



PROBIOL

PROGRAMA DE POSGRADO
EN BIOLOGÍA

CONICET



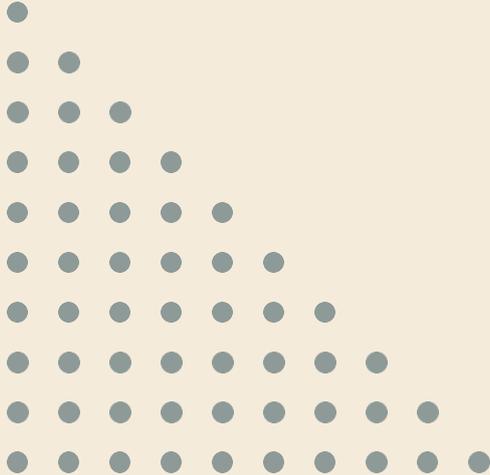
UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO

I M B E C U

TESIS DOCTORAL

**CÁNCER DE MAMA HER2:
ROL DE TERAPIAS DIRIGIDAS E
IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES
PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



LIC. ANA CARLA
CASTRO GUIJARRO

DIRECTORA: DRA. MARINA INÉS FLAMINI

CO-DIRECTOR: DR. ANGEL MATIAS SANCHEZ

LABORATORIO DE BIOLOGÍA TUMORAL. INSTITUTO DE MEDICINA Y
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL DE CUYO (IMBECU), CONICET-UNCUYO.

MENDOZA, AGOSTO DE 2024

AGRADECIMIENTOS

Por medio de estas líneas quisiera expresar mi sincero agradecimiento a todas las personas que de alguna manera u otra han contribuido a la realización de este trabajo:

- *Al Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo*

Mi gratitud se extiende especialmente a todas las personas que hacen al funcionamiento y desarrollo de IMBECU y que han sido fundamentales en mi formación doctoral.

- *A mi directora y co-director, Dra. Marina Flamini y Dr. Matias Sanchez*

Por haberme brindado un espacio en su grupo de investigación, por escuchar mis ideas y opiniones, por confiar en mi durante este recorrido académico y por proporcionarme los medios necesarios para completar mi doctorado.

- *Al laboratorio de Biología Tumoral*

A su directora, la Dra. Laura Vargas Roig, por sus enseñanzas y por tenerme siempre en cuenta. A la Dra. Analia Redondo y Dra. Laura Gómez por compartir todos sus conocimientos desinteresadamente, por brindarme apoyo y consejos. A Fiore y Josi por su compañerismo y complicidad en el día a día.

- *A Juan Manuel Fernández Muñoz*

Por su paciencia y soporte en los aspectos bioinformáticos de esta tesis.

- *A mis tutoras: Dra. Virginia Pistone Creydt, Dra. Laura Vargas Roig y Dra. Mariel Fanelli*

Agradezco su compromiso y acompañamiento en este recorrido. Desde las sugerencias para la mejora del trabajo, hasta el cumplimiento de los aspectos burocráticos.

- *A mis becaamigos:*

Por estar presentes a diario y motivarme a seguir adelante. Incluso cuando las células no cooperan, los experimentos fallan y los deadlines se acercan. Su apoyo incondicional ha sido fundamental en la montaña rusa de emociones que implica hacer ciencia.

- *A mi familia*

Por desempeñar de la mejor manera el rol esencial que cumplen en mi vida y por apoyar cada una de mis ideas, incluso las más locas y desmesuradas. Son mi piedra angular en absolutamente todo. Gracias por su paciencia, comprensión y por „los tirones de orejas“ cuando son necesarios.

- *Y para los que ya no están, pero siguen siendo tan significativos como siempre.*

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1. Biología del cáncer de mama	9
Carcinogénesis.....	9
Epidemiología.....	10
2. Clasificación del cáncer de mama	12
Clasificación histológica	12
Clasificación molecular.....	13
Estadificación del cáncer de mama.....	15
3. Cáncer de mama HER2 positivo	16
Detección HER2	16
Señalización HER2.....	17
Terapias dirigidas contra HER2	19
Algoritmo para el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo metastásico	22
Cardiotoxicidad asociada a trastuzumab.....	23
Resistencia a trastuzumab.....	24
4. Enfoques en el manejo de la resistencia a drogas dirigidas contra HER2	25
Combinaciones terapéuticas	25
Combinación Tz+Lp	26
Combinación T-DM1+Lp.....	28
Medicina personalizada: Biomarcadores.....	29
5. Metástasis	30

CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis	34
Objetivo general	34
Objetivos específicos	35
Originalidad y Relevancia	35

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍAS

1. Ensayos <i>in silico</i>	37
Análisis de expresión génica diferencial	37
Fuente e información de los datos de microarrays	37
Adquisición y procesamiento de datos de microarrays	39
Identificación de Genes Expresados Diferencialmente (DEG)	39
Ontología génica (GO).....	39
Criterio de selección de genes y análisis de interacciones proteicas.....	40
2. Ensayos <i>in vitro</i>: 2D y 3D	41
Líneas celulares	41
Modelos experimentales y condiciones de cultivo.....	41
Tratamientos	43
Silenciamiento génico mediante ARN de interferencia	43
Generación de modelo 3D: esferoides	44

Generación de modelo de resistencia adquirida a trastuzumab, SKBR3-RTz	45
Ensayos de actividad biológica	46
Ensayo de viabilidad: metabolización de MTT.....	46
Análisis de Interacción farmacológica	48
Adhesión al sustrato	51
Migración celular 2D: ensayo de la herida “Wound Healing Assay”	53
Migración celular 3D: medición del halo de migración.....	54
Detección de proteínas	55
Expresión proteica: Western Blot	55
Localización proteica: Inmunofluorescencia	59
3. Análisis <i>in silico</i> de genes candidatos a biomarcadores: Evaluación traslacional.....	61
Identificación de potenciales biomarcadores pronóstico.....	61
Identificación de genes candidatos a potenciales biomarcadores predictivos.....	63
4. Análisis estadístico	65
<u>CAPÍTULO 4: RESULTADOS</u>	
Primer objetivo específico.....	66
Análisis de expresión génica diferencial entre células resistentes a Tz/T-DM1 y sensibles	66
Clasificación ontológica de genes desregulados en los fenotipos resistentes.....	67
Selección de conjunto de genes de interés	70
Conclusión parcial del primer objetivo específico.....	71
Segundo objetivo específico.....	71
Efecto de terapias dirigidas contra HER2 sobre la viabilidad celular	71
Efecto de terapias dirigidas contra HER2 sobre la adhesión celular	77
Efecto de terapias dirigidas contra HER2 sobre la migración celular	78
Conclusión parcial del segundo objetivo específico	80
Tercer objetivo específico	80
Efecto de terapias dirigidas contra HER2 en el perfil de expresión de proteínas moduladoras de la adhesión y migración en células de cáncer de mama HER2 positivo	81
Conclusión parcial del tercer objetivo específico.....	84
Cuarto objetivo específico.....	84
Efecto de terapias dirigidas contra HER2 sobre la localización celular de FAK en células SKBR3 y BT-474	85
Efecto de terapias dirigidas contra HER2 sobre la localización celular de cortactina en células SKBR3	87
Conclusión parcial del cuarto objetivo específico	88
Quinto objetivo específico	89
Efecto de terapias dirigidas contra HER2 sobre la viabilidad de esferoides	89
Efecto de terapias dirigidas contra HER2 sobre la migración de esferoides.....	90
Conclusión parcial del quinto objetivo específico	91
Sexto objetivo específico	91
Identificación de potenciales biomarcadores pronóstico en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo. 91	91
Identificación de genes candidatos a potenciales biomarcadores predictivos en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo	98
Rol de FAK, paxilina, vinculina y cortactina en la resistencia a Tz en un modelo celular de resistencia adquirida	99
Conclusiones parciales del sexto objetivo específico	104

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

Discusión 105

CAPÍTULO 6: CONCLUSIÓN

Conclusión..... 116

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS

Referencias 117

CAPÍTULO 8: ANEXOS

Publicaciones 126

Presentaciones a Congresos 126

Premios y Distinciones 127

LISTA DE ABREVIATURAS

A	
ADC	Conjugados fármacos-anticuerpos
AKT	Proteína quinasa B
ANOVA	Análisis de la varianza
ARNm	ARN mensajero
ARNsi	ARN pequeños de interferencia
ASCO	Sociedad Americana de Oncología Clínica
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-trifosfato
AUC	Área bajo la curva
B	
BCA	Ácido bicinconínico
BRCA1	Gen del cáncer de mama 1
BRCA2	Gen del cáncer de mama 2
BT-RT-DM1	Células BT-474 resistentes a T-DM1
BT-RTz	Células BT-474 resistentes a trastuzumab
C	
CAP	Colegio Americano de Patólogos
CI	Índice de Combinación
D	
DAPI	4',6'-diamidino-2-fenilindol
DCIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
DEG	Genes expresados diferencialmente
DFS	Supervivencia libre de enfermedad
DMSF	Supervivencia libre de metástasis a distancia
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DRI	Índice de Reducción de Dosis
DTT	Ditiotreitol
E	
ECM	Matriz extracelular
EGFR/HER1	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 1
ESMO	Sociedad Europea de Oncología Médica
F	
FA	Adhesiones focales
Fa	Fracción afectada
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FDR	Tasa de descubrimiento falso
G	

GEO	Repositorio público Gene Expression Omnibus
GO	Ontología génica
H	
HER2/Neu/ERBB2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2
HER3/ERBB3	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 3
HER4/ERBB4	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 4
HR	Hazard ratio, tasa de riesgo
HRG	Heregulina
HRP	Peroxidasa de rábano
I	
IARC	Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer
IDC	Carcinoma ductal invasivo
IHC	Inmunohistoquímica
ILC	Carcinoma lobulillar invasivo
INC	Instituto Nacional del Cáncer
ISH	Hibridación <i>in situ</i>
K	
KM	Kaplan-Meier
L	
LCIS	Carcinoma lobulillar <i>in situ</i>
LO	Líquido sobrelapante
log2FC	Log2 fold change (magnitud de cambio)
Lp	Lapatinib
M	
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
mTOR	Proteína diana de rapamicina en mamíferos
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio
MUC4	Mucina 4
N	
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
O	
OS	Supervivencia global
P	
PARP	Poli ADP-ribosa polimerasa
PBS	Tampón fosfato salino
PBS-T	Tampón fosfato salino conteniendo Tween 20
pCR	Respuesta patológica completa
PhiC	Cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PIC	Cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas
PMSF	Cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas
PPI	Interacción proteína-proteína

PPS	Supervivencia post-progresión de la enfermedad
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
R	
RE	Receptor de estrógeno
RFS	Supervivencia libre de recaída
ROC	Carácterística Operativa del Receptor
RP	Receptor de progesterona
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RTK	Receptor tirosina quinasa
S	
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SKBR3-RTz	Células SKBR3 resistentes a trastuzumab
T	
TAE	Tasa ajustada estándar
TBS	Disolución salina tamponada con Tris
TBS-T	Disolución salina tamponada con Tris y Tween 20
T-DM1	Trastuzuman-emtansina
T-DXd	Trastuzumab-deruxtecan
TKI	Inhibidores de la tirosina quinasa
TP53	Proteína tumoral p53
TRPh	Texas Red-Phalloidin
Tz	Trastuzumab
U	
UV	Ultravioleta
V	
Vs.	Versus

RESUMEN

Los tumores mamarios HER2 positivos muestran sobreexpresión del receptor de membrana del factor de crecimiento epidérmico humano 2, o amplificación del gen que lo codifica, ERBB2. Estos tumores se caracterizan por ser agresivos y metastásicos. Trastuzumab (Tz) es el tratamiento estándar para el cáncer de mama HER2 positivo, sin embargo la experiencia clínica indica que eventos de resistencia son frecuentes, limitando el éxito de la terapia. Es por ello que, esta tesis tiene como objetivos estudiar los efectos de terapias dirigidas contra HER2 [Tz, trastuzumab-emtansina (T-DM1) y lapatinib (Lp)], solas o combinadas, en la progresión tumoral e identificar genes candidatos a ser potenciales biomarcadores pronósticos y predictivos.

Para llevar a cabo estos objetivos, se emplearon plataformas como CompuSyn, GEO, STRING, KM-plotter y ROC-plotter. Se llevaron a cabo ensayos de viabilidad, adhesión, migración, western blot, inmunofluorescencia, fraccionamiento celular y silenciamiento génico utilizando células sensibles (BT-474 y SKBR3) y resistentes a Tz (SKBR3-RTz).

Los resultados permitieron identificar alteraciones transcriptómicas en genes asociados a la motilidad celular en células resistentes a Tz frente a células sensibles. Se evidenció que las combinaciones Tz/T-DM1 + Lp exhiben interacciones favorables (efecto sinérgico/aditivo). Se demostró que bajas concentraciones de las combinaciones son efectivas en la inhibición de la viabilidad, adhesión y migración celular. Además, los tratamientos combinados redujeron la expresión de proteínas claves en la motilidad como SRC, FAK y paxilina; y modificaron la localización celular de FAK y cortactina. Finalmente, se evidenció el potencial de la expresión del ARNm de vinculina (VCL) y cortactina (CTTN) para predecir supervivencia en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo. Adicionalmente, se observó que la expresión de VCL y CTTN, podría tener capacidad para discriminar entre pacientes respondedores y no respondedores a Tz.

En conclusión, este trabajo demostró que las combinaciones Tz/T-DM1 + Lp ejercen una respuesta antitumoral significativa a bajas concentraciones. Estos hallazgos resultan prometedores considerando la resistencia y toxicidad asociada a Tz. Las combinaciones inhiben eficientemente la viabilidad, adhesión y migración celular al afectar la expresión y localización de proteínas clave en la modulación de estos procesos. Además, se identificaron genes que, con mayor investigación, podrían constituir prometedores biomarcadores para el cáncer de mama HER2 positivo.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1. Biología del cáncer de mama

Carcinogénesis

La carcinogénesis mamaria es un proceso complejo en el cual las células normales sufren transformaciones que las convierten en células cancerosas, capaces de crecer sin control e invadir otros tejidos (metástasis) [1]. Este proceso resulta de una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas que permiten a las células evadir los mecanismos que regulan su proliferación, supervivencia y migración [2]. Entre las principales vías de señalización que regulan el desarrollo normal de la glándula mamaria y que, cuando se alteran, contribuyen al desarrollo del cáncer de mama destacan la vía del receptor de estrógeno (RE), y la vía del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2/Neu/ERBB2) [1].

La etiología del cáncer de mama abarca una amplia gama de factores genéticos, epigenéticos, ambientales y relacionados con el estilo de vida de las personas [1]. Las mutaciones genéticas juegan un papel fundamental en la carcinogénesis, dividiéndose principalmente en dos categorías: mutaciones de ganancia de función en protooncogenes y mutaciones de pérdida de función en genes supresores de tumores. En las células normales, los protooncogenes regulan el crecimiento, la división y la supervivencia celular, mientras que los genes supresores de tumores ayudan a prevenir el crecimiento celular descontrolado, promoviendo la reparación del ADN y la activación de puntos de control del ciclo celular. Por lo tanto, cualquier desregulación que contribuya a la expresión anormal de los protooncogenes o de los genes supresores de tumores puede dar lugar al desarrollo de neoplasias. Algunos de los principales genes que han sido implicados en el desarrollo de cáncer de mama incluyen: HER2, EGFR/HER1 (receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 1), BRCA1 (gen del cáncer de mama 1), BRCA2 (gen del cáncer de mama 2), TP53 (proteína supresora tumoral p53), PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa), entre otros [2].

Estas mutaciones pueden ser heredadas o adquiridas debido a la exposición a diversos factores ambientales o estilos de vida. En este sentido, los principales factores que aumentan el riesgo de cáncer de mama incluyen ser mujer, el aumento de la edad, la

obesidad, el consumo de alcohol, antecedentes familiares de cáncer de mama, la historia reproductiva (como la edad de inicio de la menstruación y la edad del primer embarazo), el consumo de tabaco y la terapia hormonal postmenopáusicas. Además, los errores durante la replicación o reparación del ADN también pueden dar lugar a este tipo de variantes genéticas [1].

Epidemiología

El cáncer de mama representa el 12% de la carga total de cáncer a nivel mundial, siendo la neoplasia diagnosticada con mayor frecuencia y la principal causa de muerte por cáncer en mujeres. Esta afirmación surge de la última actualización de la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC), que reportó un estimado de 2,3 millones de casos nuevos (1 cada 4) y 685.000 muertes (1 cada 6) para el año 2020 [3]. Además, la IARC informó que las tasas de incidencia del cáncer de mama están aumentando en Sudamérica, donde históricamente eran bajas [3].

A través de una proyección sobre el impacto de la enfermedad para el año 2040, los investigadores estiman que los casos de cáncer de mama aumentarán a más de 3 millones de casos nuevos por año, lo que representa un aumento del 40%, y se prevé que las muertes por esta enfermedad superen el millón por año, lo que significa un incremento del 50% en comparación con las cifras actuales [3].

En particular, en Argentina, según la última actualización brindada por el Instituto Nacional del Cáncer (INC), el cáncer de mama fue el de mayor incidencia en mujeres en el año 2021, con un total de 22.024 casos. Esta cifra representa el 32,1% de todos los tumores malignos, con una tasa ajustada estándar (TAE) de 73,1 casos por cada 100.000 mujeres (*Figura 1*). La TAE de mortalidad fue de 16,4 defunciones por cada 100.000 mujeres. A nivel jurisdiccional, las tasas más elevadas se registraron en las provincias de San Luis (25,2/100.000 mujeres) y Mendoza (19,9/100.000 mujeres) (*Figura 2*) [www.argentina.gob.ar/salud/inc, consultada el 29/02/24].

Estos datos resaltan que, a pesar de los avances tecnológicos, el desarrollo de nuevas terapias y el diagnóstico precoz; la incidencia y mortalidad del cáncer de mama continúan en aumento. Este fenómeno se atribuye principalmente al crecimiento y envejecimiento de la población, así como a la adopción de comportamientos de estilo de vida occidentales que aumentan el riesgo de cáncer [3].

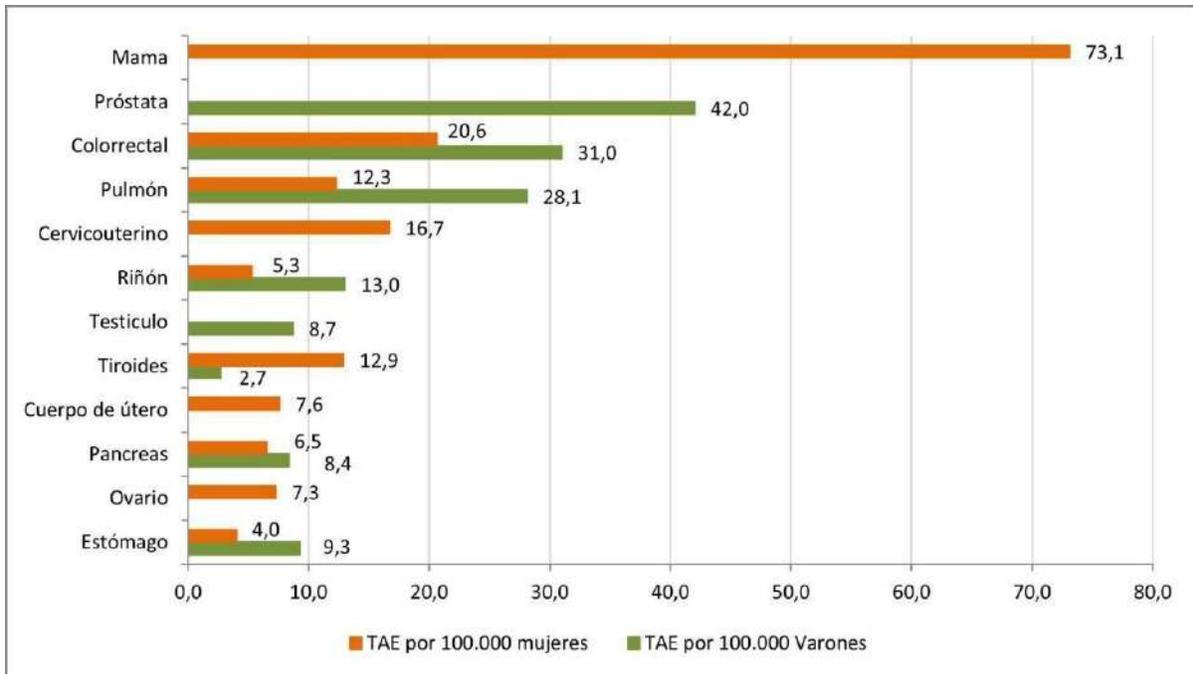


Figura 1: Incidencia de cáncer para Argentina en 2020. Principales localizaciones topográficas en varones y mujeres. Tasas ajustadas por edad según población mundial por 100.000 varones y mujeres (Fuente: INC, <https://www.argentina.gob.ar/salud/inc>).

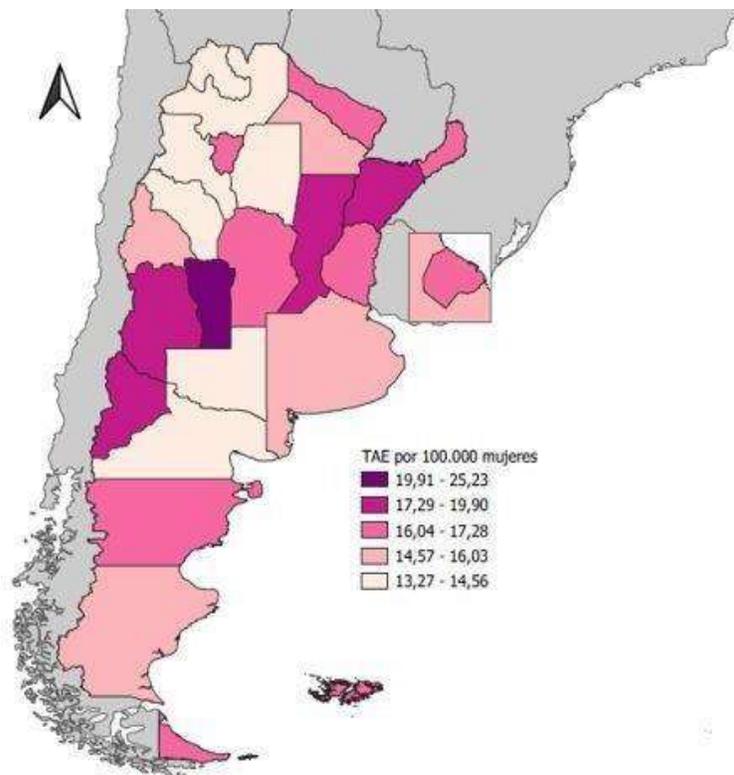


Figura 2: Distribución de casos de mortalidad por cáncer de mama en mujeres en Argentina. (Fuente: INC, <https://www.argentina.gob.ar/salud/inc>).

2. Clasificación del cáncer de mama

Clasificación histológica

El cáncer de mama es una enfermedad genética y clínicamente heterogénea [4]. En los últimos años, se ha avanzado significativamente en la comprensión de su biología, lo que ha llevado a una clasificación más refinada de esta patología [1]. Los sistemas de clasificación del cáncer de mama constituyen actualmente una herramienta valiosa para determinar el pronóstico de la enfermedad y asignar tratamientos [1, 4].

En función del origen celular, el cáncer de mama puede dividirse en carcinomas y sarcomas. Los carcinomas son el tipo más frecuente de cáncer de mama, representando más del 90% de todos los casos diagnosticados. Surgen del componente epitelial de la mama, que está formado por células mioepiteliales y células epiteliales luminales. Estas células revisten los lobulillos y los conductos responsables de la secreción y producción de leche durante la lactancia (*Figura 3*). Por otro lado, los sarcomas son una forma menos frecuente de cáncer de mama (menos del 1%), que se origina a partir del componente estromal interlobulillar (entre los lobulillos) e intralobulillar (dentro de los lobulillos) de la mama. El componente estromal está formado principalmente por tejido conectivo y tejido adiposo; su función es brindar sostén a las células epiteliales mamarias (*Figura 3*). Sin embargo, esta clasificación no siempre resulta satisfactoria, ya que, en algunos casos, un mismo tumor mamario puede ser una combinación de distintos tipos celulares [1].

Dentro del amplio grupo de los carcinomas, se pueden identificar distintos tipos según su grado de invasión: *in situ* (o no invasivos), invasivos (o infiltrantes) (*Figura 3*) y metastásicos [1, 4]. En cuanto a los no invasivos, el carcinoma ductal *in situ* (DCIS), también conocido como carcinoma intraductal, es el más común. Se desarrolla dentro de los conductos mamarios normales preexistentes. Por otro lado, el carcinoma lobulillar *in situ* (LCIS) es menos frecuente que el DCIS y se origina en los lobulillos de la mama. Ambos tipos de carcinomas se consideran etapas tempranas del cáncer de mama, ya que, aunque no han invadido los tejidos circundantes, tienen un alto potencial de volverse invasivos [1, 4].

En el caso de los carcinomas invasivos, involucran el 90-95% de todos los casos de cáncer de mama. Estos carcinomas se caracterizan por tener células cancerosas que se infiltran y se extienden fuera de los lobulillos y conductos mamarios normales hacia el tejido

estromal circundante. Según los tejidos y tipos celulares implicados, se pueden clasificar en carcinoma ductal invasivo (IDC) y carcinoma lobulillar invasivo (ILC). El IDC es el tipo más común de cáncer de mama, representando alrededor del 80% de los casos diagnosticados. Por otro lado, el ILC es el segundo tipo más común de cáncer de mama y representa aproximadamente el 10-15% de todos los casos de cáncer de mama [1, 5]

Finalmente, los carcinomas metastásicos, también conocidos como cánceres de mama en estadio IV o avanzado, son aquellos en los que las células tumorales se han extendido y colonizado otros órganos del cuerpo. Incluso después de extirpar el tumor primario, las células tumorales o las micrometástasis pueden permanecer en el organismo, favoreciendo la progresión y diseminación del cáncer. *Clínicamente, las pacientes con este diagnóstico tienen un pronóstico desfavorable, ya que actualmente no existen terapias eficaces para tratar esta enfermedad avanzada* [1].

