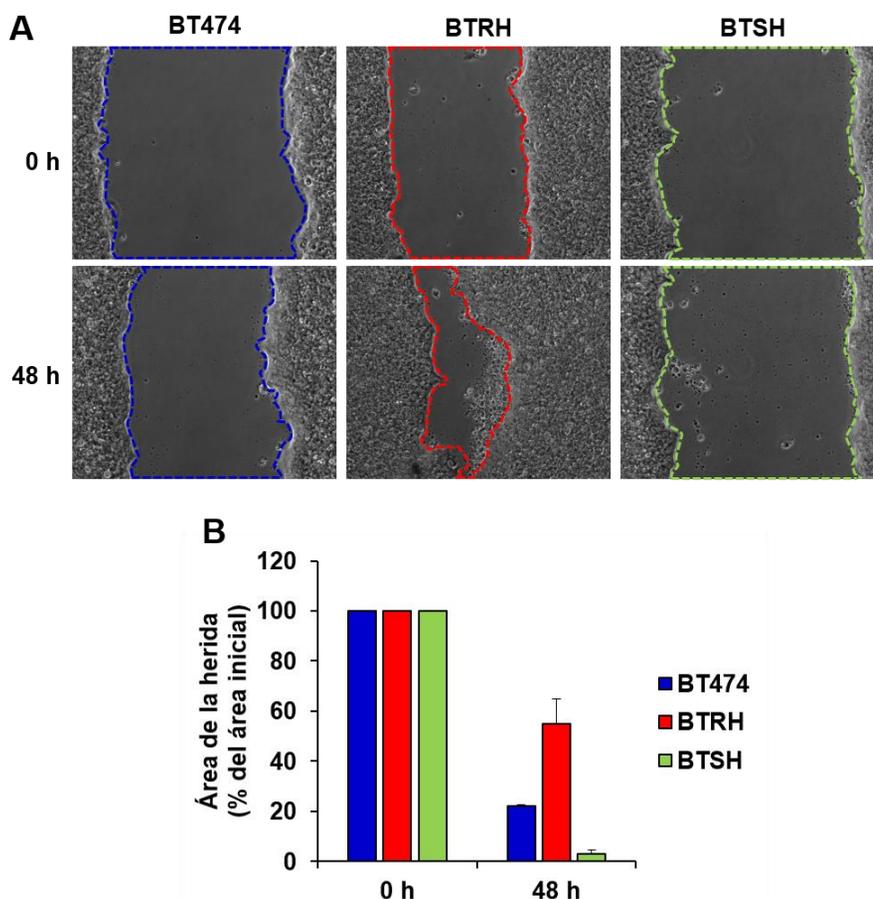


Figura 33. Análisis del proceso de migración celular en las células BT474, BTRH y BTSH. Las células fueron sembradas y tratadas con mitomicina C. Se monitorizó el cierre de la herida durante 48 horas. **(A)** Imágenes representativas correspondientes a una herida de cada línea celular en inicio y tras 48 horas. **(B)** Cuantificación del área de la herida respecto al área de inicio (al que se le asignó el valor 100 %). Los datos se muestran como la media \pm SD de tres réplicas de un experimento independiente que fue repetido tres veces.

Es importante destacar que las células BT474 no son un modelo con gran capacidad migratoria. Sin embargo, se observaron diferencias entre las líneas con distinta sensibilidad a trastuzumab. Las células resistentes migraban más que las BT474 y éstas a su vez, tenían más habilidad para migrar que el modelo hipersensible (Figura 33A y 33B). Así, se validaron las diferencias encontradas en migración entre BT474 y BTRH en los datos de expresión génica.

12. VALIDACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS SOLUBLES DESREGULADAS EN LOS ARRAYS DE ANTICUERPOS

Cuando se analizaron las diferencias de expresión de proteínas solubles en el apartado 9, los resultados demostraron la existencia de varias proteínas alteradas (Serpina E1, Serpina A5, uPA y uPAR) que participan en el sistema de activación del plasminógeno. La expresión de estas cuatro proteínas se encontró alterada entre las células BT474 y BTRH. Mientras que el uPA estaba sobreexpresado en la línea parental y el resto lo estaban en las células resistentes (Figuras 27C, 28 y 29). Una vez se interpretaron estos datos, se decidió profundizar en el estudio de esta vía y se evaluó la cantidad de Serpina E1 y uPAR en el MC de las líneas BT474, BTRH y BTSH mediante WB. Los resultados demostraron que las células BTRH secretaban más cantidad de ambas proteínas (Figura 34).

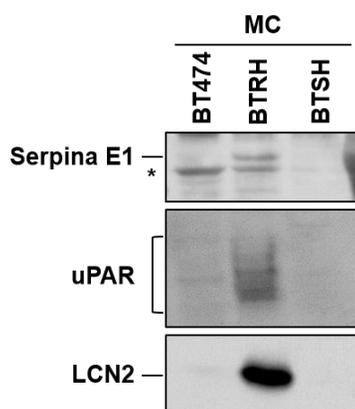


Figura 34. Expresión de las proteínas serpina E1, uPAR y LCN2 en el medio condicionado de las líneas celulares BT474, BTRH y BTSH. Los sobrenadantes se obtuvieron como se indica en la figura 27. MC: medio condicionado; *: indica una banda inespecífica reconocida por el anticuerpo anti-Serpina E1.

También se decidió trabajar con la proteína LCN2 ya que los resultados de los *arrays* de proteínas indicaron que era la más diferencialmente expresada entre las células BT474 y las BTRH. Los resultados mostraron que las células BTRH secretaban más cantidad de LCN2 que las células parentales y las hipersensibles (Figura 34), concordando con los datos del *array* de anticuerpos.

13. ESTUDIO DE LCN2 EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y LA RESPUESTA A TRASTUZUMAB EN LÍNEAS DE CÁNCER DE MAMA HER2+

13.1. Análisis de la expresión de LCN2 en líneas celulares de cáncer de mama HER2+

Cuando se validó la expresión de Serpina E1, uPAR y LCN2 mediante WB (Figura 34), se observó que la proteína que se detectaba con mayor facilidad tanto en los extractos como en los sobrenadantes celulares era la LCN2. La LCN2 es una glicoproteína secretada que se ha encontrado sobreexpresada en tumores de mama (Leng *et al.*, 2009). Se decidió evaluar la expresión de LCN2 mediante WB en otras líneas celulares de cáncer de mama HER2+ tanto sensibles (BT474 y SKBR3) como resistentes (BTRH, RT#1, RT#5, RT#10, HCC1419, HCC1569, HCC1954 y HCC2218) a trastuzumab. Queríamos saber si la sobreexpresión de LCN2 era un patrón común de las líneas con resistencia primaria o secundaria a trastuzumab.

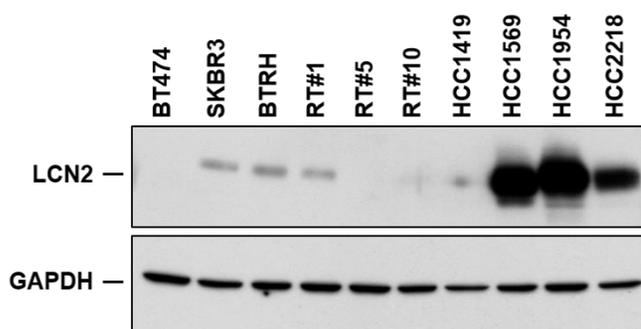


Figura 35. Análisis de la expresión de LCN2 en modelos celulares de cáncer de mama HER2+ sensibles y resistentes a trastuzumab.

Los resultados mostraron que la expresión de LCN2 no era similar en las líneas resistentes a trastuzumab. Las células SKBR3, a pesar de ser sensibles,

expresaban la proteína mientras que entre los clones generados en el laboratorio con resistencia adquirida solo la expresaba RT#1 (Figura 35). Por su parte, tres de las cuatro líneas HCC con resistencia primaria al anticuerpo expresaron grandes cantidades de LCN2 (Figura 35).

13.2. Efecto del silenciamiento de *LCN2* sobre la proliferación celular y la sensibilidad a trastuzumab en células BTRH

Para profundizar en el estudio de la *LCN2* se realizaron ensayos de pérdida de función en las células BTRH. Se silenció la expresión de *LCN2* en las células resistentes con distintas secuencias de shRNA contra *LCN2*. Se comprobó que se había conseguido un buen silenciamiento analizando los niveles de *LCN2* tanto en el extracto como en el MC de las células (Figura 36A). Los ensayos de proliferación demostraron que el silenciamiento de *LCN2* disminuía la proliferación celular pero no afectaba a la respuesta a trastuzumab en las células BTRH (Figura 36B).

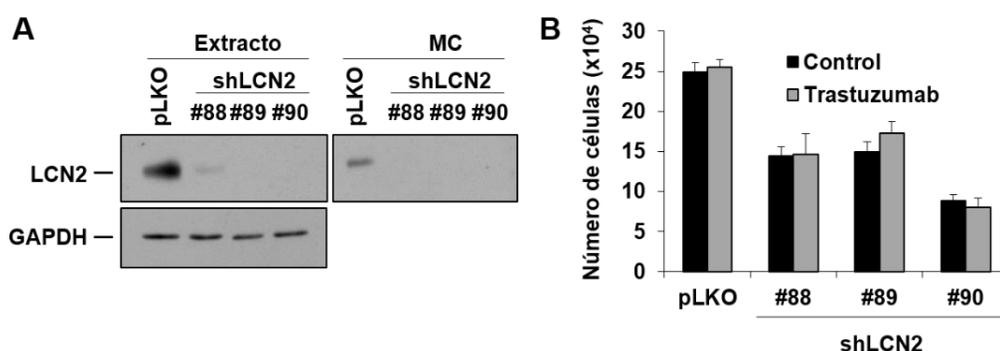


Figura 36. Efecto del silenciamiento de *LCN2* sobre la proliferación celular y la respuesta a trastuzumab en BTRH. Las células BTRH fueron infectadas con lentivirus que contenían distintas secuencias de shRNA contra *LCN2* o shRNA no codificante (pLKO). (A) Expresión de *LCN2* en el extracto y el medio condicionado de las células transducidas determinada por WB. (B) Las células fueron sembradas y tratadas con trastuzumab durante 5 días. La proliferación celular se analizó mediante contaje. Los resultados muestran la media del número de células \pm SD de un experimento representativo que se repitió tres veces.

13.2.1. Efecto del silenciamiento de *LCN2* en la proliferación celular y la respuesta a trastuzumab en BT474 y HCC1569

Para descartar que la disminución en la tasa de proliferación celular como consecuencia del silenciamiento de *LCN2* en las células BTRH no era exclusivo de

estas células, se decidió silenciar la proteína en otras líneas que expresaban distintas cantidades de LCN2: BT474 y HCC1569.

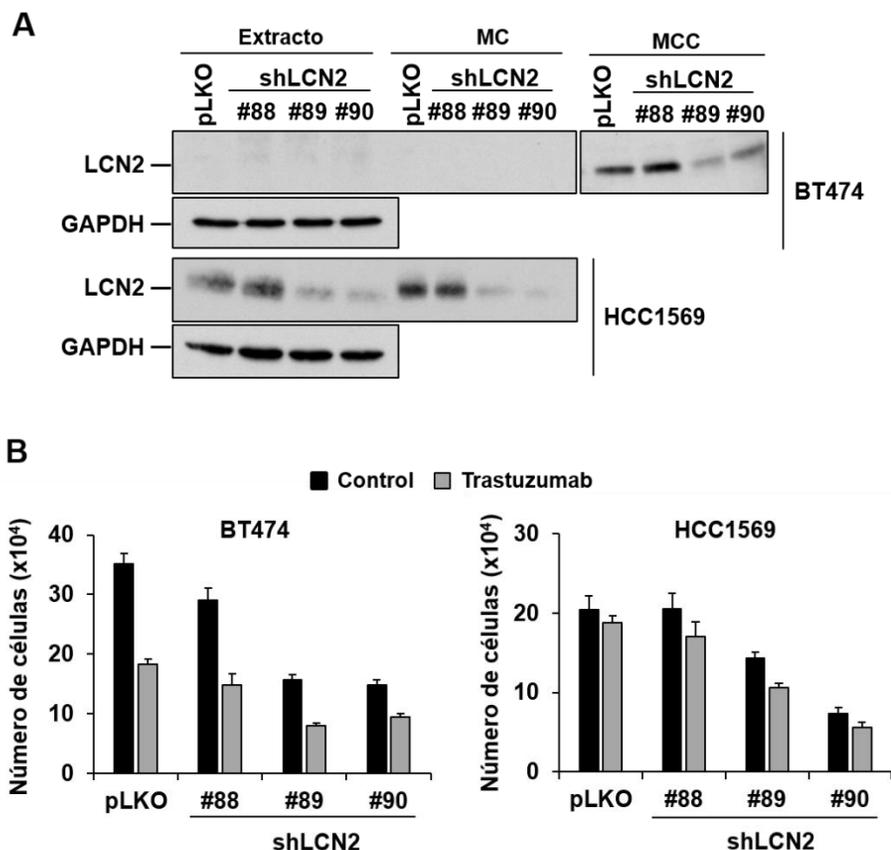


Figura 37. Efecto del silenciamiento de LCN2 sobre la proliferación celular y la respuesta a trastuzumab en células BT474 y HCC1569. (A) y (B) Los experimentos se realizaron como se describe en la figura 36. MCC: medio condicionado concentrado.

En la línea BT474, no se consiguió detectar la expresión de LCN2 ni en el extracto ni en su MC. Sin embargo, al concentrar las proteínas del sobrenadante para determinar la expresión de LCN2 en una mayor cantidad de muestra se detectó LCN2 (Figura 37A), aunque en comparación con otras líneas, su expresión en BT474 era despreciable. Se consiguió un buen silenciamiento de LCN2 con las secuencias de shRNA #89 y #90, pero no con la #88 tanto en células BT474 como en células HCC1569 (Figura 37A). Se evaluó la proliferación celular en ausencia y presencia de trastuzumab, observando los mismos resultados que en BTRH (Figura 36B), el

silenciamiento de *LCN2* disminuyó la proliferación celular de las líneas BT474 y HCC1569 pero su sensibilidad a trastuzumab no se vio modificada (Figura 37B).

14. PERFILES TRANSCRIPTÓMICOS EN LAS LÍNEAS BT474, BTRH y BTSH MEDIANTE ARRAYS DE EXPRESIÓN GÉNICA

Una vez realizada la caracterización celular y bioquímica de los modelos celulares con distinta sensibilidad a trastuzumab, se estudiaron las diferencias en cuanto a expresión génica entre BT474, BTRH y BTSH mediante *microarrays*. El objetivo era la identificación de genes que pudiesen explicar las diferencias que existían en la respuesta al tratamiento con trastuzumab. Dichos genes podrían ser utilizados posteriormente para predecir respuesta a trastuzumab en cáncer de mama HER2+.

El PCA mostró que las células BT474, BTRH y BTSH tenían patrones de expresión génica diferentes y la asociación entre las réplicas de cada línea celular (Figura 38A). Los *volcano plots* muestran las diferencias de expresión génica entre las células BT474, BTRH y BTSH (Figura 38B, 38C y 38D). Se determinó el número de GDEs entre BTRH respecto a la línea parental y BTSH respecto a la línea parental, así como entre el modelo resistente y el hipersensible. Se encontraron 425 genes desregulados entre BTRH y BT474. De ellos, 240 genes estaban infraexpresados y 185 sobreexpresados en BTRH respecto a BT474 (Figura 38B). Las diferencias en expresión génica encontradas entre las células hipersensibles y la línea parental fueron inferiores, con un total de 160 genes expresados diferencialmente. De ellos, 59 estaban infraexpresados en BTSH respecto a la línea parental mientras que 101 genes estaban sobreexpresados (Figura 38C). Por último, el número de genes desregulados entre las líneas BTRH y BTSH se elevó hasta 828, como se esperaba. Entre ellos, 505 estaban infraexpresados en BTRH respecto a BTSH y 323 sobreexpresados (Figura 38D).

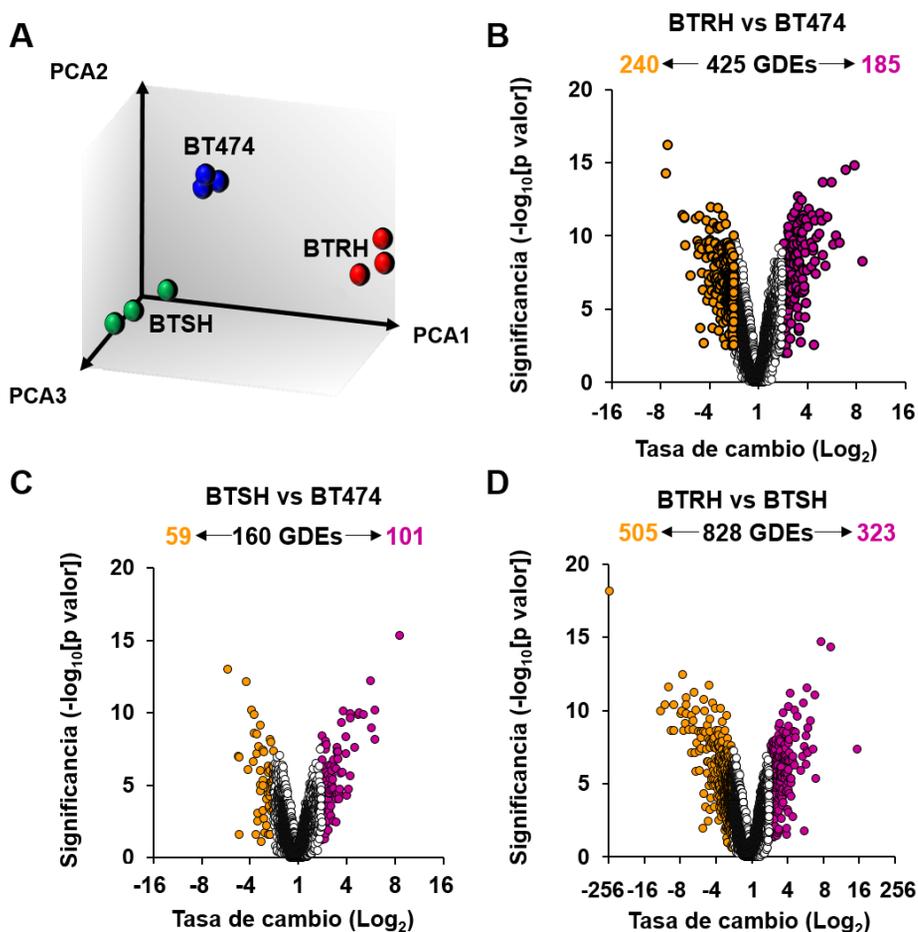


Figura 38. Análisis de perfiles de expresión génica en las células BT474, BTRH y BTSH con *microarrays*. (A) PCA de los datos obtenidos de los *microarrays*. Se muestran las tres réplicas de cada línea celular. *Volcano plots* en los que se representan los GDEs entre BTRH y BT474 (B), BTSH y BT474 (C) y BTRH y BTSH (D). Se estableció un corte de tasa de cambio de 2 y p -valor $< 0,05$. Los genes que cumplen dichos criterios se muestran en amarillo si están infraexpresados y en rosa si están sobreexpresados.

A continuación, para ir un paso más allá en la búsqueda de genes, se razonó que aquellos que estuviesen expresados de forma inversa podrían correlacionarse mejor con la sensibilidad o la resistencia a trastuzumab. Se buscaron aquellos genes que estuviesen diferencialmente expresados respecto a la línea parental y que además tuviesen “signo opuesto” en BTRH y BTSH. Es decir, se solaparon los genes que estaban sobreexpresados en BTRH respecto a la línea parental (185) con los genes que estaban infraexpresados en BTSH respecto a la línea parental (59) y viceversa (sobreexpresados en BTSH (101) e infraexpresados en BTRH (240)). Se identificaron 6 genes sobreexpresados en BTRH e infraexpresados en BTSH al mismo tiempo y 23

genes sobreexpresados en BTSH e infraexpresados en BTRH (Figura 39A). En la figura 39B, se muestran los 29 genes identificados con los valores de la tasa de cambio en BTRH y BTSH respecto a BT474.

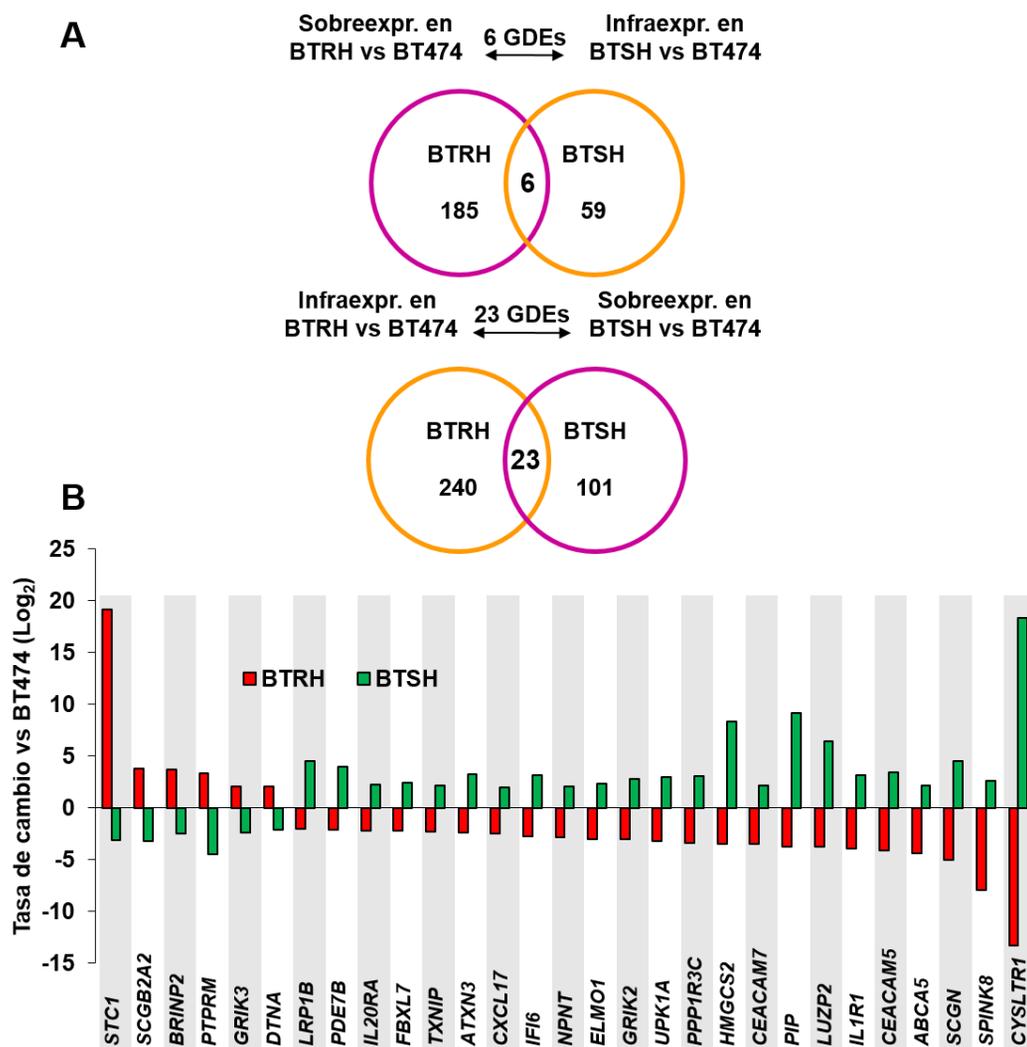


Figura 39. Identificación de GDEs y con “signo opuesto” en las células resistentes e hipersensibles a trastuzumab. (A) Los diagramas de Venn muestran el solapamiento de genes identificados en la figura 38 que tienen expresión contraria en las líneas BTRH y BTSH respecto a la línea parental. **(B)** La gráfica muestra la tasa de cambio respecto a la línea BT474 de los 29 genes con “signo opuesto”.

Posteriormente, se analizó la expresión de los 29 genes seleccionados mediante qRT-PCR. La expresión de un total de 22 genes (4 sobreexpresados en BTRH y 18 sobreexpresados en BTSH) fue validada al coincidir su tendencia con los

datos de los *microarrays* (Figura 40). La expresión de los 7 genes restantes no fue validada porque su expresión no coincidió con los datos de los *microarrays*.

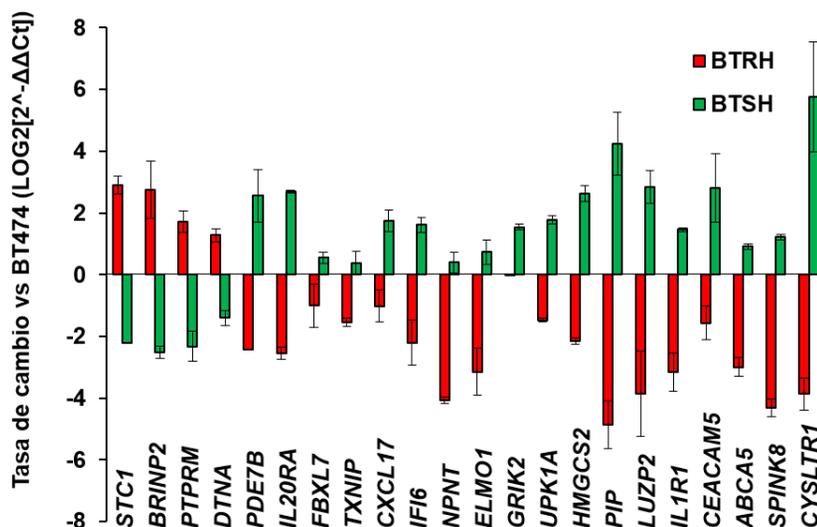


Figura 40. Validación de la expresión de los GDEs y con “signo opuesto” mediante qRT-PCR. Se analizó la expresión de los 29 genes identificados en la figura 39 mediante qRT-PCR. Los datos muestran los 22 GDEs cuya expresión fue validada ya que concordaba con los datos obtenidos en los *microarrays*. La gráfica muestra los niveles de mRNA de cada gen que se normalizaron con la expresión de *GAPDH* y se relativizaron con su expresión en la línea BT474. Los resultados se muestran como de la tasa de cambio \pm SD respecto a la línea BT474 de tres experimentos independientes.

15. GENES CON VALOR PRONÓSTICO Y PREDICTIVO EN LOS MODELOS CELULARES CON DISTINTA SENSIBILIDAD A TRASTUZUMAB

15.1. Análisis de pronóstico con KM plotter

Una vez confirmada la expresión de los genes, se decidió analizar su papel como potenciales indicadores de pronóstico en una cohorte de pacientes con cáncer de mama HER2+ utilizando la herramienta bioinformática KM plotter (Györfy *et al.*, 2010). Los análisis demostraron que una expresión elevada de *PDE7B*, *ELMO1*, *UPK1A* y *GRIK2*, que estaban sobreexpresados en células BTSH e infraexpresados en BTRH, era indicativa de pronóstico favorable en las pacientes (Figura 41 y Figura 45).

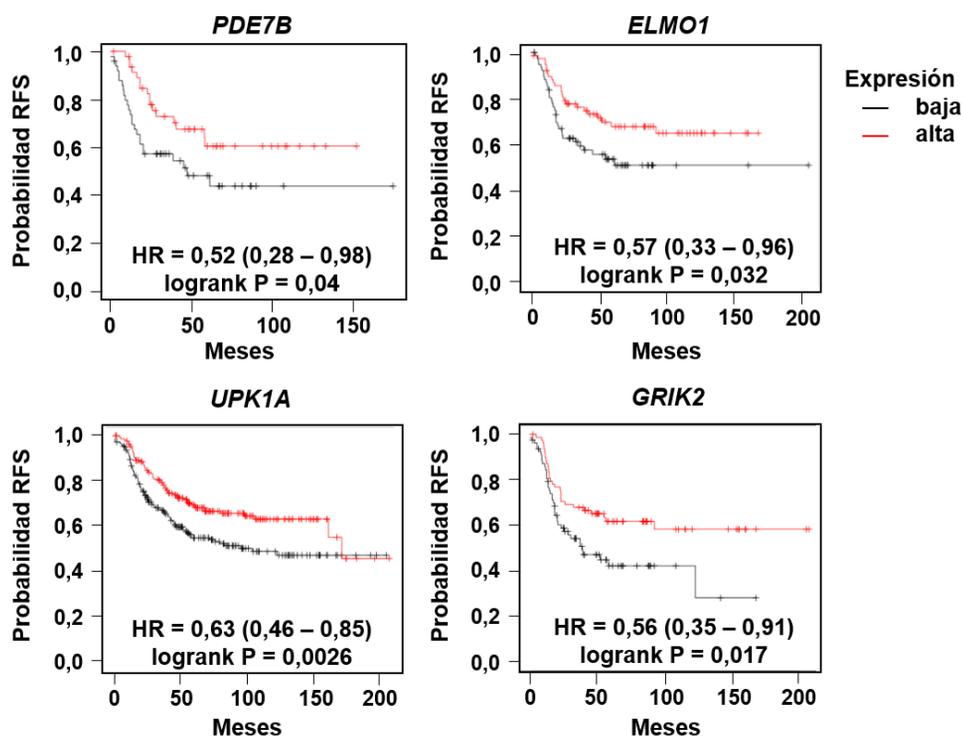


Figura 41. Identificación de genes biomarcadores de pronóstico en pacientes HER2+. Los genes que habían sido previamente validados por qRT-PCR fueron introducidos en el KM plotter y se evaluó su correlación con la supervivencia libre de recaída (RFS) en una cohorte de pacientes con cáncer de mama HER2+. El punto de corte que se utilizó para dividir a los pacientes en expresión alta o baja fueron el primer y el cuarto cuartil. Las gráficas muestran los genes que eran indicativos de buen pronóstico de forma significativa ($p < 0,05$) y estaban sobreexpresados en las células BTSH. HR: Hazard ratio.

Seguidamente, se analizó si los cuatro genes identificados podían predecir pronóstico actuando como firma génica en pacientes con cáncer de mama HER2+. Se encontró que una expresión elevada de la combinación de dichos genes se correlacionaba con mejor pronóstico de forma significativa (Figura 42 y Figura 45). Así, tenemos varios genes y un grupo de genes que podrían ser potencialmente utilizados como biomarcadores de buen pronóstico en pacientes con cáncer de mama HER2+. Sin embargo, se confirmó que ninguno de los genes sobreexpresados en las células resistentes, ya sea de forma individual o como firma génica, era indicativo de mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama HER2+ (Figura 45).

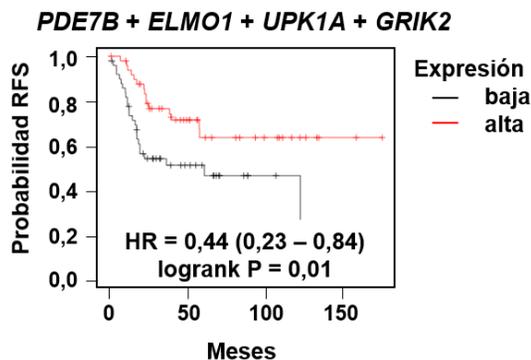


Figura 42. Identificación de una firma génica que predice buen pronóstico en pacientes HER2+. Los genes que había sido identificados como biomarcadores de buen pronóstico fueron introducidos de forma conjunta en KM plotter y se analizó su correlación con la RFS en una cohorte de pacientes con cáncer de mama HER2+. Se utilizó la herramienta de clasificación multigénica para analizar la expresión génica combinada de los cuatro genes indicados. Las pacientes fueron divididas en alta o baja expresión por los cuartiles uno y cuatro. La gráfica muestra un grupo de genes sobreexpresados en BTSH cuya expresión elevada es indicativa de buen pronóstico de forma significativa ($p < 0,05$).

15.2. Análisis de respuesta a trastuzumab con ROC plotter

A continuación, se evaluó si los 22 GDEs con “signo opuesto” que habían sido validados por qRT-PCR predecían respuesta a trastuzumab en una cohorte de pacientes con cáncer de mama HER2+ que habían sido tratadas con trastuzumab. Se utilizó la herramienta ROC plotter, que permite identificar biomarcadores predictivos de respuesta a tratamiento utilizando datos transcriptómicos de un número elevado de pacientes (Fekete y Gyórfy, 2019). Se encontró que la expresión de *ELMO1*, *UPK1A* y *GRIK2*, genes sobreexpresados en las células BTSH e infraexpresados en BTRH, era significativamente mayor en las pacientes HER2+ que respondieron a trastuzumab (Figura 43 y Figura 45).

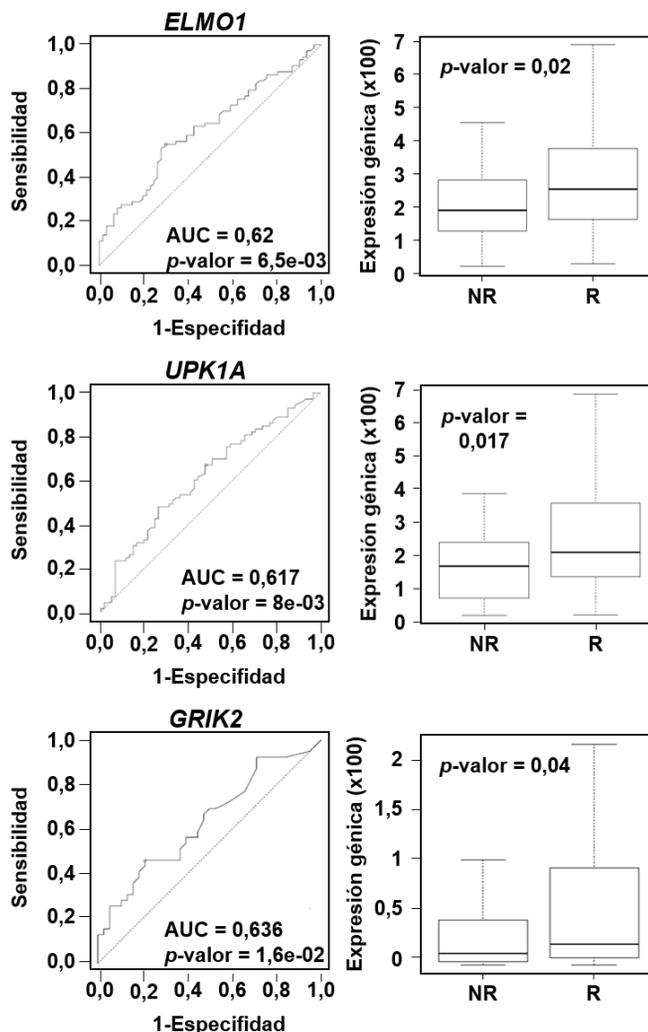


Figura 43. Identificación de genes predictivos de respuesta a trastuzumab en pacientes HER2+. Los genes cuya expresión había sido validada mediante qRT-PCR fueron introducidos en el ROC plotter para analizar su correlación con la respuesta patológica completa en pacientes con cáncer de mama HER2+ tratadas con trastuzumab. Las gráficas muestran los genes que predecían buena respuesta a trastuzumab de forma significativa y estaban sobreexpresados en las células BTSH. Se seleccionaron los genes cuya AUC > 0,6 con p -valor < 0,05. Un valor de AUC = 0,6-0,7 indica que se trata de un biomarcador con potencial utilidad en clínica. Además, las diferencias de expresión entre los grupos de pacientes tenían eran significativas, con p -valor < 0,05 para el test de Mann-Whitney. NR: no respondedoras; R: respondedoras.

De forma análoga a los resultados de KM plotter, se analizó si los genes presentados en la figura 40 funcionaban como firma génica predictiva de respuesta a trastuzumab. Para ello, los genes fueron combinados primero en parejas, y posteriormente los tres juntos. En todos los casos, estos genes fueron identificados a través de ROC plotter como biomarcadores predictivos de buena respuesta a

trastuzumab con uso potencial en clínica, ya sea individualmente o como firma génica (Figura 44A y Figura 45). Además, se amplió la firma génica con el gen *PDE7B* que había sido relacionado con buen pronóstico en KM plotter pero no jugaba un papel significativo a la hora de predecir respuesta a trastuzumab individualmente. Los resultados mostraron que *PDE7B* predecía buena respuesta a trastuzumab de forma significativa formado parte de la firma génica (Figura 44B y Figura 45).

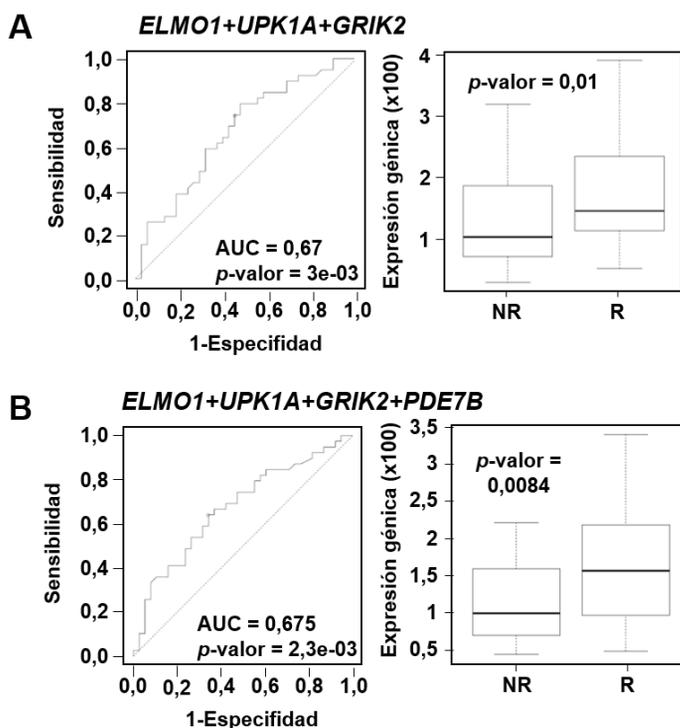


Figura 44. Identificación de firmas génicas predictivas de buena respuesta a trastuzumab en pacientes HER2+. Los biomarcadores identificados en la figura 43 (A), así como el gen *PDE7B* que había sido identificado como biomarcadores de pronóstico en la figura 41 (B), se agruparon con la opción firma y se evaluó su correlación con la respuesta patológica completa en pacientes con cáncer de mama HER2+ tratadas con trastuzumab mediante ROC plotter. Las gráficas muestran las firmas génicas que predecían buena respuesta a trastuzumab de forma significativa en pacientes HER2+ y estaban sobreexpresadas en células BTSH.

Por tanto, *ELMO1*, *UPK1A* y *GRIK2* son biomarcadores predictivos de respuesta a trastuzumab que podrían ser potencialmente utilizados en la clínica. De esta manera, se confirmó que las células BTSH eran un buen modelo para predecir sensibilidad a trastuzumab. Por el contrario, ninguno de los genes sobreexpresados en

las células resistentes fue significativo a la hora de predecir respuesta a trastuzumab en pacientes (Figura 45).

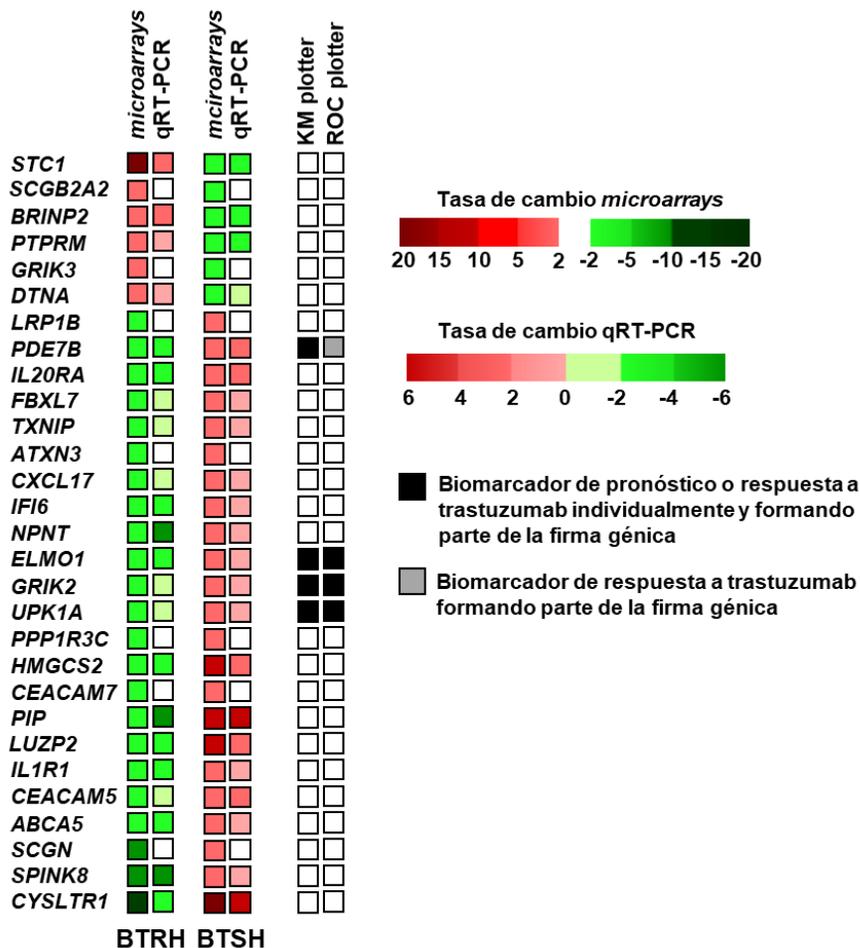


Figura 45. Representación esquemática de los valores de expresión diferencial de los *microarrays*, la validación mediante qRT-PCR y el papel como biomarcadores de pronóstico y respuesta a trastuzumab de los GDEs “con signo opuesto” identificados en las células BTRH y BTSH respecto a la línea parental BT474.

16. GENES PREDICTIVOS DE RESPUESTA A TRASTUZUMAB EN PACIENTES DEL ENSAYO PAMELA

Una vez realizados los análisis anteriores con las herramientas KM plotter y ROC plotter, para explorar más a fondo la capacidad de predecir respuesta a trastuzumab basada en los datos de expresión génica obtenidos mediante *microarrays*, se realizó un tercer estudio adicional con los datos genómicos de los tumores de pacientes con cáncer de mama del ensayo PAMELA (Lombart-Cussac *et al.*, 2017).

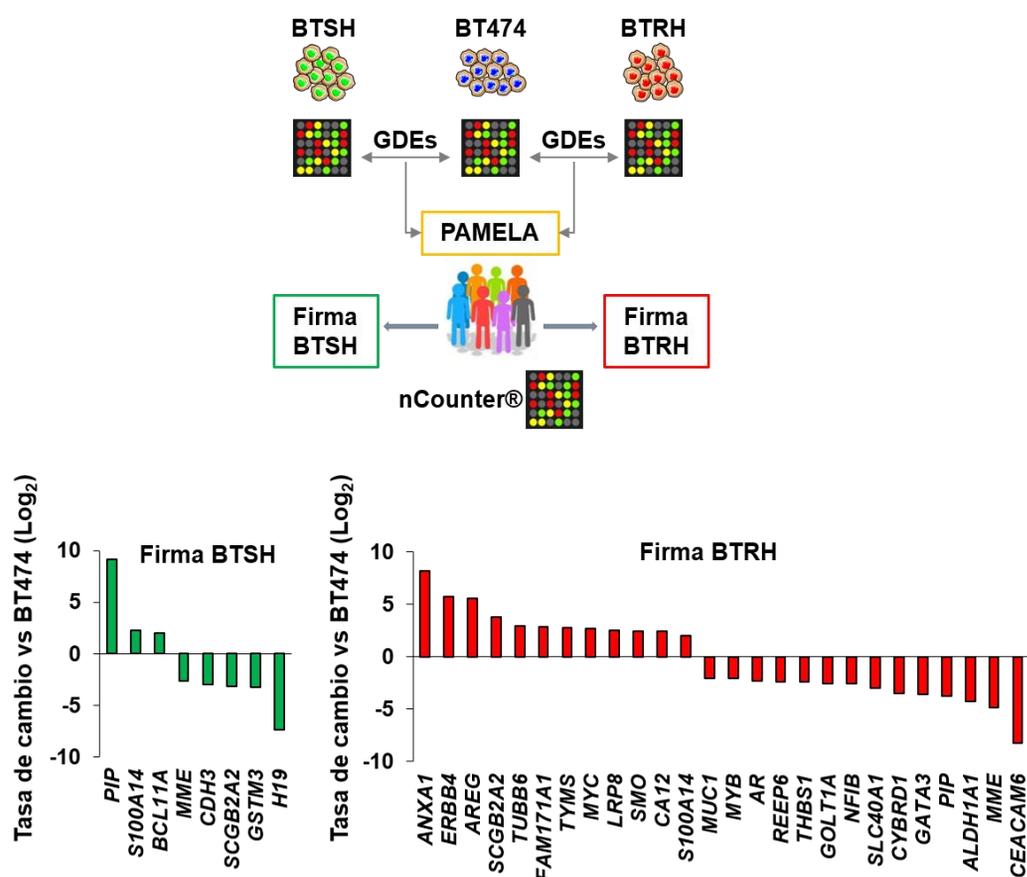


Figura 46. Firmas génicas de hipersensibilidad y de resistencia a trastuzumab. Las firmas se generaron solapando los GDEs en las células BTRH y BTSH respecto a la línea parental identificados en los *microarrays* con los genes presentes en el análisis de los tumores de las pacientes del ensayo PAMELA. Los datos muestran la tasa de cambio de cada gen respecto a la línea BT474.

Los GDEs en BTRH y BTSH respecto a la línea parental que habían sido identificados en el análisis de los *microarrays* (Figura 38) se compararon con los

datos de expresión génica de los tumores de las pacientes que habían sido obtenidos mediante la plataforma nCounter (Figura 47). Se generó una firma génica de resistencia y otra de hipersensibilidad con los GDEs en BTRH y BTSH que además estaban presentes en los análisis de expresión génica de las pacientes (Figura 46). La firma de hipersensibilidad estaba formada por 8 genes, 3 sobreexpresados en BTSH respecto a BT474 y 5 infraexpresados (Figura 46), mientras que la firma de resistencia estaba formada por 26 genes, 12 sobreexpresados y 14 infraexpresados en BTRH respecto a la línea parental (Figura 46).

Las pacientes del ensayo clínico PAMELA fueron tratadas con doble bloqueo de HER2 con trastuzumab y lapatinib sin quimioterapia. El subtipo intrínseco del tumor fue determinado mediante PAM50 antes del inicio del tratamiento y tras 14 días en las muestras tumorales y la RPC y la CTR fueron evaluadas en la cirugía (Llombart-Cussac *et al.*, 2017).

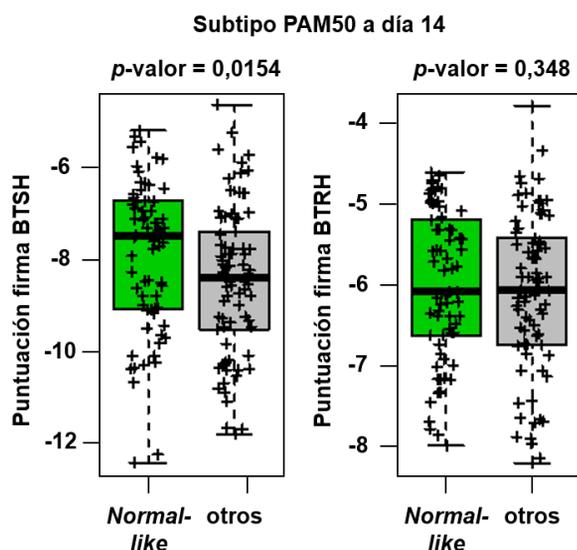


Figura 47. Respuesta al doble bloqueo de HER2 mediante subtipo PAM50 a día 14 de tratamiento. Las firmas génicas de hipersensibilidad y resistencia se evaluaron en las muestras de los pacientes del ensayo PAMELA como la suma de la media de los genes sobreexpresados o los genes infraexpresados. Los *box plots* muestran la puntuación de la firma génica de hipersensibilidad (izquierda) o de resistencia (derecha) en las pacientes con subtipo *normal-like* u otros subtipos tras 14 días de tratamiento con trastuzumab y lapatinib. Cada paciente se representa con el símbolo +.

El cambio de subtipo HER2-E a *normal-like* a día 14 de tratamiento indicaba respuesta tumoral temprana (Llombart-Cussac *et al.*, 2017). Los resultados del análisis mostraron que la firma de hipersensibilidad estaba sobreexpresada en las pacientes que respondieron al tratamiento ya que la puntuación de la firma de BTSH era significativamente mayor en las pacientes con subtipo *normal-like* a día 14 tras el tratamiento (Figura 47), en las pacientes que experimentaron RPC en el momento de la cirugía (Figura 48) y en las que tenían CTR baja (entre 0-I) (Figura 49).

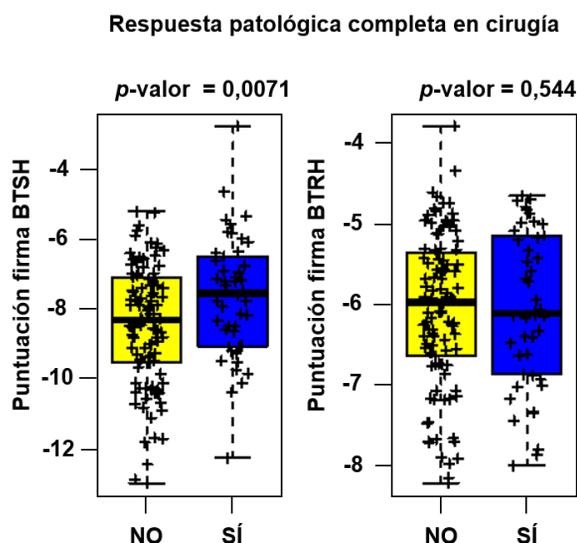


Figura 48. Respuesta al doble bloqueo de HER2 mediante RPC en la cirugía. El análisis se realizó como se describe en la figura 47. Los gráficos muestran la puntuación de las firmas de hipersensibilidad y resistencia en las muestras de las pacientes que habían experimentado (SÍ) o no (NO) RPC en el momento de la cirugía.

Estos datos demostraron que la firma génica de las células BTSH era indicativa de buena respuesta a trastuzumab y lapatinib en pacientes. Por el contrario, la firma de resistencia a trastuzumab no se encontró enriquecida en las pacientes que no respondieron al doble bloqueo de HER2 (Figura 47, 48 y 49).

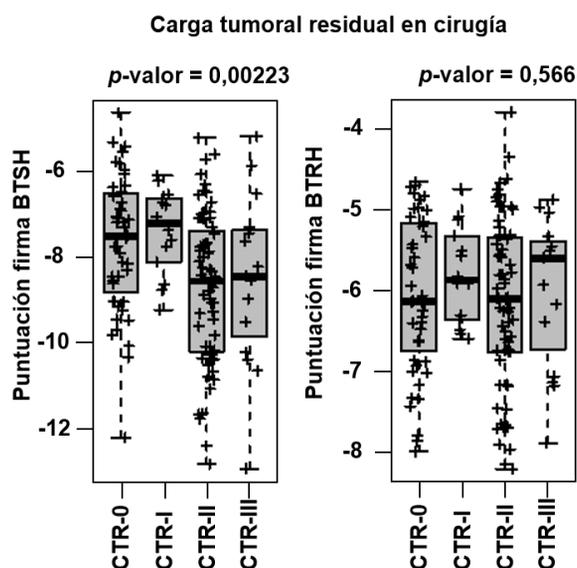


Figura 49. Respuesta al doble bloqueo de HER2 mediante CTR en la cirugía. El análisis se realizó como se describe en la figura 47. Los gráficos muestran la puntuación de las firmas de hipersensibilidad y resistencia en las muestras de las pacientes que se encuentran agrupadas según su CTR (desde 0 hasta III) en la cirugía.