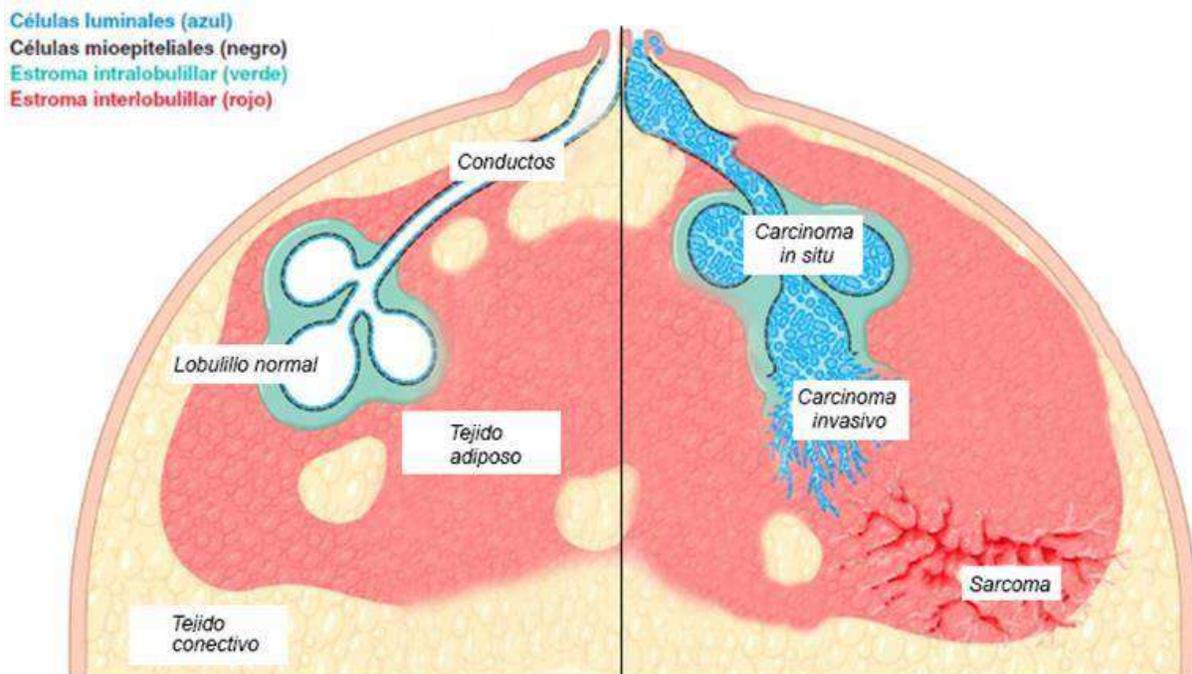


Figura 3: Anatomía normal y patológica de la mama. Se indica el componente epitelial y estromal que conforman la mama y el tipo de cáncer que se desarrolla en función del origen celular y su grado de invasión (Fuente: Modificado de Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional, 10º ed.)

Clasificación molecular

Estudios de expresión génica han permitido identificar al menos cuatro subtipos moleculares de cáncer de mama. Estos subtipos se conocen como: luminal A, luminal B, enriquecido en HER2 y triple negativo (*Figura 4*). Para identificarlos se tiene en cuenta la

presencia/ausencia de los receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP), así como del HER2. Además se considera el nivel de expresión de Ki-67, un marcador de la proliferación celular. Los subtipos moleculares de cáncer de mama difieren entre sí notablemente en su pronóstico, en la expresión de determinados genes asociados con características biológicas y clínicas de los tumores mamarios y en su tratamiento (*Figura 4*) [6].

LUMINAL A se caracteriza por ser RE y RP positivo, HER2 negativo y tener niveles bajos de Ki-67. Constituyen aproximadamente el 40% de todos los casos diagnosticados con cáncer de mama. Son de bajo grado histológico, es decir las células tumorales se parecen más a las células normales del tejido original (alto nivel de diferenciación celular), por ende son de crecimiento lento y suelen tener el mejor pronóstico. El tratamiento para este subtipo consiste en terapia hormonal [1, 7].

LUMINAL B, representa menos del 20% de todos los casos de cáncer de mama. Estos tumores al igual que los del subtipo luminal A, expresan receptores hormonales (RE/RP positivo), pero en este caso pueden tener expresión de HER2. Son tumores que se caracterizan por tener una tasa de proliferación celular más alta (altos niveles de Ki-67) que los luminales A y por ende el pronóstico es menos favorable. El tratamiento consiste en terapia hormonal, pero además puede requerir de terapia dirigida contra HER2 [1, 7].

ENRIQUECIDO EN HER2, constituye el 15-25% del total de casos diagnosticados. Se caracteriza por no expresar RE y RP, y por tener un nivel alto de expresión de HER2. Son tumores que proliferan más rápido que los luminales (altos niveles de Ki-67) y que tienen un peor pronóstico. Son tratados con terapias dirigidas contra la proteína HER2, siendo la terapia basada en trastuzumab (Tz) el tratamiento estándar [1, 7].

CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO, representa aproximadamente el 20% del total de casos de cáncer de mama. Se caracteriza por ser negativo para RE, PR y HER2. Este subtipo suele comportarse de forma más agresiva que el resto. A diferencia de los otros subtipos que cuentan con un arsenal de estrategias terapéuticas específicas, el tratamiento no quirúrgico del cáncer de mama triple negativo se limita a la quimioterapia convencional, y en aquellos casos en los que las pacientes son portadoras de la mutación BRCA1/BRCA 2 se ha aprobado recientemente el uso de olaparib, un inhibidor de la poli ADP-ribosa polimerasa (PARP). PARP es una enzima involucrada en la reparación del ADN, por lo que los inhibidores de PARP, como olaparib, funcionan bloqueando la capacidad de las células

cancerosas para reparar su ADN dañado, conduciendo a las células a una muerte celular programada (apoptosis) [1, 7].

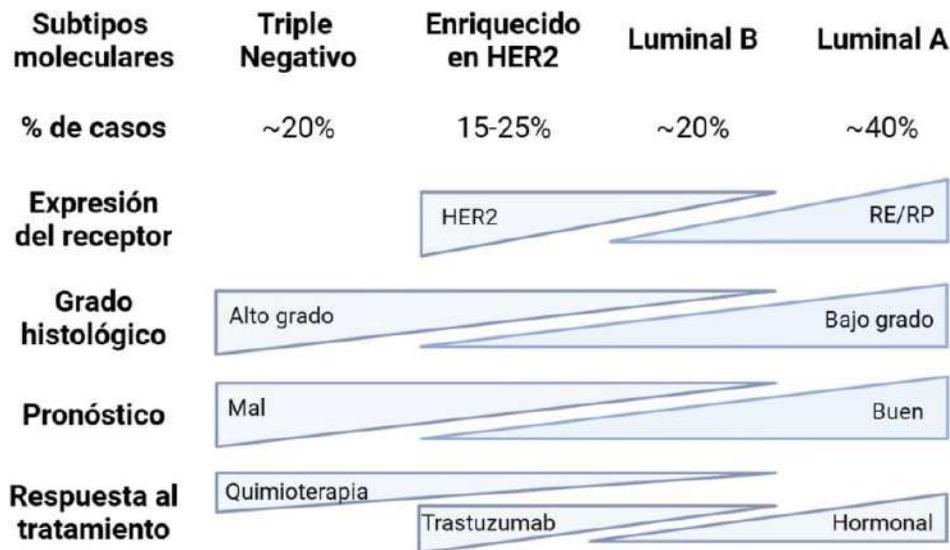


Figura 4: Características de los subtipos moleculares del cáncer de mama. Se indica en cada caso el porcentaje de casos respecto al total de casos diagnosticados, el grado histológico como un nivel de diferenciación celular, el pronóstico, y la respuesta al tratamiento (Fuente: Modificado de http://synapticpg.com/cama_clinica.html)

Estadificación del cáncer de mama

La estadificación del cáncer de mama es crucial para determinar el alcance y la gravedad en cada paciente, lo que a su vez predice el pronóstico y guía las decisiones terapéuticas. Se basa en el sistema de clasificación TNM, que considera los siguientes factores:

Tamaño tumoral (T): Evalúa el tamaño y la extensión del tumor primario. En base a esto, se asigna una puntuación que va desde T0, que indica que no hay evidencia de tumor primario, hasta T4 que indica que el tumor, de cualquier tamaño, se ha diseminado ampliamente en la mama.

Nodos/Nódulos (N): Determina si el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos. Se puntúa desde N0, que indica que no hay ganglios linfáticos afectados, hasta N3, que indica que existen ganglios linfáticos cercanos o lejanos afectados.

Metástasis (M): Analiza si el cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo. Se clasifica como M0 si no hay metástasis, o M1 si hay metástasis.

Estos tres factores se combinan para asignar un estadio al cáncer de mama. Va desde el estadio I que indica la existencia de un cáncer *in situ*, es decir confinado en la mama, hasta el estadio IV que es el más avanzado e indica la ocurrencia de un cáncer que se ha diseminado a otras partes del cuerpo (Figura 5) [8, 9]. El estadio IV representa uno de los mayores desafíos en la clínica oncológica. En esta etapa avanzada, el cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo, lo que dificulta su tratamiento y reduce significativamente las opciones terapéuticas disponibles.

Tamaño	
T1	< 2 cm
T2	2-5 cm
T3	> 5 cm
T4	Tumor de cualquier tamaño que se extiende a pared torácica
Nódulos	
N0	Ganglios axilares no palpables
N1	Ganglios axilares móviles del lado del tumor
N2	Ganglios axilares fijos en ausencia de metástasis
N3	Metástasis a ganglios supra e infraclaviculares
Metástasis	
M0	Ausencia de metástasis
M1	Metástasis a distancia
Estadíos	
I	T1-N0-M0
IIA	T1-N1-M0/T2-N0-M0
IIB	T2-N1-M0/T3-N0-M0
IIIA	T1-N2-M0/T2-N2-M0/T3-N1-M0
IIIB	T4-N0,1,2-M0
IIIC	Cualquier T- N3-M0
IV	Cualquier T y N - M1

Figura 5: Sistema de clasificación TNM. Estadificación del cáncer de mama en función del tamaño tumoral (T), el compromiso nodular (N) y presencia de metástasis (M) (Fuente: Modificado de <https://pimssalud.wordpress.com/2014/08/29/estadios-de-cancer-de-mama/>)

3. Cáncer de mama HER2 positivo

Esta tesis, se centra en el cáncer de mama HER2 positivo, que se caracteriza por la sobreexpresión/amplificación de HER2/ERBB2. Este tipo de cáncer es particularmente agresivo y presenta desafíos únicos en términos de pronóstico y tratamiento.

Detección HER2

Realizar una prueba precoz y precisa a las pacientes con cáncer de mama en el momento del diagnóstico primario es esencial para caracterizar el tumor y establecer un tratamiento óptimo [10, 11].

Las pruebas se realizan mediante técnicas validadas de inmunohistoquímica (IHC) e hibridación *in situ* (ISH). Generalmente, se llevan a cabo en muestras de tejido tumoral resecado o biopsias fijadas en formol y embebidas en parafina. La IHC detecta la expresión de la proteína HER2, mientras que la ISH permite evaluar el número de copias del oncogén ERBB2 que codifica para HER2 [10, 11].

Una puntuación IHC de 3+ se define como una tinción fuerte y completa observada en más del 10% de las células tumorales, clasificándose como HER2 positivo. Las puntuaciones IHC de 0 y 1+ indican una ausencia de tinción o una tinción débil en la membrana celular en menos del 10% de las células tumorales, y se consideran negativas para HER2. Una puntuación IHC de 2+ muestra una tinción completa de débil a moderada en la membrana celular en más del 10% de las células tumorales, clasificándose como un estado de HER2 equívoco. En estos casos 2+, se realiza adicionalmente una prueba de ISH para evaluar la amplificación del gen ERBB2 y asignar una clasificación final. Actualmente, se ha reconocido una nueva categoría llamada HER2 low, que incluye puntuaciones IHC de 1+ o 2+ sin amplificación de ERBB2 en ISH [10, 11].

En el caso de ISH con sondas fluorescentes (FISH) se emplea un ensayo de doble sonda, que detecta el número de copias del cromosoma 17 (cromosoma donde se ubica el gen ERBB2) y de ERBB2 específicamente. El puntaje general se expresa como una relación entre las señales de cada sonda. Si la relación es mayor que 2, indica amplificación de ERBB2 y por ende se clasifican como HER2 positivas, mientras que si es menor que 2, sugiere una ausencia de amplificación y son clasificadas como HER2 negativas [10, 11].

Señalización HER2

En los últimos años, los avances en técnicas genéticas y moleculares han mejorado significativamente la comprensión de los eventos que subyacen a la transformación neoplásica. En particular, el cáncer de mama HER2 positivo, ya sea luminal B o enriquecido en HER2, muestra una marcada dependencia del receptor HER2 para su desarrollo y progresión [12].

HER2 es un receptor tirosina quinasa (RTK) perteneciente a la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico humano, que también incluye a EGFR/HER1, HER3/ERBB3 y HER4/ERBB4. Estos receptores tienen una estructura básica que consta

de tres dominios principales: un dominio extracelular de unión al ligando, una porción transmembrana y un dominio tirosina quinasa intracelular [13, 14]. Aunque inicialmente se encuentran en forma de monómeros inactivos, la unión del ligando induce la formación de dímeros de receptores. Estos cambios llevan a la fosforilación y activación del dominio tirosina quinasa intracelular, desencadenando una red compleja de vías de señalización que regulan procesos celulares como la proliferación, la supervivencia, la migración, entre otros [15, 16].

A diferencia del resto de los miembros, HER2 se considera un receptor huérfano ya que hasta el momento no se ha identificado su ligando específico. No obstante, su sobreexpresión puede conducir tanto a la homodimerización como a la heterodimerización. HER2 puede formar homodímeros (dímeros compuestos exclusivamente por HER2) que son constitutivamente activos, es decir, se encuentran activados de manera continua sin la necesidad de la unión a un ligando [17]. Además, HER2 puede heterodimerizar con otros miembros de la familia. La homo- y la heterodimerización inducen la activación de varias vías de señalización corriente abajo, desencadenando una proliferación, supervivencia y migración celular descontrolada que favorece el crecimiento celular aberrante y la progresión tumoral [17] (*Figura 6*).

Aunque la familia de receptores HER se expresa en tejidos normales, se encuentran sobreexpresados en muchos tipos de cáncer [13, 18, 19]. En particular, la sobreexpresión de HER2 o la amplificación de su gen ERBB2 se observa en el 15-25% de los casos de cáncer de mama, asociándose con una enfermedad agresiva, con mayor potencial metastásico y tasas de supervivencia más cortas [20-22]. Las principales vías activadas por la señalización HER2 incluyen la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y la proteína quinasa B (AKT), fundamentales para el crecimiento celular normal [15, 23, 24]. La señalización desregulada a través de este receptor está fuertemente asociada con la transformación neoplásica (*Figura 6*). Esta desregulación puede ser causada por diversos mecanismos, como la sobreexpresión del receptor, formas constitutivamente activas, defectos en su internalización, degradación y reciclaje, entre otras [16].

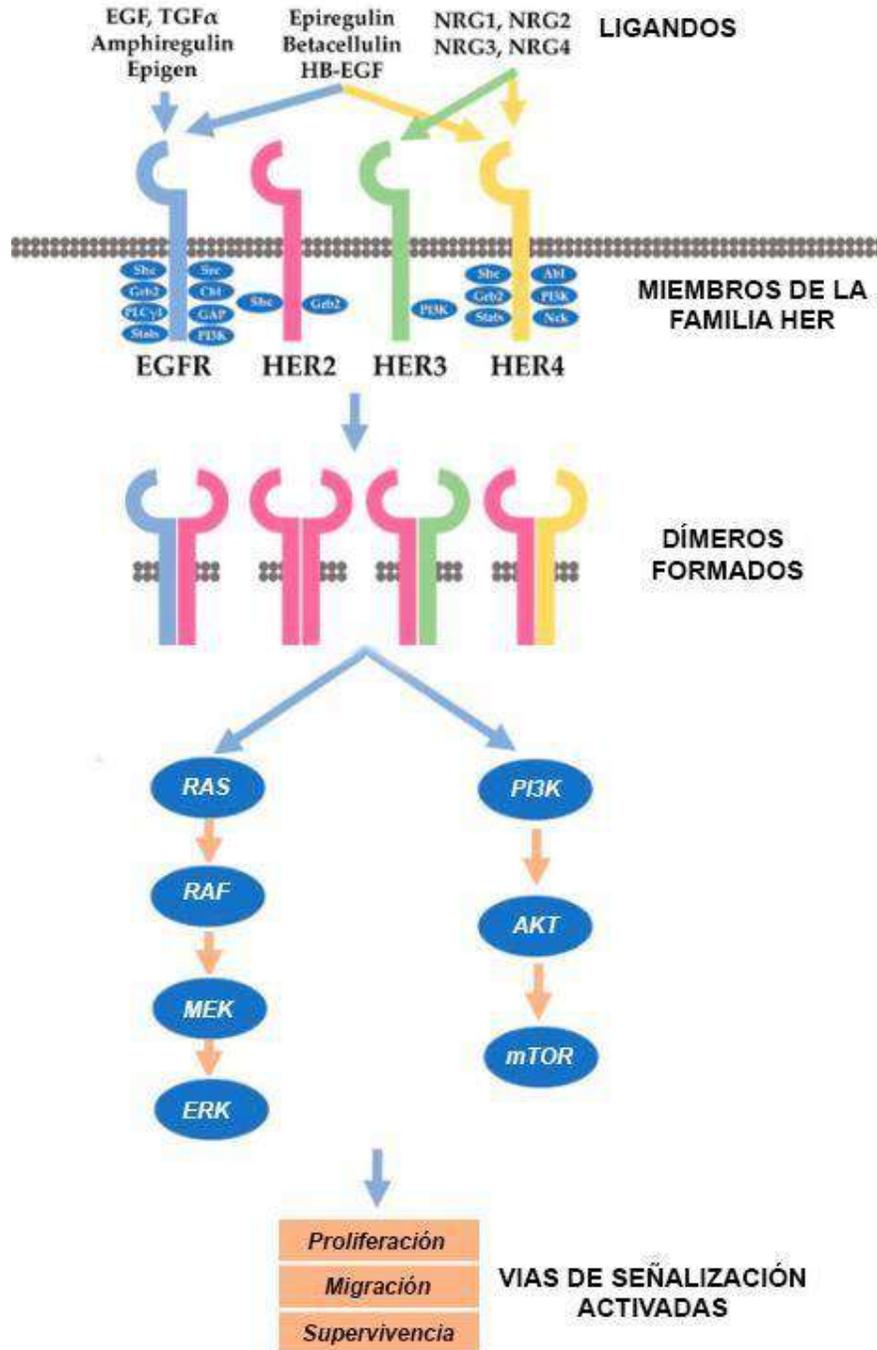


Figura 6: Señalización a través de HER2. El receptor HER2 puede formar homo- u heterodímeros que conducen a la activación aberrante de vías de señalización involucradas en la progresión tumoral (Fuente: modificado de <https://www.biochempeg.com/article/302.html>).

Terapias dirigidas contra HER2

El actual abordaje terapéutico del cáncer se basa en el uso de fármacos que interrumpen eventos moleculares cruciales para la carcinogénesis y la adquisición de un fenotipo agresivo y/o resistente. El rol de HER2 en la tumorigénesis del cáncer de mama

HER2 positivo suscita el interés en este receptor como diana para el tratamiento de esta enfermedad [25].

Para que una molécula se considere una diana óptima, debe cumplir varios atributos fundamentales. Entre ellos, es crucial que la proteína diana se exprese o se active preferentemente en el tumor, pero no en los tejidos sanos. Además, la inhibición de la función de esta proteína debe suprimir el fenotipo transformado y detener la progresión tumoral sin afectar negativamente a las células normales. En este sentido, HER2 cumple con estos principios, lo que ha dado lugar al desarrollo de una amplia gama de terapias dirigidas.

Las dos estrategias principales utilizadas para bloquear a HER2 son las dirigidas a la porción extracelular y las dirigidas a porciones intracelulares [26]. La acción sobre objetivos extracelulares se logra mediante el uso de anticuerpos monoclonales y conjugados de fármacos-anticuerpo (ADC). Por otro lado, la actuación sobre la porción intracelular se ha conseguido empleando inhibidores de la tirosina quinasa (TKI) dirigidos contra HER2 (*Figura 7*) [25].

Entre las terapias más ampliamente utilizadas en la clínica se incluyen los anticuerpos monoclonales Tz y pertuzumab. **Tz** fue el primer anticuerpo monoclonal desarrollado para HER2. Desde su creación y aprobación por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) en 1998, ha transformado significativamente el manejo del cáncer de mama HER2 positivo, elevando notablemente las tasas de supervivencia y convirtiéndose en el tratamiento estándar para esta enfermedad [27]. Este fármaco se une al dominio extracelular IV del receptor e inhibe la homodimerización, evitando así la señalización posterior. La actividad antitumoral de Tz se ejerce a través de diversos mecanismos, que incluyen la regulación a la baja o degradación de HER2, el bloqueo de la transducción de señales de la quinasa HER2 mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, la inhibición de la angiogénesis, entre otros mecanismos de acción [28, 29]. Por otro lado, **PERTUZUMAB** es un anticuerpo monoclonal que se une a HER2 por la región en la que los heterodímeros se tocan físicamente, el dominio II. Así, este agente evita la formación de heterodímeros y, en consecuencia, la activación de las vías de señalización posteriores [30].

Por otro lado, los ADC surgen como un enfoque terapéutico diseñado para aprovechar los efectos citotóxicos de terapias no selectivas. Consiste en un anticuerpo que se une

específicamente al tumor y que lleva unido de manera covalente una molécula citotóxica. De esta manera, combina la especificidad del direccionamiento de los anticuerpos monoclonales con los efectos de la molécula citotóxica, permitiendo una entrega precisa del fármaco [31]. Entre los más utilizados, destacan trastuzumab-emtansina (T-DM1) y trastuzumab-deruxtecan (T-DXd). **T-DM1** fue el primer ADC desarrollado para el cáncer de mama HER2 positivo. Consiste en una molécula de Tz cargada con un promedio de 3,6 moléculas de emtansina, un inhibidor de microtúbulos [32]. **T-DXd** es un ADC que combina una molécula de Tz con 8 moléculas de un inhibidor de la topoisomerasa I llamado deruxtecan. Este ADC al inhibir a la topoisomerasa I, una enzima crucial en la regulación de la estructura y la función del ADN durante la replicación y la reparación, induce roturas de doble cadena en el ADN y por ende, apoptosis en las células tumorales [33].

Por otra parte, los TKI son una familia de moléculas pequeñas que bloquean las tirosina quinasas al competir con el ATP (adenosin-trifosfato). Este bloqueo impide la fosforilación y activación de las cascadas de señalización subsiguientes [34]. A diferencia de otras terapias dirigidas a HER2, los TKI, debido a su tamaño reducido, tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. Esta característica es especialmente relevante en el tratamiento de metástasis cerebrales [35]. **LAPATINIB** (Lp) fue el primer TKI aprobado para el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo. Se trata de un inhibidor dual oral reversible de la quinasa de EGFR/HER1 y HER2 [36].

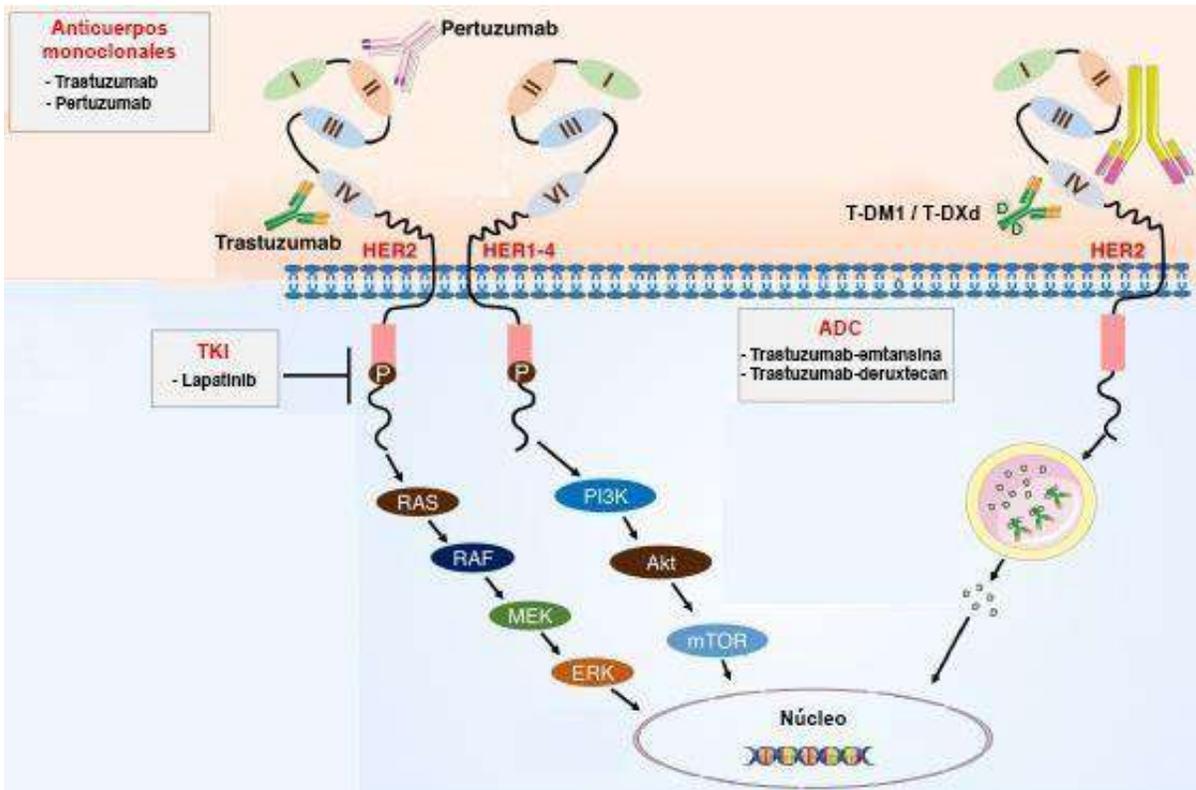


Figura 7: Terapias dirigidas contra HER2. Anticuerpos monoclonales, conjugados de fármacos y anticuerpos (ADC) e inhibidores de la tirosina quinasa (TKI) utilizados en el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo (Fuente: modificado de [37]).

Algoritmo para el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo metastásico

La elección de la terapia a seguir implica la consideración de diversos factores, que van desde las características específicas del tumor hasta la situación clínica individual del paciente. Guías oncológicas como las proporcionadas por la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) [38] y la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO) [39], ofrecen recomendaciones basadas en evidencia para orientar las decisiones terapéuticas. Es fundamental resaltar que el campo del tratamiento del cáncer está en constante evolución y desarrollo, lo que implica cambios continuos en los algoritmos terapéuticos.

La incorporación de terapias dirigidas a HER2 al tratamiento estándar ha mejorado drásticamente el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama HER2 positivo tanto en el entorno temprano como en el metastásico. En ambas etapas, las estrategias basadas en Tz son el estándar de atención. Esta tesis se enfoca particularmente en el cáncer de mama HER2 metastásico, ya que es en esta etapa de la enfermedad en que los eventos de resistencia a Tz son más frecuentes [40].

En la actualidad, la secuencia terapéutica para el cáncer de mama HER2 positivo metastásico implica una primera línea basada en Tz en combinación con pertuzumab y taxanos. Tz inhibiendo la formación de homodímeros mediante su unión al dominio IV de HER2 [28, 29], y pertuzumab inhibiendo la formación de heterodímeros mediante su unión al dominio II [30].

Cuando el tratamiento inicial (primera línea) no resulta efectivo, ya sea debido a resistencia, toxicidad o progresión de la enfermedad, se recurre a un tratamiento de segunda línea. En este escenario, se emplea T-DM1 que ha mostrado superioridad sobre la combinación de Lp y capecitabina, que hasta el año 2013 era el estándar de segunda línea [42]. Además, desde el año 2022, en países donde está disponible, otra opción de segunda línea es T-DXd [43].