Una vez determinada la capacidad de la firma de hipersensibilidad a trastuzumab para predecir buena respuesta al doble bloqueo de HER2 en las pacientes, se analizó la correlación entre la expresión de los genes que formaban parte de las firmas génicas de forma individual y la respuesta al doble bloqueo de HER2. Los resultados mostraron que *CA12* y *MYC* estaban sobreexpresados en BTRH y en los tumores de las pacientes que no manifestaron subtipo *normal-like* tras 14 días de tratamiento (Figura 50), mientras que la expresión de *NFIB* y *PIP*, infraexpresados en BTRH, estaba aumentada en las pacientes que sí habían respondido al doble bloqueo de HER2 (Figura 50).

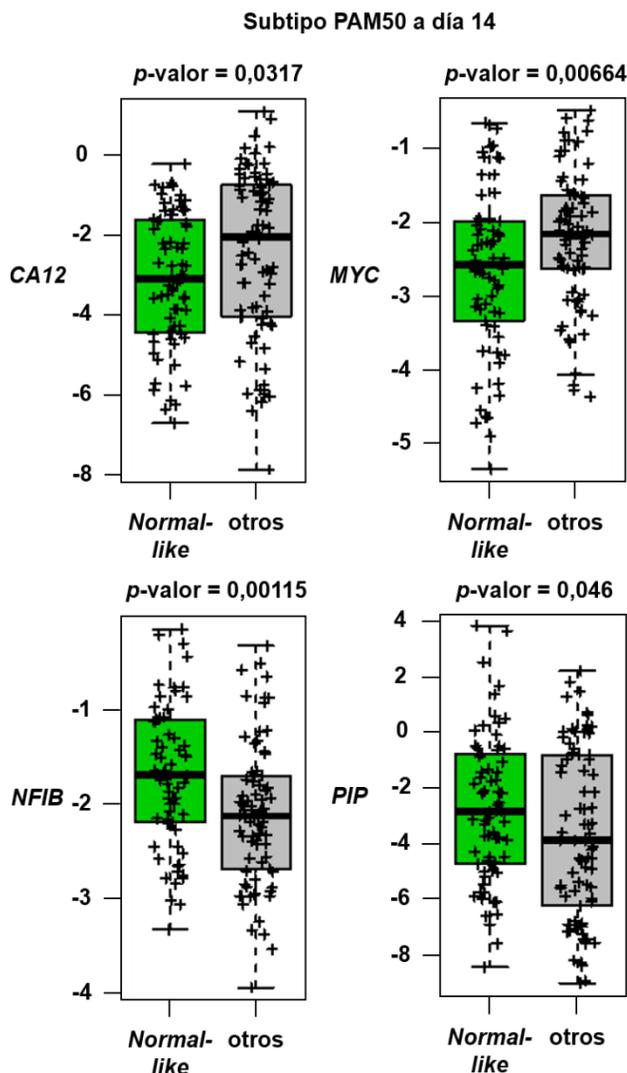


Figura 50. Identificación de genes predictivos de respuesta al doble bloqueo de HER2 en pacientes HER2+ (I). Se evaluó la correlación entre la expresión de los genes pertenecientes a las firmas de hipersensibilidad y resistencia de forma individual y la respuesta al tratamiento con trastuzumab y lapatinib determinada mediante subtipo PAM50 a día 14. Se muestran los datos que resultaron significativos (p -valor $< 0,05$). Los *box plots* muestran la expresión de cada gen en cada muestra de pacientes. Los datos se representan como la media de la expresión génica normalizada.

Los genes que funcionaban como predictores de RPC en la cirugía como *CA12*, *ERBB4* y *MYC*, los tres sobreexpresados en BTRH, estaban enriquecidos en los tumores de las pacientes que no habían respondido al tratamiento (Figura 51). Los genes *AR* y *PIP*, ambos infraexpresados en las células BTRH, eran indicativos de RPC en las pacientes (Figura 51).

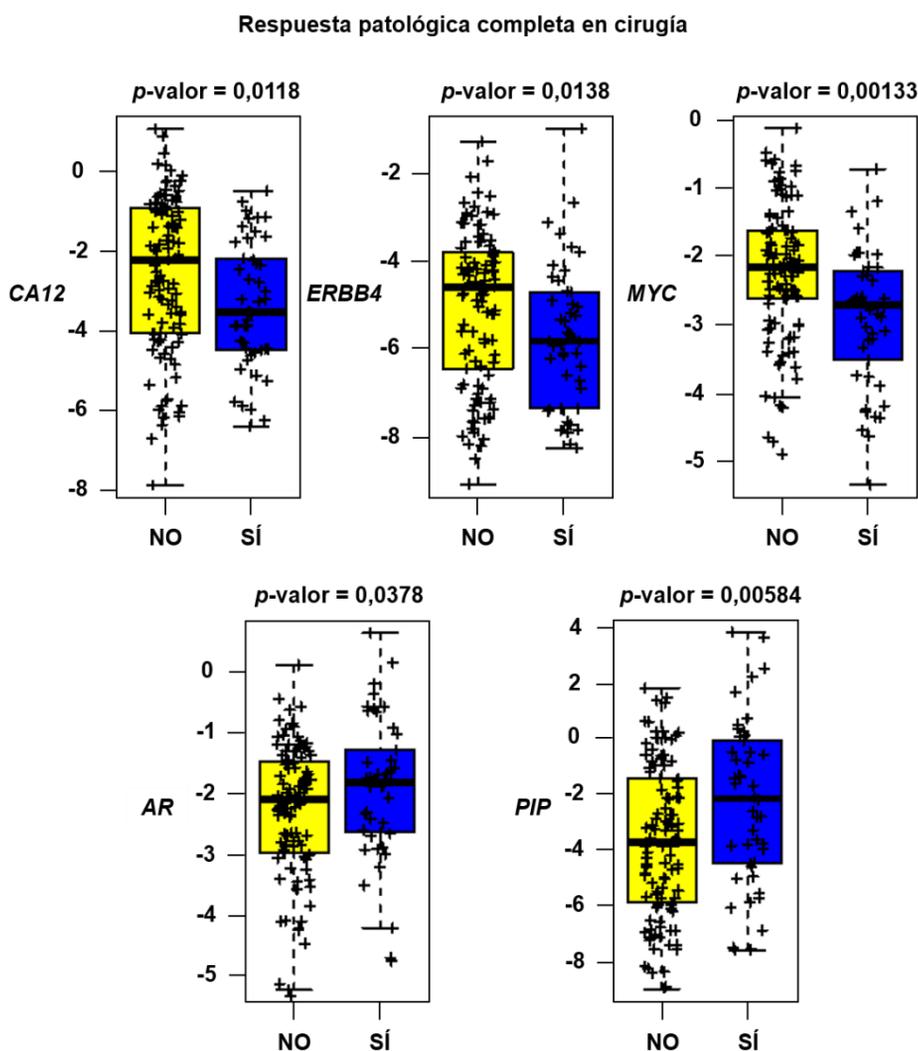


Figura 51. Identificación de genes predictivos de respuesta al doble bloqueo de HER2 en pacientes HER2+ (II). Se evaluó la correlación entre la expresión de los genes pertenecientes a las firmas de hipersensibilidad y resistencia de forma individual y la respuesta al tratamiento con trastuzumab y lapatinib determinada mediante RPC en la cirugía. Se muestran los datos que resultaron significativos (p -valor $< 0,05$). Los *box plots* muestran la expresión de cada gen en cada muestra de pacientes. Los datos se representan como la media de la expresión génica normalizada.

Por último, la expresión de *MYC* era mayor en las pacientes que manifestaron una tasa de CTR de I, II y III (Figura 52), mientras que las pacientes cuya tasa de CTR en la cirugía era 0 o I, sobreexpresaban *PIP* (Figura 52). Es importante destacar que *PIP* formaba parte de ambas firmas génicas, estando sobreexpresado en BTSH e infraexpresado en BTRH respecto a BT474.

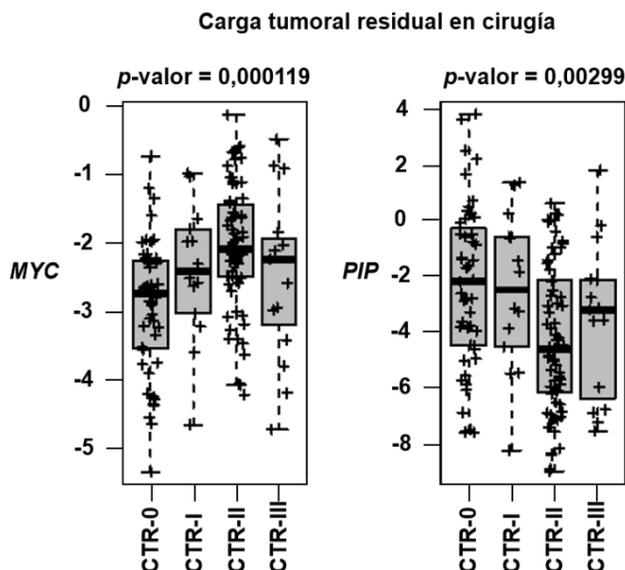


Figura 52. Identificación de genes predictivos de respuesta al doble bloqueo de HER2 en pacientes HER2+ (III). Se evaluó la correlación entre la expresión de los genes pertenecientes a las firmas de hipersensibilidad y resistencia de forma individual y la respuesta al tratamiento con trastuzumab y lapatinib determinada mediante la CTR en la cirugía. Se muestran los datos que resultaron significativos (p -valor $< 0,05$). Los *box plots* muestran la expresión de cada gen en cada muestra de pacientes. Los datos se representan como la media de la expresión génica normalizada.

En resumen, algunos genes de la firma de resistencia se correlacionaban de forma significativa con la respuesta al doble bloqueo de HER2 de forma individual. Sin embargo, dichos genes no funcionaban como firma génica a la hora de predecir resistencia a trastuzumab en las pacientes.

17. PAPEL DE PIP EN LA RESPUESTA A TRASTUZUMAB

Los resultados anteriores nos mostraron que *PIP* era un biomarcador predictivo de respuesta a trastuzumab. Se validó la expresión de dicho gen mediante WB en los modelos celulares con distinta sensibilidad a trastuzumab. La cantidad de PIP fue prácticamente indetectable en los extractos celulares de las tres líneas. Sin embargo, se detectó en el MCC de BT474 y BTSH, observando que estaba sobreexpresada en BTSH. En las células resistentes PIP no fue detectado (Figura 53A), de acuerdo con su infraexpresión en los datos de expresión génica. A continuación, se evaluó si PIP era capaz de modificar la sensibilidad a trastuzumab en las líneas BTRH y BT474. Para ello, se analizó la proliferación de dichas células en

presencia de PIP soluble y/o trastuzumab. Los resultados mostraron que el tratamiento con PIP no modificó la proliferación ni la respuesta a trastuzumab de las líneas BT474 y BTRH (Figura 53B).

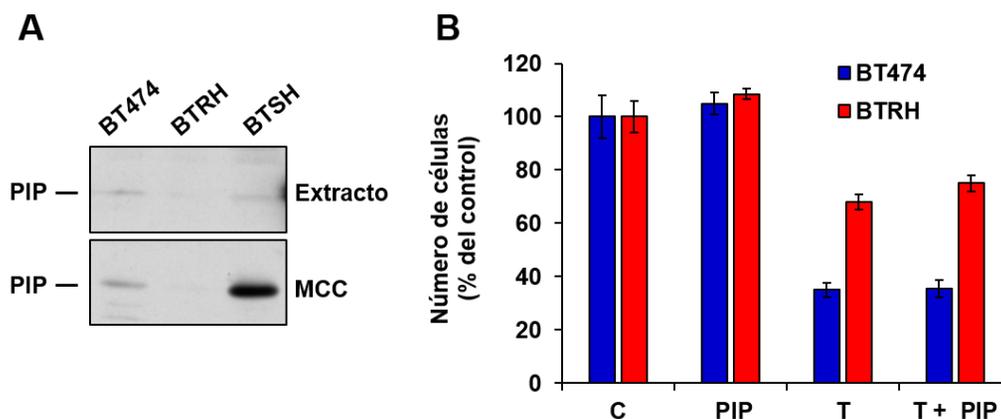


Figura 53. Análisis de la expresión de PIP y su implicación en la respuesta a trastuzumab. (A) Estudio de los niveles de PIP en el extracto y el medio condicionado concentrado de las células BT474, BTRH y BTSH mediante WB. (B) Las células fueron sembradas y tratadas con trastuzumab y/o PIP 10 nM durante 6 días. Se determinó la proliferación celular mediante contajes celulares. Los resultados muestran el porcentaje de la media \pm SD respecto al control, de un experimento representativo que se repitió dos veces.

18. PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN MODELOS CELULARES RESISTENTES E HIPERSENSIBLES A TRASTUZUMAB MEDIANTE RNAseq

Se decidió realizar un análisis de RNAseq de la línea parental, BT474, de dos modelos de resistencia, BTRH y RT#10 y de dos modelos de hipersensibilidad a trastuzumab, BTSH y ST#35, con el objetivo de estudiar las diferencias en expresión génica de todos los modelos utilizados en este trabajo, ya que no teníamos *microarrays* de RT#10 y ST#35. Además, el RNAseq también permite el análisis de mutaciones, polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), amplificaciones y deleciones, que también podrían estar condicionando la respuesta a trastuzumab.

El PCA representó las diferencias que existían entre todos los modelos celulares analizados, así como el agrupamiento de las tres réplicas de cada línea (Figura 54). Los modelos celulares resistentes y los modelos hipersensibles a trastuzumab están separados, lo que indica que son muy diferentes en cuanto a su perfil de expresión génica. Este hecho sugiere que los mecanismos responsables de la adquisición de resistencia o hipersensibilidad son diferentes. De hecho, los dos modelos celulares más parecidos en cuanto a expresión de genes son el clon RT#10 y las células BTSH.

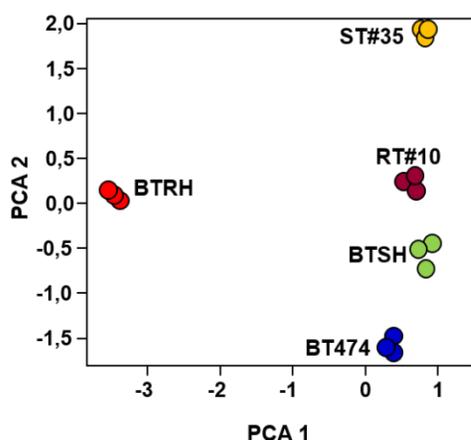


Figura 54. Análisis de componentes principales en los datos de RNAseq. Se muestra la agrupación en el espacio de muestras según su perfil de expresión génica. Las tres réplicas de cada línea celular se representan en el mismo color.

Se determinó el número de GDEs entre cada modelo celular respecto a la línea BT474. En la figura 55 se muestran los *volcano plots* correspondientes a la comparación de la expresión génica de las líneas BTRH, BTSH, RT#10 y ST#35, respecto a la línea parental. Las células BTRH eran las más diferentes en cuanto a expresión de genes respecto a BT474 (643 GDEs), seguidas del clon ST#35 (300 GDEs) y el clon RT#10 (167 GDEs) y BTSH (130 GDEs), concordando con su localización en el PCA (Figura 54).

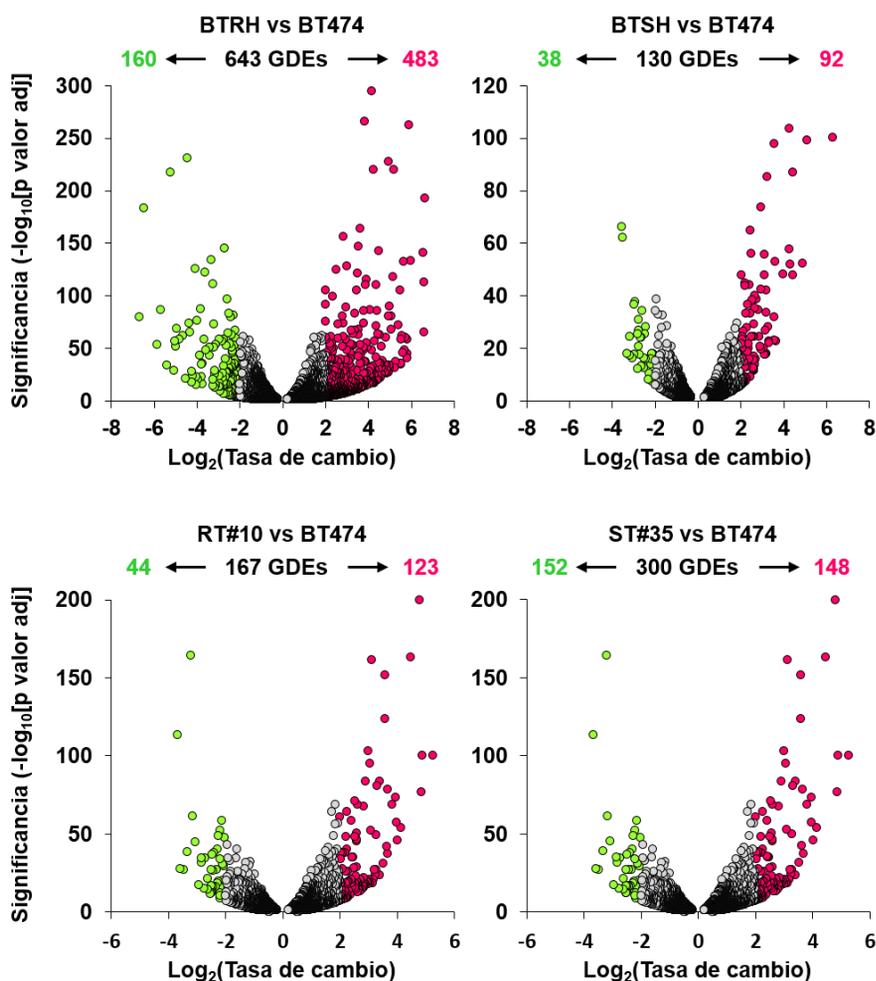


Figura 55. GDEs entre los modelos celulares con distinta sensibilidad a trastuzumab y la línea BT474 determinados por RNAseq. Se estableció un corte de tasa de cambio de 2 y p -valor ajustado $< 0,05$. Los genes que cumplen dichos criterios se muestran en verde si están infraexpresados y en rosa si están sobreexpresados.

18.1. Caracterización funcional de los GDEs en los modelos celulares con distinta sensibilidad a trastuzumab

Una vez identificados los GDEs se realizó una caracterización funcional para elucidar los procesos biológicos en los que participan dichos genes y encontrar alteraciones que pudiesen ser las responsables del fenotipo resistente o hipersensible a trastuzumab. Se utilizaron bases de datos públicas como DAVID (Huang *et al.*, 2009a, 2009b) y ToppFun (Chen *et al.*, 2009), que permiten realizar la anotación funcional de un listado de genes respecto a una base de datos de referencia.

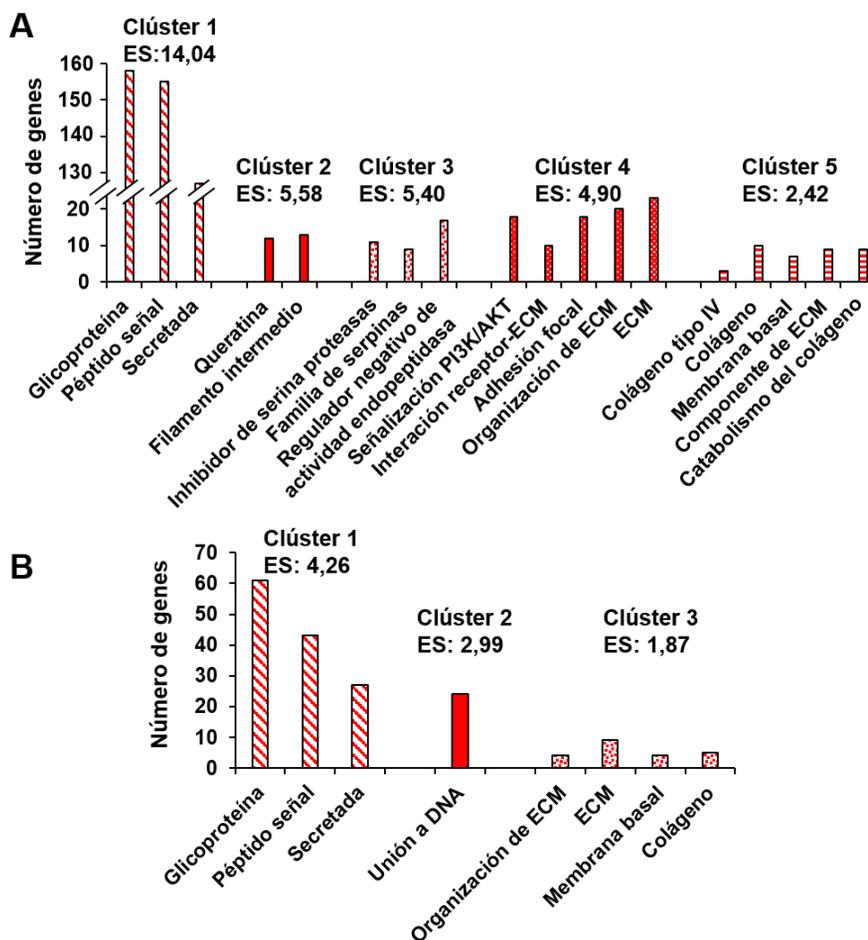


Figura 56. Análisis de enriquecimiento funcional de GDEs en BTRH respecto a BT474. Los listados de GDEs sobreexpresados (A) o infraexpresados (B) se introdujeron en DAVID y se analizaron con la función “Clustering de anotación funcional”. Se muestra el número de GDEs pertenecientes a cada categoría agrupados en clústeres de anotación funcional. ES: puntuación de enriquecimiento del clúster; ECM: matriz extracelular.

Los resultados encontrados en ellas eran similares. En las figuras 56, 57, 58 y 59 se muestran los análisis de anotación funcional de BTRH, BTSH, RT#10 y ST#35, respectivamente, obtenidos mediante la función “Clustering de anotación funcional” de DAVID. Esta función utiliza un algoritmo para medir las relaciones entre las categorías de anotación (ontología génica, interacciones entre proteínas, dominios funcionales de las proteínas, vías de señalización, etc) basándose en el grado de asociación de genes para agrupar los contenidos de anotación similares y redundantes. En el caso de las células BTRH, los genes sobreexpresados están relacionados con el citoesqueleto (filamentos intermedios y queratinas), que son importantes en los

procesos de unión entre células y con la ECM. Algunos GDEs son componentes de la ECM, como el colágeno, y otros participan en su organización y degradación y en la adhesión focal (Figura 56A), concordando con el análisis de los procesos de adhesión y migración celular en los que la ECM juega un papel fundamental. Otros genes sobreexpresados son serpinas e inhibidores de serina proteasas (Figura 56A), como ya habíamos visto en los *arrays* de proteínas solubles, en los que las células BTRH secretaron una mayor cantidad de serpinas y otros inhibidores de proteasas en comparación con la línea parental (Figura 29).

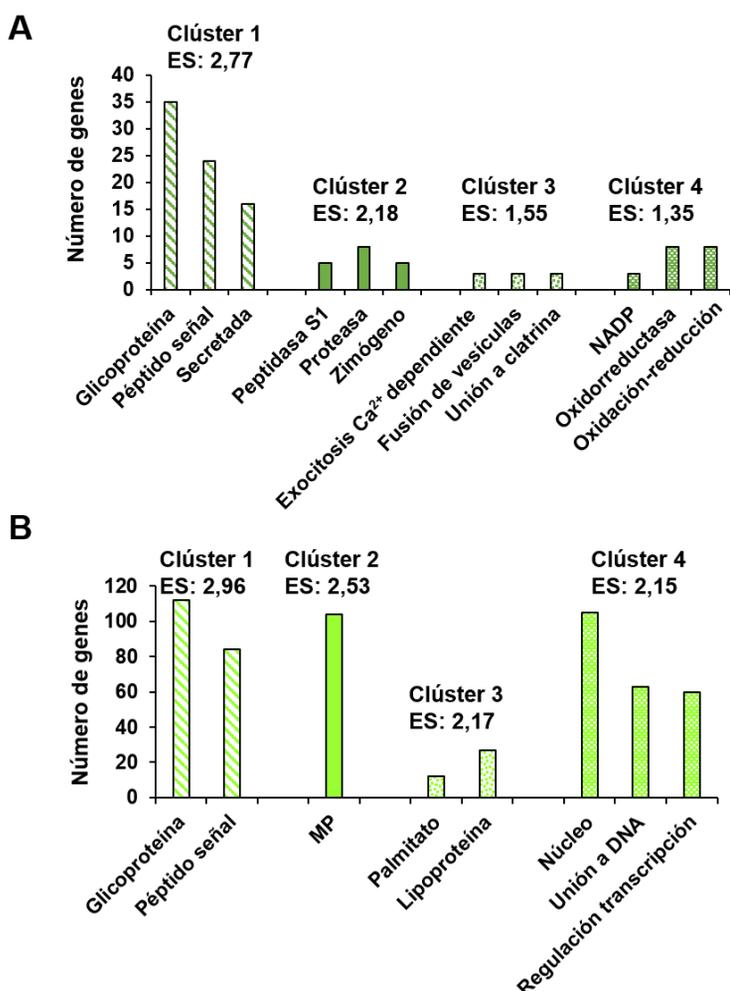


Figura 57. Análisis de enriquecimiento funcional de GDEs en BTSH respecto a BT474. El análisis se realizó como se describe en la figura 56. (A) Genes sobreexpresados. (B) Genes infraexpresados. ES: puntuación de enriquecimiento del clúster MP: membrana plasmática; Ca²⁺: calcio.

Los genes sobreexpresados por las células BTSH y ST#35 están implicados en procesos de oxidación-reducción (Figura 57A y 59A). Además, las células BTSH sobreexpresan genes relacionados con la exocitosis y la endocitosis e infraexpresan genes relacionados con lípidos (Figura 57A y 57B).

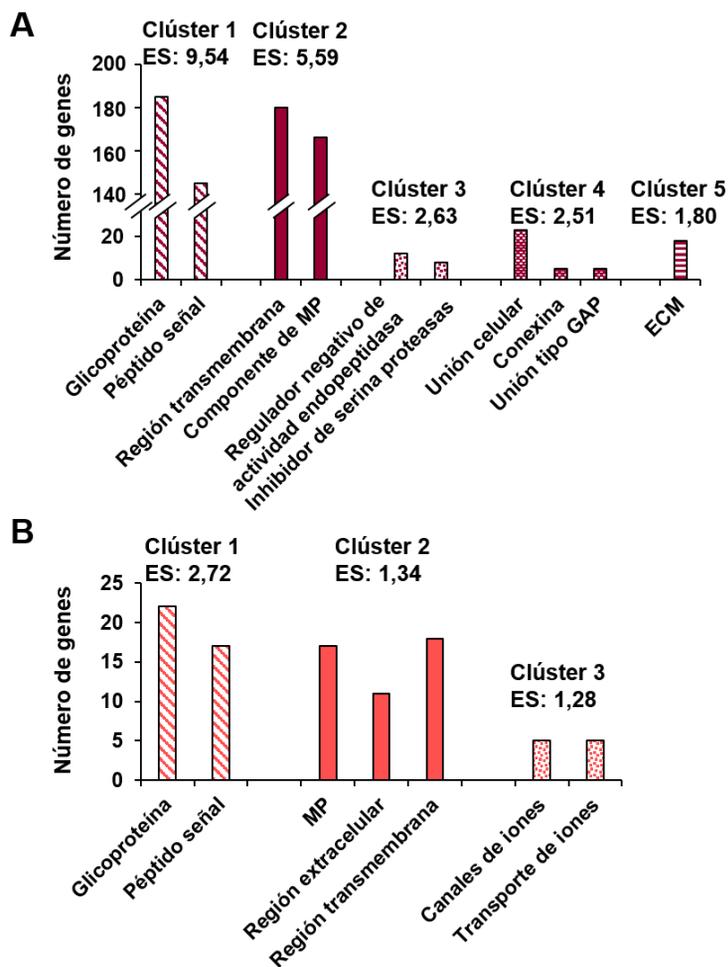


Figura 58. Análisis de enriquecimiento funcional de GDEs en RT#10 respecto a BT474. El análisis se realizó como se describe en la figura 56. (A) Genes sobreexpresados. (B) Genes infraexpresados. ES: puntuación de enriquecimiento del clúster; ECM: matriz extracelular; MP: membrana plasmática.

Por su parte, el clon RT#10 sobreexpresa genes que son inhibidores de serina proteasas y relacionados con la ECM, al igual que las células BTRH, además de genes implicados en uniones célula-célula (Figura 58A). Por el contrario, genes relacionados con el transporte de iones están infraexpresados en el clon RT#10 respecto a las células BT474 (Figura 58B).

Además de la sobreexpresión de genes relacionados con la actividad oxidorreductasa en las células BTSH y ST#35, estas últimas sobreexpresan genes implicados en el metabolismo de lípidos, como el colesterol (Figura 59A) e infraexpresan genes relacionados con el transporte de aminoácidos y la unión a DNA (Figura 59B).

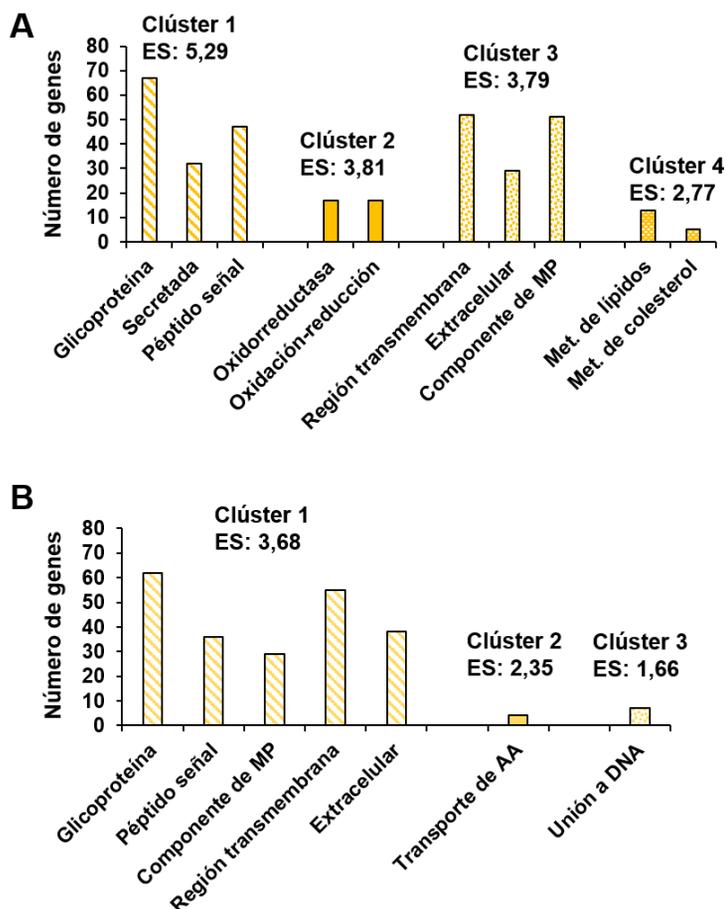


Figura 59. Análisis de enriquecimiento funcional de GDEs en ST#35 respecto a BT474. El análisis se realizó como se describe en la figura 56. **(A)** Genes sobreexpresados. **(B)** Genes infraexpresados. ES: puntuación de enriquecimiento del clúster MP: Membrana plasmática; Met.: metabolismo; AA: Aminoácidos.

18.2. Expresión diferencial de genes implicados en la EMT en las células BTRH y BTSH

Los datos de enriquecimiento funcional de los *microarrays* de expresión génica indicaron que el proceso de EMT estaba enriquecido en las células BTRH respecto a la línea BT474 (Figura 31). Además, las células BTRH migraban más que las células BT474 y esta última, a su vez más que BTSH, como se muestra en la figura 33. La EMT es un proceso crucial en la metástasis: las células tumorales adquieren un fenotipo invasivo, degradan la ECM y migran hacia otros tejidos (Méndez-García *et al.*, 2019). Se analizó si existían diferencias significativas en cuanto a la expresión de factores de transcripción inductores de EMT como *TWIST1*, *SNAIL1*, *SNAIL2*, *SNAIL3*, *ZEB1* y *ZEB2* y genes marcadores del proceso de EMT como *VIM*, *CDH1*, *CDH2* y *FNI* que codifican vimentina, E-cadherina, N-cadherina y fibronectina, respectivamente, (Méndez-García *et al.*, 2019) entre las células BTRH y BTSH respecto a la línea BT474 en los datos de RNAseq. Las células BTRH sobreexpresaban *FNI* e infraexpresaban *SNAIL3* y *VIM*, todos ellos marcadores mesenquimales, respecto a las células BT474 (Figura 60C). Por su parte, los genes *SNAIL1*, *SNAIL3*, *TWIST1* y *VIM* estaban infraexpresados por el clon RT#10 en comparación con la línea parental (Figura 60C), coincidiendo con su ausencia de capacidad migratoria.

18.3. Análisis de expresión diferencial de genes implicados en la resistencia y la sensibilidad a trastuzumab en los modelos celulares resistentes e hipersensibles

A lo largo de este trabajo se han analizado distintos procesos implicados en la acción antitumoral de trastuzumab y en la aparición de resistencias. Desde la aparición de trastuzumab, se han descrito un gran número de mecanismos y expresión de genes relacionados con aparición de resistencias, como se ha descrito detalladamente en la introducción. Entre los mecanismos convencionales se encuentran la activación constitutiva de la vía PI3K (*PIK3CA*, *PTEN*), la señalización a través de otros receptores (*ERBB4*, *IGF1R*, *MET*, *EPHA2* y *TGFB2*), así como defectos en el control del ciclo celular y la apoptosis (*CCNE1* y *BIRC5*, que codifican ciclina E y survivina). Se decidió analizar si existían diferencias en la expresión de

estos genes entre los modelos resistentes a trastuzumab BTRH y RT#10 y la línea parental que fuesen responsables del fenotipo resistente.

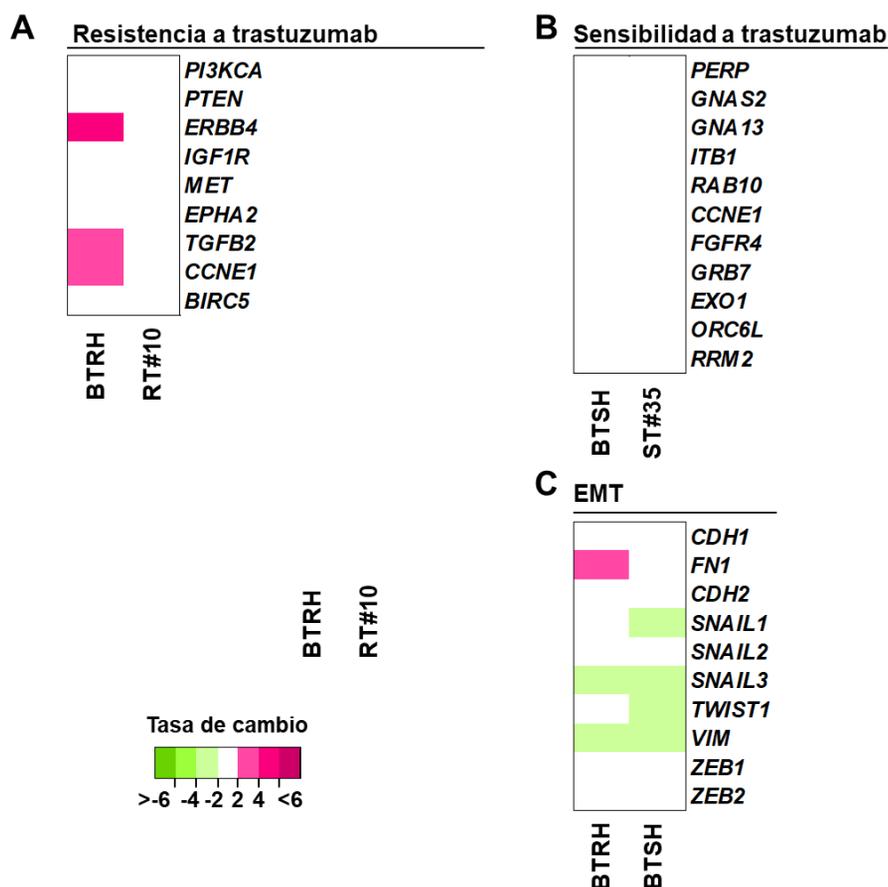


Figura 60. Análisis de la expresión de genes relacionados con la resistencia y la sensibilidad a trastuzumab y la EMT en modelos celulares con distinta sensibilidad a trastuzumab. Con los datos de RNAseq, se evaluó si existía una expresión diferencial de genes responsables de la adquisición de resistencia a trastuzumab en las células BTRH y RT#10 (A), genes implicados en la sensibilidad a trastuzumab en los clones hipersensibles BTSH y ST#35 (B) y genes implicados en la EMT en las células BTRH y BTSH (C) respecto a la línea parental. Los mapas de calor muestran la tasa de cambio de los genes respecto a la línea parental. El color blanco indica que no existen diferencias de expresión entre los modelos celulares respecto a la línea parental BT474.

El análisis de GDEs mediante RNAseq demostró que *ERBB4*, *TGFB2* y *CCNE1* estaban sobreexpresados en las células BTRH respecto a la línea parental (Figura 60A). Sin embargo, ninguno de los genes estaba diferencialmente expresado entre RT#10 y BT474 (Figura 60A). Además de los mecanismos convencionales, se analizó la expresión de 18 genes que también habían sido implicados en la falta de

respuesta a trastuzumab. Entre todos ellos, los resultados mostraron que *AREG*, *CD44*, *CD55*, *GDF15* y *YES1* estaban sobreexpresados en las células BTRH mientras que solo *CD44* estaba más expresado en RT#10 respecto a la línea parental (Figura 60A).

Por último, se analizó la expresión de los genes que habían sido asociados con buena respuesta a trastuzumab (Drucker *et al.*, 2020; Pernas *et al.*, 2019) en los modelos hipersensibles BTSH y ST#35 respecto a la línea parental. Al contrario que en los genes de resistencia, ninguno de ellos estaba significativamente expresado en nuestros modelos hipersensibles a trastuzumab (Figura 60B).

DISCUSIÓN

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea desde el punto de vista molecular. En los últimos años, se han implementado nuevas estrategias terapéuticas con el objetivo de abordar esta heterogeneidad y minimizar los efectos adversos y los costes de los tratamientos (Baselga *et al.*, 2017; Harbeck *et al.*, 2019). La sobreexpresión o amplificación de *HER2* ha sido encontrada en aproximadamente una de cada cinco pacientes con cáncer de mama y ha sido correlacionada con mal pronóstico (Slamon *et al.*, 1987). Sin embargo, el desarrollo de las terapias anti-*HER2*, especialmente de trastuzumab, ha mejorado de forma significativa el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama *HER2+* (Perez *et al.*, 2014; Piccart-Gebhart *et al.*, 2005; Robert *et al.*, 2006; Slamon *et al.*, 2001). Actualmente, trastuzumab es utilizado en primera línea para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama *HER2+* localizado y metastásico junto con quimioterapia y/o pertuzumab (Bachelot *et al.*, 2019; Baselga *et al.*, 2012; von Minckwitz *et al.*, 2017). Sin embargo, las pacientes presentan tasas de respuesta a terapias basadas en trastuzumab diversas, siendo algunos tumores resistentes al tratamiento, progresando hasta estadios más avanzados y desencadenando la aparición de recidivas (Dean-Colomb y Esteva, 2008; Gajria y Chandarlapaty, 2011). Esto se debe a que existe una gran heterogeneidad en cuanto a la expresión génica y al espectro mutacional en los tumores de las pacientes *HER2+*, justificando que la respuesta a trastuzumab sea dispar (Pogue-Geile *et al.*, 2015). Además, la distribución de la expresión de *HER2* dentro de un mismo tumor también es heterogénea (Ng *et al.*, 2015; Onsum *et al.*, 2013), afectando a la respuesta al tratamiento (Lee *et al.*, 2014). El problema principal radica en que actualmente la sobreexpresión de *HER2*, detectada por IHQ o ISH, es el único biomarcador aprobado para seleccionar pacientes que van a ser tratadas con terapias basadas en fármacos contra *HER2* (Gutierrez y Schiff, 2011), a pesar de que no todas ellas se beneficiarán del tratamiento. De manera que la sobreexpresión de *HER2* no es un predictor preciso de respuestas a terapias anti-*HER2* (Onsum *et al.*, 2013) y deben existir factores adicionales más allá de la sobreexpresión de *HER2* que dicten sensibilidad a las terapias dirigidas contra dicho receptor.

Estos hechos desencadenan la necesidad de encontrar nuevos biomarcadores que predigan respuesta a trastuzumab con el objetivo de identificar mejor a las pacientes que se van a beneficiar del tratamiento. De esta manera se mejoraría la elección de la estrategia terapéutica, resultando en una desescalada de la terapia y una reducción de los efectos adversos.

Desde 2009, el predictor de subtipo intrínseco PAM50 ha demostrado proveer valor pronóstico y predictivo en múltiples cohortes de pacientes con cáncer de mama. Además de identificar los subtipos moleculares, PAM50 proporciona información sobre la tasa de proliferación y el riesgo de recaída basado en el subtipo molecular (Prat *et al.*, 2014). Dentro del grupo de pacientes clasificadas en la clínica como HER2+ pueden ser identificados todos los subtipos intrínsecos determinados por PAM50 en diferentes proporciones. De manera que las pacientes HER2+ abarcan un amplio espectro de entidades moleculares, si bien la mayoría de los tumores suelen ser HER2-E, como se ha demostrado en ensayos clínicos (Llombart-Cussac *et al.*, 2017; Pernas *et al.*, 2019; Pogue-Geile *et al.*, 2015; Prat *et al.*, 2014, 2020; The Cancer Genome Atlas Network, 2012). El hecho de que los tumores con subtipo intrínseco HER2-E experimenten mayor tasa de RPC al tratamiento con trastuzumab en combinación con quimioterapia y otras terapias anti-HER2, como lapatinib y pertuzumab (Carey *et al.*, 2016; Llombart-Cussac *et al.*, 2017; Pernas *et al.*, 2019; Prat *et al.*, 2014), junto con la existencia de tumores considerados HER2- (según el criterio de la Sociedad Americana de Oncología Clínica) con subtipo HER2-E, demuestra que PAM50 permite identificar más pacientes que se beneficiaran con terapias anti-HER2. Además, Prat *et al.* demostraron que los tumores HER2-E y con una expresión elevada de HER2 son los que más se benefician de dichas terapias (Prat *et al.*, 2020). Sin embargo, la determinación del subtipo intrínseco de los tumores por PAM50 no se realiza de forma frecuente en el ámbito clínico.

En este trabajo se han generado modelos celulares de resistencia e hipersensibilidad a trastuzumab derivados de la línea BT474 con el objetivo de analizar los determinantes que modulan la efectividad antitumoral de dicho fármaco y abordar la necesidad de encontrar nuevos biomarcadores que puedan predecir

respuesta a trastuzumab. Se aislaron dos modelos celulares hipersensibles, BTSH y ST#35, así como varios clones resistentes a trastuzumab entre los que se encuentran RT#1, RT#5 y RT#10. Además, también se utilizó un *pool* de células resistentes a trastuzumab que se había generado previamente en el laboratorio, las células BTRH (Díaz-Rodríguez *et al.*, 2019). Se han analizado características moleculares y bioquímicas que condicionan o desencadenan tanto el efecto antitumoral de trastuzumab como la aparición de resistencias (Figura 61). Además, hemos conseguido identificar proteínas y GDEs entre los modelos celulares con distinta sensibilidad a trastuzumab, con el fin de elucidar nuevos biomarcadores que puedan predecir pronóstico y respuesta al tratamiento (Figura 62). Los resultados de los experimentos han demostrado otras características biológicas adquiridas por los modelos celulares como resultado de su generación o aislamiento.

El hecho de que existan pacientes que no responden a los sucesivos tratamientos se puede deber a la existencia de resistencias cruzadas que conllevan a la progresión tumoral y al desarrollo de metástasis. En el caso de no obtener beneficio clínico tras el tratamiento con trastuzumab combinado con quimioterapia y/o pertuzumab, las pacientes son tratadas con T-DM1 en segunda línea (von Minckwitz *et al.*, 2019; Perez *et al.*, 2019; Verma *et al.*, 2012) Si no hay respuesta, se administra en tercera línea neratinib, trastuzumab con otros agentes quimioterápicos, lapatinib más capecitabina o lapatinib más trastuzumab sin quimioterapia (Burstein *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2017; Robert *et al.*, 2006; Saura *et al.*, 2019). Se analizó la sensibilidad de nuestros modelos celulares BT474, BTRH y BTSH a T-DM1, lapatinib y neratinib, así como al propio pertuzumab, para explorar la existencia de resistencias o sensibilidades cruzadas entre dichas terapias. El efecto inhibitorio en la proliferación y la supervivencia celular desencadenado por T-DM1 fue muy fuerte y afectó de forma similar a la línea parental y a las células BTRH (Barok *et al.*, 2011). En un experimento realizado en nuestro laboratorio se observó que T-DM1 disminuía la proliferación de líneas sensibles a trastuzumab como BT474 y SKBR3 y otras con resistencia primaria a trastuzumab como HCC1569, HCC1954 y HCC1419. De hecho, la que resultó ser “menos sensible” de todas fue BT474 (García-Alonso, 2018). En el caso de las células hipersensibles a trastuzumab, T-DM1 afectó

drásticamente a su supervivencia (Figura 61). El mecanismo de acción de T-DM1 incluye la acción antitumoral de trastuzumab, así como el efecto citotóxico del DM1 (García-Alonso *et al.*, 2020). Por tanto, este resultado concuerda con la apoptosis causada por trastuzumab en células BTSH junto con la acción del DM1.

El tratamiento con pertuzumab no causó ningún efecto sobre la proliferación celular en BT474, BTRH y BTSH, incluso utilizando dosis muy altas del anticuerpo. Sin embargo, Brockhoff *et al.* observaron que pertuzumab causaba un ligero arresto del ciclo celular en células BT474 (Brockhoff *et al.*, 2007). En cambio, el tratamiento combinado de trastuzumab y pertuzumab inhibió de forma sinérgica la proliferación celular y causó apoptosis en células BT474 (Nahta *et al.*, 2004b). Además, dicha combinación aumentó la actividad antitumoral en tumores generados por células HER2+ (Scheuer *et al.*, 2009).

En un trabajo publicado por nuestro laboratorio, se demostró que el tratamiento previo con trastuzumab afectaba a la respuesta a los TKIs lapatinib y neratinib. Las células BTRH no solo eran resistentes a trastuzumab sino que también eran parcialmente resistentes a lapatinib y neratinib, ya que no inducían apoptosis (Ríos-Luci *et al.*, 2020), demostrando la existencia de resistencias cruzadas entre trastuzumab y ambos TKIs (Figura 61). Por el contrario, el tratamiento con lapatinib y neratinib afectaba de forma similar a la proliferación de las células hipersensibles a trastuzumab y la línea parental. Otros trabajos también han demostrado la existencia de resistencias cruzadas entre distintas terapias anti-HER2. Un ejemplo de ello es que las células JIMT-1, aisladas de la metástasis pleural de una paciente con cáncer de mama HER2+ resistente a trastuzumab, también lo eran a lapatinib (Köninki *et al.*, 2010). Breslin *et al.* generaron modelos celulares de resistencia a neratinib y observaron que también eran más resistentes a lapatinib que la línea parental. Además, comprobaron que líneas celulares resistentes a lapatinib y trastuzumab también eran más resistentes a la acción de neratinib que la línea parental, existiendo una resistencia bidireccional entre neratinib y lapatinib (Breslin *et al.*, 2017). Esta tendencia se observó en pacientes: aquellas que no habían sido tratadas, respondieron mejor a neratinib que las que habían recibido previamente trastuzumab (Burstein *et*

al., 2010), así como las pacientes que habían sido expuestas a lapatinib no obtuvieron tanto beneficio de neratinib como las que no habían sido tratadas con anterioridad (Awada *et al.*, 2013).

El primer paso para que trastuzumab ejerza su acción antitumoral consiste en la unión a su diana, HER2. Se han descrito mecanismos de resistencia que están relacionados con la capacidad de unión de trastuzumab a HER2 (Arteaga y Engelman, 2014), como la expresión de formas truncadas de HER2 (Gajria y Chandarlapaty, 2011) o la disminución de su expresión (Ocana y Pandiella, 2013). Se realizaron experimentos para detectar la expresión y activación (mediante fosforilación en tirosina) de HER2 total y en superficie en las células BT474, BTRH y BTSH. Los resultados demostraron que no existían diferencias en cuanto a la expresión y activación de HER2 entre los modelos celulares, descartando que los cambios en HER2 fuesen responsables del efecto diferencial de trastuzumab (Kute *et al.*, 2004, 2012) (Figura 61).

El crecimiento tumoral y la supervivencia celular en algunos tumores dependen de forma casi exclusiva de una única vía de señalización oncogénica. Este fenómeno se conoce como adicción oncogénica y ha sido utilizado para el desarrollo de terapias contra el cáncer (Griguolo *et al.*, 2019; Savas *et al.*, 2014), como es el caso de trastuzumab. Las células tumorales sobreexpresoras de HER2 dependen oncogénicamente de dicho receptor, es decir, la sobreexpresión de HER2 en la membrana plasmática es esencial en la biología de la célula tumoral (Griguolo *et al.*, 2019; Savas *et al.*, 2014). Así, se silenció la expresión de *HER2* para comprobar si los modelos celulares seguían manteniendo la dependencia oncogénica de HER2 o ésta era la causa de la resistencia en BTRH. Los experimentos demostraron que los tres modelos celulares continuaban siendo oncogénicamente dependientes de HER2. Sin embargo, mientras que para las células BT474 y BTSH, la expresión de HER2 era esencial para su supervivencia, las células resistentes podían proliferar, aunque en menor medida, tras el silenciamiento de *HER2* (Figura 61).

	BT474	BTRH	BTSH
			
Respuesta a trastuzumab	↑	↑	↑
Resistencias/sensibilidades cruzadas con otras terapias anti-HER2		Lapatinib Neratinib	T-DM1
Expresión de HER2	=	=	=
Dependencia oncogénica de HER2	✓	✓	✓
Arresto del ciclo celular en G1	✓	✗	✓
Apoptosis	✓	✗	✓
Acumulación intracelular de trastuzumab	↑	↑	↑
Colocalización de trastuzumab con LAMP1	↑	↑	↑
Degradación de HER2	=	=	=
Expresión de proteínas solubles	uPA, TFPI-2	LCN2, uPAR, Serpina E1, Serpina A5 MMP13	GRO α , MIP-3 α
Expresión de genes implicados en resistencia a trastuzumab		CCNE1, GDF15, YES1, AREG, CD44, CD55	
Adhesión	↑	↑	↑
Migración	↑	↑	↑

Figura 61. Caracterización de los modelos celulares con distinta sensibilidad a trastuzumab.

La inhibición de la proliferación celular por los anticuerpos monoclonales contra HER2 se debe principalmente a un efecto citoestático y no citotóxico (Baselga y Albanell, 2001; Carter *et al.*, 1992). En este trabajo, se observó que trastuzumab causaba arresto del ciclo celular en G1 en las líneas celulares sensibles a la acción del anticuerpo, BT474 y BTSH (Figura 61). Consecuentemente, el número de células en fase S se redujo, como había sido descrito previamente por otros autores (Baselga y Albanell, 2001; Brockhoff *et al.*, 2007; Lane *et al.*, 2000; Nahta *et al.*, 2004b). Por el contrario, este efecto no se observó en las células resistentes (Kute *et al.*, 2004).