De acuerdo a lo que se emplee en segunda línea, existen diversas opciones terapéuticas para ser usadas en tercera línea o posteriores. Entre estas opciones se incluye la combinación de Tz y Lp, es decir la inhibición dual de HER2, desde su porción extracelular por medio de Tz, y desde su porción intracelular a través de Lp (Dra. Sandra Franco, Encuentro Latinoamericano de Oncología Clínica 2024).

Esto evidencia la importancia del Tz en la terapéutica del cáncer de mama HER2 positivo metastásico, justificando su posicionamiento como terapia estándar. A pesar de los resultados favorables observados con Tz, en la clínica aún persisten limitaciones debido a eventos de toxicidad y resistencia.

Cardiotoxicidad asociada a trastuzumab

Las terapias dirigidas contra HER2, especialmente Tz, han demostrado mejorar significativamente las tasas de supervivencia de las pacientes [44]. Sin embargo, estas terapias no están exentas de riesgos y pueden estar asociadas con toxicidades potencialmente graves. La disfunción cardíaca es uno de los efectos adversos más preocupantes en la práctica clínica tras el tratamiento con Tz [45]. Aunque el mecanismo exacto mediante el cual Tz causa cardiotoxicidad aún no ha sido completamente dilucidado, se cree que está relacionado con el bloqueo de la acción fisiológica normal de HER2 en los

cardiomiocitos [46]. Entre las estrategias de mitigación, se incluye la interrupción y el reemplazo de Tz por otras terapias disponibles [47].

A pesar de que el potencial de cardiotoxicidad inducida por Tz ha sido ampliamente reportado, aún no se disponen de herramientas que permitan predecir qué pacientes tienen probabilidad de desarrollarla. Por lo tanto, la atención personalizada y el monitoreo adecuado de las pacientes durante el tratamiento son imprescindibles, al igual que la búsqueda de biomarcadores que permitan predecir este tipo de toxicidades [25, 47].

Resistencia a trastuzumab

Otro desafío que limita el éxito de Tz es que un porcentaje considerable de mujeres desarrolla resistencia al tratamiento y recae [44]. La resistencia primaria (o *de novo*) y secundaria (o adquirida) son responsables de la mayoría de los fallos terapéuticos. La resistencia primaria se presenta cuando la paciente no responde a la terapia desde el inicio del tratamiento. Por otro lado, la resistencia secundaria ocurre cuando la paciente inicialmente responde de manera satisfactoria a la terapia, pero eventualmente progresa, evolucionando hacia formas más agresivas de la enfermedad con menos probabilidad de recuperación [40].

En los últimos años, se han identificado diversos mecanismos de resistencia al Tz [48]. Estos incluyen:

VARIANTES DEL RECEPTOR HER2 La expresión de isoformas de HER2, como p95HER2, que carece del dominio extracelular, compromete la capacidad de Tz para unirse eficazmente al receptor conduciendo a la resistencia al tratamiento [49].

ENMASCARAMIENTO DEL EPÍTOPO La sobreexpresión de mucina 4 (MUC4) y el complejo polimérico CD44-hialuronano, interfieren en la unión de Tz al enmascarar la región específica de HER2 que es reconocida por Tz, es decir el epítipo [50, 51].

ALTERACIÓN EN LA SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR La inhibición inducida por Tz afecta la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR, pero la activación constitutiva de esta vía puede evitar la inhibición anti-HER2. Se ha observado que las mutaciones activadoras de la subunidad catalítica de PI3K (PI3KCA) están asociadas con la resistencia a Tz [52]. Asimismo, la pérdida del supresor tumoral PTEN que conduce a la hiperactivación de la vía de PI3K se

ha observado en tumores resistentes a Tz [52]. Otros mecanismos intracelulares implicados en la resistencia a Tz incluyen la activación aberrante de SRC, aguas abajo de HER2 [53], y la sobreexpresión de la ciclina E, una proteína que promueve la transición G1/S del ciclo celular [54].

ACTIVACIÓN DE VÍAS COMPENSATORIAS Existe un cruce bidireccional entre las vías HER2 y RE. En este sentido, tumores HER2+/RE+ se caracterizan por la falta de respuesta a la terapia hormonal [55] y a Tz [56] cuando son usados como monoterapia [57]. Por el contrario, al combinar ambos tipos de terapias los resultados clínicos mejoran confirmando la interrelación entre la vía HER2 y RE [58]. Por otro lado, dado que la inhibición de la formación de homodímeros de HER2 inducida por Tz no afecta la formación de heterodímeros, diversos RTK pueden heterodimerizar con HER2 superando los efectos inhibitorios de Tz. Alguno de los socios de dimerización de HER2 incluyen los otros miembros de la familia HER, los receptores 1 y 2 del factor de crecimiento similar a la insulina, el receptor del factor de crecimiento hepatocitario, el receptor del factor de transición mesenquimal-epitelial y el receptor de efrina A2 [59-61].

HETEROGENEIDAD EN EL ESTADO DE HER2 La variabilidad en la expresión de HER2 dentro del tumor, conocida como heterogeneidad intratumoral, es otra posible fuente de resistencia a Tz [62]. Esto se debe a que solo las células tumorales que expresan y dependen de HER2 para su progresión son afectadas por el tratamiento anti-HER2, mientras que las células que son HER2 negativas no se ven afectadas. Estas últimas células pueden ser seleccionadas durante el tratamiento dirigido contra HER2 y continuar proliferando resistentes al tratamiento [62].

4. Enfoques en el manejo de la resistencia a drogas dirigidas contra HER2

Combinaciones terapéuticas

Detectar e identificar los mecanismos de resistencia que operan en el cáncer de mama HER2 positivo es crucial para determinar el tratamiento óptimo destinado a superar la resistencia o ralentizar la progresión de la enfermedad. Sin embargo, en la práctica, esta tarea es sumamente compleja dado que existen numerosos mecanismos moleculares que pueden contribuir a la resistencia a Tz, y constantemente se descubren nuevos. Además, debido a la heterogeneidad tumoral, es posible que un mismo paciente presente varios

tipos de resistencia lo que complica aún más su identificación, seguimiento y tratamiento [63].

Frente a esta situación, el uso de terapias combinadas se ha vuelto una práctica habitual en la oncología médica debido a su potencial para superar la resistencia a los tratamientos y mejorar la eficacia de estos [64]. En este contexto, la combinación de fármacos ofrece diversas ventajas clínicas. En primer lugar, mejora los resultados del tratamiento y produce efectos terapéuticos superiores, especialmente cuando se logra una combinación sinérgica/aditiva [65]. En segundo lugar, aborda la heterogeneidad clonal, lo que se asocia con mejoras en las tasas de respuesta [66]. En tercer lugar, en una combinación favorable, es posible utilizar dosis reducidas manteniendo la eficacia terapéutica, lo que permite reducir la toxicidad de los fármacos [67]. Por último, otra ventaja de las terapias combinadas es la disminución de la aparición de resistencia farmacológica [65]. En este sentido, la terapia combinada permite el ataque simultáneo a múltiples objetivos esenciales para la supervivencia de las células cancerosas, o bien a un mismo objetivo por diferentes modos de acción, lo que suprime los mecanismos celulares asociados a la resistencia adquirida [67].

A la hora de evaluar el uso combinado de drogas como esquema terapéutico es crucial su optimización ya que los fármacos que intervienen en la combinación pueden tener efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos. *Las combinaciones de interés en oncología son aquellas que son aditivas o sinérgicas, lo que permite aumentar los efectos beneficiosos utilizando dosis más bajas de cada componente. Esto, a su vez, reduce los efectos adversos y minimiza la inducción de resistencia a la terapia.* Una combinación es sinérgica cuando el efecto que produce es mayor que el efecto aditivo de cada fármaco individual. Mientras que una combinación es antagónica cuando su efecto combinado es menor que el efecto aditivo de cada fármaco individual [68].

Combinación Tz+Lp

Una estrategia prometedora para superar la resistencia a Tz es utilizar un esquema basado en la combinación de drogas para dar lugar a un bloqueo más completo de la señalización HER2 [63]. En este contexto, Lp emerge como un inhibidor particularmente prometedor debido a su actividad dual sobre HER1 y HER2, ofreciendo un modo de acción más completo y complementario al de Tz, que es efectivo principalmente en la inhibición de homodímeros HER2 [28, 36]. Además, Lp inhibe la forma constitutivamente activa de HER2

(p95) sobre la cual Tz es ineficaz [69]. Más aún Lp, a diferencia de Tz, al ser una molécula pequeña tiene mayor facilidad para atravesar la barrera hematoencefálica siendo esto favorable en caso de metástasis cerebrales [70].

En este sentido, ya existen reportes que muestran el beneficio de la combinación Tz+Lp. Estos estudios están enfocados principalmente en sus efectos sobre la proliferación, supervivencia y muerte celular. Konecny et al. (2006) realizaron una serie de estudios *in vitro* para evaluar los efectos inhibidores de la combinación Tz+Lp sobre la proliferación celular [71]. Observaron interacciones farmacológicas sinérgicas y demostraron que, Lp conserva una importante actividad *in vitro* en líneas celulares resistentes a Tz [71]. Por otro lado, Rimawi et al. (2011), utilizando modelos *in vivo* de xenoinjertos con sobreexpresión de HER2, demostraron que Tz o Lp como monoterapia no son tan eficaces como su combinación en antagonizar las vías de señalización relacionadas con HER2. Evidenciaron que Tz+Lp proporciona una inhibición más eficaz de la proliferación celular y una mayor inducción de la apoptosis [72].

Por otro lado, en pacientes, el uso de la terapia combinada de Tz y Lp ha arrojado resultados controversiales, en particular en los ensayos clínicos más relevantes: NeoALTTO [73] y ALTTO [74]. El estudio clínico de fase III NeoALTTO evaluó la eficacia del Tz y Lp, en combinación o en monoterapia, antes de la cirugía (llamado tratamiento neoadyuvante) en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo en estadio temprano. Este estudio mostró que la combinación de Tz y Lp mejora significativamente las tasas de pCR en comparación con cualquiera de los dos fármacos por separado [73]. El estudio clínico fase III ALTTO, investigó la eficacia del Tz y Lp en el entorno adyuvante (después de la cirugía). En este caso, la combinación de Tz con Lp no mejoró significativamente la supervivencia libre de enfermedad (DFS) ni la supervivencia global (OS) en comparación con el tratamiento de Tz. Si bien se concluye que la combinación no puede recomendarse para el tratamiento adyuvante, la interpretación de estos resultados ha sido objeto de debate debido a que en diferentes subgrupos de pacientes se observó beneficio con el tratamiento dual como el subgrupo de pacientes que sobreexpresaban tanto HER2 como EGFR/HER1 y el subgrupo triple positivo (HER2+/RE+/RP+) [74].

Por otra parte, se ha reportado que una exposición sostenida a Tz+Lp puede dar lugar a eventos de resistencia adquirida a la combinación [75]. El receptor RE tiene un rol clave en la adquisición de resistencia al activar la vía PI3K/AKT/mTOR en células de cáncer de

mama HER2+/RE+ [76]. En concordancia, otro estudio mostró que fulvestrant, un antagonista de RE, restaura la sensibilidad de las células tumorales tanto a Lp como a Tz+Lp, siendo ineficaz contra las células resistentes a Tz [75]. Así, la resistencia a Tz ha sido asociada a una reactivación de la vía HER2, mientras que la resistencia a Lp y a Tz+Lp se debe a una señalización alternativa y compensatoria a través de la vía RE [75].

Optimizar las dosis de la combinación terapéutica es clave para mejorar la efectividad, reducir los eventos de resistencia y la toxicidad asociada a estos tratamientos oncológicos. Sin embargo, son escasos los estudios que han estudiado sus efectos a dosis reducidas. Rimawi et. al (2011) mostró en un modelo de xenoinjertos que una reducción a la mitad de dosis de ambos fármacos (Tz: 5 mg/kg, 2días/semana; Lp 50 mg/kg, 5 días/semana) resulta igualmente de efectiva que el tratamiento a dosis completa (Tz: 10 mg/kg, 2 días/semana; Lp: 100 mg/kg 5días/semana). En ambos casos, se logró una regresión completa en el 93% de los ratones tratados [72].

Combinación T-DM1+Lp

T-DM1 comparte similitudes estructurales y de acción con Tz y, además, incorpora las acciones antitumorales del agente citotóxico DM1 [77]. Esto ha llevado a que varios estudios en líneas celulares y en xenoinjertos hayan demostrado su superioridad respecto a Tz [78, 79]. En un estudio aleatorizado realizado en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo se comparó T-DM1 versus Tz más docetaxel como tratamiento de primera línea. En este caso, se reportó una mediana de supervivencia libre de progresión (PFS) superior con T-DM1 (14,2 meses vs. 9,2 meses), que a su vez mostró un perfil de seguridad más favorable con menos efectos adversos graves que Tz+docetaxel[80]. Además, T-DM1 ha demostrado ser efectivo en modelos *in vitro* e *in vivo* de cáncer de mama resistentes a Tz y a la combinación de Tz+Lp [78, 79].

En los últimos años, ha existido un interés sustancial en investigar la eficacia y seguridad de T-DM1 en combinación con otros agentes antineoplásicos, particularmente con aquellos que han demostrado ser efectivos en su combinación con Tz [77]. Estudios han evaluado la combinación de T-DM1 con taxanos como paclitaxel y docetaxel [81, 82], capecitabina [83], pertuzumab [84], entre otros. Incluso, actualmente existen estudios clínicos en marcha que involucran el estudio de la combinación de T-DM1 con otros agentes [http://clinicaltrials.gov, Acceso: 17/07/24].

Sin embargo, a pesar de los antecedentes que demuestran los beneficios de la combinación de Tz+Lp en cáncer de mama HER2 positivo, la similitud de T-DM1 con Tz y la superioridad de T-DM1 respecto a Tz, existe información limitada acerca de los efectos antitumorales de T-DM1+Lp.

Medicina personalizada: Biomarcadores

La resistencia desarrollada a las terapias dirigidas contra HER2, y en especial a Tz, es una de las principales causas de fracaso terapéutico en el cáncer de mama HER2 positivo [44]. El principal factor que contribuye a esto es la heterogeneidad de los tumores, que se refiere a las diferencias genéticas, epigenéticas, fenotípicas y funcionales presentes tanto entre las células de un solo tumor (heterogeneidad intratumoral) como entre pacientes con la misma enfermedad (heterogeneidad intertumoral) [62]. La heterogeneidad tumoral puede tener importantes implicaciones clínicas y terapéuticas [62]. Por ejemplo, en tumores considerados HER2 positivos, se ha demostrado que la expresión y amplificación de HER2 puede ser heterogénea entre subpoblaciones de células tumorales [85]. Se ha reportado que las pacientes con una alta heterogeneidad tumoral tienen una menor supervivencia o respuestas ineficaces al tratamiento [86].

La medicina personalizada o medicina de precisión es un enfoque emergente para el manejo del cáncer que tiene en cuenta la heterogeneidad tumoral en cada persona diagnosticada de cáncer [87]. El desarrollo y la aplicación de la medicina personalizada dependen del uso de biomarcadores [88]. Un biomarcador es una característica específica de las células tumorales que puede ser detectada en biopsias de tejido, muestras de sangre u otros fluidos del paciente, y se utiliza ya sea como:

BIOMARCADOR DIAGNÓSTICO: para diagnosticar el tumor o su recurrencia [89].

BIOMARCADOR PRONÓSTICO: para definir el pronóstico de la enfermedad (supervivencia), independientemente del tratamiento. Permite identificar pacientes con tumores más agresivos [89].

BIOMARCADOR PREDICTIVO: para predecir la respuesta terapéutica del paciente a medicamentos específicos o la toxicidad potencial de intervenciones terapéuticas. Anticipa si un tratamiento concreto tiene algún beneficio; por tanto, ayuda a seleccionar a los pacientes adecuados para asignar un tratamiento específico frente a otro [89].

Por lo tanto, los biomarcadores constituyen herramientas esenciales para definir la estrategia terapéutica óptima para cada paciente, teniendo en cuenta la agresividad de la enfermedad y maximizando la respuesta terapéutica, al mismo tiempo en que se minimiza cualquier toxicidad relacionada con el tratamiento [89]. Hasta la fecha, se han realizado enormes esfuerzos para descubrir nuevos biomarcadores. Aún así, el número de marcadores utilizados en la práctica clínica es escaso [90].

En el caso particular del cáncer de mama HER2 positivo, la sobreexpresión de HER2 o la amplificación de su gen, ERBB2, es el único biomarcador predictivo validado para terapias basadas en Tz [44]. Su detección permite seleccionar únicamente a las pacientes HER2 positivas para asignarles el tratamiento dirigido estándar, Tz [81]. Además de funcionar como un biomarcador predictivo, HER2 también es un biomarcador pronóstico. Su sobreexpresión/amplificación ha sido asociada con una tasa aumentada de metástasis, un tiempo reducido hasta la recurrencia de la enfermedad y una disminución de la OS [20, 21]. *Si bien HER2 es actualmente el único biomarcador predictivo para el cáncer de mama HER2 positivo permitiendo seleccionar aquellas pacientes que se beneficiarán con la terapia basada en Tz, la gran mayoría de las pacientes desarrollan resistencia. Esto resalta la urgencia de encontrar nuevos biomarcadores, ya que el uso exclusivo de HER2 no resulta suficiente, como se ha evidenciado en la práctica clínica [44].*

5. Metástasis

El cáncer, en constante evolución y altamente heterogéneo, otorga a las células tumorales propiedades singulares que les permiten evadir el bloqueo de HER2. Estos eventos de resistencia suelen ser más frecuentes en los estadios metastásicos de la enfermedad, donde el pronóstico de las pacientes es desfavorable y el tratamiento se vuelve más complejo. De hecho, los avances en la detección temprana y el tratamiento del cáncer han permitido que la mayoría de los tumores diagnosticados en etapas tempranas sean tratables y curables; sin embargo, una vez que el cáncer se propaga, su tratamiento se dificulta, principalmente debido al desarrollo de resistencia al tratamiento.

La metástasis representa la principal causa de muerte en el cáncer, siendo responsable del 90% de los casos [91]. La diseminación metastásica es un fenómeno en el cual las células transformadas escapan del tumor primario para formar nuevos tumores en sitios distantes [91]. Este proceso comprende al menos cuatro pasos secuenciales conocidos colectivamente como cascada metastásica: (1) el desprendimiento de las células

cancerosas del tumor primario y su invasión a través de la lámina basal, (2) la intravasación de las células cancerosas al sistema circulatorio/linfático, (3) su supervivencia dentro de la vasculatura y (4) su extravasación, colonización y crecimiento dentro del sitio metastásico distante (*Figura 8*) [92].

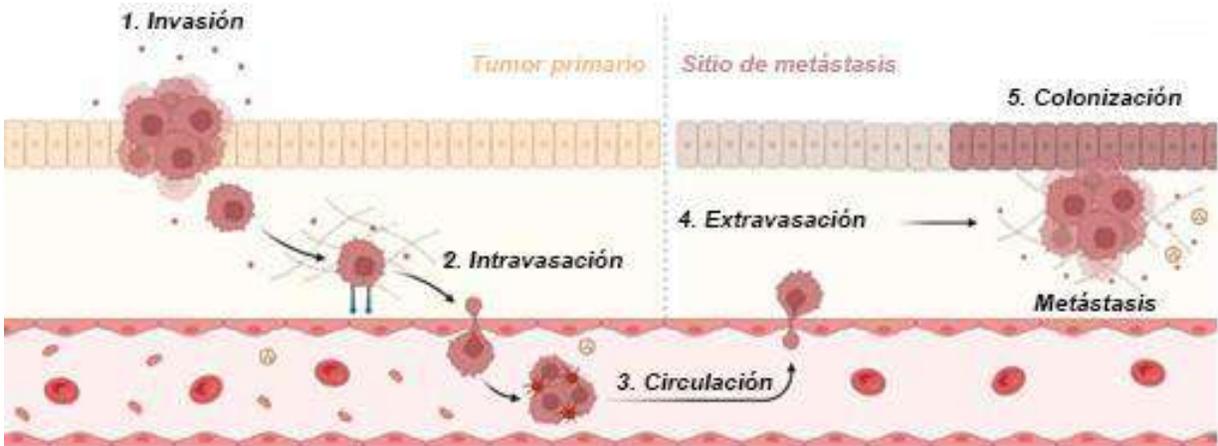


Figura 8: Cascada metastásica. Pasos secuenciales de la cascada metastásica (Fuente: Creado con Biorender, <https://app.biorender.com/>).

Para que la cascada metastásica ocurra de forma exitosa, las células tumorales deben ser capaces de llevar a cabo procesos celulares fundamentales como la **ADHESIÓN** y la **MIGRACIÓN**. Estos eventos son altamente dinámicos y complejos, y dependen del ensamblaje/desensamblaje continuo de las adhesiones focales (FA) [93, 94].

Las FA son complejos proteicos que se forman en la membrana plasmática y conectan la célula a la matriz extracelular (ECM). Dentro de la célula, las FA se vinculan a las fibras de estrés de actomiosina (un complejo formado por la interacción entre la actina y la miosina), que generan fuerzas para la tracción celular y la migración [95]. Las FA están integradas por sistemas de proteínas que incluyen proteínas del citoesqueleto (actina), estructurales (vinculina y cortactina) y adaptadoras (paxilina), que proporcionan una unión estable entre la ECM y la actina, y proteínas de señalización (como FAK y SRC), responsables de la coordinación general de los cambios requeridos durante el ciclo de vida de las FA (*Figura 9*) [95]

Ante distintos estímulos como factores de crecimiento o cambios en la ECM, las integrinas se agrupan en la superficie celular y se activan. La quinasa de adhesión focal (FAK) responde a este cambio mediante la autofosforilación, lo que induce su activación [96-99]. Esta autofosforilación crea un motivo en su estructura que le permite el

reconocimiento, unión y posterior activación/fosforilación de SRC [100, 101]. Ambas proteínas, FAK y SRC, no sólo participan en el anclaje de la célula a la ECM, sino que además están involucradas en diversas vías de señalización, incluidas aquellas que contribuyen a la migración celular [100, 102]. Es fundamental destacar que la activación de FAK y SRC no está limitada al agrupamiento de integrinas, ya que estas quinasas también pueden ser activadas por RTK como HER2 [103, 104]. Por lo tanto, ante una sobreexpresión de HER2, es esperable que estas proteínas posteriores se encuentren hiperactivadas. Activas y localizadas en las FA, FAK y SRC actúan en concierto para reclutar, fosforilar y activar a otras proteínas como paxilina y vinculina [105, 106] que participan en la maduración y estabilidad de las FA (*Figura 9*) [107].

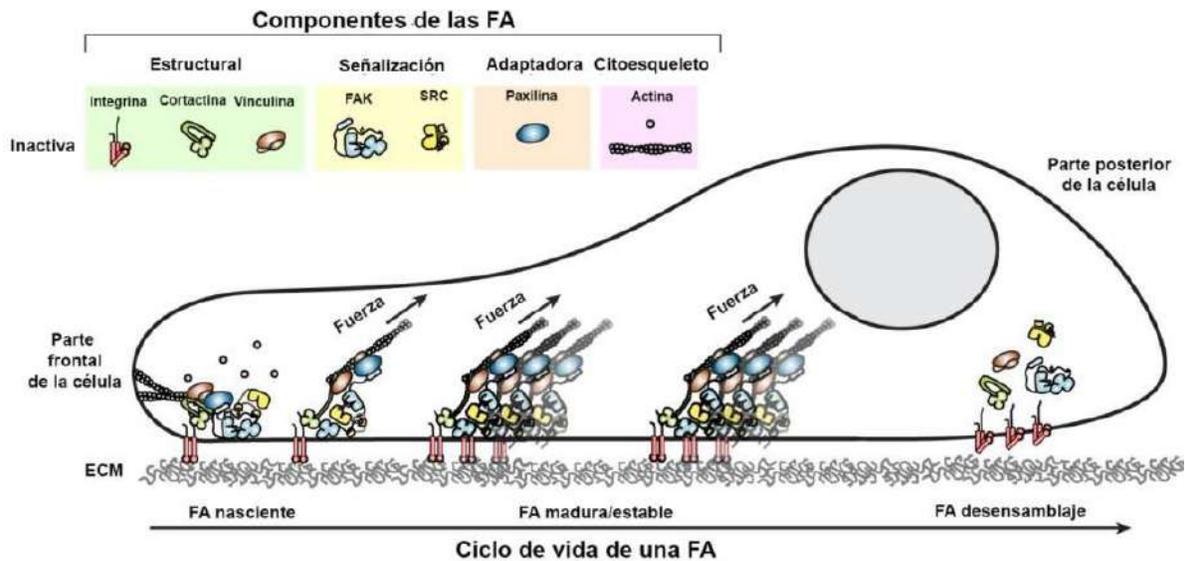


Figura 9: Dinámica de las adhesiones focales en la adhesión y migración celular. Se indican los componentes estructurales de las adhesiones focales y su ciclo de vida. FA: adhesiones focales (Fuente: modificado de [108]).

La formación de estructuras protrusivas como lamelipodios, filopodios, podosomas e invadopodios, en el frente de la célula facilita la generación de fuerzas por la contracción de las fibras de actomiosina, y por ende el movimiento celular. El complejo Arp2/3 es quien contribuye a generar estas estructuras protrusivas, cuya activación depende de factores promotores de la nucleación como cortactina [109]. De esta manera, ocurre el movimiento celular en 4 pasos cíclicos como se muestra en la *Figura 10*.

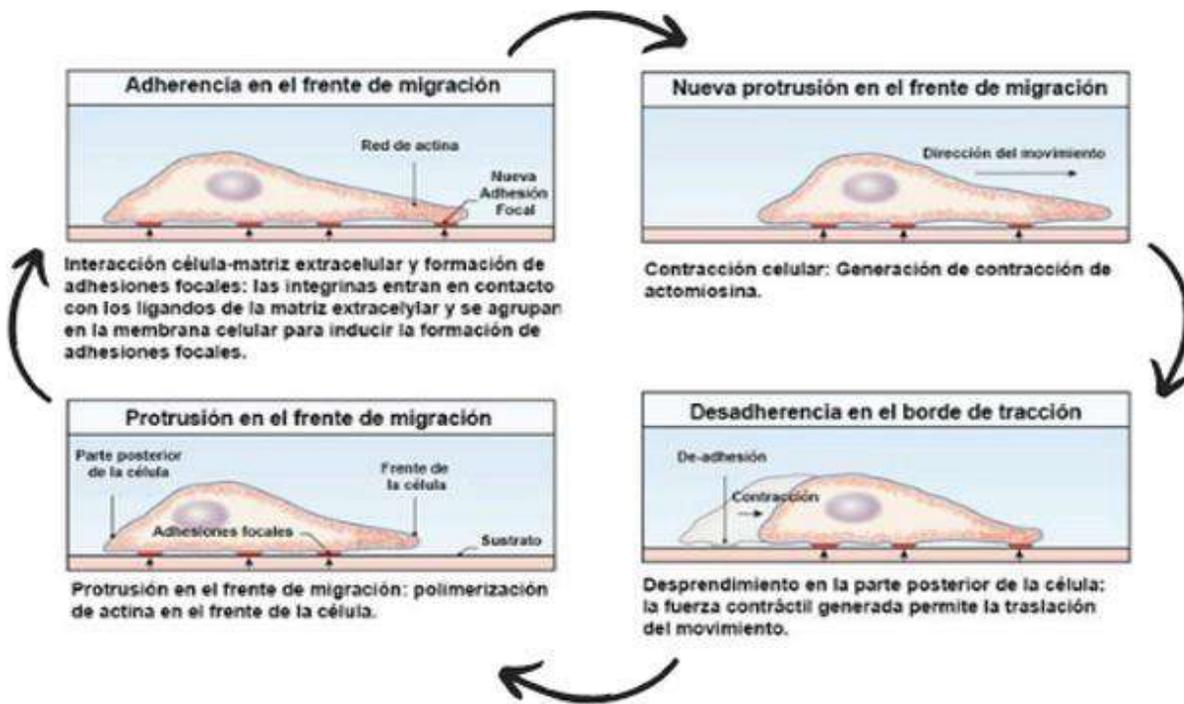


Figura 10: Pasos secuenciales del movimiento celular. Eventos cíclicos que permiten la migración celular. (Fuente: modificado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780123971579000059>)

La participación de SRC, FAK, paxilina, vinculina y cortactina en la regulación de diferentes etapas de la adhesión y migración celular de diversas células tumorales ha sido ampliamente demostrada previamente por este grupo de investigación [110-115], así como por otros autores [116-118]. Además, la expresión de estas proteínas se ha encontrado regulada al alza en muchos tumores invasivos y se correlaciona con un mal pronóstico en pacientes [119-123].