Además, experimentos de bioquímica mostraron un aumento de la expresión de p27 tras el tratamiento con trastuzumab en la línea BT474 (Lane *et al.*, 2000; Scaltriti *et al.*, 2011; Yakes *et al.*, 2002) y las células BTSH. A nivel basal, no se encontraron diferencias en los niveles de p27 entre las distintas líneas. Esto es un hecho destacable, ya que la infraexpresión de p27 había sido descrita como un mecanismo de resistencia a trastuzumab (Nahta *et al.*, 2004a). Los niveles de p21 estaban infraexpresados en las células resistentes a trastuzumab respecto a la línea parental, de acuerdo con lo que había sido descrito en modelos celulares de cáncer gástrico (Shu *et al.*, 2020). El tratamiento con trastuzumab disminuyó la expresión de p21 en las células BT474 y BTSH, al contrario de lo que había sido descrito previamente (D'Alesio *et al.*, 2017; Darini *et al.*, 2019; Mittendorf *et al.*, 2010). En cuanto a las células BTRH, la expresión de p21 no se vió modificada por el tratamiento. En lo que respecta al efecto citotóxico, el tratamiento con trastuzumab provocó una inducción de la muerte celular en las células BTSH (Figura 61) y desencadenó la expresión de formas procesadas de caspasa 3, caspasa 7 y PARP en las células hipersensibles, así como la activación de caspasa 3, determinada por fluorimetría. La inducción de la apoptosis en BTSH no fue un efecto aislado, ya que también fue observada en el otro clon hipersensible a trastuzumab, ST#35. Cuando se analizó el mecanismo de acción de trastuzumab en la línea parental, se observó una pequeña población de células que morían en presencia de trastuzumab (Milella *et al.*, 2004). El hecho de que esta población aumentase sustancialmente en el caso de las líneas hipersensibles a trastuzumab podría estar indicando que de alguna forma habríamos seleccionado una subpoblación de células que se ven más afectadas por el anticuerpo. En cambio, trastuzumab no causó muerte celular en las células resistentes. En otros trabajos observaron que trastuzumab causaba una mayor inducción de la apoptosis en células BT474 y SKBR3 que la que se describe en este trabajo (Bulut *et al.*, 2020; Zoi *et al.*, 2019).

La existencia de defectos en el control del ciclo celular y la apoptosis, como el aumento en el número de copias del gen que codifica la ciclina E (Scaltriti *et al.*, 2011) y el aumento de expresión de la proteína antiapoptótica survivina (Chakrabarty *et al.*, 2013) habían sido identificados como mecanismos de resistencia a trastuzumab.

Los datos de expresión diferencial obtenidos mediante RNAseq, mostraron que *CCNE1* estaba sobreexpresado significativamente en células BTRH (Figura 61) respecto a la línea parental mientras que no se encontraron diferencias en cuanto a la expresión de survivina.

Los experimentos de IF demostraron que trastuzumab se unía rápidamente a HER2 en la superficie celular de forma similar en todas las líneas celulares (Figura 61). Sin embargo, el proceso de internalización de trastuzumab era lento. Se observaron acumulaciones intracelulares de trastuzumab a partir de 3 y 6 horas de incubación. Sin embargo, hasta las 24 horas de tratamiento, trastuzumab se encontraba mayoritariamente en membrana (Zhu *et al.*, 2007). Se observó una mayor acumulación intracelular de trastuzumab en los modelos celulares sensibles a trastuzumab, BT474, BTSH y ST#35, indicando que dichas células internalizaban una cantidad de trastuzumab mayor que los modelos celulares resistentes (Figura 61). El proceso de internalización de trastuzumab en ST#35 era más lento, ya que tras 48 horas de tratamiento, la acumulación intracelular alcanzó su punto máximo. Cuando las células fueron tratadas con trastuzumab acoplado a pHrodo, se observó que el número de células positivas para trastuzumab-pHrodo era sustancialmente menor en el caso del clon ST#35. Esto puede deberse a que el proceso de internalización de trastuzumab en este clon, y por tanto su llegada al lisosoma era más lento, como sugerían los datos de IF, o a la existencia de un defecto lisosomal que hace que los lisosomas no sean ácidos y no funcionen correctamente (Ríos-Luci *et al.* 2017), que impedirían el procesamiento de trastuzumab y podrían estar prolongando su acción antitumoral.

Además, se analizó la degradación de trastuzumab mediante su colocalización con los lisosomas. La colocalización de trastuzumab con el marcador lisosomal LAMP1 se incrementó de acuerdo al tiempo de incubación, alcanzando su máximo tras 24 y 48 horas de incubación. En las células BT474 y BTSH el porcentaje de colocalización entre trastuzumab y LAMP1 fue mayor que en los modelos celulares resistentes BTRH y RT#10 (Figura 61). Esto puede deberse a que en las células resistentes la cantidad de trastuzumab internalizado era menor que en las células

sensibles. En el caso del clon hipersensible ST#35, la colocalización de trastuzumab con LAMP1 fue similar a las células BTRH y RT#10. Esto coincidiría con el análisis de la internalización de trastuzumab por IF y acoplado a pHrodo que sugerían que la internalización era más prolongada en el tiempo.

Originalmente se describió que trastuzumab desencadenaba su acción antitumoral mediante la internalización de HER2, disminuyendo sus niveles de expresión (Baselga y Albanell, 2001; Cuello *et al.*, 2001; Scaltriti *et al.*, 2007), alejándolo de la vía de reciclaje y dirigiéndolo hacia la degradación lisosomal (Rubin y Yarden, 2001). Sin embargo, otros estudios concluyeron que trastuzumab no inducía la internalización del receptor, por lo menos en solitario (Austin *et al.*, 2004; Hommelgaard *et al.*, 2004; Wymant *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2007), demostrando que la disminución de HER2 no era importante en el mecanismo de acción de trastuzumab (Austin *et al.*, 2004; Hommelgaard *et al.*, 2004). Además, algunos estudios demostraron que HER2 internalizado junto con trastuzumab volvía a encontrarse en membrana pasadas 4 horas desde el tratamiento inicial, mientras que trastuzumab era degradado (Zhu *et al.*, 2007). En otro trabajo, se utilizó un anticuerpo biparatópico tetravalente contra HER2 (anti-HER2-Bs) que reconocía un epítipo en el subdominio IV, igual que trastuzumab y otro en el subdominio II (Cheng *et al.*, 2020). Anti-HER2-Bs era internalizado rápidamente en comparación a trastuzumab y al otro anticuerpo contra el subdominio II por separado, cuya internalización era lenta. La unión simultánea de los dos epítipos era necesaria para que se internalizasen rápidamente. Una vez en el interior celular, el complejo formado por HER2 y el anticuerpo biparatópico se mantenía estable y se degradaba conjuntamente en los lisosomas, causando una disminución en los niveles de HER2. Por el contrario, el complejo trastuzumab-HER2 se separaba en el interior celular, resultado en un reciclaje de HER2 y la degradación de trastuzumab en los lisosomas (Cheng *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2007).

Cuando se analizó la vida media de HER2 en superficie tras el tratamiento con trastuzumab, se observó que trastuzumab causaba la desaparición de HER2 en las células BT474, BTRH y BTSH, sugiriendo que se internalizaba junto con

trastuzumab y era degradado en los lisosomas. Sin embargo, el tratamiento con trastuzumab no causó una disminución destacable en la expresión de HER2 en superficie, ya que se sintetiza de forma continua. Cuando se evaluó la colocalización de HER2 y LAMP1 tras el tratamiento con trastuzumab, no se observó una tendencia que indicase que HER2 se estuviese degradando en el lisosoma. Esto puede explicarse porque HER2 se sintetiza y degrada continuamente y, aunque trastuzumab provocó su degradación, la cantidad de HER2 total no se alteró y su colocalización con los lisosomas no se vio modificada.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio habían demostrado que las células BTRH no generaban tumores resistentes a trastuzumab cuando eran inyectadas en ratones desnudos. Con el objetivo de obtener un modelo celular resistente a trastuzumab *in vivo*, se evaluó si alguno de los clones resistentes que habían sido aislados podía generar tumores resistentes a trastuzumab. Se seleccionaron los clones RT#1, RT#5 y RT#10 que eran altamente resistentes al anticuerpo *in vitro*. Como control del experimento, en paralelo se analizó la respuesta a trastuzumab en tumores generados por las células BTRH y la línea parental. Los tumores generados por las células BT474 y BTRH fueron sensibles al tratamiento con trastuzumab, como se esperaba, mientras que los generados por el clon RT#10 eran resistentes. En cuanto a los tumores generados por RT#1, el tratamiento provocó inicialmente una ligera disminución de su tamaño, pero tras unas semanas continuaron creciendo. Con estos datos no pudimos concluir si se trataba de resistencia primaria o adquirida. En el caso de RT#5, existió más variabilidad en cuanto a la respuesta al tratamiento. Además, se observó que en algunos tumores originados por BT474, RT#5 y en un tumor de BTRH, la exposición continuada a trastuzumab desencadenó la aparición de recidivas, ya que los tumores que habían respondido inicialmente al fármaco, se volvieron resistentes. Esto sucede de forma análoga en la clínica, ya que el tratamiento con terapias basadas en trastuzumab, cuya duración es de casi un año (Harbeck *et al.*, 2019), favorece la aparición de resistencia adquirida en las pacientes (Gajria y Chandarlapaty, 2011). Es importante destacar que se trata de un experimento preliminar con muchas limitaciones. Sería necesario

aumentar el tamaño muestral para obtener datos concluyentes. Estos datos demuestran que la resistencia a trastuzumab *in vitro* no predice resistencia *in vivo*.

En un trabajo realizado de forma muy similar al nuestro (Kute *et al.*, 2004), seleccionaron un clon resistente a trastuzumab a partir de la línea BT474. Al igual que nuestras células BTRH, dicho clon presentaba niveles similares de HER2, se unía de forma eficaz a trastuzumab, y era capaz de crecer en presencia de trastuzumab con tasas de crecimiento y ciclo celular comparables a la línea parental en ausencia de trastuzumab. Sin embargo, cuando estas células resistentes *in vitro* se inyectaron en ratones desnudos atímicos, trastuzumab redujo el crecimiento tumoral de forma similar a la línea parental (Kute *et al.*, 2009), al igual que sucede en el caso de las células BTRH. En este caso, evaluaron la ADCC *in vitro* en el clon resistente y en la línea parental. Utilizaron la línea celular de NK, NK-92 y células mononucleadas aisladas de sangre periférica humana y analizaron la viabilidad celular en presencia y ausencia de trastuzumab. Ambas líneas eran igual de susceptibles a la ADCC a pesar de tener distinta respuesta a trastuzumab y tanto las células NK como las mononucleadas eran más eficientes a la hora de causar muerte celular en presencia de trastuzumab. Estos resultados sugirieron que el efecto antitumoral causado por trastuzumab *in vivo* se basaba en la ADCC desencadenada por la fracción mononuclear de las células inmunes innatas (Kute *et al.*, 2009). Otros estudios demostraron que los tumores generados en ratones desnudos con la línea JIMT-1, resistente a trastuzumab, eran también resistentes a la acción del fármaco *in vivo*. En este caso se sugirió que el mecanismo responsable de la resistencia era la sobreexpresión de MUC4 (Nagy *et al.*, 2005). Sin embargo, otros trabajos posteriores con JIMT-1 demostraron que la capacidad de trastuzumab para mediar la ADCC e inhibir el crecimiento tumoral dependía de la carga celular tumoral y de la accesibilidad de los efectores del sistema inmune innato a las células tumorales. Cuando los tumores eran muy pequeños o no estaban establecidos, trastuzumab reducía parcialmente el crecimiento del tumor. Sin embargo, los tumores de gran tamaño eran insensibles a la acción de trastuzumab (Barok *et al.*, 2007). En el caso de las células RT#10, podemos decir que la expresión de MUC4 no era la responsable de la resistencia *in vivo*, ya que no sobreexpresaban *MUC4* en comparación con la línea

parental. En un estudio realizado por Kute *et al.* observaron que la ADCC dependía del ratio entre células efectoras del sistema inmune y células tumorales diana debido a que el número de células tumorales se reducía de forma proporcional al aumento del ratio célula efectora/célula diana en presencia de trastuzumab. Además, observaron que las células inmunes que desencadenaban la ADCC *in vitro* con mayor eficacia eran las NK, seguidas de monocitos, células B y T (Kute *et al.*, 2012).

Entre los mecanismos de resistencia a trastuzumab descritos se encuentra la activación de la señalización por otros receptores pertenecientes o no a la familia. La formación de dímeros formados por HER2/HER3 y HER2/EGFR inducidos por la sobreexpresión de ligandos o de los propios receptores ha sido relacionada con una disminución de la respuesta a trastuzumab (Huang *et al.*, 2010; Ritter *et al.*, 2007; Sergina *et al.*, 2007; Xia *et al.*, 2004). Las células BT474 además de sobreexpresar HER2, también expresan EGFR y HER3 (Ríos-Luci *et al.*, 2020). La expresión de estos miembros de la familia HER se mantiene en las células resistentes BTRH, que además sobreexpresan *ERBB4* de forma muy significativa respecto a BT474. De acuerdo con este dato, en los análisis de identificación de genes que predicen respuesta a trastuzumab se encontró que *ERBB4* estaba sobreexpresado de forma significativa en las pacientes del ensayo PAMELA que no respondieron al tratamiento neoadyuvante con trastuzumab y lapatinib, ya que no presentaban RPC en la cirugía.

El papel que desempeña el receptor HER4 en cáncer de mama es controvertido. Algunos trabajos sugirieron que HER4 ejercía efectos antiproliferativos (Sartor *et al.*, 2001) y pro-apoptóticos (Naresh *et al.*, 2006) en líneas con cáncer de mama HER2+, indicando que podía estar antagonizando la actividad de HER2 (Naresh *et al.*, 2006; Sartor *et al.*, 2001; Suo *et al.*, 2002). Existen bastantes estudios que apoyan que la expresión de HER4 se correlacionaba con un pronóstico favorable en pacientes con cáncer de mama (Koutras *et al.*, 2008; Suo *et al.*, 2002; Witton *et al.*, 2003), mientras que otros autores sugirieron que HER4 era un biomarcador de mal pronóstico (Bièche *et al.*, 2003; Koutras *et al.*, 2010), en línea con nuestros resultados. En un trabajo publicado por Barros *et al.* demostraron que la

incidencia de la heterodimerización de HER2/HER4 no se asociaba a peor pronóstico y que no existía una correlación entre la formación de dímeros HER2/HER4 y la respuesta a trastuzumab (Barros *et al.*, 2014). En cuanto al resto de los receptores cuya sobreexpresión ha sido implicada en la resistencia al tratamiento con trastuzumab, como IGF-1R (Huang *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2001; Nahta *et al.*, 2005), MET (Minuti *et al.*, 2012; Shattuck *et al.*, 2008), EphA2 (Zhuang *et al.*, 2010) y el receptor de TGF β (Wang *et al.*, 2008), no se encontraron diferencias significativas en la expresión de dichos receptores entre las células BTRH o el clon RT#10 respecto a la línea parental en los datos de RNAseq que puedan explicar la resistencia a trastuzumab.

Numerosos estudios realizados con modelos celulares cáncer de mama HER2+ con resistencia adquirida a trastuzumab, que habían sido generados de forma similar a los nuestros, demostraron la implicación de distintas proteínas como las responsables de causar el fenotipo resistente. De todos ellos, *GDF15* (Donnelly *et al.*, 2013; Joshi *et al.*, 2011), *YES1* (Takeda *et al.*, 2017), *AREG* (Kim *et al.*, 2016) y *CD44* (Boulbes *et al.*, 2015) también estaban sobreexpresados significativamente en las células BTRH respecto a la línea parental (Figura 61), como demostraron los datos de RNAseq. En el caso de *CD44*, también estaba más expresado en el clon RT#10, sin embargo, las células hipersensibles BTSH y ST#35 también presentaron niveles superiores en comparación con BT474. Por último, la expresión de CD55 se encontró aumentada en pacientes HER2+ que no respondieron a trastuzumab (Wang *et al.*, 2017b) y se observó que se encontraba sobreexpresada en células BTRH respecto a la línea parental (Figura 61). El hecho de que existan distintos mecanismos implicados en la resistencia a trastuzumab, incluso generados a partir de la misma línea parental, indica que la resistencia a fármacos es un fenómeno complejo.

Como parte del proceso de búsqueda de genes que pudiesen ser responsables de la respuesta diferencial a trastuzumab en los modelos celulares utilizados en este trabajo, se estudió la expresión de proteínas solubles como citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento y otras que tenían actividad proteasa o funcionaban como inhibidoras de proteasas. Los resultados demostraron que las proteínas cuya expresión

estaba alterada entre los distintos modelos participaban en procesos relacionados con la organización y degradación de la ECM, así como la interacción entre proteínas de membrana con componentes de la matriz y la activación de MMPs.

El análisis de enriquecimiento funcional de los datos de expresión génica obtenidos por los *microarrays* y el RNAseq demostró que los GDEs en las células BTRH respecto a la línea parental BT474 estaban relacionados con la expresión de queratinas y filamentos intermedios, así como componentes de la ECM como colágeno y fibronectina. Dichos GDEs participaban en la organización de la ECM, en la interacción entre la ECM y los receptores y en los procesos de adhesión focal, la EMT y migración celular, enriquecidos en las células BTRH.

Cuando se analizó el proceso de adhesión a sustrato en placas pretratadas con FN en las células BT474, BTRH y BTSH, se determinó que las células BTRH se adherían más rápidamente que la línea parental y las hipersensibles a trastuzumab (Figura 61). Estas diferencias podían deberse a que las células BTRH sobreexpresan componentes de la ECM que median la adhesión, así como la propia FN, que fue el sustrato utilizado para realizar estos experimentos. La FN es una proteína que media la interacción de las células tumorales con la ECM y estimula la adhesión y la migración celular y la transformación oncogénica (Pankov, 2002). Mediante su unión a integrinas, la FN participa en procesos biológicos como la supervivencia celular, la angiogénesis y la resistencia a terapias (Jeon *et al.*, 2015).

Un estudio realizado por Rybinska *et al.* demostró que el pronóstico de un grupo de pacientes HER2+ con alta expresión de genes que codifican proteínas estructurales de la ECM, implicadas en EMT, adhesión celular, metástasis e hipoxia, mejoraba cuando eran tratadas con trastuzumab y quimioterapia, en lugar de quimioterapia como monoterapia (Rybinska *et al.*, 2020). En un modelo animal de cáncer de mama HER2+ transgénico, mutado en *PIK3CA* y con resistencia a trastuzumab, pertuzumab y buparlisib (inhibidor de PI3K), encontraron que proteínas que formaban la ECM y participaban en la adhesión celular como colágenos, laminina, vitronectina, trombospondina y tenascina, estaban sobreexpresados en los

tumores (Hanker *et al.*, 2017). Algunos componentes, como los colágenos, inducían la resistencia *in vitro* y ésta era revertida mediante la inhibición de su secreción (Hanker *et al.*, 2017). La sobreexpresión de colágeno II también se correlacionó con una respuesta a terapias anti-HER2 reducida en pacientes HER2+ (Hanker *et al.*, 2017). Zazo *et al.* demostraron que la sobreexpresión de la quimioquina CCL5 (RANTES) estaba implicada en la adquisición de resistencia a trastuzumab ya que su silenciamiento génico o farmacológico revertía dicha resistencia. Sin embargo, la adición de CCL5 sobre células BT474 parentales no inducía resistencia a trastuzumab, sugiriendo que la adquisición de resistencia era un proceso complejo que requería otras alteraciones, además de la sobreexpresión de CCL5 (Zazo *et al.*, 2020). En los modelos celulares con distinta sensibilidad a trastuzumab BT474, BTRH y BTSH el nivel de CCL5 detectado en el MC fue muy bajo en todas las líneas. Sin embargo, la cantidad de CCL5 secretada por las células BTRH era aproximadamente el doble que la línea parental, concordando con los datos anteriores.

Algunas proteínas que habían sido implicadas en la resistencia a trastuzumab también regulan las propiedades invasivas y migratorias de las células. Este es el caso de GDF15. Las células BT474 transfectadas con GDF15 eran más invasivas que las que llevaban el vector vacío (Donnelly *et al.*, 2013). Otro estudio demostró que la expresión de POU4F1 confería resistencia a trastuzumab en modelos celulares de cáncer de mama HER2+ con resistencia adquirida y que su silenciamiento entorpecía la invasión y migración de dichas células (Wu *et al.*, 2020a).

La metástasis es un fenómeno complejo que engloba varios procesos por los que las células tumorales se transportan desde el tumor primario a un órgano distante (Méndez-García *et al.*, 2019). Este proceso consta de tres estadios: la invasión local, la migración y la colonización. Durante la invasión local, las células tumorales sufren cambios fenotípicos que hacen que adquieran más movilidad. Este proceso se conoce como EMT (Méndez-García *et al.*, 2019). Las células epiteliales adheridas a la membrana basal se transforman en células móviles con capacidad de secretar componentes de la ECM y migrar a otros tejidos. Entre los cambios que sufren se

incluyen cambios morfológicos, desregulación de marcadores epiteliales (E-cadherina y citoqueratinas 8 y 18), aumento de la expresión de marcadores mesenquimales (N-cadherina, vimentina, FN) y secreción de enzimas que degradan la ECM, facilitando la invasión y la metástasis (Méndez-García *et al.*, 2019).

En un trabajo publicado por Oliveras-Ferraro *et al.*, demostraron que existía una relación entre el fenotipo mesenquimal y la resistencia a trastuzumab. Las células JIMT-1, resistentes a trastuzumab y enriquecidas en una subpoblación con fenotipo mesenquimal CD44⁺CD24^{-baja}, expresaban los factores de transcripción inductores de EMT: SNAIL2, TWIST1 y ZEB1. El silenciamiento de *SNAIL2*, *TWIST1* y *ZEB1* suprimió el fenotipo mesenquimal y sensibilizó las células al tratamiento con trastuzumab. El efecto más destacado en la respuesta a trastuzumab fue el conseguido por el silenciamiento de *SNAIL2*. Se demostró que la subpoblación con fenotipo mesenquimal CD44⁺CD24^{-baja} era insensible a trastuzumab, mientras que la subpoblación epitelial CD44⁺CD24⁺ era sensible. Además, en tumores generados por dichas células se observó que el silenciamiento de *SNAIL2* reducía el crecimiento tumoral y sensibilizaba al tratamiento con trastuzumab (Oliveras-Ferraro *et al.*, 2012). Se analizó si existía una expresión diferencial en factores de transcripción inductores de EMT y otras proteínas marcadoras del proceso como en los modelos con distinta sensibilidad a trastuzumab mediante RNAseq. *TWIST1*, *SNAIL1* y *SNAIL3* estaban infraexpresados en BTSH respecto a la línea BT474, sugiriendo una desregulación en la EMT en las células hipersensibles a trastuzumab. En cambio, la FN, marcador mesenquimal, estaba sobreexpresada en células BTRH mientras que *SNAIL3* y *VIM* estaban infraexpresados respecto a la línea parental. No se encontraron diferencias significativas en el resto de marcadores que se analizaron entre las células BTRH y BTSH y la línea parental.

La progresión desde un tumor localizado a un crecimiento invasivo demostró que estaba asociada a la expresión de MMPs (MMP-11, MMP-2, MMP-14 y MMP-13), implicadas en la invasión y remodelación de la ECM (Giussani *et al.*, 2015). Los resultados del *array* de proteasas demostraron que las células BTRH secretaban una mayor cantidad de MMP-13 que las células BT474 (Figura 61). En un trabajo

desarrollado por nuestro grupo se demostró que la activación de los receptores HER mediante el tratamiento con NRG desencadenaba el aumento de MMP-13 que inducía la diseminación metastática en tumores de mama (Seoane *et al.*, 2016). En células BT474, NRG aumentaba la expresión de MMP-13 y a su vez, inducía la invasión y la migración celular (Orive-Ramos *et al.*, 2017). El tratamiento con dasatinib inhibió la producción de MMP-13 y a su vez, la migración e invasión inducida por NRG (Orive-Ramos *et al.*, 2017).

Cuando se analizó la capacidad migratoria de las líneas celulares BT474, BTRH y BTSH, se observaron diferencias entre ellas. A pesar de que las células BT474 tienen una capacidad migratoria muy reducida, se encontró que las células BTRH, resistentes a trastuzumab, migraban más que BT474, y ésta última a su vez, más que las células BTSH, que no se desplazaban (Figura 61).

La ausencia de expresión de LCN2 fue asociada a un retraso en la tumorigénesis y en la aparición de metástasis en tumores de mama HER2+, además su silenciamiento provocó la disminución de la capacidad invasiva y migratoria de las células SKBR3 (Leng *et al.*, 2009). Sin embargo, la asociación entre la expresión de LCN2 y la respuesta a trastuzumab no había sido estudiada. En este trabajo, se observó que las células BTRH secretaban mayor cantidad de LCN2 respecto a la línea parental (Figura 61). Cuando se analizó la expresión de LCN2 en un panel de líneas celulares HER2+ sensibles y resistentes a trastuzumab, se observó que la sobreexpresión de LCN2 no era una característica exclusiva y común de las células resistentes. Los resultados demostraron que el silenciamiento de *LCN2* en las células BTRH no aumentaba su sensibilidad a trastuzumab, pero sí reducía la proliferación celular, como se había descrito en líneas celulares de cáncer de próstata y de cáncer gástrico (Koh y Lee, 2015; Tung *et al.*, 2013). Un efecto similar al ocasionado en BTRH por el silenciamiento de *LCN2* sobre la proliferación celular y la respuesta a trastuzumab también fue demostrado en las células HCC1569 sobreexpresoras de LCN2 y con resistencia primaria a trastuzumab, así como en células BT474. En esta última, a pesar de secretar niveles particularmente bajos, eran suficientes para verse afectadas por el silenciamiento de *LCN2*. Estos datos indicaron que la resistencia a

trastuzumab de las células BTRH no se debía a la sobreexpresión de LCN2, o por lo menos no de manera exclusiva.

Como se ha demostrado en ensayos clínicos y se observa de forma rutinaria en la práctica clínica, la heterogeneidad biológica dentro de las pacientes con cáncer de mama HER2+ determina la respuesta a los tratamientos y el pronóstico (Pernas *et al.*, 2019). Esta variabilidad se puede ilustrar con los modelos celulares de resistencia e hipersensibilidad a trastuzumab generados en este trabajo. Los datos de RNAseq demostraron que las células BT474, BTRH, RT#10, BTSH y ST#35 son muy diferentes en cuanto a expresión génica, sugiriendo que los mecanismos responsables de la adquisición de resistencia o hipersensibilidad a trastuzumab son diversos.

Una vez caracterizados los modelos celulares con distinta sensibilidad a trastuzumab, se analizaron sus perfiles transcriptómicos con los datos obtenidos mediante *microarrays* de expresión génica. Se identificaron los GDEs entre las células BTRH y BTSH respecto a la línea parental con el fin de identificar genes que pudiesen predecir la respuesta a trastuzumab. Para ganar fortaleza, se siguió una estrategia que consistió en seleccionar aquellos GDEs que tuviesen “signo opuesto”, con expresión inversa entre BTRH y BTSH respecto a la línea BT474, identificando un total de 29 genes. Se analizó el valor pronóstico y predictivo de 22 de los 29 GDEs cuya expresión había sido validada por qRT-PCR. El análisis con KM plotter (Györfy *et al.*, 2010) mostró que una expresión elevada de *PDE7B*, *ELMO1*, *GRIK2* y *UPK1A*, ya sea de forma individual o agrupados como firma génica, indicaba pronóstico favorable en pacientes con cáncer de mama HER2+ (Figura 62). La correlación que existe entre la expresión de dichos genes y el pronóstico en pacientes con cáncer de mama no había sido descrita con anterioridad.

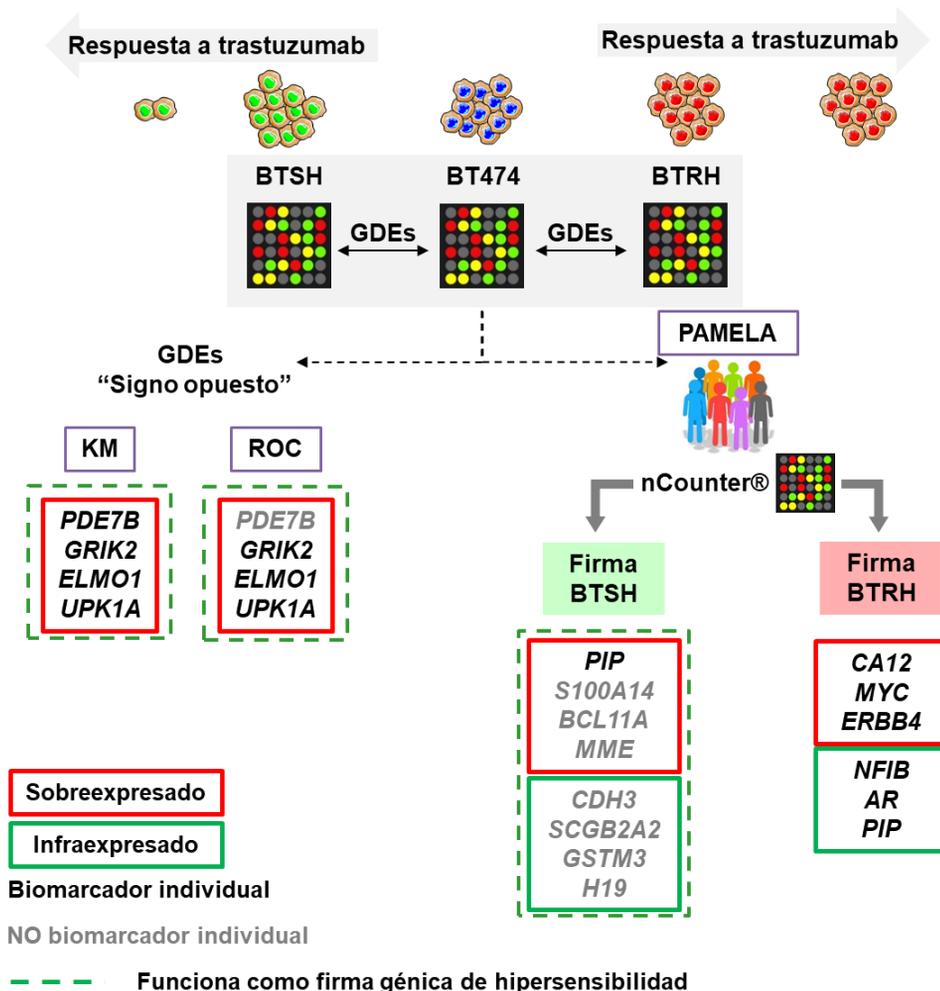


Figura 62. Biomarcadores de pronóstico y respuesta a trastuzumab. Los GDEs en BTSH y BTRH respecto a la línea parental BT474 se identificaron mediante *microarrays*. Para identificar biomarcadores de pronóstico y respuesta a trastuzumab se siguieron dos estrategias. En primer lugar, el papel de los GDEs con “signo opuesto” en pronóstico y respuesta a trastuzumab en pacientes con cáncer de mama HER2+ se evaluó mediante KM plotter y ROC plotter, respectivamente. Los resultados demostraron que algunos genes sobreexpresados en las células BTSH indicaban pronóstico favorable y buena respuesta a trastuzumab, de forma individual o como firma génica. Por otro lado, los GDEs se solaparon con los datos transcriptómicos de los tumores de las pacientes del ensayo clínico PAMELA y se evaluó la respuesta al doble bloqueo de HER2. Los resultados mostraron que la firma de hipersensibilidad estaba enriquecida en pacientes que respondieron a las terapias contra HER2. Además, algunos genes pertenecientes a la firma de resistencia se correlacionaron con baja respuesta al doble bloqueo de HER2 de forma individual.

La herramienta ROC plotter (Fekete y Gyórfy, 2019) permitió la identificación de tres genes *ELMO1*, *UPK1A* y *GRIK2*, todos sobreexpresados en células BTSH, que predecían mayor tasa de RPC al tratamiento con trastuzumab en

pacientes con cáncer de mama HER2+ (Figura 62). Es importante destacar el hecho de que los genes que predecían respuesta a trastuzumab también indicaban buen pronóstico en las pacientes. Conjuntamente, estos estudios han conducido a la identificación de genes y grupos de genes que estaban más expresados en las células BTSH con potencial utilidad en clínica como biomarcadores de respuesta a trastuzumab y buen pronóstico en pacientes con cáncer de mama HER2+. Sin embargo, tiene sus limitaciones, ya que la expresión génica que causa un fenotipo resistente no tiene porqué ser totalmente inversa a la del fenotipo hipersensible a una terapia.

Con el objetivo de facilitar la traslación de nuestros resultados al ámbito clínico, los GDEs en BTRH y BTSH respecto a la línea parental se compararon con datos de expresión génica de los tumores de una cohorte de 151 pacientes con cáncer de mama HER2+ pertenecientes al ensayo PAMELA que habían sido tratadas con doble bloqueo de HER2 con trastuzumab y lapatinib (Llombart-Cussac *et al.*, 2017) (Figura 62). Siguiendo esta estrategia, se generó una firma génica de hipersensibilidad y otra de resistencia que eran expresadas por los tumores de las pacientes antes del tratamiento. Los resultados del análisis mostraron que la firma génica de hipersensibilidad estaba enriquecida significativamente en pacientes que respondieron al doble bloqueo de HER2. Estos datos concordaban con el hecho de que las células BTSH son muy sensibles al tratamiento con trastuzumab o lapatinib. Estos datos sugirieron que algunos genes expresados por las células BTSH podían predecir respuesta a trastuzumab. Por el contrario, no existía una asociación entre la expresión de la firma de resistencia y la ausencia de respuesta al doble bloqueo de HER2. Este dato podía deberse al hecho de que la firma génica de resistencia estaba formada por un grupo más numeroso de genes que la de hipersensibilidad y por tanto, la asociación con la respuesta al doble bloqueo de HER2 estaba condicionada por más variables. Se realizaron otros análisis para evaluar la correlación entre la expresión de los genes que formaban parte de las firmas génicas de forma individual y la respuesta a la combinación de trastuzumab y lapatinib. Los resultados mostraron que algunos genes que pertenecían a la firma génica de resistencia podían predecir respuesta a trastuzumab de forma significativa. Por un lado, *CA12* y *MYC* estaban más

expresados en las pacientes que no respondieron al tratamiento y en las células BTRH. En términos de RPC, *CA12*, *ERBB4* y *MYC* estaban sobreexpresados en las células BTRH y en las pacientes que no mostraron RPC en la cirugía. Además, *AR* y *PIP* estaban infraexpresados en pacientes que no alcanzaron la RPC de acuerdo con su infraexpresión en las células BTRH. Al ser *PIP* el único gen que formaba parte tanto de la firma de hipersensibilidad (sobreexpresado en BTSH) como de la firma de resistencia (infraexpresado en BTRH) y tener “signo opuesto”, se seleccionó como gen candidato. Sin embargo, se observó que la adición de *PIP* exógeno no modificaba la respuesta a trastuzumab, sugiriendo que la hipersensibilidad de las células BTSH y la resistencia de las BTRH no se debía a la expresión diferencial de *PIP* o por lo menos no de forma exclusiva.

Existen multitud de investigaciones acerca de genes implicados en la adquisición de resistencia a trastuzumab y otras terapias anti-HER2. Sin embargo, apenas existen trabajos en los que se analice la sensibilidad a trastuzumab (Drucker *et al.*, 2020; Pernas *et al.*, 2019; Wheeler *et al.*, 2021). En estos trabajos se demostró que los genes *PERP*, *GNAS2*, *GNA13*, *ITB1*, *RAB10*, *HER2*, *CCNE1*, *FGFR4*, *GRB7*, *EXO1*, *ORC6L* y *RRM2* predecían respuesta a trastuzumab en líneas celulares y/o pacientes con cáncer de mama HER2+ (Drucker *et al.*, 2020; Pernas *et al.*, 2019). No obstante, ninguno de ellos estaba expresado de forma diferencial los modelos celulares BTSH y ST#35 respecto a la línea parental.

Las firmas génicas de hipersensibilidad generadas con las células BTSH han indicado pronóstico favorable y respuesta a terapias basadas en trastuzumab en pacientes HER2+, sugiriendo que BTSH es un modelo celular útil para realizar estudios preclínicos.

En este trabajo se han generado y caracterizado modelos celulares de hipersensibilidad y resistencia a trastuzumab. Se ha elucidado que el mecanismo biológico responsable del efecto diferencial de trastuzumab entre las células hipersensibles y la línea parental consistía en una fuerte inducción de la apoptosis. Se han identificado varios genes y firmas génicas que predicen pronóstico y respuesta a

trastuzumab en pacientes con cáncer de mama HER2+. Estos hallazgos representan un paso importante hacia la implementación de nuevos biomarcadores de respuesta a trastuzumab en cáncer de mama y abren la posibilidad de validación de los mismos en ensayos clínicos.

CONCLUSIONES

1. Se han generado y caracterizado modelos celulares hipersensibles y resistentes a trastuzumab a partir de la línea parental BT474.
2. Las diferencias en la respuesta a trastuzumab entre las células BT474, BTRH y BTSH no se deben a cambios en la expresión o activación de HER2.
3. Las células BTSH son más sensibles a T-DM1 que la línea parental mientras que las células BTRH son más resistentes a los TKIs lapatinib y neratinib.
4. Las células BT474, BTRH y BTSH siguen siendo oncogénicamente dependientes de HER2.
5. Trastuzumab provoca un arresto del ciclo celular en G1 similar en las células BT474 y BTSH, pero no en BTRH. El efecto diferencial de trastuzumab en BTSH se debe a la fuerte inducción de la apoptosis en estas células.
6. La internalización de trastuzumab es mayor en los modelos celulares sensibles a la acción de trastuzumab.
7. Las células BTRH sobreexpresan LCN2. El silenciamiento de *LCN2* reduce la proliferación celular pero no revierte la resistencia a trastuzumab.
8. Las células BTRH se adhieren más rápidamente y migran más que la línea parental. Además, los estudios transcriptómicos indicaron que los procesos de adhesión y migración están enriquecidos en las células BTRH respecto a BT474.
9. La estrategia de búsqueda de genes con “signo opuesto” ha conducido a la identificación de genes y grupos de genes correlacionados con pronóstico y respuesta a trastuzumab en pacientes con cáncer de mama HER2+.
10. La expresión individual o conjunta de *PDE7B*, *GRIK2*, *ELMO1* y *UPK1A* es indicativa de pronóstico favorable en pacientes con cáncer de mama HER2+.
11. La expresión individual o conjunta de *GRIK2*, *ELMO1* y *UPK1A* predice buena respuesta a trastuzumab en pacientes con cáncer de mama HER2+.
12. La firma génica de hipersensibilidad generada a partir de los datos de expresión génica de las muestras tumorales de las pacientes del ensayo PAMELA y de BTSH está enriquecida en aquellas pacientes que respondieron al tratamiento con terapias anti-HER2.

13. Se ha identificado un grupo de genes (*CA12*, *MYC*, *ERBB4*, *NFIB*, *AR* y *PIP*) que individualmente predicen respuesta al doble bloqueo de HER2.

BIBLIOGRAFÍA

AECC. Asociación Española Contra el Cáncer. (2020) <https://www.aecc.es/es>

Afgan, E., Baker, D., Batut, B., van den Beek, M., Bouvier, D., Čech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Grüning, B.A., *et al.* (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res*; *46*, W537–W544.

Aghazadeh, S., and Yazdanparast, R. (2017). Activation of STAT3/HIF-1 α /Hes-1 axis promotes trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancer cells via down-regulation of PTEN. *Biochim Biophys. Acta Gen Subj*; *1861*, 1970–1980.

Agus, D.B., Akita, R.W., Fox, W.D., Lewis, G.D., Higgins, B., Pisacane, P.I., Lofgren, J.A., Tindell, C., Evans, D.P., Maiese, K., *et al.* (2002). Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer Cell*; *2*, 127–137.

Alonso, R., Salavert, F., Garcia-Garcia, F., Carbonell-Caballero, J., Bleda, M., Garcia-Alonso, L., Sanchis-Juan, A., Perez-Gil, D., Marin-Garcia, P., Sanchez, R., *et al.* (2015). Babelomics 5.0: functional interpretation for new generations of genomic data. *Nucleic Acids Res*; *43*, W117–W121.

Andrews, S. (2021). Babraham Bioinformatics FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

Anido, J., Scaltriti, M., Bech Serra, J.J., Josefát, B.S., Rojo Todo, F., Baselga, J., and Arribas, J. (2006). Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation. *EMBO J*; *25*, 3234–3244.

Arora, A., and Scholar, E.M. (2005). Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. *J Pharmacol Exp Ther*, *315*: 971–979.

Arteaga, C.L., and Engelman, J.A. (2014). ERBB Receptors: From Oncogene Discovery to Basic Science to Mechanism-Based Cancer Therapeutics. *Cancer Cell*; *25*, 282–303.

Austin, C.D., Maziere, A.M.D., Pisacane, P.I., van Dijk, S.M., Eigenbrot, C., Sliwkowski, M.X., Klumperman, J., and Scheller, R.H. (2004). Endocytosis and Sorting of ErbB2 and the Site of Action of Cancer Therapeutics Trastuzumab and Geldanamycin DV. *Mol Biol Cell*; *15*, 5268–5282.

Awada, A., Dirix, L., Manso Sanchez, L., Xu, B., Luu, T., Diéras, V., Hershman, D.L., Agrapart, V., Ananthakrishnan, R., and Staroslawska, E. (2013). Safety and efficacy of neratinib (HKI-272) plus vinorelbine in the treatment of patients with ErbB2-positive metastatic breast cancer pretreated with anti-HER2 therapy. *Ann Oncol*; *24*, 109–116.

Bachelot, T., Ciruelos, E., Schneeweiss, A., Puglisi, F., Peretz-Yablonski, T., Bondarenko, I., Paluch-Shimon, S., Wardley, A., Merot, J.-L., du Toit, Y., *et al.* (2019). Preliminary safety and efficacy of first-line pertuzumab combined with trastuzumab and taxane therapy for HER2-positive locally recurrent or metastatic breast cancer (PERUSE). *Ann Oncol*; *30*, 766–773.

- Barok, M., Isola, J., Pályi-Krekk, Z., Nagy, P., Juhász, I., Vereb, G., Kauraniemi, P., Kapanen, A., Tanner, M., Vereb, G., *et al.* (2007). Trastuzumab causes antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated growth inhibition of submacroscopic JMT-1 breast cancer xenografts despite intrinsic drug resistance. *Mol Cancer Ther*; 6, 2065–2072.
- Barok, M., Tanner, M., Köninki, K., and Isola, J. (2011). Trastuzumab-DM1 causes tumour growth inhibition by mitotic catastrophe in trastuzumab-resistant breast cancer cells in vivo. *Breast Cancer Res*; 13, R46.
- Barros, F.F.T., Abdel-Fatah, T.M.A., Moseley, P., Nolan, C.C., Durham, A.C., Rakha, E.A., Chan, S., Ellis, I.O., and Green, A.R. (2014). Characterisation of HER heterodimers in breast cancer using in situ proximity ligation assay. *Breast Cancer Res Treat*; 144, 273–285.
- Baselga, J., and Albanell, J. (2001). Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies. *Ann Oncol*; 12, S35–S41.
- Baselga, J., Cortés, J., Kim, S.-B., Im, S.-A., Hegg, R., Im, Y.-H., Roman, L., Pedrini, J.L., Pienkowski, T., Knott, A., *et al.* (2012). Pertuzumab plus Trastuzumab plus Docetaxel for Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med*; 366, 109–119.
- Baselga, J., Coleman, R.E., Cortés, J., and Janni, W. (2017). Advances in the management of HER2-positive early breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*; 119, 113–122.
- Beck, A., Goetsch, L., Dumontet, C., and Corvaia, N. (2017). Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nat Rev Drug Discov*; 16, 315–337.
- Berns, K., Horlings, H.M., Hennessy, B.T., Madiredjo, M., Hijmans, E.M., Beelen, K., Linn, S.C., Gonzalez-Angulo, A.M., Stemke-Hale, K., Hauptmann, M., *et al.* (2007). A Functional Genetic Approach Identifies the PI3K Pathway as a Major Determinant of Trastuzumab Resistance in Breast Cancer. *Cancer Cell*; 12, 395–402.
- Bièche, I., Onody, P., Tozlu, S., Driouch, K., Vidaud, M., and Lidereau, R. (2003). Prognostic value of *ERBB* family mRNA expression in breast carcinomas: *ERBB* Family Expression in Breast Cancer. *Int J Cancer*; 106, 758–765.
- Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*; 30, 2114–2120.
- Boulbes, D.R., Chauhan, G.B., Jin, Q., Bartholomeusz, C., and Esteva, F.J. (2015). CD44 expression contributes to trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*; 151, 501–513.
- Brasó-Maristany, F., Griguolo, G., Pascual, T., Paré, L., Nuciforo, P., Llombart-Cussac, A., Bermejo, B., Oliveira, M., Morales, S., Martínez, N., *et al.* (2020). Phenotypic changes of HER2-positive breast cancer during and after dual HER2 blockade. *Nat Commun*; 11, 385.
- Breslin, S., Lowry, M.C., and O’Driscoll, L. (2017). Neratinib resistance and cross-resistance to other HER2-targeted drugs due to increased activity of metabolism enzyme cytochrome P4503A4. *Br J Cancer*; 116, 620–625.

- Brockhoff, G., Heckel, B., Schmidt-Bruecken, E., Plander, M., Hofstaedter, F., Vollmann, A., and Diermeier, S. (2007). Differential impact of Cetuximab, Pertuzumab and Trastuzumab on BT474 and SK-BR-3 breast cancer cell proliferation. *Cell Prolif*; 40, 488–507.
- Bulut, G., Atmaca, H., and Karaca, B. (2020). Trastuzumab in combination with AT-101 induces cytotoxicity and apoptosis in Her2 positive breast cancer cells. *Future Oncol*; 16 4485–4495.
- Burgess, A.W., Cho, H.-S., Eigenbrot, C., Ferguson, K.M., Garrett, T.P.J., Leahy, D.J., Lemmon, M.A., Sliwkowski, M.X., Ward, C.W., and Yokoyama, S. (2003). An Open-and-Shut Case? Recent Insights into the Activation of EGF/ErbB Receptors. *Mol Cell*; 12, 541–552.
- Burstein, H.J., Keshaviah, A., Baron, A.D., Hart, R.D., Lambert-Falls, R., Marcom, P.K., Gelman, R., and Winer, E.P. (2007). Trastuzumab plus vinorelbine or taxane chemotherapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer: The trastuzumab and vinorelbine or taxane study. *Cancer*; 110, 965–972.
- Burstein, H.J., Sun, Y., Dirix, L.Y., Jiang, Z., Paridaens, R., Tan, A.R., Awada, A., Ranade, A., Jiao, S., Schwartz, G., *et al.* (2010). Neratinib, an Irreversible ErbB Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, in Patients With Advanced ErbB2-Positive Breast Cancer. *J Clin Oncol*; 28, 1301–1307.
- Canonici, A., Gijsen, M., Mullooly, M., Bennett, R., Bouguern, N., Pedersen, K., O'Brien, N.A., Roxanis, I., Li, J.-L., Bridge, E., *et al.* (2013). Neratinib overcomes trastuzumab resistance in HER2 amplified breast cancer. *Oncotarget*; 4, 1592–1605.
- Carey, L.A., Berry, D.A., Cirrincione, C.T., Barry, W.T., Pitcher, B.N., Harris, L.N., Ollila, D.W., Krop, I.E., Henry, N.L., Weckstein, D.J., *et al.* (2016). Molecular Heterogeneity and Response to Neoadjuvant Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Targeting in CALGB 40601, a Randomized Phase III Trial of Paclitaxel Plus Trastuzumab With or Without Lapatinib. *J. Clin. Oncol*; 34, 542–549.
- Carter, P., Presta, L., Gorman, C.M., Ridgway, J.B., Henner, D., Wong, W.L., Rowland, A.M., Kotts, C., Carver, M.E., and Shepard, H.M. (1992). Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*; 89, 4285–4289.
- Carvalho, S., Levi-Schaffer, F., Sela, M., and Yarden, Y. (2016). Immunotherapy of cancer: from monoclonal to oligoclonal cocktails of anti-cancer antibodies: IUPHAR Review 18: Monoclonal to oligoclonal anticancer antibodies. *Br J Pharmacol*; 173, 1407–1424.
- Cesca, M.G., Vian, L., Cristóvão-Ferreira, S., Pondé, N., and de Azambuja, E. (2020). HER2-positive advanced breast cancer treatment in 2020. *Cancer Treat Rev*; 88, 102033.
- Chakrabarty, A., Bholra, N.E., Sutton, C., Ghosh, R., Kuba, M.G., Dave, B., Chang, J.C., and Arteaga, C.L. (2013). Trastuzumab-Resistant Cells Rely on a HER2-PI3K-FoxO-Survivin Axis and Are Sensitive to PI3K Inhibitors. *Cancer Res*; 73, 1190–1200.
- Chan, A., Delaloge, S., Holmes, F.A., Moy, B., Iwata, H., Harvey, V.J., Robert, N.J., Silovski, T., Gokmen, E., von Minckwitz, G., *et al.* (2016). Neratinib after trastuzumab-based

adjuvant therapy in patients with HER2-positive breast cancer (ExteNET): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*; *17*, 367–377.

Chen, E.Y., Tan, C.M., Kou, Y., Duan, Q., Wang, Z., Meirelles, G., Clark, N.R., and Ma'ayan, A. (2013). Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics*; *14*, 128.

Chen, J., Bardes, E.E., Aronow, B.J., and Jegga, A.G. (2009). ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Res*; *37*, W305–W311.

Cheng, J., Liang, M., Carvalho, M.F., Tigue, N., Faggioni, R., Roskos, L.K., and Vainshtein, I. (2020). Molecular Mechanism of HER2 Rapid Internalization and Redirected Trafficking Induced by Anti-HER2 Biparatopic Antibody. *Antibodies*; *9*, 49.

Cho, H.-S., Mason, K., Ramyar, K.X., Stanley, A.M., Gabelli, S.B., Denney, D.W., and Leahy, D.J. (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature*; *421*, 756–760.

Choi, H.-J., Jin, S., Cho, H., Won, H.-Y., An, H.W., Jeong, G.-Y., Park, Y.-U., Kim, H.-Y., Park, M.K., Son, T., *et al.* (2019). CDK12 drives breast tumor initiation and trastuzumab resistance via WNT and IRS1-ErbB-PI3K signaling. *EMBO Rep*; *20*, e48058.

Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G., and Ravetch, J.V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*; *6*, 443–446.

Cocco, E., Lopez, S., Santin, A.D., and Scaltriti, M. (2019). Prevalence and role of HER2 mutations in cancer. *Pharmacol Ther*; *199*, 188–196.

Conlon, N.T., Kooijman, J.J., van Gerwen, S.J.C., Mulder, W.R., Zaman, G.J.R., Diala, I., Eli, L.D., Lalani, A.S., Crown, J., and Collins, D.M. (2021). Comparative analysis of drug response and gene profiling of HER2-targeted tyrosine kinase inhibitors. *Br J Cancer*; *124*, 1249–1259.

Corti, C., and Criscitiello, C. (2021). Tucatinib approval by EMA expands options for HER2-positive locally advanced or metastatic breast cancer. *ESMO Open*; *6*, 100063.

Coussens, L., Yang-Feng, T.L., Liao, Y.C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P.H., Libermann, T.A., Schlessinger, J., and Francke, U. (1985). Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*; *230*, 1132–1139.