Teniendo esto en cuenta, aunque la metástasis y la resistencia al tratamiento son las principales causas de muertes relacionadas con el cáncer, bloquear alguno de estos procesos celulares críticos (adhesión y migración celular) se presenta como un enfoque valioso en el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo avanzado.

CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Actualmente, HER2 es el único biomarcador validado que se asocia con un mal pronóstico y predice la respuesta a terapias dirigidas en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo. Gracias a la implementación de tratamientos específicos contra HER2, en particular el anticuerpo monoclonal Tz, el pronóstico de las pacientes ha mejorado significativamente. Sin embargo, a pesar de estos avances, es común encontrar pacientes en estadios metastásicos en las que, tras una respuesta inicial, los tumores desarrollan resistencia y progresan hacia formas más agresivas de la enfermedad, empeorando el pronóstico y complejizando su tratamiento. Además, teniendo en cuenta que el anticuerpo monoclonal Tz, así como el ADC T-DM1, tienen mecanismos de acción complementarios al del TKI Lp, se propone que:

- La combinación de fármacos dirigidos contra HER2, uno que inhibe al receptor desde su porción extracelular junto a otro que lo hace desde la porción citoplasmática, generan un bloqueo más eficiente de los procesos celulares modulados por HER2 necesarios para el establecimiento de metástasis.
- Proteínas involucradas en el proceso metastásico, corriente abajo de HER2, se expresan diferencialmente en células resistentes a Tz respecto a células sensibles y posibilitan la predicción de la agresividad tumoral y su respuesta al tratamiento.

Objetivo general

Para poner a prueba las hipótesis de trabajo se plantea como objetivo general:

- Estudiar los efectos de la combinación de anticuerpos monoclonales y ADC contra HER2 (Tz/T-DM1) con TKI de HER2 (Lp), en la inhibición de la progresión tumoral e identificar genes candidatos a potenciales biomarcadores pronósticos y predictivos.

Objetivos específicos

Este objetivo general se llevó a cabo a partir de los siguientes objetivos específicos:

Objetivo específico 1: Caracterizar los perfiles de expresión de genes desregulados en modelos celulares de cáncer de mama resistentes a las terapias dirigidas contra HER2 mediante bioinformática y el uso del repositorio público "Gene Expression Omnibus".

Objetivo específico 2: Evaluar el efecto de Tz/T-DM1, en combinación o no con Lp, en la viabilidad, adhesión y migración en líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivo.

Objetivo específico 3: Identificar de qué manera las terapias dirigidas contra HER2, combinadas o no, modulan la expresión de proteínas vinculadas a procesos celulares que subyacen a la metástasis.

Objetivo específico 4: Determinar en células tumorales mamarias HER2 positivas, luego del tratamiento con Tz/T-DM1, en combinación o no con Lp, la localización celular de proteínas claves.

Objetivo específico 5: Validar en un modelo 3D los resultados obtenidos en cultivos en monocapa (2D).

Objetivo específico 6: Mediante un estudio *in silico*, identificar genes candidatos a posibles biomarcadores pronósticos y predictivos en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo.

Originalidad y Relevancia

A pesar de los avances significativos en el tratamiento del cáncer en las últimas décadas, las metástasis y la resistencia terapéutica continúan siendo responsables de más del 90% de las muertes asociadas a esta enfermedad. Estos dos fenómenos están estrechamente interrelacionados, como lo evidencia la mayor frecuencia de eventos de resistencia en estadios metastásicos. Aunque estudios previos han demostrado el beneficio de combinar Tz y Lp, estos se centran principalmente en la proliferación, supervivencia celular y apoptosis. En cambio, existe información limitada acerca de cómo estas terapias, Tz+Lp y T-DM1+Lp, influyen en los procesos celulares críticos para la metástasis (adhesión

y migración) y en las proteínas específicas que modulan estos procesos. Este enfoque abre la posibilidad de identificar nuevas dianas terapéuticas para abordar la metástasis.

Por otro lado, aunque tanto T-DM1 como Lp han demostrado eficacia individualmente en el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo, los efectos antitumorales de la administración concomitante de estos dos agentes ha sido poco explorada.

Otro aspecto innovador de esta investigación es la evaluación de la eficacia de las combinaciones anti-HER2 utilizando concentraciones menores a las encontradas habitualmente en la bibliografía. Esto es por demás ventajoso, ya que el uso de dosis reducidas podría disminuir la toxicidad, retrasar el desarrollo de resistencia y disminuir los costos económicos asociados a la atención oncológica.

Adicionalmente este estudio busca identificar genes involucrados en los procesos metastásicos que, con mayor investigación, podrían constituir prometedores biomarcadores para el cáncer de mama HER2 positivo. Esta aproximación es particularmente relevante en la era de la medicina personalizada, ya que actualmente no se dispone de biomarcadores fiables que permitan una selección más precisa de pacientes, optimizando así los resultados del tratamiento y minimizando la exposición innecesaria a terapias potencialmente tóxicas.

Esta investigación, por lo tanto, genera nuevo conocimiento acerca de posibles nuevos blancos terapéuticos y potenciales biomarcadores que podrían, mediante investigaciones adicionales, mejorar la atención de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo.

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍAS

1. Ensayos *in silico*

Los enfoques bioinformáticos son herramientas valiosas en el estudio de las alteraciones genéticas y el descubrimiento de biomarcadores en diversas patologías, ya que permiten el análisis y manejo de grandes conjuntos de datos. Estos enfoques están siendo ampliamente utilizados en la investigación del cáncer, generando resultados prometedores que contribuyen a una mejor comprensión de la complejidad de esta enfermedad [124-126].

En este estudio, se llevó a cabo un análisis *in silico* para descubrir nuevas dianas terapéuticas e identificar genes candidatos a posibles biomarcadores pronósticos y predictivos en el cáncer de mama HER2 positivo. A partir de dos conjuntos de datos de microarrays obtenidos del repositorio público Gene Expression Omnibus (GEO), se identificaron genes expresados diferencialmente (DEG) entre células resistentes y sensibles a Tz/T-DM1. Posteriormente, a partir de los DEG seleccionados, se realizó un análisis de ontología génica (Gene Ontology, GO) y se construyó una red de interacción proteína-proteína (PPI). Este enfoque permitió identificar genes clave que podrían estar asociados con la resistencia a Tz en el cáncer de mama HER2 positivo.

Análisis de expresión génica diferencial

Fuente e información de los datos de microarrays

Se utilizaron dos conjuntos de datos de microarrays, GSE119397 y GSE100192, obtenidos con la plataforma HG-U133 plus 2.0 GeneChip (Affymetrix). Estos perfiles de expresión fueron depositados en GEO, perteneciente al Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/; consultada el 23 de mayo de 2022) para facilitar a la comunidad científica el acceso a los datos para estudios genómicos, fomentando la colaboración, la transparencia y la reutilización de datos. Esto es especialmente importante en el campo de la genómica, donde los conjuntos de datos masivos y complejos pueden ser costosos de generar y valiosos para una amplia gama de investigaciones [127].

Los microarrays son matrices compuestas por una disposición ordenada de micropuntos, donde cada punto contiene un ácido nucleico que representa un gen de interés. Esta tecnología de alto rendimiento se basa en la hibridación entre moléculas marcadas procedentes de la muestra biológica y los fragmentos de ADN fijados en la matriz. La señal de hibridación, generada por complementariedad de bases, produce una señal que representa el nivel de expresión del ARN mensajero (ARNm) del gen correspondiente. Estas señales se detectan, cuantifican, integran y normalizan utilizando un software específico, que crea el perfil de expresión génica, o 'retrato molecular', de cada muestra biológica analizada (Figura 11). Por lo tanto, los ensayos de microarrays son una potente tecnología molecular que permite comparar simultáneamente la expresión de miles de genes en muestras de interés [128].

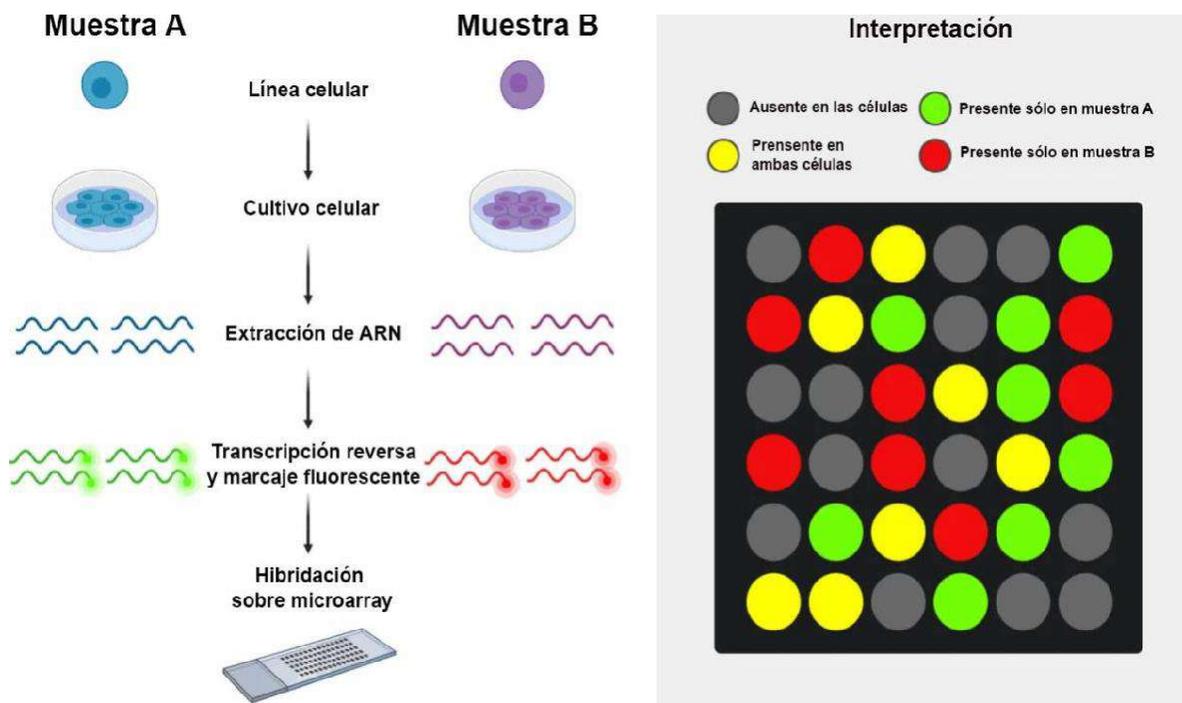


Figura 11: Técnica de microarrays. Ensayo empleado por los autores de las bases de datos seleccionadas para el estudio *in silico* de este trabajo (Fuente: modificado de <https://microbenotes.com/dna-microarray/>).

Para generar el conjunto de datos GSE119397, se utilizaron células de cáncer de mama humano HER2 positivas: la línea celular BT-474. El diseño experimental desarrollado por los autores consistió en generar células BT474 resistentes a Tz. Para ello, las células fueron sembradas a baja densidad y cultivadas en presencia de 50 nM de Tz (7,5 µg/ml) durante 6 meses. El modelo de resistencia *in vitro* a Tz (BT-RTz) comprende cinco repeticiones, y sus parentales BT474 ocho repeticiones [129].

El conjunto de datos GSE100192 comprende clones resistentes a T-DM1 (BT-RT-DM1) con tres réplicas de cada uno y tres repeticiones de la línea celular parental BT-474. Los clones resistentes a T-DM1 derivan de células que fueron expuestas de forma prolongada a T-DM1 después de un estudio inicial en la que fueron sometidas a distintas concentraciones de T-DM1 (0,1 nmol/L–100 nmol/L) durante 5 días. Las líneas celulares BT-RT-DM1 resistentes fueron obtenidas mediante clonación de células individuales y fueron cultivadas en presencia de 5 nmol/L de T-DM1 durante 3 meses [130].

Adquisición y procesamiento de datos de microarrays

Para obtener los conjuntos de datos GSE119397 y GSE100192, se utilizó el paquete R GEOquery [131]. Para procesar los datos crudos se incorporó el paquete R/Bioconductor y Limma [127, 132, 133]. Los métodos incorporados, como la prueba T y Benjamini-Hochberg, se utilizaron para calcular el valor p ajustado, el \log_2 fold change (\log_2FC) y la tasa de descubrimiento falso (FDR) para determinar los DEG entre las células resistentes a Tz/T-DM1 y las sensibles (controles) [134].

Identificación de Genes Expresados Diferencialmente (DEG)

Los DEG entre células resistentes a Tz/T-DM1 y células sensibles se analizaron utilizando la herramienta en línea GEO2R (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/). Los genes que obtuvieron un valor P ajustado $< 0,05$ se consideraron DEG. Se consideraron DEG regulados positivamente si $\log_2FC > 1$ y DEG regulados negativamente si $\log_2FC < 1$. Los datos fueron visualizados mediante un gráfico de volcán (volcano plot) que muestra la significancia estadística, $-\log_{10}$ del valor p, versus (vs.) la magnitud del cambio, \log_2FC .

Ontología génica (GO)

Con el objetivo de determinar las funciones biológicas asociadas a los DEG en células resistentes a Tz/T-DM1 en comparación con células sensibles, se utilizó la herramienta PANTHER (www.pantherdb.org) (consultada el 1 de junio de 2022) para llevar a cabo un análisis de GO.

Al realizar este análisis, se tomó en consideración los resultados publicados de la base de datos GSE119397 (modelo de resistencia a Tz, BT-RTz) [129]. Diaz-Rodriguez, E. *et al.* (2019) reportaron las funciones alteradas que poseen las células resistentes a Tz debido a los DEG identificados. Estas incluyen la desregulación de los procesos celulares

relacionadas con la muerte celular, el metabolismo, la **MIGRACIÓN**, la respuesta al daño del ADN, el ciclo celular, la transcripción, la diferenciación y la **ADHESIÓN** (Figura 12) [129]. Díaz-Rodríguez, E. *et al.* (2019) realizaron su estudio centrándose en los DEG relacionados con la muerte celular. En este trabajo, en cambio, se hizo hincapié en los DEG relacionados a los procesos de **ADHESIÓN** y **MIGRACIÓN CELULAR**. Esta elección se basa en que, como se mencionó en la introducción de esta tesis, son procesos críticos para la formación de metástasis, un estadio en el que el pronóstico para las pacientes es desfavorable y hay una mayor frecuencia de eventos de resistencia a los tratamientos dirigidos contra HER2.

Por lo tanto, identificar los DEG asociados al fenotipo resistente implicados en los procesos de adhesión y migración celular, se presenta como un enfoque valioso en la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas e identificación de genes candidatos a biomarcadores para el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo en etapas avanzadas. Teniendo esto en cuenta, se realizó una GO para identificar los DEG que participan en la migración celular (GO: 0016477) y la adhesión celular (GO: 0007155). La GO de los DEG se representó gráficamente para una mejor visualización de los datos en gráficos de barra utilizando el software GraphPad Prism 8.0.1.

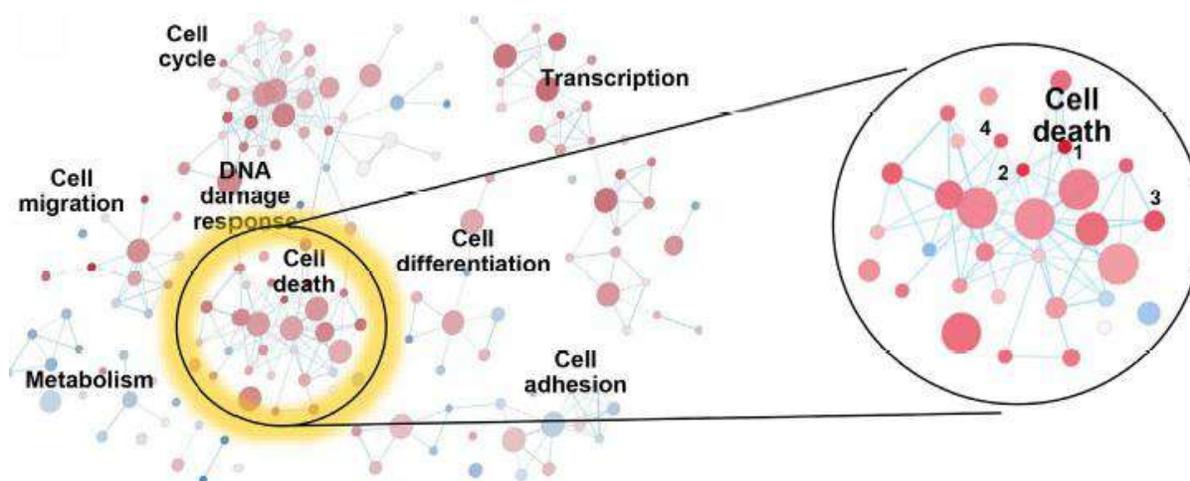


Figura 12: Procesos desregulados en células resistentes a trastuzumab. Resultados publicados por Díaz-Rodríguez *et al.* (2019) [129].

Criterio de selección de genes y análisis de interacciones proteicas

El siguiente paso fue priorizar aquellos genes que se encontraban simultáneamente desregulados y de la misma manera (ya sea regulado a la baja o regulado al alza) en ambos modelos de resistencia, tanto resistentes a Tz (BT-RTz) como resistentes a T-DM1 (BT-RT-DM1). Además se priorizó a aquellos genes más promiscuos, es decir los que

modulaban ambos procesos de interés, la adhesión y migración. Los genes que cumplieron con este criterio fueron ingresados en la versión 11.0 del software STRING (<https://string-db.org/>, consultada el 21 de junio de 2022) para constituir una red de PPI y determinar las interacciones funcionales y directas del producto funcional de los DEG seleccionados. Para erradicar del conjunto de datos las interacciones inconsistentes, se fijó el estándar de corte en una puntuación de interacción segura $\geq 0,4$. [135, 136]. El conjunto de proteínas implicadas en el interactoma construido se consolidó como el set de interés para los estudios *in vitro* posteriores.

2. Ensayos in vitro: 2D y 3D

A continuación, se investigó la actividad antitumoral de Tz/T-DM1, en combinación o no con Lp, sobre el conjunto de proteínas de interés obtenido a partir de los ensayos *in silico*. Con este fin, se realizaron estudios *in vitro* utilizando líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivo cultivadas en modelos de cultivo celular bidimensionales y tridimensionales.

Líneas celulares

Modelos experimentales y condiciones de cultivo

Las líneas celulares son herramientas fundamentales ampliamente utilizadas en estudios básicos y preclínicos. Su valor radica en la capacidad que tienen de preservar las características genéticas del cáncer original, facilitando el estudio de la biología del cáncer, la validación de blancos terapéuticos y la evaluación de la eficacia de fármacos [137].

En este trabajo para llevar a cabo los ensayos *in vitro* se utilizaron las líneas celulares de carcinoma de mama humano SKBR3 y BT-474 obtenidas de ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EE.UU.). La elección de estos modelos experimentales se fundamenta en que ambas líneas celulares sobreexpresan el gen que codifica para HER2 (ERBB2). SKBR3 mimetiza el subtipo enriquecido en HER2 (HER2+/RE-/RP-), y BT-474 al subtipo luminal B (HER2+/RE+/RP+). Además, en esta tesis se utilizó un modelo celular de resistencia adquirida a Tz mediante exposición prolongada de las células SKBR3 a Tz (*Ver Generación de modelo de resistencia adquirida a trastuzumab, SKBR3-RTz*).

La línea celular SKBR3 fue establecida en 1970 a partir de un derrame pleural de una mujer caucásica de 43 años con adenocarcinoma maligno de mama (*Figura 13*). Por otra parte, BT-474 es una línea celular establecida en 1977, aislada de un IDC de mama

obtenido de una paciente de raza blanca de 60 años (*Figura 14*) (www.atcc.org/, consultada el 22 de marzo de 2024). Ambas líneas son ampliamente utilizadas como modelo experimental en estudios de cáncer que buscan cribar agentes terapéuticos dirigidos contra HER2 y delinear los mecanismos de resistencia a estas terapias [138-140].

Las células fueron mantenidas en medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco, Rockville, MD, EE.UU.) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), penicilina y estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), en condiciones controladas de 5% de CO₂ y temperatura de 37 °C.

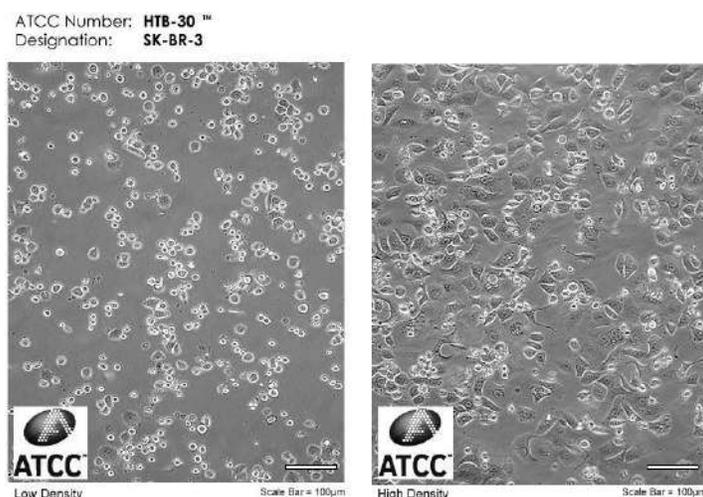


Figura 12: Fotografía microscópica de células SKBR3. A la izquierda se muestra una confluencia baja de células, a la derecha una confluencia alta (Fuente: ATCC, www.atcc.org/).

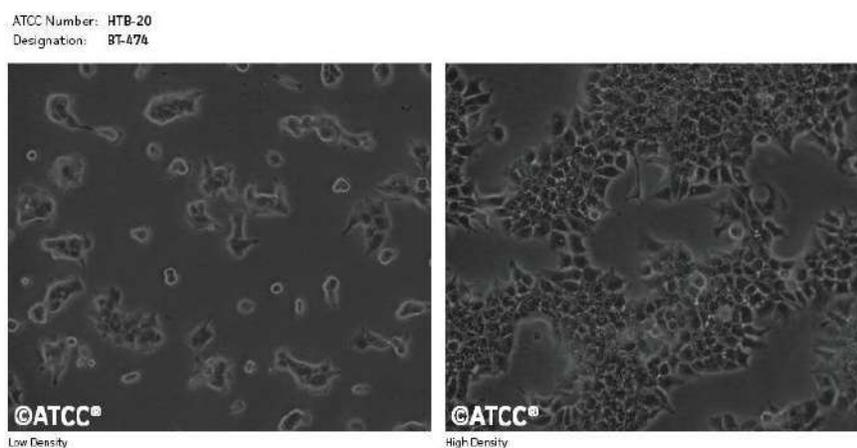


Figura 13: Fotografía microscópica de células BT-474. A la izquierda se muestra una confluencia baja de células, a la derecha una confluencia alta (Fuente: ATCC, www.atcc.org/).

Tratamientos

Para poner a prueba las hipótesis de trabajo, las líneas celulares fueron expuestas a terapias dirigidas contra HER2, como Tz (Herceptin®), T-DM1 (Kadcyla®) y Lp (Tykerb®). Tz y T-DM1 fueron adquiridos en ROCHE S.A.Q.e I (Buenos Aires, Argentina) y disueltos en agua estéril hasta alcanzar una concentración final de 1000 µg/ml. Lp fue obtenido de Novartis (Basilea, Suiza) y se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) hasta alcanzar una concentración final de 1000 µg/ml. La proteína humana recombinante heregulina (HRG) beta 1 se obtuvo de Abcam (Cambridge, Reino Unido) y se preparó en agua apirógena estéril para ser utilizada como ligando de HER3 e inducir la señalización a través del heterodímero HER2-HER3.

Las concentraciones utilizadas en este estudio fueron seleccionadas en base a la literatura existente. En general, Tz y T-DM1 se emplean en estudios *in vitro* en un rango de concentración de 10-20 µg/ml, mientras que Lp se utiliza en un rango de 0,3-2 µg/ml. Para determinar la concentración a utilizar en los experimentos, se realizaron ensayos de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio] MTT que abarcaron los rangos de concentraciones reportadas en la literatura (0,1-100 µg/ml) para evaluar el tipo de interacción farmacológica en los tratamientos combinados (*Ver Análisis de Interacción farmacológica*). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se seleccionó la concentración de 1 µg/ml para Tz y T-DM1, y de 0,1 µg/ml para Lp, tanto en forma individual como en combinación, para los experimentos subsiguientes en cultivos 2D, y la concentración de 10 µg/ml para Tz y T-DM1, y de 1 µg/ml para Lp, tanto en forma individual como en combinación, para los experimentos subsiguientes en cultivos 3D. En cuanto a la duración del tratamiento, debido a que este estudio pretende investigar el efecto de las drogas dirigidas contra HER2 en funciones celulares críticas para la metástasis, se optó por utilizar tiempos prolongados de exposición, específicamente 72 horas. Previamente, un estudio publicado por este grupo de investigación ya había establecido que un periodo de 72 horas es adecuado para observar efectos inhibitorios significativos sobre la supervivencia celular con 1 y 10 µg/ml de Tz [114].

Silenciamiento génico mediante ARN de interferencia

Por otro lado, para evaluar el papel de proteínas específicas en funciones celulares y en la respuesta a los tratamientos, se silenció la expresión de las mismas mediante el uso de ARN pequeños de interferencia (ARNsi). Este mecanismo biológico implica que ARN

pequeños de doble cadena inducen la degradación del ARNm complementario, produciendo la regulación a la baja de la proteína [141]. En este estudio, se utilizaron ARNsi dirigidos contra FAK (gen PTK2), paxilina (gen PXN), cortactina (gen CTTN) y un control. El control consiste en un ARNsi no dirigido a ningún gen específico o dirigido a un gen no relacionado con el objetivo del estudio, y su propósito es evaluar si los efectos observados se atribuyen realmente al ARNsi de interés o si son el resultado de factores no específicos. El ARNsi dirigido contra FAK y el control fueron adquiridos en Dharmacon (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE. UU.). Los ARNsi contra paxilina y cortactina se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (Buenos Aires, Argentina).

Para la transfección, las células se cultivaron hasta alcanzar una confluencia del 70–80%. Posteriormente, se incubaron con 50–70 nM del ARNsi específico o ARNsi control en medio libre de SFB utilizando Lipofectamina® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). La Lipofectamina® es el método de transfección gold-standard. Los lípidos en la Lipofectamina® interactúan con los ARNsi, formando complejos lipídicos-ARN. Estos complejos lipídicos protegen los ácidos nucleicos de la degradación enzimática y facilitan su transporte a través de la membrana celular. Una vez dentro de la célula, los complejos lipídicos liberan los ARNsi en el citoplasma, donde pueden ejercer su función específica [142]. Tras 48 horas de la incorporación de la Lipofectamina®, se administraron a las células los tratamientos dirigidos contra HER2. La eficacia de la inhibición génica se evaluó mediante ensayos de western blot. Este protocolo de transfección ha sido previamente publicado por el grupo en diferentes trabajos [111, 114].

Generación de modelo 3D: esferoides

Si bien los hallazgos realizados en modelos de cultivo en monocapa (2D) son de suma importancia y validez en biología tumoral, los mismos presentan determinadas limitaciones. Con esta premisa, se han desarrollado estrategias de cultivos que permiten complejizar el sistema experimental, imitando a un microtumor avascular. Este tipo de cultivos tridimensionales (3D) o esferoides se ubican en una complejidad intermedia entre los cultivos 2D y los modelos animales y presentan la ventaja de que los resultados experimentales obtenidos son más traslacionales, es decir se pueden extrapolar mejor a la respuesta que se obtendría en un modelo animal [111]. Así, el modelo de cultivos 3D imita más fehacientemente la arquitectura y complejidad de un tumor *in vivo*, permitiendo el estudio del comportamiento tumoral y la respuesta a las terapias en un contexto fisiológicamente más relevante [111].

Teniendo esto en cuenta, en el desarrollo de esta tesis se validaron los resultados obtenidos en la viabilidad y la migración celular en cultivos en monocapa (2D) en un modelo de esferoides o cultivos 3D. Para la generación de esferoides homotípicos (contienen un solo tipo celular) se utilizó la técnica de „líquido sobrelapante“ (LO, del inglés liquid overlay) y como soporte placas de 96 pocillos con fondo en U previamente recubiertas con una delgada capa de 1% agarosa en agua estéril. Se sembraron 1×10^4 células en cada pocillo en 100 μ l de medio con 5% de SFB. Las placas se incubaron en estufa a 37 °C y 5% de CO₂ durante 72 horas para permitir la formación de esferoides. Una vez formados fueron utilizados en ensayos de MTT y de migración.

Generación de modelo de resistencia adquirida a trastuzumab, SKBR3-RTz

En pacientes se habla de resistencia cuando las células cancerosas se resisten/son refractarias a los efectos de los fármacos utilizados para el tratamiento y, por tanto, pueden crecer y volver a formar tumores en un proceso conocido como recurrencia o recaída. La resistencia en pacientes puede ser primaria (o *de novo*) o secundaria (o adquirida).

In vitro, el método más común y ampliamente utilizado para generar líneas celulares resistentes a fármacos implica el tratamiento sostenido de las células parentales a las drogas anticancerígenas durante un período prolongado. Teniendo esto en cuenta, en este estudio se desarrolló un modelo de cáncer de mama HER2 positivo con resistencia adquirida a Tz (SKBR3-RTz), mediante una exposición prolongada a concentraciones moderadas del fármaco. Para ello, se cultivó la línea celular SKBR3 en medio de cultivo RPMI 1640, suplementado con 10% de SFB y antibióticos, a los que se añadieron 10 μ g/ml de Tz. Las células se mantuvieron en estas condiciones durante 30 días, con dos cambios de medio por semana. Después de este periodo, la concentración de Tz se incrementó hasta alcanzar una concentración final de 15 μ g/ml, y se mantuvieron en estas condiciones durante 5 meses para obtener poblaciones resistentes. Paralelamente, se cultivó la línea parental sin tratamiento para mantener su sensibilidad al fármaco, utilizándolas como controles. La elección de la concentración y el método para inducir la resistencia se basaron en la bibliografía existente [129, 143].

La resistencia en células se alcanza por definición cuando las células tratadas muestran un mayor crecimiento o viabilidad durante el tratamiento farmacológico en comparación con las células control (línea celular parental). De esta manera, se considera que las células son resistentes cuando el tratamiento no consigue inhibir la supervivencia y,

por tanto, las células resistentes proliferan a un ritmo similar al de las células no tratadas (control) [144]. Para confirmar este fenómeno, se realizó un ensayo de viabilidad celular (MTT) para cada condición (sensible y resistente), tanto en ausencia como en presencia de Tz. Además, se analizó el perfil de expresión/activación de moléculas involucradas en vías asociadas con la respuesta y resistencia al Tz, como la proteína quinasa B (AKT) y la proteína diana de rapamicina en mamíferos (mTOR).

Ensayos de actividad biológica

Ensayo de viabilidad: metabolización de MTT

Para evaluar la actividad citotóxica y la eficacia de las terapias dirigidas contra HER2, tanto como monoterapias como en combinación, se llevaron a cabo ensayos de MTT. Este método *in vitro* se considera una herramienta útil, fiable y rápida para determinar la actividad antitumoral de fármacos o combinaciones de estos [145, 146].

El objetivo principal del ensayo MTT consiste en medir la viabilidad celular, basándose en que la actividad mitocondrial de la mayoría de las células viables es constante. Por lo tanto, cualquier cambio en el número de células viables se reflejará linealmente en la actividad mitocondrial. En este ensayo, la actividad mitocondrial se evalúa mediante la conversión del MTT en cristales insolubles de formazán, gracias a la acción de las enzimas mitocondriales (*Figura 15*). A su vez, el formazán resultante puede solubilizarse para su medición por densidad óptica (DO). Así, cualquier cambio en el número de células viables puede detectarse mediante un aumento o disminución de la DO [146].

En este estudio, el ensayo de MTT se llevó a cabo por duplicado con 4-6 réplicas por condición. En cultivos 2D, se sembraron 2×10^4 células SKBR3 y $4,5 \times 10^4$ células BT-474 por pocillo, en 100 μ l de medio de cultivo suplementado con 10% de SFB, en placas de 96 pocillos. Estas cantidades se seleccionaron para alcanzar una confluencia del 70%, evitando así un crecimiento excesivo que pudiera influir negativamente en los resultados. Un crecimiento celular excesivo puede saturar el ensayo, dificultando la conversión eficiente del reactivo MTT en formazán debido a la competencia por los recursos disponibles en el medio de cultivo, lo que comprometería la precisión y reproducibilidad de los resultados.

Las células se dejaron adherir durante 24 horas antes de ser expuestas a diferentes concentraciones de las drogas dirigidas contra HER2 (Tz, T-DM1 y Lp). Las drogas se

probaron tanto como agentes únicos, en un rango de concentración de 0-100 µg/ml, como en combinación (Tz/T-DM1 + Lp), en una relación constante de 1:10 (1 volumen de Lp por cada 10 volúmenes de Tz/T-DM1), abarcando el rango de 0,1-1 a 10-100 µg/ml. Para garantizar la estabilidad de las drogas, se realizaron diluciones escalonadas al momento del ensayo, a partir de un stock de 1000 µg/ml de cada droga conservado a -20 °C, utilizando el medio de cultivo como disolvente. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ durante 72 horas. Este período de incubación se seleccionó debido a informes previos del grupo que indicaron que es el tiempo óptimo para observar los efectos inhibitorios de Tz sobre la supervivencia celular [114]. Además, en este periodo de tiempo las células se encontraban en su fase logarítmica de crecimiento, una fase en la que están metabólicamente activas y son más sensibles a los tratamientos farmacológicos u otros estímulos externos.

Después de las 72 horas de incubación, se retiró el medio de cultivo y las células se incubaron con 0,5 mg/ml de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Se tomaron precauciones especiales durante este paso, ya que el MTT es tóxico, nocivo y sensible a la luz. Se preparó una dilución 1:10 utilizando medio de cultivo como disolvente a partir de un stock de MTT de 5 mg/ml. Tras 4 horas de incubación, se retiró el medio con MTT y los anillos de formazán se disolvieron con 100 µl de DMSO. La absorbancia se midió a 570 nm utilizando un lector de microplacas (MULTISKAN EX; Thermo Scientific).

Este ensayo también se llevó a cabo en esferoides (cultivo 3D), siguiendo un protocolo similar, sembrando un esferoide por pocillo. Se tuvo un cuidado especial en este caso, disgregando enérgicamente cada esferoide al momento de disolver el formazán para obtener absorbancias confiables.

Además, dado que el ensayo MTT es una herramienta adecuada para estudiar la resistencia a fármacos, también utilizamos este método para confirmar la resistencia adquirida a Tz del modelo establecido, SKBR3-RTz. Se sembraron en este caso 2×10^4 células por pocillo y se siguió el protocolo descripto anteriormente.

En todos los casos, la viabilidad celular se calculó utilizando la siguiente fórmula: $(DO \text{ del pocillo tratado} - DO \text{ del blanco}) / (DO \text{ medio del pocillo control} - DO \text{ del blanco}) \times 100$. En esta fórmula, DO representa la densidad óptica, pocillo tratado hace referencia a las condiciones con las drogas, el blanco se refiere a los pocillos que contienen solamente el disolvente en ausencia de células (utilizado como control interno para tener en cuenta la

posible influencia de los disolventes en la DO de fondo), mientras que el pocillo control consiste en las células sin tratamiento. Todos los datos se normalizaron respecto al control, cuya absorbancia media se consideró como el 100% de viabilidad.

Este ensayo ha sido descrito anteriormente en Castro-Guijarro et al. (2022) [110].



Figura 15: Reacción enzimática mitocondrial en la que se fundamenta el ensayo de MTT (Fuente: https://hmong.es/wiki/MTT_assay).

Análisis de Interacción farmacológica

Con los recientes avances en ómicas y biología celular, la comprensión del cáncer como una enfermedad compleja ha aumentado el interés en el uso de combinaciones de drogas en la atención oncológica. El objetivo principal al evaluar combinaciones es lograr efectos de interacción positivos, demostrando que la combinación tiene más beneficio que los medicamentos individuales. En este sentido, una combinación favorable podría mejorar la eficiencia del tratamiento, disminuir la toxicidad y reducir el desarrollo de resistencia [147, 148].

A lo largo de los años, se han propuesto diversos modelos basados en diferentes supuestos y marcos teóricos para evaluar el tipo de interacción en una combinación. Estos enfoques pueden dividirse en: basados en efectos y basados en dosis-efecto. El término "efecto", a veces referido como respuesta, se evalúa generalmente mediante viabilidad celular (ensayo de MTT en este caso). Los enfoques de referencia basados en efectos engloban a su vez cuatro estrategias principales: Combinación de Umbrales Subyacentes, Agente Único Más Eficaz, Aditividad de Respuesta, y Modelo de Independencia de Bliss. Por otra parte, las estrategias basadas en dosis-efecto comprenden el método de Aditividad de Loewe (incluye el método de Chou-Talalay) y el método de potencia de interacción cero (Figura 16) [148, 149].

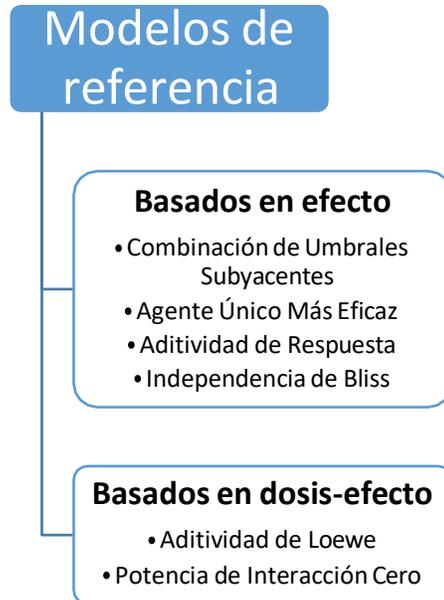


Figura 16: Modelos de referencia más conocidos para el análisis de combinaciones de fármacos. (Fuente: Adaptado de Duarte & Vale 2022 [148]).

A pesar de las diferentes estrategias desarrolladas para evaluar la interacción de los fármacos en terapias combinadas, todos presentan limitaciones. Hasta la fecha, no hay consenso entre la comunidad científica con respecto al modelo más apropiado para este tipo de análisis. En este sentido, la evaluación de combinaciones de fármacos puede beneficiarse del uso cooperativo de diferentes enfoques [148]. Teniendo esto en cuenta, en el marco de esta tesis se utilizó simultáneamente el método de Combinación de Umbrales Subyacentes (basado en efecto) y el método de Chou-Talalay (basado en dosis-efecto).

COMBINACIÓN DE UMBRALES SUBYACENTES: Es el enfoque más simple. Asume que el efecto de una combinación es positivo en función de los valores P obtenidos de pruebas estadísticas de la comparación con las drogas individuales. El efecto observado se considera significativo desde el punto de vista estadístico cuando $p < 0,05$. Aunque este enfoque todavía se utiliza, se debe tener en cuenta que los efectos observados pueden no ser precisos y por ende no detectar sinergismo si el mismo es modesto. Otras limitaciones de este método son que no permite el cálculo de un índice de combinación, CI y que es menos preciso (Figura 17) [147].

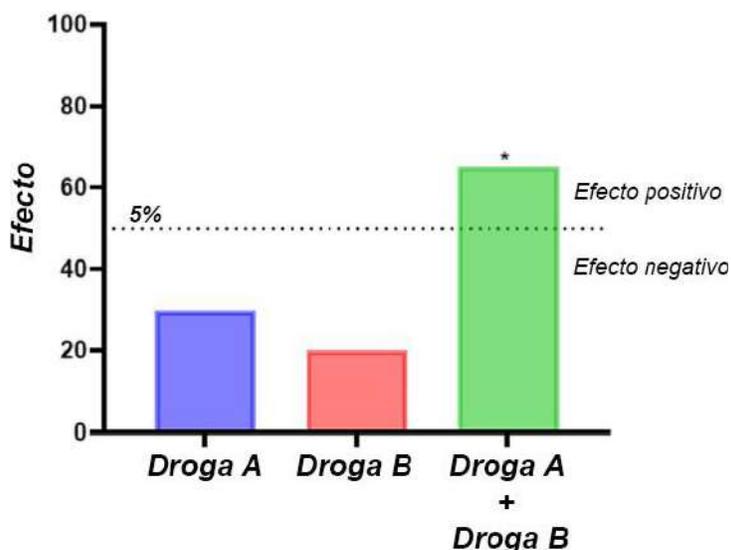


Figura 17: Demostración del enfoque de Combinación de Umbrales Subyacentes. (Fuente: Adaptado de Duarte & Vale 2022 [148]).

MÉTODO DE CHOU-TALALAY: El método de Chou-Talalay es uno de los enfoques más utilizados en estudios biológicos para cuantificar las interacciones de fármacos. A diferencia de los métodos basados en efecto, permite manejar efectos complejos y no lineales de los fármacos. Para realizar este análisis se utilizó el software CompuSyn (<http://www.combosyn.com>). Este modelo fue construido en base al modelo de aditividad de Loewe [150]. El principio de aditividad de Loewe se basa en la suposición de que dos fármacos con mecanismos de acción similares pueden ser considerados aditivos si producen el mismo efecto que se esperaría de sus efectos individuales combinados. El método de Chou-Talalay es una extensión del principio de aditividad de Loewe, que además incorpora la ecuación del efecto mediano (Figura 18) derivada del principio de la ley de acción de masas. De esta manera, proporciona una forma cuantitativa y precisa de evaluar las interacciones entre fármacos.

$$\frac{fa}{fu} = \left(\frac{D}{Dm} \right)^m$$

Figura 18: Ecuación del efecto mediano de Chou-Talalay. Donde D representa la dosis o concentración del fármaco, fa la fracción inhibida por la dosis del fármaco D, fu la fracción no afectada, Dm la dosis que causa el 50% de inhibición y m el coeficiente que indica la forma de la curva dosis-efecto. (Fuente: Duarte & Vale 2022 [148]).

El modelo también se describe por un valor (r), que indica el ajuste de los datos a la ley de acción de masas. Los valores de m (coeficiente que indica la forma de la curva dosis-efecto), D_m (dosis que causa el 50% de inhibición) y r para cada fármaco individual son los parámetros de dosis-efecto requeridos para realizar el análisis. A partir de ellos, calcula un índice de combinación (CI).

En esta tesis, para obtener los valores de CI se utilizaron los resultados del MTT realizado previamente. A partir de ellos, se calculó la fracción afectada (F_a) para cada concentración ensayada, tanto de los compuestos individuales como de las combinaciones, mediante la siguiente fórmula $F_a = 1 - (\% \text{ viabilidad}/100)$. Estos datos fueron cargados en el software CompuSyn®, el cuál realizó los cálculos y arrojó un valor de CI para cada concentración testada y que permitió determinar el tipo de interacción existente entre las drogas que se combinan (*Tabla 1*).

Tabla 1: Valores de CI y su indicación de tipo de interacción farmacológica

CI		Tipo de interacción
<0,1	+++++	Sinergismo muy fuerte
0,1-0,3	++++	Sinergismo fuerte
0,3-0,7	+++	Sinergismo
0,7-0,85	++	Sinergismo moderado
0,85-0,9	+	Sinergismo leve
0,9-1,1		Aditivo
1,1-1,2	-	Antagonismo leve
1,2-1,45	--	Antagonismo moderado
1,45-3,3	---	Antagonismo
3,3-10	----	Antagonismo fuerte
>10	-----	Antagonismo muy fuerte
Valores de CI simplificados y su significado		
< 0,8		Sinergismo
0,8-1,2		Aditivo
> 1,2		Antagonismo

Este protocolo ha sido anteriormente descrito en Vanderhoeven et al. (2018) [114].

Adhesión al sustrato

Las interacciones entre células cancerosas y su ECM pueden influir significativamente en su comportamiento invasivo y en su potencial metastásico. La adhesión celular desempeña un papel crucial, ya que es fundamental tanto en el desprendimiento inicial de las células cancerosas del tumor primario, así como en su posterior adhesión en sitios distantes para llevar a cabo la colonización [151].

En este estudio, se llevó a cabo un ensayo de adhesión al sustrato, con el objetivo de evaluar el efecto de los tratamientos dirigidos contra HER2 (Tz, T-DM1 y Lp), ya sea en forma individual o combinada, sobre la adhesión celular. Para ello, se sembraron células SKBR3 y BT-474 al 70% de confluencia en placas de 6 pocillos y se expusieron durante 72 horas a las monoterapias (1 $\mu\text{g/ml}$ de Tz/T-DM1 y 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de Lp) y a sus combinaciones (1 $\mu\text{g/mL}$ de Tz/T-DM1 + 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de Lp) en medio de cultivo suplementado con 10% de SFB. Al finalizar el periodo de incubación, las células fueron tripsinizadas y resuspendidas en medio de cultivo suplementado con 10% SFB. Se determinó el número de células viables de cada condición experimental utilizando el colorante azul de tripan y una cámara de Neubauer. El azul de tripan puede penetrar en las células dañadas pero no en las células viables, permitiendo la visualización y cuantificación de las células vivas bajo el microscopio. Se realizaron los cálculos pertinentes para garantizar una densidad uniforme de células viables en cada condición experimental. Se sembraron 3×10^4 células SKBR3 y 5×10^4 células BT-474 por pocillo en 100 μl de medio de cultivo suplementado con 10% SFB en placas de 96 pocillos previamente recubiertas con gelatina estéril al 1% (Sigma-Aldrich) para favorecer la adhesión. Las células se incubaron a 37 °C durante 2 horas para permitir su adherencia. Posteriormente, se eliminaron las células no adheridas mediante lavados repetidos con tampón fosfato salino (PBS) y las células adheridas se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos y se tiñeron con cristal violeta al 10% en etanol durante 15 minutos. Luego, se realizaron lavados con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.

La cantidad de cristal violeta se correlaciona con la cantidad de células adheridas al sustrato, y por ende, una mayor absorbancia indica una mayor adhesión celular permitiendo la cuantificación de la adherencia celular mediante mediciones de absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas (MULTISKAN EX; Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Alemania). Todos los datos se expresaron como porcentaje de adhesión y se normalizaron respecto al control, cuya absorbancia media se consideró como el 100% de adhesión celular. Además, se tomaron imágenes representativas utilizando un microscopio Nikon Eclipse E200 acoplado a una cámara digital CCD de alta resolución.

Este protocolo también se utilizó en células resistentes a Tz, SKBR3-RTz, para investigar el papel de FAK, paxilina y cortactina en la respuesta a Tz. Con este fin, las células fueron silenciadas mediante la transfección de ARNsi específicos para estas proteínas de interés. Se sembraron 3×10^4 células viables en 100 μl de medio de cultivo

suplementado con 10% de SFB por pocillo. Es importante mencionar que en este caso, las células tratadas fueron inicialmente sometidas al ensayo de migración. Una vez finalizado, el mismo pool de células fue sometido al ensayo de adhesión.

Este protocolo ha sido previamente descrito en Castro-Guijarro et al. (2022) [110].

Migración celular 2D: ensayo de la herida “Wound Healing Assay”

La migración celular contribuye significativamente a procesos patológicos como la diseminación de células cancerosas para formar metástasis tumorales. Uno de los métodos *in vitro* más comunes para estudiar la migración celular en cultivos 2D es el ensayo de la herida (también conocido como Wound Healing Assay) [152]. En este método, las células se cultivan hasta que forman una monocapa con una confluencia de alrededor del 70-80%. Posteriormente, se crea una herida sobre esta capa con la punta de una pipeta. Las células en el borde de la herida se polarizan y comienzan a migrar espontáneamente hacia el centro de la herida para cerrarla. De esta manera, monitoreando el cierre de la herida con un microscopio óptico convencional se puede estudiar el movimiento celular [152].

En este caso, para obtener la monocapa, se sembraron 1×10^5 células SKBR3 y 1×10^5 SKBR3-RTz por pocillo en medio de cultivo completo en placas de 24 pocillos. Las placas fueron incubadas por 24 horas en estufa de cultivo a 37 °C y 5% CO₂ para permitir la adherencia. Luego, con ayuda de una regla estéril se procedió a hacer dos heridas paralelas por pocillo utilizando un tip de 10 µl (*Figura 19*). A continuación, se realizaron lavados suaves con PBS para eliminar las células que se levantaron como resultado de este procedimiento. Para poder evaluar el impacto de las terapias dirigidas contra HER2 (1 µg/ml de Tz/T-DM1 y 0,1 µg/ml de Lp), como monoterapia o combinadas, las células fueron expuestas a estas drogas por 72 horas. Además, en el caso de las células resistentes a Tz, SKBR3-RTz, para evaluar el rol de FAK, paxilina y cortactina en la respuesta a Tz en el proceso de migración se realizaron transfecciones con ARNsi específicos, previo a los tratamientos dirigidos a HER2.

En este ensayo es importante tener en cuenta la contribución de la proliferación celular en la cicatrización de la herida durante el experimento para poder discernir entre un cierre de herida debido a la proliferación y un cierre de herida debido efectivamente a la migración. Para hacer frente a esto, se agregó a cada pocillo un inhibidor selectivo de la síntesis del

ADN, sin inhibir la síntesis de ARN, denominado clorhidrato de citosina β -D-arabinofuranosido (Sigma-Aldrich, 10 μ M) como inhibidor de la proliferación.

A continuación, se capturaron distintas imágenes por pocillo utilizando un microscopio Nikon Eclipse E200 acoplado a una cámara digital CCD de alta resolución para registrar el estado inicial de la herida (0 horas). Las células se incubaron durante 72 horas en una estufa de cultivo en condiciones controladas de temperatura (37° C) y atmósfera (5% CO₂). Al finalizar el periodo de tratamiento, se tomaron nuevamente imágenes para registrar el estado final de la herida (72 horas). Las imágenes a las 0 y 72 horas fueron tomadas exactamente en la misma posición del pocillo ya que previo al inicio del ensayo, se marcó la parte posterior de las placas con una línea horizontal en el centro de cada pocillo, y esta marca sirvió como referencia para capturar las fotografías correctamente (*Figura 19*). Para analizar la migración celular, se midió el área de las heridas a los tiempos 0 y 72 horas utilizando el software ImageJ. El área migrada se calculó como la diferencia del área en el tiempo inicial (0 horas) y el área de la misma herida en el tiempo final (72 horas). La migración celular en cada caso se expresó como un porcentaje del área migrada y se normalizó respecto al control, que se consideró como el 100% de migración.

Este protocolo ha sido descrito en publicaciones previas del grupo [110, 111].

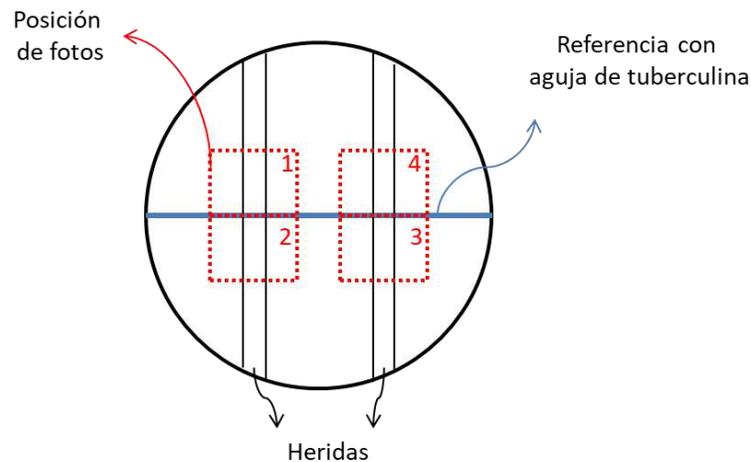


Figura 19: Esquema representativo del ensayo de la herida. La imagen indica en un pocillo de una placa de 24 pocillos la referencia que se realizó para tomar las fotos de las heridas a los tiempos 0 y 72 horas en la misma posición para el ensayo de migración celular.

Migración celular 3D: medición del halo de migración

Además, se evaluó el impacto de las terapias dirigidas contra HER2, ya sea de forma individual o en combinación, mediante ensayos de migración de células tumorales en

plataformas tridimensionales (3D) o esferoides. Para este fin, se recolectaron 10 esferoides de la línea tumoral SKBR3 formados utilizando la técnica de LO previamente descrita. Estos esferoides fueron trasladados a tubos de 1,5 ml con precaución de mantener la integridad de su estructura. A continuación, se realizaron lavados dejando sedimentar los esferoides en el fondo del tubo antes y después del agregado del PBS y retirando el sobrenadante. Posteriormente, se agregó 1 ml de tratamiento (10 µg/ml de Tz/T-DM1, con o sin 1 µg/ml de Lp) preparado en medio de cultivo completo, suplementado con clorhidrato de citosina β-D-arabinofuranosido (Sigma-Aldrich, 10 µM) como inhibidor de la proliferación. Los esferoides junto con el medio con tratamiento fueron transferidos a placas de 6 pocillos, con la precaución de que quedaran distribuidos uniformemente y no agrupados, de forma de permitir una evaluación adecuada de la migración. Estas placas, junto con la placa control (conteniendo únicamente los esferoides con medio de cultivo completo y el inhibidor de la proliferación), se incubaron en una estufa de cultivo a 37 °C y 5% de CO₂ durante 72 horas para permitir la migración celular.