Cuello, M., Ettenberg, S.A., Clark, A.S., Keane, M.M., Posner, R.H., Nau, M.M., Dennis, P.A., and Lipkowitz, S. (2001). Down-regulation of the erbB-2 receptor by trastuzumab (herceptin) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines that overexpress erbB-2. *Cancer Res*; *61*, 4892–4900.

D'Alesio, C., Bellese, G., Gagliani, M.C., Aiello, C., Grasselli, E., Marcocci, G., Bisio, A., Tavella, S., Daniele, T., Cortese, K., *et al.* (2017). Cooperative antitumor activities of carnosisic acid and Trastuzumab in ERBB2+ breast cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*; *36*, 154.

- Darini, C., Ghaddar, N., Chabot, C., Assaker, G., Sabri, S., Wang, S., Krishnamoorthy, J., Buchanan, M., Aguilar-Mahecha, A., Abdulkarim, B., *et al.* (2019). An integrated stress response via PKR suppresses HER2+ cancers and improves trastuzumab therapy. *Nat. Commun.* *10*, 2139.
- Dave, B., Migliaccio, I., Gutierrez, M.C., Wu, M.-F., Chamness, G.C., Wong, H., Narasanna, A., Chakrabarty, A., Hilsenbeck, S.G., Huang, J., *et al.* (2011). Loss of Phosphatase and Tensin Homolog or Phosphoinositol-3 Kinase Activation and Response to Trastuzumab or Lapatinib in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Overexpressing Locally Advanced Breast Cancers. *J Clin Oncol*; *29*, 166–173.
- Dean-Colomb, W., and Esteva, F.J. (2008). Her2-positive breast cancer: herceptin and beyond. *Eur J Cancer*; *44*, 2806–2812.
- Decker, J.T., Kandagatla, P., Wan, L., Bernstein, R., Ma, J.A., Shea, L.D., and Jeruss, J.S. (2020). Cyclin E overexpression confers resistance to trastuzumab through noncanonical phosphorylation of SMAD3 in HER2+ breast cancer. *Cancer Biol Ther*; *21*, 994–1004.
- Deeks, E.D. (2017). Neratinib: First Global Approval. *Drugs*; *77*, 1695–1704.
- Díaz-Rodríguez, E., Pérez-Peña, J., Ríos-Luci, C., Arribas, J., Ocaña, A., and Pandiella, A. (2019). TRAIL receptor activation overcomes resistance to trastuzumab in HER2 positive breast cancer cells. *Cancer Lett*; *453*, 34–44.
- Ding, K., Wu, Z., Li, X., Sheng, Y., Wang, X., and Tan, S. (2018). LMO4 mediates trastuzumab resistance in HER2 positive breast cancer cells. *Am J Cancer Res*; *8*, 594–609.
- Ding, L., Getz, G., Wheeler, D.A., Mardis, E.R., McLellan, M.D., Sougnez, C., Greulich, H., Muzny, D.M., Morgan, M.B., Fulton, L., *et al.* (2009). Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*; *455*, 1069–1075.
- Donnelly, S.M., Paplomata, E., Peake, B.M., Sanabria, E., Chen, Z., and Nahta, R. (2013). P38 MAPK Contributes to Resistance and Invasiveness of HER2- Overexpressing Breast Cancer. *Curr Med Chem*; *21*, 501–510.
- Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J., and Waterfield, M.D. (1984). Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature*; *307*, 521–527.
- Drucker, A., Yoo, B.H., Khan, I.A., Choi, D., Montermini, L., Liu, X., Jovanovic, S., Younis, T., and Rosen, K.V. (2020). Trastuzumab-induced upregulation of a protein set in extracellular vesicles emitted by ErbB2-positive breast cancer cells correlates with their trastuzumab sensitivity. *Breast Cancer Res*; *22*, 105.
- Du, C., Yi, X., Liu, W., Han, T., Liu, Z., Ding, Z., Zheng, Z., Piao, Y., Yuan, J., Han, Y., *et al.* (2014). MTDH mediates trastuzumab resistance in HER2 positive breast cancer by decreasing PTEN expression through an NFκB-dependent pathway. *BMC Cancer*; *14*, 869.
- Esteva, F.J., Guo, H., Zhang, S., Santa-Maria, C., Stone, S., Lanchbury, J.S., Shain, A.A., Hortobagyi, G.N., and Yu, D. (2010). PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K Status. *Am J Pathol*; *177*, 1647–1656.

- Fekete, J.T., and Györfy, B. (2019). ROCplot.org: Validating predictive biomarkers of chemotherapy/hormonal therapy/anti-HER2 therapy using transcriptomic data of 3,104 breast cancer patients. *Int J Cancer*; *145*, 3140–3151.
- Gajria, D., and Chandarlapaty, S. (2011). HER2-amplified breast cancer: mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies. *Expert Rev Anticancer Ther*; *11*, 263–275.
- García-Alonso, S. (2018). Anticuerpos conjugados a fármacos frente a receptores ERBB: Nuevas indicaciones y mecanismos de resistencia. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- García-Alonso, S., Ocaña, A., and Pandiella, A. (2020). Trastuzumab Emtansine: Mechanisms of Action and Resistance, Clinical Progress, and Beyond. *Trends Cancer*; *6*, 130–146.
- Geyer, C.E., Forster, J., Lindquist, D., Chan, S., Romieu, C.G., Pienkowski, T., Jagiello-Gruszfeld, A., Crown, J., Chan, A., Kaufman, B., *et al.* (2006). Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*; *355*, 2733–2743.
- Gianni, L., Pienkowski, T., Im, Y.-H., Tseng, L.-M., Liu, M.-C., Lluch, A., Starosławska, E., de la Haba-Rodriguez, J., Im, S.-A., Pedrini, J.L., *et al.* (2016). 5-year analysis of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in patients with locally advanced, inflammatory, or early-stage HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a multicentre, open-label, phase 2 randomised trial. *Lancet Oncol*; *17*, 791–800.
- Gilbertson, R., Hernan, R., Pietsch, T., Pinto, L., Scotting, P., Allibone, R., Ellison, D., Perry, R., Pearson, A., and Lunec, J. (2001). Novel ERBB4 juxtamembrane splice variants are frequently expressed in childhood medulloblastoma. *Genes. Chromosomes Cancer*; *31*, 288–294.
- Giussani, M., Merlino, G., Cappelletti, V., Tagliabue, E., and Daidone, M.G. (2015). Tumor-extracellular matrix interactions: Identification of tools associated with breast cancer progression. *Semin Cancer Biol*; *35*, 3–10.
- GCO.Global Cancer Observatory. (2021). <http://gco.iarc.fr/>
- González-Alonso, P., Zazo, S., Martín-Aparicio, E., Luque, M., Chamizo, C., Sanz-Álvarez, M., Minguez, P., Gómez-López, G., Cristóbal, I., Caramés, C., *et al.* (2020). The Hippo Pathway Transducers YAP1/TEAD Induce Acquired Resistance to Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer. *Cancers*; *12*, 1108.
- Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Daly, J.M., and Hynes, N.E. (1997). ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J*; *16*, 1647–1655.
- Griguolo, G., Pascual, T., Dieci, M.V., Guarneri, V., and Prat, A. (2019). Interaction of host immunity with HER2-targeted treatment and tumor heterogeneity in HER2-positive breast cancer. *J Immunother Cancer*; *7*, 90.
- Gutierrez, C., and Schiff, R. (2011). HER 2: Biology, Detection, and Clinical Implications. *Arch Pathol Lab Med*; *135*, 55–62.

- GuY, P.M., Platko, J.V., CANTLEYt, L.C., Cerione, R.A., and IIItt, K.L.C. (1994). Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*; *91*, 8132-8136.
- Györfy, B., Lanczky, A., Eklund, A.C., Denkert, C., Budczies, J., Li, Q., and Szallasi, Z. (2010). An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using *microarray* data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat*; *123*, 725–731.
- Hanker, A.B., Estrada, M.V., Bianchini, G., Moore, P.D., Zhao, J., Cheng, F., Koch, J.P., Gianni, L., Tyson, D.R., Sánchez, V., *et al.* (2017). Extracellular Matrix/Integrin Signaling Promotes Resistance to Combined Inhibition of HER2 and PI3K in HER2 + Breast Cancer. *Cancer Res*; *77*, 3280–3292.
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., and Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nat Rev Dis Primer*; *5*, 66.
- Hartwell, L.H., Szankasi, P., Roberts, C.J., Murray, A.W., and Friend, S.H. (1997). Integrating genetic approaches into the discovery of anticancer drugs. *Science*; *278*, 1064-1068.
- Hegde, G.V., de la Cruz, C.C., Chiu, C., Alag, N., Schaefer, G., Crocker, L., Ross, S., Goldenberg, D., Merchant, M., Tien, J., *et al.* (2013). Blocking NRG1 and Other Ligand-Mediated Her4 Signaling Enhances the Magnitude and Duration of the Chemotherapeutic Response of Non-Small Cell Lung Cancer. *Sci Transl Med*; *5*, 171ra18.
- Heldin, C.-H. (1995). Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*; *80*, 213–223.
- Hennessy, B.T., Smith, D.L., Ram, P.T., Lu, Y., and Mills, G.B. (2005). Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*; *4*, 988–1004.
- Herschkowitz, J.I., Simin, K., Weigman, V.J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K.E., Jones, L.P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., *et al.* (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*; *8*, R76.
- Hoadley, K.A., Yau, C., Wolf, D.M., Cherniack, A.D., Tamborero, D., Ng, S., Leiserson, M.D.M., Niu, B., McLellan, M.D., Uzunangelov, V., *et al.* (2014). Multiplatform Analysis of 12 Cancer Types Reveals Molecular Classification within and across Tissues of Origin. *Cell*; *158*, 929–944.
- Hommelgaard, A.M., Lerdrup, M., and van Deurs, B. (2004). Association with Membrane Protrusions Makes ErbB2 an Internalization-resistant Receptor. *Mol Biol Cell* ;*15*, 1557–1567.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009a). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res*; *37*, 1–13.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009b). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*; *4*, 44–57.

- Huang, X., Gao, L., Wang, S., McManaman, J.L., Thor, A.D., Yang, X., Esteva, F.J., and Liu, B. (2010). Heterotrimerization of the Growth Factor Receptors erbB2, erbB3, and Insulin-like Growth Factor-I Receptor in Breast Cancer Cells Resistant to Herceptin. *Cancer Res*; *70*, 1204–1214.
- Hwang, S.-Y., Choi, S.-K., Seo, S.H., Jo, H., Shin, J.-H., Na, Y., Lee, Y.-S., and Kwon, Y. (2020). Specific Roles of HSP27 S15 Phosphorylation Augmenting the Nuclear Function of HER2 to Promote Trastuzumab Resistance. *Cancers*; *12*, 1540.
- Hyman, D.M., Piha-Paul, S.A., Won, H., Rodon, J., Saura, C., Shapiro, G.I., Juric, D., Quinn, D.I., Moreno, V., Doger, B., *et al.* (2018). HER kinase inhibition in patients with HER2- and HER3-mutant cancers. *Nature*; *554*, 189-194.
- Hynes, N.E., and Lane, H.A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*; *5*, 341–354.
- Hynes, N.E., and MacDonald, G. (2009). ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol*; *21*, 177–184.
- Jaiswal, B.S., Kljavin, N.M., Stawiski, E.W., Chan, E., Parikh, C., Durinck, S., Chaudhuri, S., Pujara, K., Guillory, J., Edgar, K.A., *et al.* (2013). Oncogenic ERBB3 Mutations in Human Cancers. *Cancer Cell*; *23*, 603–617.
- Jeon, M., Lee, J., Nam, S.J., Shin, I., Lee, J.E., and Kim, S. (2015). Induction of fibronectin by HER2 overexpression triggers adhesion and invasion of breast cancer cells. *Exp Cell Res*; *333*, 116-126.
- Jiang, L., Ren, L., Chen, H., Pan, J., Zhang, Z., Kuang, X., Chen, X., Bao, W., Lin, C., Zhou, Z., *et al.* (2020a). NCAPG confers trastuzumab resistance via activating SRC/STAT3 signaling pathway in HER2-positive breast cancer. *Cell Death Dis*; *11*, 547.
- Jiang, M., Qi, L., Li, L., and Li, Y. (2020b). The caspase-3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer. *Cell Death Discov*; *6*, 112.
- Joshi, J.P., Brown, N.E., Griner, S.E., and Nahta, R. (2011). Growth differentiation factor 15 (GDF15)-mediated HER2 phosphorylation reduces trastuzumab sensitivity of HER2-overexpressing breast cancer cells. *Biochem Pharmacol*; *82*, 1090–1099.
- Keam, S.J. (2020). Trastuzumab Deruxtecan: First Approval. *Drugs*; *80*, 501–508.
- Kim, D., Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods*; *12*, 357–360.
- Kim, J.-W., Kim, D.K., Min, A., Lee, K.-H., Nam, H.-J., Kim, J.H., Kim, J.-S., Kim, T.-Y., Im, S.-A., and Park, I.A. (2016). Amphiregulin confers trastuzumab resistance via AKT and ERK activation in HER2-positive breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*; *142*, 157–165.
- King, J., Mir, H., and Singh, S. (2017). Association of Cytokines and Chemokines in Pathogenesis of Breast Cancer. *Prog Mol Biol Transl Sci*; *151*, 113-136.
- Koh, S.A., and Lee, K.H. (2015). HGF mediated upregulation of lipocalin 2 regulates MMP9 through nuclear factor- κ B activation. *Oncol Rep*; *34*, 2179–2187.

- Köninki, K., Barok, M., Tanner, M., Staff, S., Pitkänen, J., Hemmilä, P., Ilvesaro, J., and Isola, J. (2010). Multiple molecular mechanisms underlying trastuzumab and lapatinib resistance in JIMT-1 breast cancer cells. *Cancer Lett*; 294, 211–219.
- Koutras, A.K., Kalogeras, K.T., Dimopoulos, M.-A., Wirtz, R.M., Dafni, U., Briasoulis, E., Pectasides, D., Gogas, H., Christodoulou, C., Aravantinos, G., *et al.* (2008). Evaluation of the prognostic and predictive value of HER family mRNA expression in high-risk early breast cancer: A Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) study. *Br J Cancer*; 99, 1775–1785.
- Koutras, A.K., Fountzilias, G., Kalogeras, K.T., Starakis, I., Iconomou, G., and Kalofonos, H.P. (2010). The upgraded role of HER3 and HER4 receptors in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*; 74, 73–78.
- Kovtun, Y.V., and Goldmacher, V.S. (2007). Cell killing by antibody–drug conjugates. *Cancer Lett*; 255, 232–240.
- Kraus, M.H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N.C., and Aaronson, S.A. (1989). Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci*; 86, 9193–9197.
- Kreutzfeldt, J., Rozeboom, B., Dey, N., and De, P. (2020). The trastuzumab era: current and upcoming targeted HER2+ breast cancer therapies. *Am J Cancer Res*; 10, 1045–1067.
- Kuleshov, M.V., Jones, M.R., Rouillard, A.D., Fernandez, N.F., Duan, Q., Wang, Z., Koplev, S., Jenkins, S.L., Jagodnik, K.M., Lachmann, A., *et al.* (2016). Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res*; 44, W90–W97.
- Kute, T., Lack, C.M., Willingham, M., Bishwokama, B., Williams, H., Barrett, K., Mitchell, T., and Vaughn, J.P. (2004). Development of Herceptin resistance in breast cancer cells. *Cytometry*; 57A, 86–93.
- Kute, T., Stehle, Jr., J.R., Ornelles, D., Walker, N., Delbono, O., and Vaughn, J.P. (2012). Understanding key assay parameters that affect measurements of trastuzumab-mediated ADCC against Her2 positive breast cancer cells. *OncoImmunology*; 1, 810–821.
- Kute, T.E., Savage, L., Stehle, J.R., Kim-Shapiro, J.W., Blanks, M.J., Wood, J., and Vaughn, J.P. (2009). Breast tumor cells isolated from in vitro resistance to trastuzumab remain sensitive to trastuzumab anti-tumor effects in vivo and to ADCC killing. *Cancer Immunol Immunother*; 58, 1887–1896.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*; 227, 680–685.
- Lane, H.A., Beuvink, I., Motoyama, A.B., Daly, J.M., Neve, R.M., and Hynes, N.E. (2000). ErbB2 potentiates breast tumor proliferation through modulation of p27(Kip1)-Cdk2 complex formation: receptor overexpression does not determine growth dependency. *Mol Cell Biol*; 20, 3210–3223.
- Lee, A. (2020). Tucatinib: First Approval. *Drugs*; 80, 1033–1038.

Lee, H.J., Seo, A.N., Kim, E.J., Jang, M.H., Suh, K.J., Ryu, H.S., Kim, Y.J., Kim, J.H., Im, S.-A., Gong, G., *et al.* (2014). HER2 Heterogeneity Affects Trastuzumab Responses and Survival in Patients With HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *Am J Clin Pathol*; *142*, 755–766.

Leng, X., Ding, T., Lin, H., Wang, Y., Hu, L., Hu, J., Feig, B., Zhang, W., Pusztai, L., Symmans, W.F., *et al.* (2009). Inhibition of Lipocalin 2 Impairs Breast Tumorigenesis and Metastasis. *Cancer Res*; *69*, 8579–8584.

Lewis Phillips, G.D., Li, G., Dugger, D.L., Crocker, L.M., Parsons, K.L., Mai, E., Blättler, W.A., Lambert, J.M., Chari, R.V.J., Lutz, R.J., *et al.* (2008). Targeting HER2-Positive Breast Cancer with Trastuzumab-DM1, an Antibody–Cytotoxic Drug Conjugate. *Cancer Res*; *68*, 9280–9290.

Li, Y., Chu, J., Feng, W., Yang, M., Zhang, Y., Zhang, Y., Qin, Y., Xu, J., Li, J., Vasilatos, S.N., *et al.* (2019). EPHA5 mediates trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancers through regulating cancer stem cell-like properties. *FASEB J*; *33*, 4851–4865.

Liao, Y., Smyth, G.K., and Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*; *30*, 923–930.

Llombart-Cussac, A., Cortés, J., Paré, L., Galván, P., Bermejo, B., Martínez, N., Vidal, M., Pernas, S., López, R., Muñoz, M., *et al.* (2017). HER2-enriched subtype as a predictor of pathological complete response following trastuzumab and lapatinib without chemotherapy in early-stage HER2-positive breast cancer (PAMELA): an open-label, single-group, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol*; *18*, 545–554.

Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*; *15*, 550.

Lu, Y., Zi, X., Mascarenhas, D., and Pollak, M. (2001). Insulin-Like Growth Factor-I Receptor Signaling and Resistance to Trastuzumab (Herceptin). *J. Natl Cancer Inst*; *93*, 6.

Lynch, T.J., Okimoto, R.A., Supko, J.G., and Settleman, J. (2004). Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non–Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N Engl J Med*; *350*, 2129–2139.

Markham, A. (2021). Margetuximab: First Approval. *Drugs*; *81*, 599–604.

Marmor, M.D., Skaria, K.B., and Yarden, Y. (2004). Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol*; *58*, 903–913.

Martin, M., Holmes, F.A., Ejlertsen, B., Delaloge, S., Moy, B., Iwata, H., Minckwitz, G. von, Chia, S.K.L., Mansi, J., Barrios, C.H., *et al.* (2017). Neratinib after trastuzumab-based adjuvant therapy in HER2-positive breast cancer (ExteNET): 5-year analysis of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*; *18*, 1688–1700.

Massagué, J., and Pandiella, A. (1993). Membrane-Anchored Growth Factors. *Annu Rev Biochem*; *62*, 515–541.

Méndez-García, L.A., Nava-Castro, K.E., Ochoa-Mercado, T. de L., Palacios-Arreola, M.I., Ruiz-Manzano, R.A., Segovia-Mendoza, M., Solleiro-Villavicencio, H., Cázarez-Martínez,

- C., and Morales-Montor, J. (2019). Breast Cancer Metastasis: Are Cytokines Important Players During Its Development and Progression? *J Interferon Cytokine Res*; *39*, 39–55.
- Mercogliano, M.F., De Martino, M., Venturutti, L., Rivas, M.A., Proietti, C.J., Inurriagarro, G., Frahm, I., Allemand, D.H., Deza, E.G., Ares, S., *et al.* (2017). TNF α -Induced Mucin 4 Expression Elicits Trastuzumab Resistance in HER2-Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res*; *23*, 636–648.
- Milella, M., Trisciuglio, D., Bruno, T., Ciuffreda, L., Mottolese, M., Cianciulli, A., Cognetti, F., Zangemeister-Wittke, U., Del Bufalo, D., and Zupi, G. (2004). Trastuzumab Down-Regulates Bcl-2 Expression and Potentiates Apoptosis Induction by Bcl-2/Bcl-X_L Bispecific Antisense Oligonucleotides in *HER-2* Gene-Amplified Breast Cancer Cells. *Clin Cancer Res*; *10*, 7747–7756.
- von Minckwitz, G., Procter, M., de Azambuja, E., Zardavas, D., Benyunes, M., Viale, G., Suter, T., Arahmani, A., Rouchet, N., Clark, E., *et al.* (2017). Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*; *377*, 122–131.
- von Minckwitz, G., Huang, C.-S., Mano, M.S., Loibl, S., Mamounas, E.P., Untch, M., Wolmark, N., Rastogi, P., Schneeweiss, A., Redondo, A., *et al.* (2019). Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*; *380*, 617–628.
- Minuti, G., Cappuzzo, F., Duchnowska, R., Jassem, J., Fabi, A., O'Brien, T., Mendoza, A.D., Landi, L., Biernat, W., Czartoryska-Arlukowicz, B., *et al.* (2012). Increased MET and HGF gene copy numbers are associated with trastuzumab failure in HER2-positive metastatic breast cancer. *Br J Cancer*; *107*, 793–799.
- Mitra, D., Brumlik, M.J., Okamgba, S.U., Zhu, Y., Duplessis, T.T., Parvani, J.G., Lesko, S.M., Brogi, E., and Jones, F.E. (2009). An oncogenic isoform of HER2 associated with locally disseminated breast cancer and trastuzumab resistance. *Mol Cancer Ther*; *8*, 2152–2162.
- Mittendorf, E.A., Wu, Y., Scaltriti, M., Meric-Bernstam, F., Hunt, K.K., Dawood, S., Esteva, F.J., Buzdar, A.U., Chen, H., Eksambi, S., *et al.* (2009). Loss of HER2 Amplification Following Trastuzumab-Based Neoadjuvant Systemic Therapy and Survival Outcomes. *Clin Cancer Res*; *15*, 7381–7388.
- Mittendorf, E.A., Liu, Y., Tucker, S.L., McKenzie, T., Qiao, N., Akli, S., Biernacka, A., Liu, Y., Meijer, L., Keyomarsi, K., *et al.* (2010). A novel interaction between HER2/neu and cyclin E in breast cancer. *Oncogene*; *29*, 3896–3907.
- Modi, S., Saura, C., Yamashita, T., Park, Y.H., Kim, S.-B., Tamura, K., Andre, F., Iwata, H., Ito, Y., Tsurutani, J., *et al.* (2020). Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*; *382*, 610–621.
- Mootha, V.K., Lindgren, C.M., Eriksson, K.-F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstråle, M., Laurila, E., *et al.* (2003). PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet*; *34*, 267–273.

- Moscatoello, D.K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A.K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P.W., Biegel, J.A., Hayes, R.L., and Wong, A.J. (1995). Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res*; 55, 5536–5539.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*; 65, 55-63.
- Murthy, R.K., Loi, S., Okines, A., Paplomata, E., Hamilton, E., Hurvitz, S.A., Lin, N.U., Borges, V., Abramson, V., Anders, C., *et al.* (2020). Tucatinib, Trastuzumab, and Capecitabine for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med*; 382, 597–609.
- Musolino, A., Naldi, N., Bortesi, B., Pezzuolo, D., Capelletti, M., Missale, G., Laccabue, D., Zerbini, A., Camisa, R., Bisagni, G., *et al.* (2008). Immunoglobulin G Fragment C Receptor Polymorphisms and Clinical Efficacy of Trastuzumab-Based Therapy in Patients With HER-2/ *neu* –Positive Metastatic Breast Cancer. *J. Clin Oncol*; 26, 1789–1796.
- Nagano, M., Kohsaka, S., Ueno, T., Kojima, S., Saka, K., Iwase, H., Kawazu, M., and Mano, H. (2018). High-Throughput Functional Evaluation of Variants of Unknown Significance in *ERBB2*. *Clin Cancer Res*; 24, 5112–5122.
- Nagata, Y., Lan, K.-H., Zhou, X., Tan, M., Esteva, F.J., Sahin, A.A., Klos, K.S., Li, P., Monia, B.P., Nguyen, N.T., *et al.* (2004). PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell*; 6, 117–127.
- Nagy, P., Friedlander, E., Tanner, M., Kapanen, A.I., Carraway, K.L., Isola, J., and Jovin, T.M. (2005). Decreased Accessibility and Lack of Activation of ErbB2 in JIMT-1, a Herceptin-Resistant, MUC4-Expressing Breast Cancer Cell Line. *Cancer Res*; 65, 473-482.
- Nahta, R., Takahashi, T., Ueno, N.T., Hung, M.-C., and Esteva, F.J. (2004a). P27^{kip1} Down-Regulation Is Associated with Trastuzumab Resistance in Breast Cancer Cells. *Cancer Res*; 64, 3981–3986.
- Nahta, R., Hung, M.-C., and Esteva, F.J. (2004b). The HER-2-Targeting Antibodies Trastuzumab and Pertuzumab Synergistically Inhibit the Survival of Breast Cancer Cells. *Cancer Res*; 64, 2343–2346.
- Nahta, R., Yuan, L.X.H., Zhang, B., Kobayashi, R., and Esteva, F.J. (2005). Insulin-like Growth Factor-I Receptor/Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Heterodimerization Contributes to Trastuzumab Resistance of Breast Cancer Cells. *Cancer Res*; 65, 11118–11128.
- Naresch, A., Long, W., Vidal, G.A., Wimley, W.C., Marrero, L., Sartor, C.I., Tovey, S., Cooke, T.G., Bartlett, J.M.S., and Jones, F.E. (2006). The ERBB4/HER4 Intracellular Domain 4ICD Is a BH3-Only Protein Promoting Apoptosis of Breast Cancer Cells. *Cancer Res*; 66, 6412–6420.
- Nath, N., Godat, B., Zimprich, C., Dwight, S.J., Corona, C., McDougall, M., and Urh, M. (2016). Homogeneous plate based antibody internalization assay using pH sensor fluorescent dye. *J Immunol Methods*; 431, 11-21.