La formación del halo de migración tumoral se evaluó después de 72 horas mediante imágenes capturadas con un microscopio Nikon Eclipse E200 acoplado a una cámara digital CCD de alta resolución. Se prestó especial atención al mover las placas de cultivo para evitar que los esferoides se desplazaran del halo de migración formado. Para cuantificar la migración celular, se determinó el área del halo de migración utilizando el software ImageJ y se expresó como porcentaje de área migrada en las células tratadas en comparación con las células no tratadas (control), cuya migración se consideró del 100%.

Detección de proteínas

Expresión proteica: Western Blot

En este trabajo se utilizó la técnica de western blot con varios propósitos: 1) evaluar el impacto de las terapias dirigidas contra HER2, solas o combinadas, en el perfil de expresión de proteínas claves en los procesos de adhesión y migración celular; 2) dilucidar la expresión de proteínas en distintas fracciones celulares (nuclear y citoplasmática) luego del fraccionamiento subcelular; 3) confirmar la resistencia adquirida a Tz en el modelo celular establecido, SKBR3-RTz, mediante la evaluación de la expresión de formas fosforiladas de proteínas asociadas a la resistencia a Tz; 4) corroborar el silenciamiento de genes de interés luego de la transfección de las células con ARNsi específicos. La técnica se llevó a cabo como se detalla a continuación:

LISADOS CELULARES: Una vez realizado los tratamientos en las líneas celulares SKBR3, BT-474 y SKBR3-RTz, el sobrenadante fue descartado y las células adheridas se lavaron repetidas veces con PBS. Luego, se retiró el exceso de PBS y se añadió buffer de lisis frío [100 mM Tris-HCl pH 6,8; dodecil sulfato de sodio (SDS) al 4%, glicerol al 20%; 1 mM de ortovanadato de sodio (Na_3VO_4); 1 mM de fluoruro de sodio (NaF); 1 mM de cócteles de inhibidores de proteasas y fosfatasa (PMSF, PIC y PhiC)] para favorecer la disgregación de las células. Este procedimiento fue favorecido con disgregación mecánica utilizando un raspador de células (scraper). El lisado obtenido se recogió en tubos de 1,5 ml y se conservaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ para su posterior utilización. Todo el proceso de extracción de proteínas fue realizado sobre hielo para evitar la desnaturalización y la degradación de las proteínas.

FRACCIONAMIENTO CELULAR: El ensayo de fraccionamiento celular se utilizó para separar los componentes nucleares y citoplasmáticos de las células después de su exposición a los tratamientos dirigidos contra HER2 (1 $\mu\text{g/ml}$ de Tz/T-DM1 con o sin 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de Lp). Se siguió una modificación del protocolo informado por Andrews et al. (1991) [153]. Inicialmente, las células fueron centrifugadas a baja velocidad para obtener un pellet celular. A este pellet se le adicionaron 100-500 μl de buffer A [10 mM de HEPES; 1,5 mM de MgCl_2 ; 10 mM de KCl; 0,5 mM de ditioneitol (DTT); 0,05% de tetraóxido de fósforo (NP_4O); pH 7,9] y se dejó reposar en hielo durante 10 minutos para favorecer la extracción de proteínas. Luego, las células fueron sometidas a una centrifugación a 3.000 rpm durante 10 minutos a $4\text{ }^\circ\text{C}$, y el sobrenadante resultante, que corresponde al extracto citoplasmático, se conservó a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su utilización. Posteriormente, el pellet fue resuspendido en 374 μl de buffer B (5 mM de HEPES; 1,6 mM de MgCl_2 ; 0,2 mM de EDTA; 0,5 mM de DTT; 26% de glicerol; pH 7,9) y se agregó 26 μl de NaCl (4,6 M). La suspensión se homogeneizó enérgicamente con una jeringa y una aguja de tuberculina durante un tiempo considerable. Luego, se dejó reposar en hielo durante 30 minutos para favorecer la extracción de proteínas. Posteriormente, se sometió a centrifugación a 12.800 rpm durante 25 minutos a $4\text{ }^\circ\text{C}$ para obtener el sobrenadante correspondiente al extracto nuclear, el cual se conservó a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su posterior utilización.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: Se cuantificó la concentración de proteínas utilizando el kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific). Este kit se basa en la capacidad de las proteínas para reducir el Cu^{2+} a Cu^{1+} en un medio alcalino. Este proceso ocurre

debido a que ciertas proteínas contienen residuos de cisteína que tienen grupos sulfhidrilo (-SH) reductores. Estos grupos sulfhidrilo son capaces de reducir el ion cobre. El ácido bicinónico (BCA) actúa como un agente quelante del Cu^{1+} , formando un complejo coloreado. De esta manera, la intensidad de la absorbancia a 570 nm está directamente relacionada con la concentración de proteínas presentes en la muestra, permitiendo cuantificarlas [154]. Para llevar a cabo la cuantificación, en una placa de 96 pocillos, se cargó en cada pocillo 2 μl de la muestra y 98 μl de agua destilada. Luego se añadió 100 μl de la solución de BCA compuesta por 50% del reactivo A, 48% del reactivo B y 2% del reactivo C. La placa se incubó a 37 °C durante 40 minutos en oscuridad. Luego de ese periodo de tiempo se detectó la absorbancia a 570 nm en el lector de microplacas (MULTISKAN EX; Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Alemania). Este procedimiento se realizó utilizando triplicados para cada muestra. La concentración de proteínas se realizó extrapolando los valores medios de absorbancia a los obtenidos en la curva estándar que se realizó en simultaneo utilizando albumina de suero bovina en un rango de concentración de 0 -100 $\mu\text{g/ml}$.

ELECTROFORESIS: La separación de proteínas se llevó a cabo mediante geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), siguiendo el protocolo estándar. Se prepararon geles de poliacrilamida con un porcentaje adecuado según el peso molecular de las proteínas a resolver, siendo en su mayoría del 10%. Para cada muestra, se tomó una cantidad equivalente a 30-60 μg y se mezcló con buffer de carga 5X. Este buffer contiene 0,2 M de Tris; SDS al 10%; glicerol al 20%; azul de bromofenol al 0,05% y agua destilada en la cantidad necesaria. Antes de su uso, se agregó 1 $\mu\text{l/ml}$ de DTT al buffer como agente reductor, para asegurar que las proteínas estuvieran en su forma desnaturizada y lineal antes de la electroforesis. Además, las muestras fueron desnaturizadas mediante calentamiento a 95 °C durante 5 minutos. A continuación, los geles fueron montados y sembrados adecuadamente. Se utilizó Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (cat. 1610374 - Bio-Rad) como marcador de peso molecular. Las proteínas fueron separadas utilizando un buffer de electroforesis/corrida (25 mM de Tris-base; 192 mM de glicina; 0,1% de SDS; pH 8,6), aplicando un voltaje de 80 V en el gel de apilamiento y 120 V en el gel de resolución.

TRANSFERENCIA, BLOQUEO E INCUBACIÓN: Una vez finalizada la electroforesis, se procedió a realizar una transferencia húmeda a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) con un tamaño de poro de 0,45 μm (cat. # 88518, Thermo Scientific, Lafayette, USA).

Previamente, la membrana fue activada en metanol. La transferencia se llevó a cabo utilizando buffer de transferencia (20 mM de Tris base; 150 mM de glicina; 10% de metanol; pH 8,4) y aplicando un voltaje de 100 V durante 1 hora. Posteriormente, se realizó el bloqueo de las membranas utilizando buffer de bloqueo (disolución salina tamponada con Tris y Tween 20, TBS-T (1% de BSA en TBS-Tween: 137 mM de NaCl; 20 mM de Tris; 0,1% de Tween-20). Las membranas se incubaron en esta solución durante al menos 1 hora a temperatura ambiente para bloquear las uniones inespecíficas. Luego, las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios específicos para la proteína de interés. El anticuerpo primario se diluyó en TBS-T con 1% de albúmina durante toda la noche a 4 °C o durante 6 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces durante 10 minutos con TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo y las uniones inespecíficas. A continuación, se incubaron las membranas durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave en el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a la peroxidasa de rábano (HRP), diluido en TBS-T. Nuevamente, se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBS-T. Los anticuerpos utilizados en este estudio se especifican en la Tabla 2.

REVELADO Y ANÁLISIS: La inmunodetección se realizó utilizando quimioluminiscencia. Para ello, se le adicionó a la membrana una mezcla del mismo volumen de solución A (100 mM Tris; 2,5 mM luminol; 0,5 mM de ácido cumárico; pH 8,5) y el mismo volumen de solución B (H₂O₂ al 0,1%; 100 mM Tris; pH 8,5). Las imágenes fueron registradas con un equipo de detección quimioluminiscente ChemiDoc™ XRS, provisto del software Image Lab™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) de imágenes digitales cuantitativas (Chemidoc XRS con Image Lab, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Los resultados fueron analizados mediante densitometría utilizando el software ImageJ. Se evaluó la DO de cada banda, y cada valor fue normalizado con respecto a su control de carga. Los resultados fueron expresados como una relación con el control, al que se le asignó un valor de 1. Los datos posteriormente fueron sometidos a análisis estadístico.

Tabla 2: Anticuerpos utilizados en inmunodetección

Anticuerpo	Código	Dilución	Especie	Procedencia
Anti-HER2	ab16901	1:1500	Ratón	Abcam
Anti-SRC	sc-5266	1:1000	Ratón	Santa Cruz
Anti-FAK	sc-271195-R	1:1000	Ratón	Santa Cruz
Anti-paxilina	sc-31010	1:1000	Cabra	Santa Cruz

Anti-vinculina	MAB3574	1:1000	Ratón	Calbiochem
Anti-cortactina	sc-11408	1:1000	Conejo	Santa Cruz
Anti-actina	sc-1615	1:1000	Cabra	Santa Cruz
Anti-GAPDH	cat# 2118	1:1000	Conejo	Cell Signaling
Anti-HDAC1	WH0003065M2	1:1000	Ratón	Sigma-Aldrich
Anti-fosfo-AKT 1/2/3 (T308)	sc-16646-R	1:1000	Conejo	Santa Cruz
Anti-fosfo-mTOR (S2448)	sc-101738	1:1000	Conejo	Santa Cruz
Anti-ratón (Secundario)	sc-358914	1:2000	Conejo	Santa Cruz
Anti-conejo (Secundario)	sc-2357	1:2000	Ratón	Santa Cruz
Anti-cabra (Secundario)	sc-2354	1:2000	Ratón	Santa Cruz

Localización proteica: Inmunofluorescencia

Utilizamos ensayos de inmunofluorescencia indirecta para examinar la distribución y la localización subcelular de proteínas clave en la motilidad celular, como FAK y cortactina. Estas proteínas fueron seleccionadas específicamente debido a su función como marcadores de distintas etapas del proceso de migración celular. FAK juega un papel crucial en la formación de FA, las cuales permiten que la célula se adhiera a la EMC. Mientras que, cortactina, es importante para la nucleación de actina necesaria en la formación de protrusiones ricas en actina que la célula utiliza para moverse.

En este método, los anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos se utilizan para visualizar nuestras proteínas de interés. Estos anticuerpos secundarios reconocen y se unen a los anticuerpos primarios dirigidos específicamente hacia el antígeno de interés. Cuando la muestra es excitada con luz de una longitud de onda adecuada, los fluoróforos emiten luz visible, permitiendo la visualización y la localización precisa del antígeno (en este caso, FAK y cortactina) en la muestra biológica bajo un microscopio de fluorescencia.

Con este propósito, 2×10^4 células BT-474 y SKBR3 fueron cultivadas sobre cubreobjetos en placas de 6 pocillos en 700 μ l de medio de cultivo completo. Luego de 24 horas de incubación en estufa de cultivo a 37 °C y 5% CO₂, una vez adheridas las células, el medio fue retirado y se suministraron los tratamientos dirigidos contra HER2 (1 μ g/ml de Tz/T-DM1 con o sin 0,1 μ g/ml de Lp) durante 72 horas. A continuación se realizaron lavados con PBS para eliminar el tratamiento y todas aquellas células no adheridas/muertas. Las células adheridas fueron fijadas con paraformaldehído al 4%

durante 20 minutos. Luego, se realizaron dos lavados con PBS para retirar el exceso de fijador y se permeabilizó la célula con tritón al 0,1% durante 5 minutos para favorecer la penetración de los anticuerpos. Después, se realizó un lavado con tampón fosfato salino conteniendo Tween-20 (PBS-T, PBS con Tween-20 al 0,1%) y se bloquearon los sitios de unión no específica utilizando buffer de bloqueo (BSA al 1% en PBS-T) durante 30 minutos. Seguidamente se incubó el anticuerpo primario en PBS-T durante toda la noche a 4 °C. En un protocolo se marcó FAK con su anticuerpo específico (sc-271195, dilución 1:60, 50 µl/cubreobjeto, especie ratón) y en otro protocolo paralelo se marcó cortactina (sc-11408, dilución 1:60, 50 µl/cubreobjeto, especie conejo).

Al día siguiente, todos los pasos que siguieron se realizaron en oscuridad. Las células se lavaron con PBS-T para remover el exceso de anticuerpo primario, y se incubaron los anticuerpos secundarios conjugados a los fluoróforos durante 2 horas a temperatura ambiente. Se utilizó como anticuerpo secundario anti-ratón Alexa Fluor 488 (A-11001, Invitrogen) en el caso de las células marcadas con anti-FAK, y anticuerpo secundario anti-conejo Dylight 488 (DI-1488, Vector Laboratories) en las células marcadas previamente con anti-cortactina. Además, las células también fueron incubadas con 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma-Aldrich, dilución 1:10000) y Texas Red-Phalloidin (TRPh, Sigma-Aldrich, dilución 7:300) por 10 y 30 minutos a temperatura ambiente respectivamente. El colorante fluorescente DAPI penetra en las células y se une al ADN presente en el núcleo celular, intercalándose entre las bases del ADN de doble cadena, formando complejos DAPI-ADN. Esta intercalación causa un cambio en las propiedades ópticas del DAPI, haciéndolo fluorescente cuando se expone a la luz UV o luz azul. Mientras que TRPh tiene una gran afinidad por los filamentos de actina, permitiendo su unión específica. Así, cuando se excita con luz adecuada y se observa bajo un microscopio de fluorescencia se produce una intensa fluorescencia roja permitiendo visualizar y estudiar la organización, la distribución y la dinámica de los filamentos de actina en las células. Luego los preparados fueron lavados con PBS y se montaron sobre portaobjetos utilizando como medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories).

La inmunofluorescencia se visualizó utilizando un microscopio Nikon Eclipse E200 y se registró con una cámara digital Olympus DP70 de alta resolución. Además, la localización subcelular de las proteínas de interés fue confirmada mediante visualización de los preparados en Microscopio Confocal FV1000 de Olympus. Este protocolo ha sido detalladamente descrito anteriormente en publicaciones del grupo [110, 111].

3. Análisis *in silico* de genes candidatos a biomarcadores: Evaluación traslacional

A través de un enfoque traslacional, se buscó establecer una conexión entre los hallazgos obtenidos *in vitro* y su relevancia clínica en el contexto del cáncer de mama HER2 positivo. Para ello, se utilizaron bases de datos que contienen información clínica sobre pacientes diagnosticadas con esta enfermedad, incluyendo la respuesta al tratamiento y la supervivencia. Mediante el análisis de estos datos en relación con la expresión de las proteínas estudiadas *in vitro*, se pudo identificar genes candidatos a biomarcadores.

Identificación de potenciales biomarcadores pronóstico

Un marcador pronóstico predice la evolución de la enfermedad (supervivencia), independientemente del tratamiento; permitiendo identificar las pacientes con un tumor más agresivo. Para evaluar el potencial de los genes de interés como biomarcadores pronósticos en cáncer de mama HER2 positivo, se empleó la plataforma bioinformática Kaplan-Meier (KM) Plotter (www.kmplot.com). Esta herramienta permite evaluar la correlación entre la expresión génica y la supervivencia. Utiliza datos provenientes de muestras tumorales alojados en los repositorios GEO, EGA, TCGA, Metabric, Impact y PubMed [155].

En este estudio, en base a los resultados obtenidos, se seleccionaron varios genes de interés que codifican proteínas relevantes en la progresión del cáncer de mama HER2 positivo. Entre estos genes se incluyen: ERBB2 (HER2), SRC (SRC), PTK2 (FAK), PXN (paxilina), VCL (vinculina) y CTTN (cortactina). Para analizar la expresión de estos genes se utilizó el método JetSet que permite seleccionar, entre las sondas disponibles, las más adecuadas en base a su especificidad, cobertura y resistencia a la degradación. Las sondas escogidas fueron: 216836_s_at (ERBB2), 213324_at (SRC), 208820_at (PTK2), 201087_at (PXN), 200931_s_at (VCL) y 201059_at (CTTN).

El programa, entre sus opciones, permite ajustar el criterio de selección de pacientes (*Figura 20*). En este caso, se limitó el análisis a pacientes con cáncer de mama HER2 positivo, considerando tanto la clasificación según el estado de HER2 por array, STGallen y PAM50. Para el análisis, se utilizaron como criterios de valoración las siguientes métricas: supervivencia libre de recaída (RFS, n= 285), supervivencia global (OS, n= 150),

supervivencia libre de metástasis a distancia (DMSF, n= 160) y supervivencia post-progresión de la enfermedad (PPS, n= 36). RFS se refiere al tiempo que transcurre hasta la reaparición de la enfermedad. OS indica el tiempo que transcurre hasta la muerte del paciente. DMSF se refiere al tiempo que transcurre hasta que los pacientes presentan metástasis a distancia, es decir, la diseminación del cáncer a órganos distantes del sitio original del tumor. PPS se define como el tiempo transcurrido desde la progresión de la enfermedad hasta la muerte del paciente.

Para analizar el valor pronóstico de los genes de interés, los pacientes incluidos en el análisis se dividieron en dos grupos basados en los valores de expresión media del gen de interés: un grupo de alta expresión y un grupo de baja expresión. Para determinar esta división, KM-Plotter calculó un punto de corte óptimo en la expresión génica utilizando métodos estadísticos avanzados. Estos métodos implican calcular todos los valores de corte posibles entre los cuartiles inferior y superior, y seleccionar el punto de corte que optimice el rendimiento. Se considera como punto de corte óptimo aquel que muestra la mayor significancia y la menor FDR. En caso de que varios valores de corte muestren una significancia idéntica, se selecciona aquel que presente la tasa de riesgo (HR, hazard ratio) más alta [155].

Las dos cohortes de pacientes fueron comparadas mediante el análisis de supervivencia de KM. Estas curvas ilustran la probabilidad de supervivencia a lo largo del tiempo para cada grupo de pacientes. Para realizar la comparación estadística entre los grupos, el programa calcula la tasa de riesgo (HR) con intervalos de confianza del 95% y el valor logrank P, considerando un $p < 0,05$ como estadísticamente significativo [155].

En este trabajo, se evaluó además la capacidad pronóstica de los genes de interés como firma genética, considerando todos los genes en simultáneo.

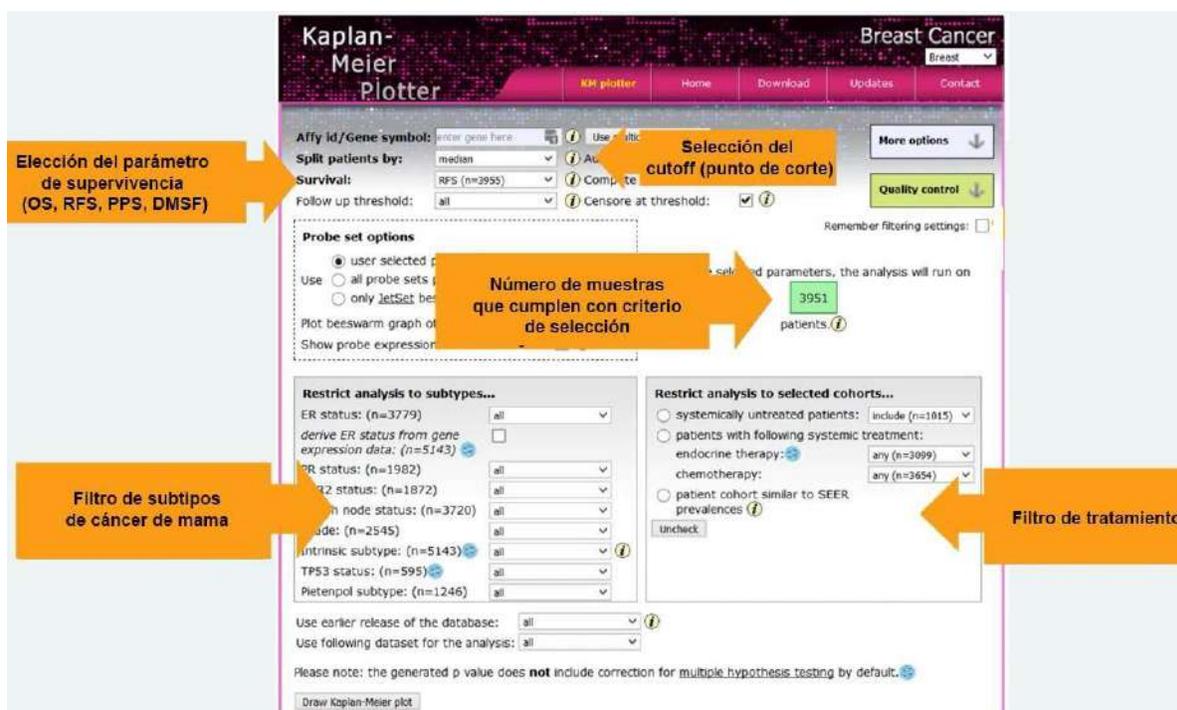


Figura 20: Plataforma KM-Plotter. Opciones de configuración (Fuente: www.kmplot.com).

Identificación de genes candidatos a potenciales biomarcadores predictivos

Un biomarcador predictivo se utiliza para predecir la respuesta de un paciente a un tratamiento específico. Anticipa si un tratamiento concreto tiene un beneficio para el paciente. La utilidad de los biomarcadores predictivos radica en su capacidad para ayudar a los médicos a tomar decisiones informadas sobre qué tratamiento sería más efectivo para un paciente en particular. Así, los biomarcadores predictivos pueden predecir si un paciente responderá favorablemente a una determinada terapia permitiendo una atención médica más personalizada y eficiente.

En este estudio, se evaluó si los niveles de ARNm de ERBB2, SRC, PTK2, PXN, VCL y CTTN tienen capacidad de discriminar entre pacientes respondedores al tratamiento con Tz o como no respondedores al mismo. Para ello, se utilizó el análisis de la curva Característica Operativa del Receptor (del término en inglés Receiver Operating Characteristic, ROC) mediante el software en línea ROC-Plotter (www.rocplotter.org) [156]. Esta herramienta permite generar y analizar curvas ROC al vincular la expresión génica y la respuesta terapéutica utilizando datos transcriptómicos de pacientes [157]. Las curvas ROC representan la capacidad del gen en estudio para discriminar entre dos grupos, comúnmente un grupo de casos (respondedores al tratamiento) y un grupo de controles (no respondedores al tratamiento), en función de su sensibilidad y especificidad (1 -

sensibilidad). La sensibilidad, o tasa de verdaderos positivos, indica qué tan bueno es para detectar a las personas con la condición investigada (respuesta al tratamiento), es decir, su capacidad para identificar correctamente los casos positivos (respondedores). La especificidad, o tasa de verdaderos negativos, indica qué tan bueno es para definir correctamente a las personas sin la condición (no respuesta al tratamiento); es decir, su capacidad para identificar correctamente los casos negativos (no respondedores) [156].

Para llevar a cabo este análisis, se utilizaron bases de datos alojadas en la plataforma provenientes de los repositorios GEO, EGA, TCGA y similares; que cumplieran con el criterio de inclusión de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo tratados con Tz. Estas opciones fueron configuradas desde el menú del software (*Figura 21*). Las sondas JetSet utilizadas para analizar la expresión de los genes de interés fueron: 216836_s_at (ERBB2), 213324_at (SRC), 208820_at (PTK2), 201087_at (PXN), 200931_s_at (VCL) y 201059_at (CTTN). Cada uno de los genes fue evaluado de forma individual y como una firma genética.

Se llevaron a cabo dos análisis. Por un lado, los pacientes se dividieron en dos cohortes según pCR, es decir, aquellos con pCR vs. los que presentaban enfermedad residual después de completar la terapia. Por otro lado, se realizó el estudio considerando la RFS, es decir, pacientes que sobrevivieron más de 5 años vs. los que sufrieron una recaída antes de los 5 años desde el inicio de la terapia. En cada caso, la herramienta ROC, a través de la opción de selección automática (*Figura 21*), permitió determinar el punto de corte más sólido para cada gen de interés, capaz de discriminar mejor entre los pacientes respondedores y no respondedores. Además, se generó un gráfico de barras de respondedores y no respondedores según la expresión media del gen de interés para evaluar las diferencias estadísticas entre los grupos mediante la prueba U de Mann-Whitney [157]. En paralelo, se calculó el área bajo la curva (AUC), que muestra el potencial pronóstico de cada gen. Un AUC < 0,6 se considera limitado para una potencial utilidad clínica, mientras que un AUC de > 0,6 indica una potencial utilidad clínica [157].

Es importante mencionar que un resultado positivo en este análisis mediado por ROC-plotter no permite afirmar que los genes estudiados sean biomarcadores predictivos. Para ello, es necesario realizar análisis estadísticos más robustos como el test de Cox multivariado. En contraste, el análisis realizado en esta tesis únicamente constituye una primera aproximación sobre un posible potencial predictivo.

The image shows the configuration options for the ROC-ploter platform. It features several sections: 'Gene symbol' with a search bar; 'Response' with two radio button options; 'Treatment' with three sub-sections of radio button options; 'Filters (optional)' with five dropdown menus; a summary table with three columns; and 'Settings' with four checked checkboxes. A green 'Calculate' button is located at the bottom left. Three orange arrows point to specific features: 'Selección de parámetro de respuesta para asignación de cohortes' points to the 'Response' section, 'Filtro de tratamiento' points to the 'Treatment' section, and 'Filtro de subtipo de cáncer de mama' points to the 'Molecular subtype' dropdown.

Figura 21: Plataforma ROC- plotter. Opciones de configuración (Fuente: www.rocplotter.org).

4. Análisis estadístico

Todos los valores fueron expresados como media \pm la desviación estándar (media \pm SD). Para evaluar el efecto de los tratamientos experimentales (Tz, T-DM1, Lp, Tz+Lp, T-DM1+Lp) con respecto al grupo control, se utilizó como prueba estadística el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido de pruebas de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer o la prueba de Kruskal Wallis según la naturaleza de los datos. Cada vez que se comparó el efecto de la combinación de terapias con la monodroga se realizó una prueba T de Student o la prueba U de Mann-Whitney según naturaleza de los datos. La normalidad de los datos se verificó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con $p < 0,05$. El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el software GraphPad Prism versión 8.0.1. Los análisis bioinformáticos de expresión génica diferencial se realizaron utilizando R versión 4.0.4 en un entorno de Windows con Intel Core i7 con 32 GB de RAM. Los análisis estadísticos de los datos de KM-plotter y ROC-plotter fueron proporcionados por las propias herramientas.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Primer objetivo específico

Mediante bioinformática y el uso del repositorio público “Gene Expression Omnibus” caracterizar los perfiles de expresión de genes desregulados en modelos celulares de cáncer de mama resistentes a las terapias dirigidas contra HER2.

Análisis de expresión génica diferencial entre células resistentes a Tz/T-DM1 y sensibles

La aparición de resistencia a Tz constituye en la actualidad un desafío significativo en la práctica oncológica. Con el propósito de identificar diferencias en la expresión génica entre células resistentes y sensibles a este fármaco, se llevó a cabo un análisis de expresión génica diferencial. Con este fin, se empleó la base de datos GSE119397, obtenida en GEO, que contiene datos transcriptómicos de células resistentes a Tz (BT-RTz) y sus parentales sensibles (BT-474). Se observó la presencia de 3.148 genes desregulados en la línea celular resistente en comparación con la sensible. Entre ellos, 1.183 genes mostraron una regulación al alza (*Figura 22A, indicados en rojo*), mientras que 1.965 genes presentaron una regulación a la baja (*Figura 22A, indicados en celeste*). Sin embargo, es previsible que muchos de los genes expresados de manera diferencial en el fenotipo resistente estén implicados en eventos que no están directamente relacionados con la resistencia a Tz.

Teniendo esta consideración en cuenta y con el objetivo de refinar este estudio, se llevó a cabo un nuevo análisis de expresión génica diferencial. Se utilizó la base de datos GSE100192 obtenida de GEO, que contiene datos de expresión génica de células resistentes a T-DM1 (BT-RT-DM1) y sus respectivas líneas parentales sensibles (BT-474). Este enfoque se fundamenta en la similitud estructural entre Tz y T-DM1. La estructura del T-DM1 consta de una molécula de Tz unida a moléculas de emtansina. Debido a esta alta similitud, ambas drogas comparten mecanismos de acción [32], y por ende, se espera que los eventos moleculares que desencadenan la resistencia a estos fármacos sean también similares. En la comparación de células resistentes a T-DM1 (BT-RT-DM1) vs. sensibles (BT-474), se observó que 2.794 genes mostraron una expresión diferencial. De estos, 921 genes mostraron una regulación al alza (*Figura 22B, indicados en rojo*), y 1.873 genes una regulación a la baja (*Figura 22B, indicados en celeste*).

Seguidamente, se encontró que las células BT-474 resistentes a Tz (BT-RTz) y las células resistentes a T-DM1 (BT-RT-DM1), comparten 106 genes regulados al alza (Figura 22C) y 457 genes regulados a la baja (Figura 22D), sugiriendo una posible contribución de los genes desregulados compartidos por ambas en la adquisición de resistencia a Tz.

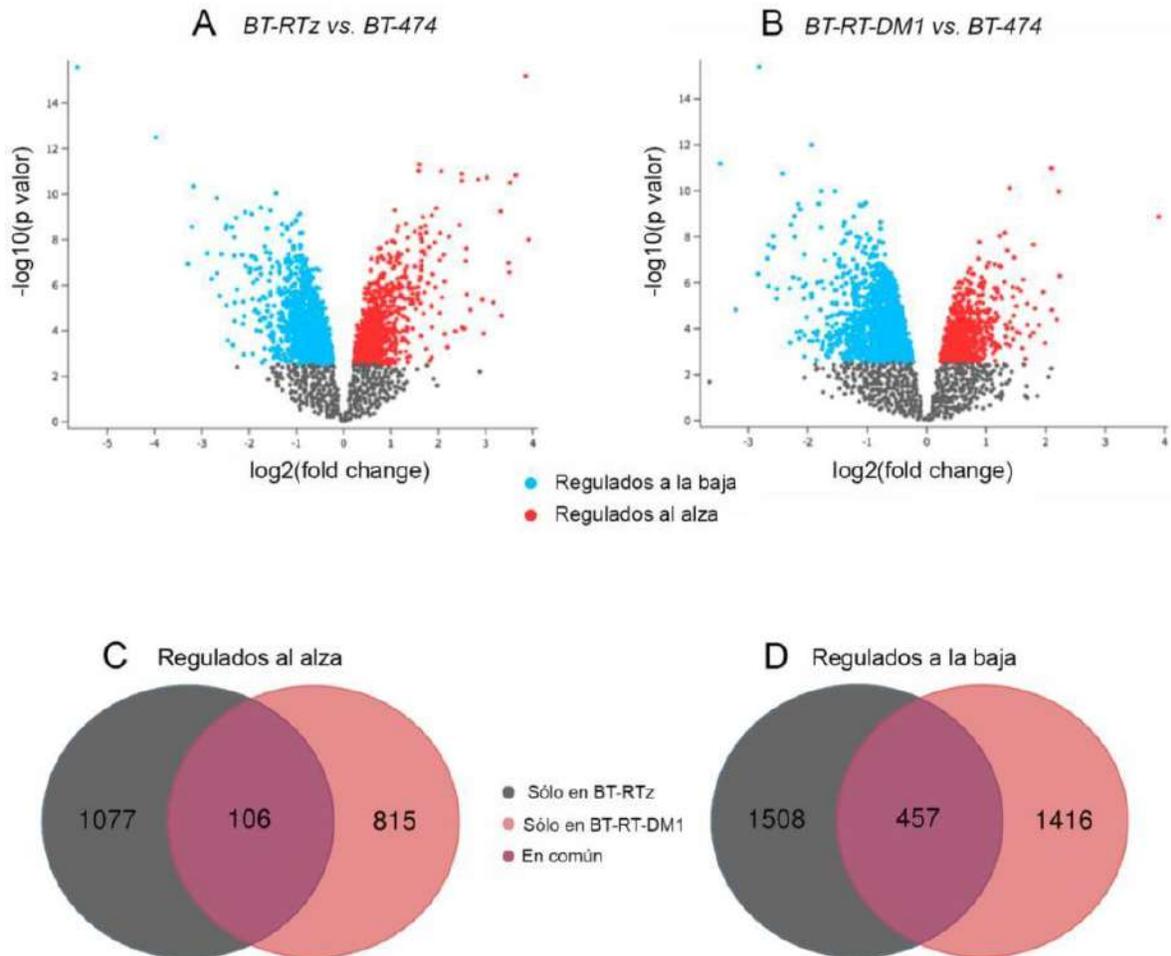


Figura 22: Modificaciones transcriptómicas asociadas a la resistencia a Tz y T-DM1. Genes expresados diferencialmente (DEG) en (A) células BT-RTz vs. BT-474 y en (B) células BT-RT-DM1 vs. BT-474. Cada punto en los gráficos de volcano representa genes que en los fenotipos resistentes están regulados a la baja (en color celeste) y regulados al alza (en color rojo). Los genes coloreados en gris no mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$). Los diagramas de Venn muestran el número de genes (C) regulados al alza y (D) regulados a la baja en cada modelo de resistencia, así como aquellos en común entre ambos modelos resistentes, BT-RTz y BT-RT-DM1.

Clasificación ontológica de genes desregulados en los fenotipos resistentes

Una expresión génica regulada es crucial para el funcionamiento normal de las células. Las desregulaciones en la expresión de los genes, ya sea por sobreexpresión o subexpresión, pueden alterar los procesos biológicos y promover la resistencia a terapias. Según Diaz-Rodríguez *et al.* (2019), grupo que subió a GEO la base de datos utilizada en el

análisis transcriptómico, las desregulaciones génicas en las células resistentes a Tz tienen consecuencias funcionales, incluida la alteración de vías relacionadas con la muerte celular, el metabolismo, la **MIGRACIÓN**, la respuesta al daño del ADN, el ciclo celular, la transcripción, la diferenciación y la **ADHESIÓN CELULAR** (Figura 12) [129]. Teniendo esto en cuenta, se utilizó la herramienta PANTHER para identificar genes desregulados en los fenotipos resistentes a Tz y T-DM1 (Figura 22), implicados en la adhesión y en la migración celular. Los procesos de adhesión y migración celular son fundamentales para el desarrollo de metástasis, etapa de la enfermedad en la que la adquisición de resistencia es más frecuente en las pacientes.

Los resultados revelaron que varios genes relacionados con la adhesión y migración están desregulados de igual forma en ambos modelos resistentes. En particular, en ambas células resistentes, MACF1 se observó sobreexpresado (Figura 23A-B, resaltado en rojo) y PARVA, PXN, ITGB8, L1CAM, CDH11 y PC se encontraron regulados a la baja (Figura 23A-B, resaltados en azul) en la adhesión celular. De manera análoga, en ambos modelos resistentes, se observó que PXN se encuentra regulado a la baja (Figura 23C-D, resaltado en azul), mientras que S100A14 se encuentra regulado al alza (Figura 23C-D, resaltado en rojo) en la migración celular.

Interesantemente, PXN (paxilina) además de coincidir en su perfil de expresión en ambos fenotipos resistentes, participa simultáneamente en la regulación de la adhesión y la migración celular (Figura 23A-D), demostrando ser una molécula prometedoras en el estudio del cáncer de mama HER2 positivo metastásico en el contexto de resistencia terapéutica. Particularmente, actúa en la diseminación celular dependiente de la adhesión al sustrato (GO: 0034446) y en la migración celular de tipo ameboidal (GO: 0001667) (Figura 23A-D). Paxilina es una proteína de andamio localizada en las FA crucial para la adhesión y migración en células normales y cancerosas. Cumple un rol fundamental en la regulación del citoesqueleto de actina y en la transducción de señales mediada por las FA [158].

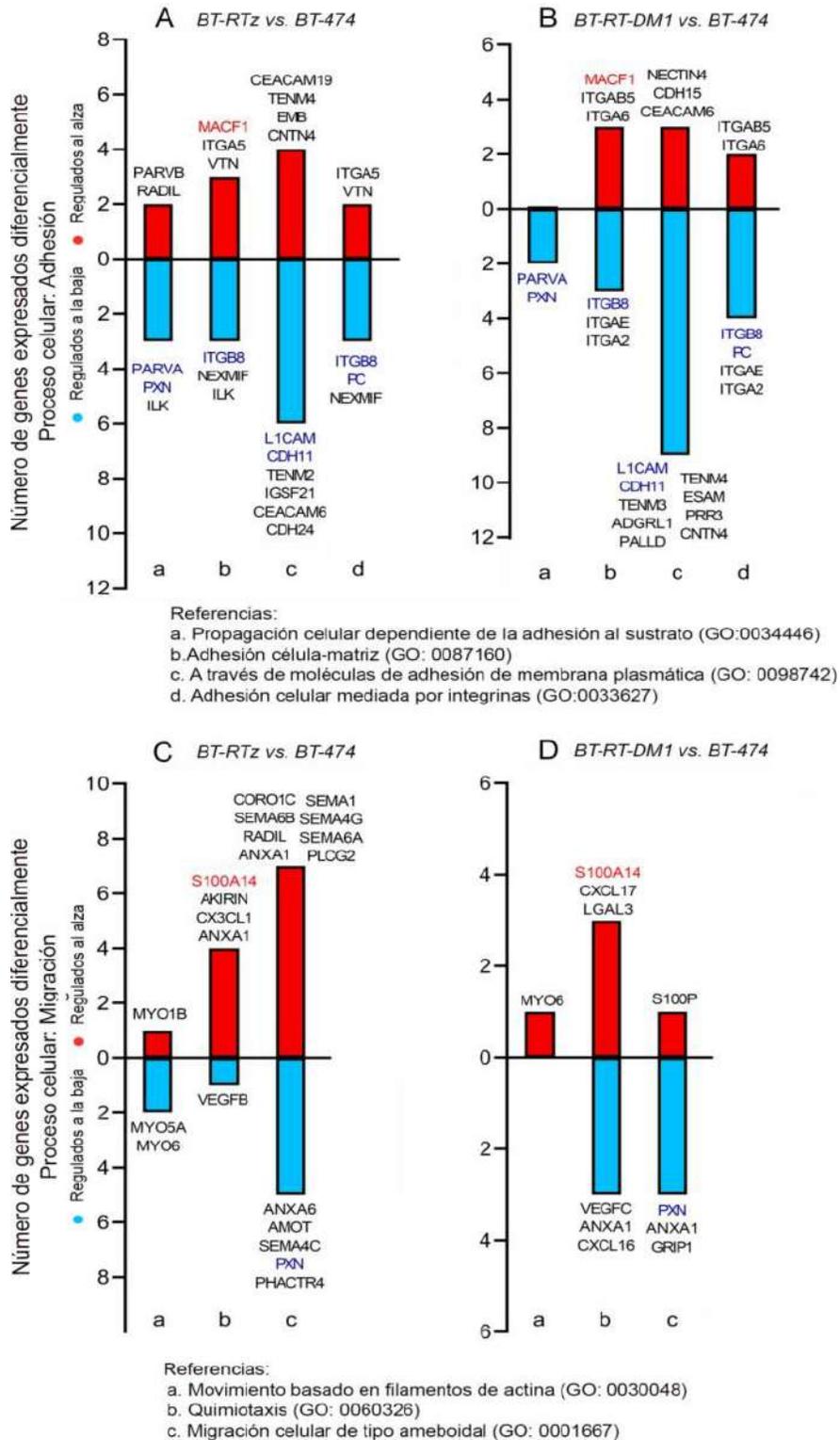


Figura 23: Clasificación ontológica PANTHER. Genes expresados diferencialmente (DEG) en (A, C) células resistentes a Tz vs. sensibles, y (B, D) en células resistentes a T-DM1 vs. sensibles implicados en la (A, B) adhesión y (C, D) la migración celular. Las columnas rojas representan el número de genes regulados al alza, mientras que las celestes indican el número de genes regulados a la baja. Aquellos genes que mostraron el mismo patrón de expresión en ambos modelos resistentes se resaltan en rojo o azul, según estén sobreexpresados o subexpresados, respectivamente.

Selección de conjunto de genes de interés

Además de considerar los resultados obtenidos (*Figura 23*), para continuar el estudio, se tuvieron en cuenta otras consideraciones. Además de considerar los resultados obtenidos (*Figura 23*), para continuar el estudio, se tuvieron en cuenta otras consideraciones.

Del análisis de expresión diferencial se observa que el gen que codifica para paxilina (PXN) se encuentra negativamente regulado en los fenotipos resistentes en comparación con las células parentales. Aunque inicialmente podría parecer poco intuitivo, dado que comúnmente se asume que una regulación positiva de paxilina podría favorecer una mayor migración y un fenotipo más agresivo (resistente), el estudio detallado de los procesos metastásicos, indica que esta suposición no siempre es correcta. El proceso de motilidad celular requiere de una regulación adecuada en la dinámica de ensamblaje y desensamblaje de las adhesiones focales [159]. Una expresión alterada de PXN, ya sea positiva o negativa, afecta dicho proceso. Más aun, encontrar a PXN regulada a la baja no brinda información directa acerca de su expresión proteica y de su estado de fosforilación/activación. De hecho Boyer *et al.* (2013) observaron mediante fosfoproteómica cuantitativa una regulación a la baja en PXN en células BT-474 resistentes a Tz [160]. Los autores postulan que estos resultados pueden deberse a modificaciones en la fosforilación, en la expresión total de la proteína, o una combinación de ambos factores [160]. Por otra parte, una de las principales causas de la resistencia a terapias dirigidas es la plasticidad migratoria [161]. Deakin *et al.* (2010) encontraron que paxilina y una proteína relacionada llamada Hic-5 coordinan la plasticidad migratoria mesenquimal y ameboide [162]. Es probable que en las células resistentes a Tz, en las que paxilina está regulado negativamente, estén operando este mecanismo alternativo de migración.

Teniendo esto en cuenta, al encontrar que la expresión de PXN se encuentra alterada de la misma manera en ambos fenotipos resistentes (*Figura 23*), y que además participa en la modulación de los dos procesos de interés en este estudio, la adhesión y migración (*Figura 23*), se decidió centrar la atención en paxilina y sus interacciones funcionales. Con este objetivo, se utilizó la plataforma STRING, para identificar el interactoma de PXN/paxilina. En este análisis sólo se consideraron aquellas interacciones implicadas en la adhesión y migración celular. Como resultado, se observó que PXN/paxilina interactúa con ERBB2/HER2, SRC, PTK2/FAK, VCL/vinculina y CTTN/cortactina (*Figura 24A*), considerándose este conjunto como el set de interés para los estudios subsiguientes.

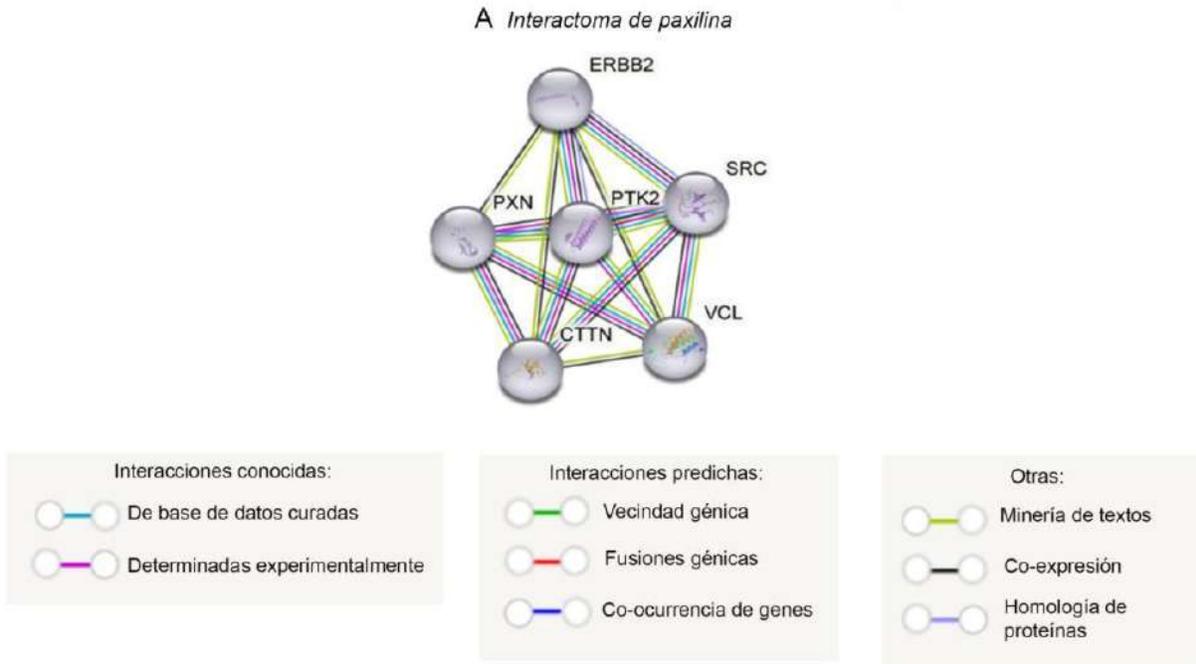


Figura 24: Interactoma de paxilina. Red de interacción proteína-proteína de paxilina (PXN) utilizando STRING. La nomenclatura utilizada en el gráfico es la de los genes implicados. ERBB2, SRC, PTK2, PXN, VCL y CTTN son los genes que codifican para las proteínas HER2, SRC, FAK, paxilina, vinculina y cortactina, respectivamente. Diferentes colores de líneas identifican un tipo de interacción particular.

Conclusión parcial del primer objetivo específico

Los hallazgos presentados hasta este punto revelan modificaciones transcriptómicas en los procesos de adhesión y migración celular asociadas a la resistencia a Tz y T-DM1. En particular, se evidenció una alteración en la expresión de PXN/paxilina en los fenotipos resistentes. Estos resultados podrían sugerir que PXN/paxilina contribuye a la adquisición de resistencia a través de su rol en los procesos de adhesión y migración celular.

Segundo objetivo específico

Evaluar el efecto de Tz/T-DM1, en combinación o no con Lp, en la viabilidad, adhesión y migración de líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivo.

Efecto de terapias dirigidas contra HER2 sobre la viabilidad celular

El empleo de terapias combinadas se ha posicionado como la estrategia principal para abordar la resistencia al tratamiento del cáncer. En este estudio, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular (MTT) con el fin de evaluar el efecto antitumoral de terapias dirigidas contra HER2 y el tipo de interacción farmacológica existente entre las drogas

combinadas. Para ello, las células BT-474 y SKBR3 fueron expuestas a Tz, T-DM1 y Lp en distintas concentraciones (0,1 – 100 µg/ml), tanto como agentes individuales como en combinación (Tz/T-DM1 + Lp), durante un periodo de 72 horas.

Efecto antitumoral de las terapias dirigidas:

En las células BT-474, se observó que todos los tratamientos testeados, excepto 0,1 µg/ml de Tz, inhibieron la viabilidad celular (*Figura 25A*). El efecto de cada tratamiento fue dosis-dependiente, es decir, al aumentar la concentración de la droga se apreció una mayor inhibición de la viabilidad (*Figura 25A*).

En las células SKBR3, todos los tratamientos redujeron la viabilidad celular, excepto la concentración más baja testada de Tz y T-DM1 (0,1 µg/ml) (*Figura 25B*). El comportamiento en la línea SKBR3 fue dependiente de la concentración para T-DM1, Lp y las combinaciones (Tz + Lp y T-DM1 + Lp), no así en los tratamientos con Tz, donde se observó una estabilización del efecto inhibitorio en el rango 10-100 µg/ml (*Figura 25B*).

En relación con la eficacia de las terapias dirigidas contra HER2, se analizó la capacidad de los diferentes tratamientos para lograr la inhibición del 50% de la viabilidad celular. En ambas líneas celulares, se observó que los tratamientos que resultaron más eficaces, es decir alcanzaron el 50% de inhibición a concentraciones más bajas, fueron aquellos basados en Lp, ya sea como monodroga o en las combinaciones Tz + Lp y T-DM1 + Lp (*Figura 25A-B*).

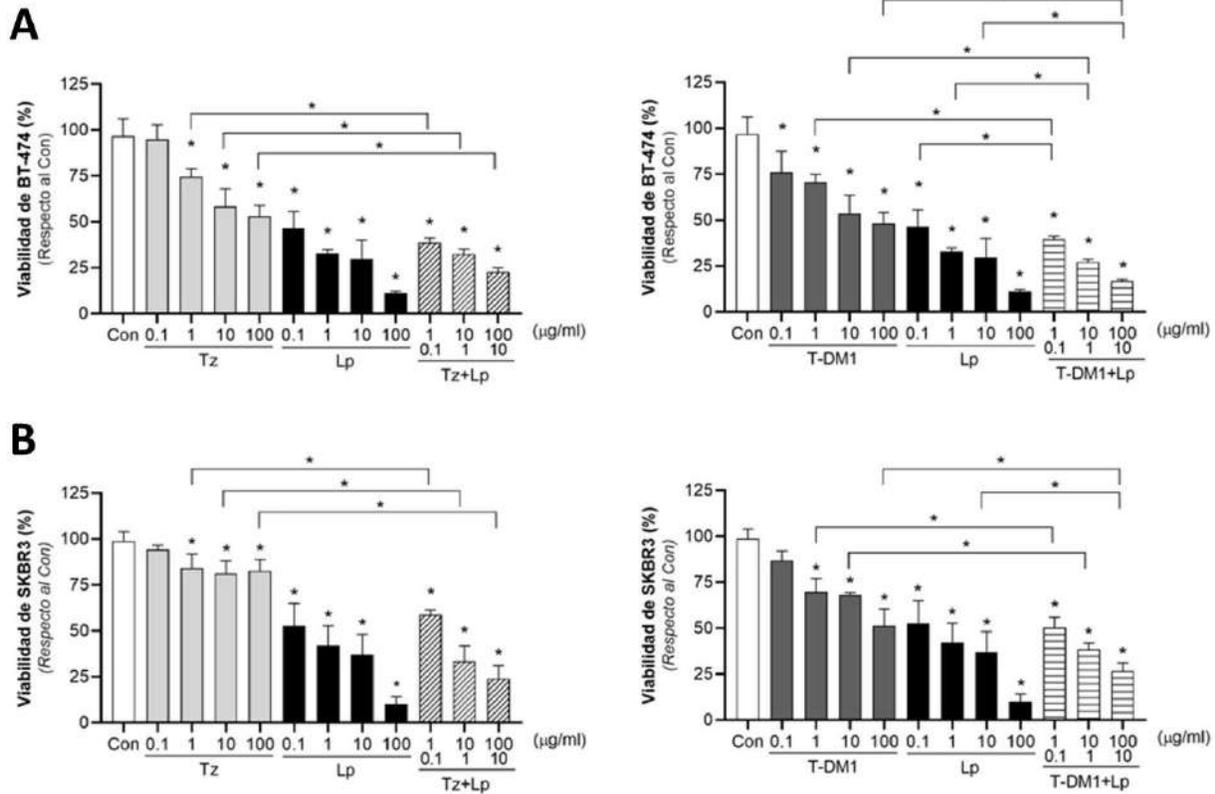


Figura 25: Efecto de tratamientos dirigidos contra HER2 en la viabilidad celular de BT-474 y SKBR3. La viabilidad celular se evaluó mediante ensayo MTT en células (A-B) BT-474 y (C-D) SKBR3. Las células se trataron con concentraciones crecientes (0,1-100 µg/ml) de Tz, T-DM1, Lp y sus combinaciones (Tz + Lp y T-DM1 + Lp) en una relación constante de 10:1 µg/ml durante 72 horas. Los resultados se expresaron como porcentaje (%) de células viables en comparación con el control (Con, 100% de viabilidad). * = p < 0,05. Los asteriscos sobre las barras indican diferencias significativas respecto al control. Los asteriscos sobre las líneas indican diferencias significativas entre los tratamientos combinados vs. monodroga.

Análisis de interacción farmacológica: Método de Combinación de Umbrales Subyacentes

A partir de los efectos obtenidos en la viabilidad celular con cada tratamiento, se evaluó si la interacción entre las drogas combinadas era favorable mediante el método de combinación de umbrales subyacentes. Este método considera que el efecto de la combinación es positivo respecto a ambas monodrogas cuando la comparación estadística resulta en un $p < 0,05$. Teniendo esto en cuenta, que la combinación muestre diferencias estadísticamente significativas vs. sólo una de las drogas combinadas no es suficiente para inferir un tipo de interacción favorable (sinergismo).

En las células BT-474 no se evidenciaron interacciones favorables para la combinación de Tz y Lp (*Figura 25A*). Sin embargo, se observó sinergismo en la combinación de T-DM1 y Lp en todas las dosis testeadas (*Figura 25A*).

En la línea celular SKBR3, no se observaron efectos significativos para la combinación Tz+Lp vs. ambas monodrogas en el rango de concentración estudiado (*Figura 25B*). Mientras que para el tratamiento combinado T-DM1+Lp, únicamente se observó un efecto superior al de ambas monodrogas a la máxima concentración testada de 100 µg/ml de T-DM1 + 10 µg/ml de Lp (*Figura 25B*).

Análisis de interacción farmacológica: Método de Chou-Talalay

Actualmente no hay consenso entre la comunidad científica con respecto al modelo más apropiado para el análisis de interacción farmacológica. Además, debido a que el método de combinación de umbrales subyacentes es menos preciso y tiene varias limitaciones como no detectar sinergismo si el mismo es modesto y no permitir el cálculo de un índice de combinación (CI) (*Figura 17*), se realizó nuevamente el análisis de interacción farmacológica entre las drogas combinadas, esta vez mediante el método de Chou-Talalay.