- Ng, C.K., Martelotto, L.G., Gauthier, A., Wen, H.-C., Piscuoglio, S., Lim, R.S., Cowell, C.F., Wilkerson, P.M., Wai, P., Rodrigues, D.N., *et al.* (2015). Intra-tumor genetic heterogeneity and alternative driver genetic alterations in breast cancers with heterogeneous HER2 gene amplification. *Genome Biol*; *16*, 107.
- NISC Comparative Sequencing Program, Prickett, T.D., Agrawal, N.S., Wei, X., Yates, K.E., Lin, J.C., Wunderlich, J.R., Cronin, J.C., Cruz, P., Rosenberg, S.A., *et al.* (2009). Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4. *Nat Genet*; *41*, 1127–1132.
- Ocana, A., and Pandiella, A. (2013). Targeting HER Receptors in Cancer. *Curr Pharm Des*; *19*, 808–817.
- Ogitani, Y., Hagihara, K., Oitate, M., Naito, H., and Agatsuma, T. (2016). Bystander killing effect of DS-8201a, a novel anti-human epidermal growth factor receptor 2 antibody-drug conjugate, in tumors with human epidermal growth factor receptor 2 heterogeneity. *Cancer Sci*; *107*, 1039–1046.
- Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A., and Hynes, N.E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*; *19*, 3159–3167.
- Oliveras-Ferraros, C., Corominas-Faja, B., Cufí, S., Vazquez-Martin, A., Martin-Castillo, B., Iglesias, J.M., López-Bonet, E., Martin, Á.G., and Menendez, J.A. (2012). Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) confers primary resistance to trastuzumab (Herceptin). *Cell Cycle*; *11*, 4020–4032.
- Onsum, M.D., Geretti, E., Paragas, V., Kudla, A.J., Moulis, S.P., Luus, L., Wickham, T.J., McDonagh, C.F., MacBeath, G., and Hendriks, B.S. (2013). Single-Cell Quantitative HER2 Measurement Identifies Heterogeneity and Distinct Subgroups within Traditionally Defined HER2-Positive Patients. *Am J Pathol*; *183*, 1446–1460.
- Orive-Ramos, A., Seoane, S., Ocaña, A., Pandiella, A., and Montero, J.C. (2017). Regulation of the prometastatic neuregulin–MMP 13 axis by SRC family kinases: therapeutic implications. *Mol Oncol*, *11*, 1788–1805.
- Paez, J.G., Janne, P.A., Lee, J.C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F.J., Lindeman, N., Boggon, T.J., *et al.* (2004). EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Science*; *304*, 1497-1500.
- Pankov, R., and Yamada, K.M (2002). Fibronectin at a glance. *J Cell Sci*. *115*, 3861-3863.
- Parker, J.S., Mullins, M., Cheang, M.C.U., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., Hu, Z., *et al.* (2009). Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*; *27*, 1160–1167.
- Peake, B.F., and Nahta, R. (2014). Resistance to HER2-targeted therapies: a potential role for FOXM1. *Breast Cancer Manag*; *3*, 423–431.
- Pegram, M.D., Konecny, G., and Slamon, D.J. (2000). The molecular and cellular biology of HER2/neu gene amplification/overexpression and the clinical development of herceptin (trastuzumab) therapy for breast cancer. *Cancer Treat Res*; *103*, 57–75.

- Perez, E.A., Romond, E.H., Suman, V.J., Jeong, J.-H., Sledge, G., Geyer, C.E., Martino, S., Rastogi, P., Gralow, J., Swain, S.M., *et al.* (2014). Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831. *J. Clin Oncol*; *32*, 3744–3752.
- Perez, E.A., Barrios, C., Eiermann, W., Toi, M., Im, Y.-H., Conte, P., Martin, M., Pienkowski, T., Pivot, X.B., Burris, H.A., *et al.* (2019). Trastuzumab emtansine with or without pertuzumab versus trastuzumab with taxane for human epidermal growth factor receptor 2-positive advanced breast cancer: Final results from MARIANNE. *Cancer*; *125*, 3974–3984.
- Pernas, S., and Tolaney, S.M. (2019). HER2-positive breast cancer: new therapeutic frontiers and overcoming resistance. *Ther Adv Med Oncol*; *11*, 175883591983351.
- Pernas, S., Petit, A., Climent, F., Paré, L., Perez-Martin, J., Ventura, L., Bergamino, M., Galván, P., Falo, C., Morilla, I., *et al.* (2019). PAM50 Subtypes in Baseline and Residual Tumors Following Neoadjuvant Trastuzumab-Based Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer: A Consecutive-Series From a Single Institution. *Front Oncol*; *9*, 707.
- Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., *et al.* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*; *406*, 747–752.
- Piccart-Gebhart, M.J., Untch, M., Jackisch, C., Huang, C.-S., Lichinitser, M., Lohrisch, C., Greaux, V., Ward, C., Straehle, C., and Gelber, R.D. (2005). Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*; *353*, 1659-1672.
- Plowman, G.D., Culouscou, J.M., Whitney, G.S., Green, J.M., Carlton, G.W., Foy, L., Neubauer, M.G., and Shoyab, M. (1993). Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA*; *90*, 1746–1750.
- Pogue-Geile, K.L., Song, N., Jeong, J.-H., Gavin, P.G., Kim, S.-R., Blackmon, N.L., Finnigan, M., Rastogi, P., Fehrenbacher, L., Mamounas, E.P., *et al.* (2015). Intrinsic Subtypes, *PIK3CA* Mutation, and the Degree of Benefit From Adjuvant Trastuzumab in the NSABP B-31 Trial. *J Clin Oncol*; *33*, 1340–1347.
- Prat, A., and Perou, C.M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*; *5*, 5–23.
- Prat, A., Bianchini, G., Thomas, M., Belousov, A., Cheang, M.C.U., Koehler, A., Gómez, P., Semiglazov, V., Eiermann, W., Tjulandin, S., *et al.* (2014). Research-Based PAM50 Subtype Predictor Identifies Higher Responses and Improved Survival Outcomes in HER2-Positive Breast Cancer in the NOAH Study. *Clin Cancer Res*; *20*, 511–521.
- Prat, A., Pascual, T., De Angelis, C., Gutierrez, C., Llombart-Cussac, A., Wang, T., Cortés, J., Rexer, B., Paré, L., Forero, A., *et al.* (2020). HER2-Enriched Subtype and ERBB2 Expression in HER2-Positive Breast Cancer Treated with Dual HER2 Blockade. *J Natl Cancer Inst*; *112*, 46–54.

- Riese, D.J., and Stern, D.F. (1998). Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol* 20, 41–48.
- Ríos-Luci, C., Díaz-Rodríguez, E., Gandullo-Sánchez, L., Díaz-Gil, L., Ocaña, A., and Pandiella, A. (2020). Adaptive resistance to trastuzumab impairs response to neratinib and lapatinib through deregulation of cell death mechanisms. *Cancer Lett* 470, 161–169.
- Ritter, C.A., Perez-Torres, M., Rinehart, C., Guix, M., Dugger, T., Engelman, J.A., and Arteaga, C.L. (2007). Human Breast Cancer Cells Selected for Resistance to Trastuzumab *In vivo* Overexpress Epidermal Growth Factor Receptor and ErbB Ligands and Remain Dependent on the ErbB Receptor Network. *Clin Cancer Res* 13, 4909–4919.
- Robert, N., Leyland-Jones, B., Asmar, L., Belt, R., Ilegbodu, D., Loesch, D., Raju, R., Valentine, E., Sayre, R., Cobleigh, M., *et al.* (2006). Randomized phase III study of trastuzumab, paclitaxel, and carboplatin compared with trastuzumab and paclitaxel in women with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*; 24, 2786–2792.
- Rubin, I., and Yarden, Y. (2001). The basic biology of HER2. *Ann. Oncol*; 12 *Suppl 1*, S3-8.
- Rugo, H.S., Im, S.-A., Cardoso, F., Cortés, J., Curigliano, G., Musolino, A., Pegram, M.D., Wright, G.S., Saura, C., Escrivá-de-Romaní, S., *et al.* (2021). Efficacy of Margetuximab vs Trastuzumab in Patients With Pretreated ERBB2-Positive Advanced Breast Cancer: A Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*; 7, 573.
- Ryan, Q., Ibrahim, A., Cohen, M.H., Johnson, J., Ko, C., Sridhara, R., Justice, R., and Pazdur, R. (2008). FDA Drug Approval Summary: Lapatinib in Combination with Capecitabine for Previously Treated Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER-2. *The Oncologist*; 13, 1114–1119.
- Rybinska, I., Sandri, M., Bianchi, F., Orlandi, R., De Cecco, L., Gasparini, P., Campiglio, M., Paolini, B., Sfondrini, L., Tagliabue, E., *et al.* (2020). Extracellular Matrix Features Discriminate Aggressive HER2-Positive Breast Cancer Patients Who Benefit from Trastuzumab Treatment. *Cells*; 9, 434.
- Salomon, D.S., Brandt, R., Ciardiello, F., and Normanno, N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 19, 183–232.
- Sartor, C.I., Zhou, H., Kozłowska, E., Guttridge, K., Kawata, E., Caskey, L., Harrelson, J., Hynes, N., Ethier, S., Calvo, B., *et al.* (2001). HER4 Mediates Ligand-Dependent Antiproliferative and Differentiation Responses in Human Breast Cancer Cells. *Mol Cell Biol*; 21, 4265–4275.
- Saura, C., Oliveira, M., Feng, Y.-H., Dai, M.-S., Hurvitz, S.A., Kim, S.-B., Moy, B., Delaloge, S., Gradishar, W.J., Masuda, N., *et al.* (2019). Neratinib + capecitabine versus lapatinib + capecitabine in patients with HER2+ metastatic breast cancer previously treated with ≥ 2 HER2-directed regimens: Findings from the multinational, randomized, phase III NALA trial. *J Clin Oncol*; 38, 3138-3149.

Savas, P., Caramia, F., Teo, Z.L., and Loi, S. (2014). Oncogene addiction and immunity: clinical implications of tumour infiltrating lymphocytes in breast cancers overexpressing the HER2/neu oncogene. *Curr Opin Oncol*; 26, 562–567.

Scaltriti, M., Rojo, F., Ocana, A., Anido, J., Guzman, M., Cortes, J., Di Cosimo, S., Matias-Guiu, X., Ramon y Cajal, S., Arribas, J., *et al.* (2007). Expression of p95HER2, a Truncated Form of the HER2 Receptor, and Response to Anti-HER2 Therapies in Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst*; 99, 628–638.

Scaltriti, M., Eichhorn, P.J., Cortés, J., Prudkin, L., Aura, C., Jiménez, J., Chandarlapaty, S., Serra, V., Prat, A., Ibrahim, Y.H., *et al.* (2011). Cyclin E amplification/overexpression is a mechanism of trastuzumab resistance in HER2⁺ breast cancer patients. *Proc Natl Acad Sci*; 108, 3761–3766.

Scheuer, W., Friess, T., Burtscher, H., Bossenmaier, B., Endl, J., and Hasmann, M. (2009). Strongly Enhanced Antitumor Activity of Trastuzumab and Pertuzumab Combination Treatment on HER2-Positive Human Xenograft Tumor Models. *Cancer Res*; 69, 9330–9336.

Scott, A.M., Wolchok, J.D., and Old, L.J. (2012). Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*; 12, 278–287.

Seoane, S., Montero, J.C., Ocaña, A., and Pandiella, A. (2016). Breast cancer dissemination promoted by a neuregulin-collagenase 3 signalling node. *Oncogene*; 35, 2756–2765.

SEOM. Sociedad Española de Oncología Médica. (2021). Las cifras del cáncer en España

Sergina, N.V., Rausch, M., Wang, D., Blair, J., Hann, B., Shokat, K.M., and Moasser, M.M. (2007). Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature*; 445, 437–441.

Shah, M., Wedam, S., Cheng, J., Fiero, M.H., Xia, H., Li, F., Fan, J., Zhang, X., Yu, J., Song, P., *et al.* (2021). FDA Approval Summary: Tucatinib for the Treatment of Patients with Advanced or Metastatic HER2-positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res*; 27, 1220–1226.

Shattuck, D.L., Miller, J.K., Carraway, K.L., and Sweeney, C. (2008). Met Receptor Contributes to Trastuzumab Resistance of Her2-Overexpressing Breast Cancer Cells. *Cancer Res*; 68, 1471–1477.

Sheng, Q., Liu, X., Fleming, E., Yuan, K., Piao, H., Chen, J., Moustafa, Z., Thomas, R.K., Greulich, H., Schinzel, A., *et al.* (2010). An Activated ErbB3/NRG1 Autocrine Loop Supports In Vivo Proliferation in Ovarian Cancer Cells. *Cancer Cell*; 17, 298–310.

Shin, I., Yakes, F.M., Rojo, F., Shin, N.-Y., Bakin, A.V., Baselga, J., and Arteaga, C.L. (2002). PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27Kip1 at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med*; 8, 1145–1152.

Shu, S., Yamashita-Kashima, Y., Yanagisawa, M., Nakanishi, H., Kodera, Y., Harada, N., and Yoshimura, Y. (2020). Trastuzumab in combination with paclitaxel enhances antitumor activity by promoting apoptosis in human epidermal growth factor receptor 2-positive trastuzumab-resistant gastric cancer xenograft models. *Anticancer. Drugs*; 31, 241–250.

- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., and McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*; *235*, 177–182.
- Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., *et al.* (2001). Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *N Engl J Med*; *344*, 783–792.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*; *150*, 76–85.
- Sørli, T. (2004). Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. *Eur J Cancer*; *40*, 2667–2675.
- Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., *et al.* (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci* *98*, 10869–10874.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., *et al.* (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci*; *102*, 15545–15550.
- Subramanian, J., Katta, A., Masood, A., Vudem, D.R., and Kancha, R.K. (2019). Emergence of *ERBB2* Mutation as a Biomarker and an Actionable Target in Solid Cancers. *The Oncologist*; *24*, e1303-e1314.
- Sugawa, N., Ekstrand, A.J., James, C.D., and Collins, V.P. (1990). Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci*; *87*, 8602–8606.
- Suo, Z., Risberg, B., Kalsson, M.G., Willman, K., Tierens, A., Skovlund, E., and Nesland, J.M. (2002). EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. *J Pathol*; *196*, 17–25.
- Takeda, T., Yamamoto, H., Kanzaki, H., Suzawa, K., Yoshioka, T., Tomida, S., Cui, X., Murali, R., Namba, K., Sato, H., *et al.* (2017). Yes1 signaling mediates the resistance to Trastuzumab/Lapatinib in breast cancer. *PLoS One*; *12*, e0171356.
- Tarantino, P., Morganti, S., Uliano, J., Giugliano, F., Crimini, E., and Curigliano, G. (2021). Margetuximab for the treatment of HER2-positive metastatic breast cancer. *Expert Opin Biol Ther*; *21*, 127–133.
- Tung, M.-C., Hsieh, S.-C., Yang, S.-F., Cheng, C.-W., Tsai, R.-T., Wang, S.-C., Huang, M.-H., and Hsieh, Y.-H. (2013). Knockdown of lipocalin-2 suppresses the growth and invasion of prostate cancer cells: Role of LCN2 in Prostate Cancer Cells. *The Prostate*; *73*, 1281–1290.

- Turcotte, M., Allard, D., Mittal, D., Bareche, Y., Buisseret, L., José, V., Pommey, S., Delisle, V., Loi, S., Joensuu, H., *et al.* (2017). CD73 Promotes Resistance to HER2/ErbB2 Antibody Therapy. *Cancer Res*; *77*, 5652–5663.
- Verma, S., Miles, D., Gianni, L., Krop, I.E., Welslau, M., Baselga, J., Pegram, M., Oh, D.-Y., Diéras, V., Guardino, E., *et al.* (2012). Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*; *367*, 1783–1791.
- Vezina, H.E., Cotreau, M., Han, T.H., and Gupta, M. (2017). Antibody-Drug Conjugates as Cancer Therapeutics: Past, Present, and Future. *J Clin Pharmacol*; *57*, S11–S25.
- Wang, Z. (2017a). ErbB Receptors and Cancer. *Methods Mol Biol*; *1652*, 3–35.
- Wang, S.E., Xiang, B., Guix, M., Olivares, M.G., Parker, J., Chung, C.H., Pandiella, A., and Arteaga, C.L. (2008). Transforming Growth Factor β Engages TACE and ErbB3 To Activate Phosphatidylinositol-3 Kinase/Akt in ErbB2-Overexpressing Breast Cancer and Desensitizes Cells to Trastuzumab. *Mol Cell Biol*; *28*, 5605–5620.
- Wang, Y., Yang, Y.-J., Wang, Z., Liao, J., Liu, M., Zhong, X.-R., Zheng, H., and Wang, Y.-P. (2017b). CD55 and CD59 expression protects HER2-overexpressing breast cancer cells from trastuzumab-induced complement-dependent cytotoxicity. *Oncol Lett*; *14*, 2961–2969.
- Weinstein, I.B. (2002). CANCER: Enhanced: Addiction to Oncogenes--the Achilles Heal of Cancer. *Science*; *297*, 63–64.
- Wheeler, D.A., Takebe, N., Hinoue, T., Hoadley, K.A., Cardenas, M.F., Hamilton, A.M., Laird, P.W., Wang, L., Johnson, A., Dewal, N., *et al.* (2021). Molecular Features of Cancers Exhibiting Exceptional Responses to Treatment. *Cancer Cell*; *39*, 38-53.e7.
- Wilson, T.R., Lee, D.Y., Berry, L., Shames, D.S., and Settleman, J. (2011). Neuregulin-1-Mediated Autocrine Signaling Underlies Sensitivity to HER2 Kinase Inhibitors in a Subset of Human Cancers. *Cancer Cell*; *20*, 158–172.
- Witton, C.J., Reeves, J.R., Going, J.J., Cooke, T.G., and Bartlett, J. (2003). Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J Pathol*; *200*, 290-297.
- Wu, P. (2015). FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *36*, 422-439.
- Wu, D., Jia, H., Wei, N., and Li, S. (2020a). POU4F1 confers trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer through regulating ERK1/2 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*; *533*, 533–539.
- Wu, Y., Sarkissyan, M., Ogah, O., Kim, J., and Vadgama, J.V. (2020b). Expression of MALAT1 Promotes Trastuzumab Resistance in HER2 Overexpressing Breast Cancers. *Cancers*; *12*, 1918.
- Wymant, J.M., Sayers, E.J., Muir, D., and Jones, A.T. (2020). Strategic Trastuzumab Mediated Crosslinking Driving Concomitant HER2 and HER3 Endocytosis and Degradation in Breast Cancer. *J Cancer*; *11*, 3288–3302.
- Xia, W., Liu, L.-H., Ho, P., and Spector, N.L. (2004). Truncated ErbB2 receptor (p95ErbB2) is regulated by heregulin through heterodimer formation with ErbB3 yet remains sensitive to the dual EGFR/ErbB2 kinase inhibitor GW572016. *Oncogene*; *23*, 646–653.

Yakes, F.M., Chinratanalab, W., Ritter, C.A., King, W., Seelig, S., and Arteaga, C.L. (2002). Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt Is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res*; 62, 4132–4141.

Yarden, Y., and Pines, G. (2012). The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer*; 12, 553–563.

Yarden, Y., and Sliwkowski, M.X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2, 127–137.

Yi, Z., Rong, G., Guan, Y., Li, J., Chang, L., Li, H., Liu, B., Wang, W., Guan, X., Ouyang, Q., *et al.* (2020). Molecular landscape and efficacy of HER2-targeted therapy in patients with HER2-mutated metastatic breast cancer. *Npj Breast Cancer*; 6, 59.

Zazo, S., González-Alonso, P., Martín-Aparicio, E., Chamizo, C., Luque, M., Sanz-Alvarez, M., Mínguez, P., Gómez-López, G., Cristobal, I., Caramés, C., *et al.* (2020). Autocrine CCL5 effect mediates trastuzumab resistance by ERK pathway activation in HER2-positive breast cancer. *Mol Cancer Ther*; 19, 1696-707.

Zhang, J., Yang, P.L., and Gray, N.S. (2009). Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer*; 9, 28–39.

Zhu, W., Okollie, B., and Artemov, D. (2007). Controlled internalization of Her-2/neu receptors by cross-linking for targeted delivery. *Cancer Biol Ther*; 6, 1960–1966.

Zhuang, G., Brantley-Sieders, D.M., Vaught, D., Yu, J., Xie, L., Wells, S., Jackson, D., Muraoka-Cook, R., Arteaga, C., and Chen, J. (2010). Elevation of Receptor Tyrosine Kinase EphA2 Mediates Resistance to Trastuzumab Therapy. *Cancer Res*; 70, 299–308.

Zoi, I., Karamouzis, M.V., Xingi, E., Sarantis, P., Thomaidou, D., Lembessis, P., Theocharis, S., and Papavassiliou, A.G. (2019). Combining RANK/RANKL and ERBB-2 targeting as a novel strategy in ERBB-2-positive breast carcinomas. *Breast Cancer Res*; 21, 132.

FINANCIACIÓN

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC), centro mixto de la Universidad de Salamanca y el CSIC.

La autora del trabajo ha sido beneficiaria de un contrato predoctoral cofinanciado por la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León y el Fondo Social Europeo.

El trabajo que se desarrolla en el laboratorio del Dr. Atanasio Pandiella Alonso ha estado financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2015-71371-R), la Junta de Castilla y León (CSI146P20), el Instituto de Salud Carlos III a través del Centro de Investigación Biomédica en Red Cancer de Cáncer (CIBERONC), la Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer (AECC), la Fundación CRIS contra el Cáncer, la Asociación Leonesa de Mujeres Operadas de cáncer de Mama (ALMOM), la Asociación Ceutí de Mujeres Mastectomizadas (ACMUMA) y la Asociación Unidos contra el Cáncer de Toro, su Alfoz y la provincia de Zamora (UCCTA). Este laboratorio ha recibido apoyo adicional de la Comunidad Europea a través del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

AGRADECIMIENTOS

La escritura de esta tesis marca el comienzo del final de una etapa de mi vida y me gustaría dar las gracias a todas las personas que me habéis acompañado estos años, tanto en el ámbito académico como en el personal. Sin vosotros no hubiese sido posible.

Gracias al Centro de Investigación del Cáncer y a su personal por permitirme realizar la tesis en sus instalaciones.

Gracias a Apa, mi director, por darme la oportunidad, por transmitirme sus conocimientos y guiarme durante estos años.

Gracias a mis compañeros del L15, especialmente a Elena y Juancar, por enseñarme tantas cosas y ayudarme cuando lo he necesitado. A Azu, Adri, Sara, Yolanda, Javi, Lucía, Fany, Sofía, Inés y Sheila, por el tiempo compartido y por contribuir al buen funcionamiento del laboratorio.

Gracias a mis pilares del L15. A Ari, por amadrinarme cuando llegué y por los buenos momentos vividos dentro y fuera del lab. A Anita y a Patri. Me siento muy afortunada porque la vida me puso en vuestro camino. Por lo bien que nos entendemos, por vuestro apoyo y cariño incondicional y las risas que nos hemos echado. Os he sentido muy cerca estos años a pesar de la distancia. Gracias por vuestros consejos y compañía virtual durante el periodo de escritura. A Cris, porque llegaste en un momento muy necesario y por tu ayuda en todos los ámbitos.

Gracias a las otras personitas que os habéis dejado caer por el L15, la otra Laura, Ale, Elena S, Sabri, Irene y otros, porque fue muy guay (aunque muy corto) haber coincidido con vosotros.

Gracias a Fara Brasó, Claudriana Locatelli y Balász Györfy por sus contribuciones a este trabajo.

Gracias al personal de Servicios Centrales del CIC por vuestro saber hacer y facilitarnos tanto las cosas. Gracias al Servicio de Microscopía y Citometría, por las horas de confocal, ayudarme siempre con el Nikon, el Accuri y demás, y por vuestra simpatía.

Gracias a mis compañeros del CIC. Por compartir tanto, por vuestro apoyo y por las batallitas. Me habéis alegrado los días.

Gracias a María y a Clara, por aparecer y conectar tanto conmigo. Habéis sido mi chaleco salvavidas. ¡Qué suerte teneros!. A Ana y a Sara, por estar ahí siempre y ayudarme a salir del bucle. Gracias a Raquel, por tu humor y tu cariño. Gracias a Nacho, por tu positividad y tu derroche de simpatía. Gracias a Inma, Álvaro, Andrea, Cris...Gracias a todos por los buenos momentos y porque compartida, la vida es más.

Gracias a mis amigos de aquí y de allá. Especialmente a Irene, Marta y Celia, por vuestro apoyo infinito y por estar siempre a mi lado.

Gracias a mi familia. A mi hermana Elena, por ejercer de hermana mayor cuando más lo he necesitado, por escucharme y por tus buenos consejos. A mi hermano Raúl, por llegar a nuestras vidas para hacerlas más bonitas.

Gracias a mis padres. Por enseñarme desde pequeña a ser responsable, a hacer las cosas bien, y a que con esfuerzo, todo es posible. Por los valores que me habéis inculcado. Por confiar tanto en mí, por vuestro apoyo incondicional y aguantarme hasta la saciedad (sé que no ha sido fácil). Solo os ha faltado venir a pipetear. Todo lo que os diga se queda corto. Esta tesis es vuestra.