Con este objetivo, a partir de los datos obtenidos del ensayo de viabilidad por MTT se calculó la fracción afectada [$F_a = 1 - (\% \text{ viabilidad}/100)$] para cada tratamiento testado y mencionados valores fueron cargados en el software CompuSyn®. Esta herramienta permitió determinar la existencia de efecto sinérgico/antagónico/aditivo en las drogas combinadas a partir del índice de combinación (CI).

En las células BT-474, los valores obtenidos de CI para las dosis de 1-0,1 µg/ml y 10-1 µg/ml de Tz + Lp fueron de 0,23 y 0,69 respectivamente, lo que indica una interacción

sinérgica (*Tabla 3, resaltado en rojo*). Mientras tanto, el valor de CI para la dosis 100-10 µg/ml de Tz + Lp fue de 1,18 señalando un efecto aditivo (*Tabla 3*). En el tratamiento combinado de T-DM1 + Lp, los valores de CI fueron de 0,27 para todas las dosis testeadas, mostrando una acción sinérgica (*Tabla 3, resaltado en rojo*).

Tabla 3: Análisis del tipo de interacción farmacológica por CompuSyn® en células BT-474

Combinación	Concentración Tz/T-DM1		Concentración Lp	Fa	CI	Tipo de interacción
Tz + Lp	1	+	0,1	0,61	0,23	Sinergismo
	10	+	1	0,68	0,69	Sinergismo
	100	+	10	0,77	1,18	Efecto aditivo
T-DM1 + Lp	1	+	0,1	0,60	0,27	Sinergismo
	10	+	1	0,73	0,27	Sinergismo
	100	+	10	0,83	0,27	Sinergismo

Nota: Las dosis de cada fármaco se encuentran en µg/ml. Fa: fracción afectada. CI: Índice de combinación. Las interacciones de interés en oncología, sinérgicas o aditivas, se encuentran resaltadas en rojo.

Por otro lado, en las células SKBR3, la combinación Tz + Lp mostró un efecto aditivo a la concentración de 1-0,1 µg/ml (CI= 1,08), y sinérgico a 10-1 µg/ml y 100-10 µg/ml (CI= 0,34 y 0,82 respectivamente) (*Tabla 4, resaltado en rojo*). Respecto a la combinación T-DM1 + Lp, los valores de CI mostraron sinergismo para las dosis de 1-0,1 µg/ml y 10-1 µg/ml (CI= 0,34 y 0,81 respectivamente) (*Tabla 4, resaltado en rojo*). Por el contrario, a la dosis más alta testada de 100-10 µg/ml, las drogas combinadas manifestaron un efecto antagónico (CI= 1,37) (*Tabla 4*).

Tabla 4: Análisis del tipo de interacción farmacológica por CompuSyn® en células SKBR3

Combinación	Concentración Tz/T-DM1		Concentración Lp	Fa	CI	Tipo de interacción
Tz + Lp	1	+	0,1	0,41	1,08	Efecto aditivo
	10	+	1	0,67	0,34	Sinergismo
	100	+	10	0,76	0,82	Sinergismo
T-DM1 + Lp	1	+	0,1	0,50	0,34	Sinergismo
	10	+	1	0,61	0,81	Sinergismo
	100	+	10	0,73	1,37	Antagonismo

Nota: Las dosis de cada fármaco se encuentran en µg/ml. Fa: fracción afectada. CI: Índice de combinación. Las interacciones de interés en oncología, sinérgicas o aditivas, se encuentran resaltadas en rojo.

Como puede observarse, los resultados obtenidos en cuanto al tipo de interacción farmacológica entre las drogas combinadas varían dependiendo del método empleado. Considerando la mayor precisión de los métodos basados en dosis-efecto en comparación con aquellos basados únicamente en efecto [148, 163], así como la bibliografía existente sobre la interacción entre Tz y Lp [71], decidimos utilizar para los experimentos posteriores una concentración de 1 µg/ml de Tz/T-DM1 + 0,1 µg/ml de Lp. Estas bajas concentraciones en los tratamientos combinados demostraron ser efectivas, logrando inhibiciones de la

viabilidad celular cercanas al 50%. De esta manera, se evita emplear concentraciones más altas y potencialmente tóxicas. Además, este trabajo busca explorar los efectos de las terapias anti-HER2 combinadas a concentraciones menores que las comúnmente estudiadas en la literatura.

Efecto de terapias dirigidas contra HER2 sobre la adhesión celular

A continuación, se exploró el impacto de las terapias dirigidas contra HER2 en procesos celulares críticos para el establecimiento de metástasis, como la adhesión. La adhesión celular es fundamental tanto en el desprendimiento inicial de las células cancerosas del tumor primario, así como en su posterior adhesión en sitios distantes para llevar a cabo la colonización [151]. Con este fin, las células BT-474 y SKBR3 fueron expuestas a 1 µg/ml de Tz, 1 µg/ml de T-DM1 y 0,1 µg/ml de Lp durante 72 horas. Se analizó el efecto de estas terapias administradas como monodrogas y combinadas (Tz + Lp y T-DM1 + Lp).

En las células BT-474, se observó que Tz y T-DM1 no afectaron significativamente la adhesión celular en comparación con el control. En contraste, Lp indujo una inhibición de la adhesión del 44% (*Figura 26A-B*). En los tratamientos combinados, se observaron los mayores efectos inhibitorios, con una reducción de la adherencia del 66% con Tz + Lp y del 62% con T-DM1 + Lp (*Figura 26A-B*). Se evidenció que los tratamientos combinados (Tz + Lp y T-DM1 + Lp) potencian los efectos inhibitorios de las drogas individuales, lo que resultó en una disminución estadísticamente significativa y mayor de la adhesión celular en comparación con las monodrogas (*Figura 26A-B*).

Por otro lado, en las células SKBR3, se evidenció que Tz no tuvo un impacto significativo en la adhesión celular en comparación con el control (*Figura 26A-C*). Sin embargo, T-DM1, Lp, Tz + Lp y T-DM1 + Lp inhibieron eficazmente la adhesión celular en un 28%, 73%, 82% y 61%, respectivamente (*Figura 26A-C*). Además, Tz + Lp mejoró el efecto inhibitorio en la capacidad de adhesión de las células en comparación con Tz y Lp como monodrogas. En cambio, la combinación T-DM1 + Lp no resultó superior a las monodrogas en la inhibición de la adhesión dado que Lp como monodroga obtuvo un porcentaje de inhibición mayor (*Figura 26A-C*).

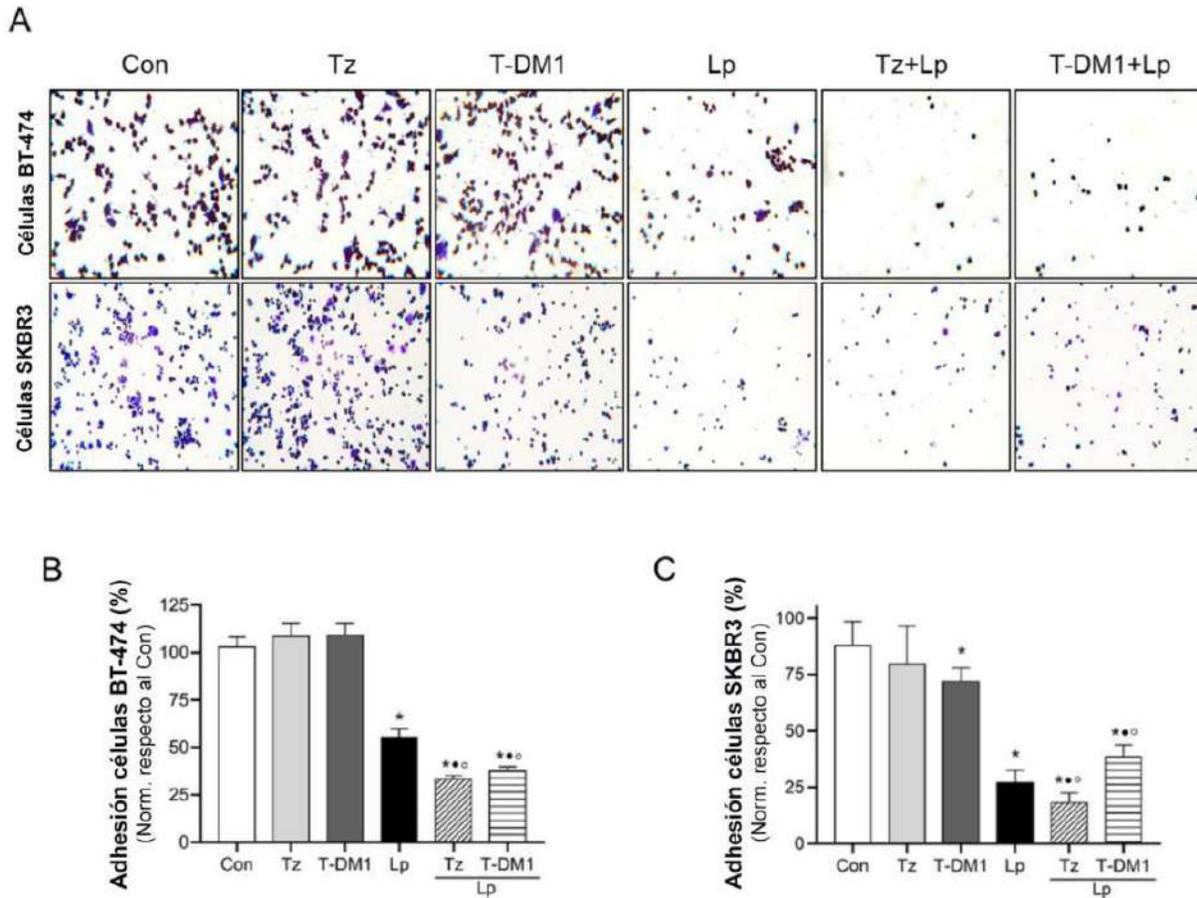


Figura 26: Impacto de terapias dirigidas contra HER2 en la adhesión celular. Las células SKBR3 y BT-474 se trataron con Tz (1 µg/ml), T-DM1 (1 µg/ml), Lp (0,1 µg/ml) o sus combinaciones (Tz + Lp y T-DM1 + Lp) durante 72 horas, y se realizó un ensayo de adhesión a un sustrato. **(A)** Se muestran imágenes representativas de células adheridas a gelatina (sustrato) respecto al control (Con) para cada condición experimental. Las células adheridas fueron cuantificadas mediante mediciones de absorbancias a 570nm. Los resultados de adhesión se expresaron como porcentaje de células adheridas frente a las células control (Con). Se muestra cuantificación y análisis estadístico en **(B)** células BT-474 y **(C)** células SKBR3. * = $p < 0,05$ frente a control, • = $p < 0,05$ en tratamientos combinados frente a Tz/T-DM1, y ○ = $p < 0,05$ en tratamientos combinados frente a Lp.

Efecto de terapias dirigidas contra HER2 sobre la migración celular

Luego, se evaluó el impacto de las terapias dirigidas contra HER2 en otro proceso crítico para el establecimiento de las metástasis, como es la migración celular. Durante la progresión tumoral, las células cancerosas adquieren la capacidad de migrar. Esto les permite avanzar desde el tumor primario, invadir los tejidos circundantes, ingresar al torrente sanguíneo o linfático, y establecer colonias metastásicas en sitios distantes del cuerpo [164].

Las células SKBR3 fueron expuestas a 1 µg/ml de Tz, 1 µg/ml de T-DM1 y 0,1 µg/ml de Lp, tanto de forma individual como combinadas (Tz + Lp y T-DM1 + Lp), para evaluar el

cierre de la herida después de un periodo de exposición de 72 horas. Se utilizó exclusivamente el modelo experimental de las células SKBR3, ya que la línea celular BT-474 presenta una capacidad migratoria reducida.

Los ensayos revelaron que los tratamientos con las monodrogas Tz, T-DM1 y Lp redujeron la migración de las células SKBR3 en un 34%, 38% y 25%, respectivamente en comparación con el control. Por otro lado, las combinaciones, Tz + Lp y T-DM1 + Lp, lograron inhibiciones del 59 y 51%, respectivamente (*Figura 27A-B*). Además, se observó que la combinación de Tz + Lp potencia significativamente los efectos inhibitorios en comparación con los tratamiento basado en monodrogas. Por otro lado, la combinación T-DM1 + Lp, no resultó superior a ambas monodrogas en la inhibición de la adhesión dado que no se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto a T-DM1 (*Figura 27A-B*).

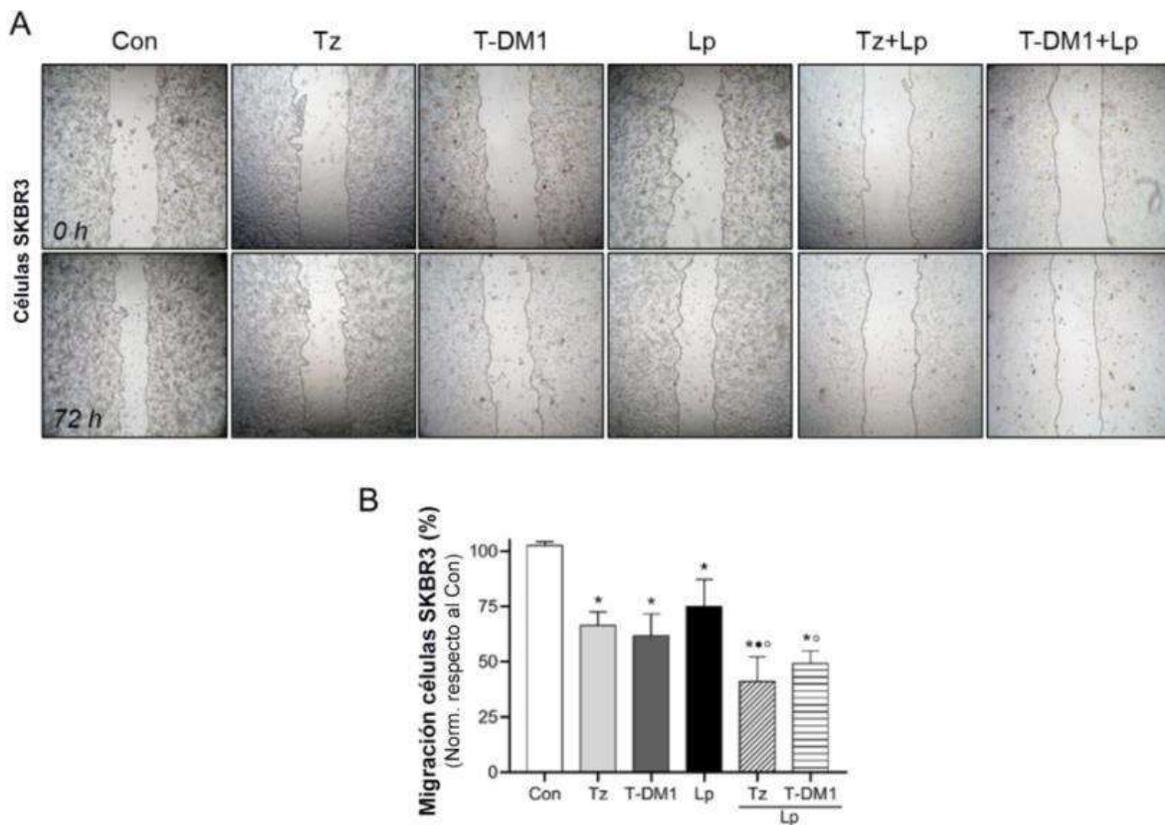


Figura 27: Impacto de terapias dirigidas contra HER2 en la migración celular. Las células SKBR3 se trataron con Tz (1 µg/ml), T-DM1 (1 µg/ml), Lp (0,1 µg/ml) y sus combinaciones (Tz + Lp y T-DM1 + Lp) durante 72 horas, y se realizó un ensayo de migración. **(A)** Se muestran imágenes representativas del ensayo de cierre de la herida para cada condición experimental. **(B)** Los resultados de migración se expresaron como porcentaje de migración en cada condición experimental frente al control (Con). * = p < 0,05 frente a control, • = p < 0,05 en tratamientos combinados frente a Tz/T-DM1, y o = p < 0,05 en tratamientos combinados frente a Lp.

Conclusión parcial del segundo objetivo específico

Estos hallazgos demuestran que Tz y T-DM1 pueden administrarse junto con Lp a bajas concentraciones dando lugar a combinaciones favorables (sinérgicas/aditivas) que permiten obtener efectos inhibitorios considerables sobre la viabilidad, adhesión y migración de células de cáncer de mama HER2 positivo (*Figura 28*).

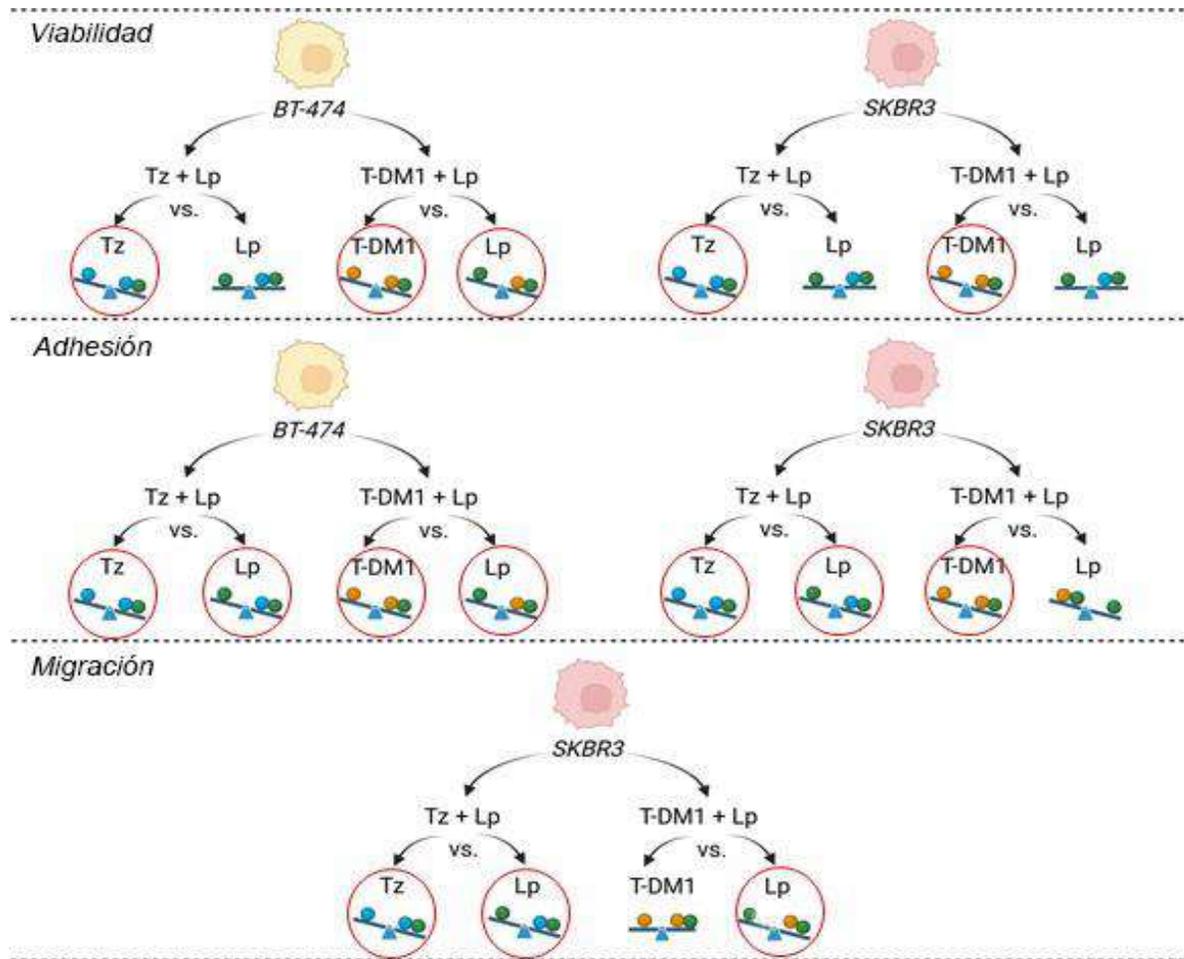


Figura 28: Esquema representativo de la conclusión parcial del segundo objetivo específico. Efectos de las combinaciones respecto a las monodrogas sobre la viabilidad, adhesión y migración en células BT-474 y SKBR3. Con un círculo rojo se destacan las condiciones en las que las combinaciones resultaron superiores respecto a una o ambas monodrogas.

Tercer objetivo específico

Identificar de qué manera las terapias dirigidas contra HER2, combinadas o no, modulan la expresión de proteínas vinculadas a procesos celulares que subyacen a la metástasis.

Efecto de terapias dirigidas contra HER2 en el perfil de expresión de proteínas moduladoras de la adhesión y migración en células de cáncer de mama HER2 positivo

A continuación se evaluó el impacto de las terapias dirigidas contra HER2 en el perfil de expresión del conjunto de interés seleccionado previamente: HER2, FAK, SRC, paxilina, vinculina y cortactina (*Figura 24*). Estas proteínas, modulan los procesos de adhesión y migración, y por ende, la cascada metastásica. Con este propósito, las células BT-474 y SKBR3 fueron expuestas a 1 µg/ml de Tz, 1 µg/ml de T-DM1 y 0,1 µg/ml de Lp, tanto de forma individual como en combinación, durante un periodo de 72 horas para realizar ensayos de western blots.

En las células BT-474 se observó que Tz y T-DM1 no afectaron la expresión de HER2 en comparación con el control (*Figura 29A-B*). A su vez, los tratamientos de Tz y T-DM1, indujeron una regulación a la baja de las proteínas quinasas SRC y FAK (*Figura 29A, C-D*). Sin embargo, no afectaron la expresión de las proteínas posteriores en la vía como paxilina, vinculina y cortactina (*Figura 29A, E-G*). Por otro lado, Lp como monoterapia, indujo la expresión de HER2, SRC, paxilina y cortactina (*Figura 29A-C, E, G*). Este efecto fue inesperado ya que el Lp es un TKI (*Figura 29A, D*). Las combinaciones, (Tz + Lp y T-DM1+ Lp) no modificaron la expresión del receptor HER2 en comparación con el control (*Figura 29A-B*), pero sí inhibieron eficientemente la expresión de las proteínas corriente abajo de HER2 como SRC, FAK y vinculina (*Figura 29A-D, F*). El tratamiento combinado de T-DM1 + Lp redujo también la expresión de paxilina y cortactina (*Figura 29A, E, G*).

En resumen, en la línea celular BT-474, en general Tz y T-DM1 exhibieron un efecto inhibitorio sobre la expresión de la expresión de proteínas, mientras que Lp indujo la expresión de las mismas. Sin embargo, al combinar Tz o T-DM1 con Lp, prevalecen los efectos inhibitorios de Tz y T-DM1 sobre los efectos inductores de Lp. Esto se refleja en la inhibición persistente de la expresión de SRC y FAK, así como en la disminución de la expresión de HER2 a niveles basales. Además, en las combinaciones, se observa adicionalmente la inhibición de la expresión de vinculina en el caso de Tz + Lp, y de cortactina en el caso de T-DM1 + Lp (*Figura 29A-G*). Estos resultados sugieren que en BT-474 Lp, como monofármaco, es ineficaz debido a que induce la expresión de proteínas oncogénicas; y que las combinaciones son más eficientes en inducir la regulación a la baja de proteínas críticas implicadas en la metástasis.

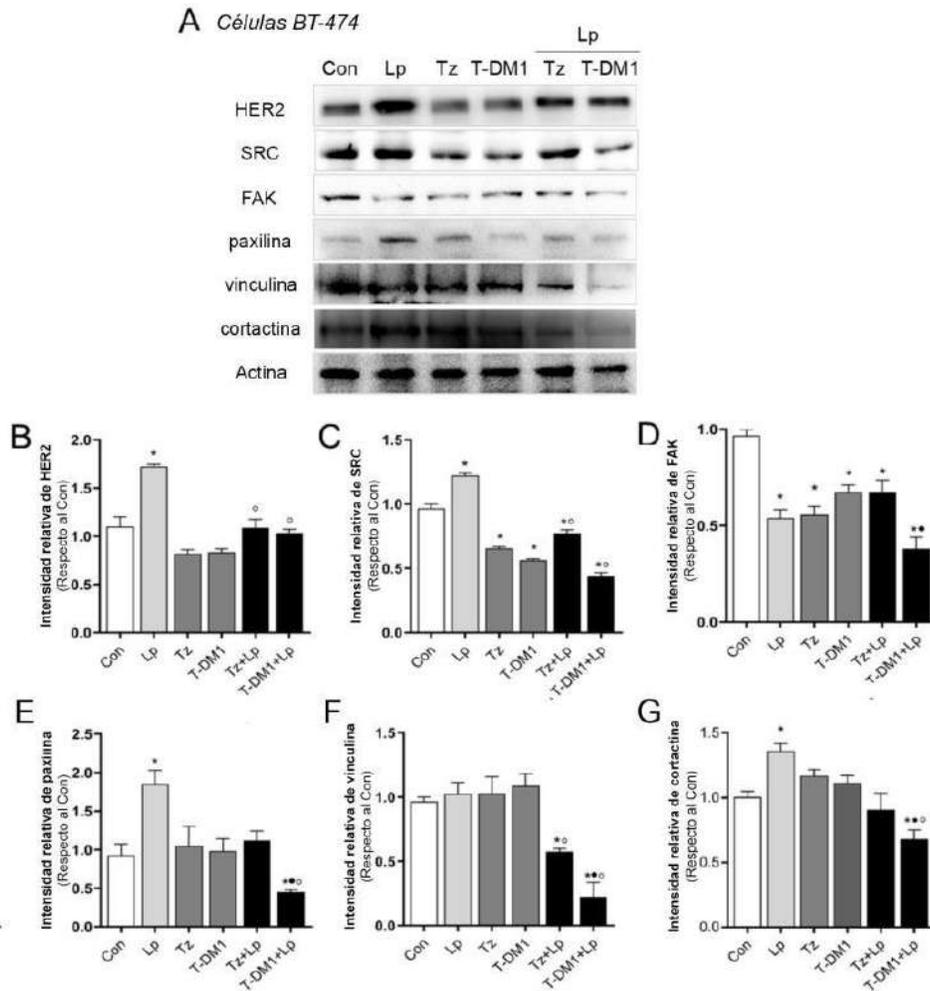


Figura 29: Efecto de tratamientos dirigidos contra HER2 sobre la expresión de proteínas moduladoras de la adhesión y migración en células BT-474. (A) Las células BT-474 se expusieron a Tz (1 µg/ml), T-DM1 (1 µg/ml), Lp (0,1 µg/ml) y sus combinaciones (Tz + Lp y T-DM1 + Lp) durante 72 horas, y se analizó la expresión de HER2, SRC, FAK, paxilina, vinculina y cortactina mediante ensayos de western blots. La expresión de actina se utilizó como control de carga. (B-G) Densitometrías de las bandas de HER2, SRC, FAK, paxilina, vinculina y cortactina respectivamente. Los valores de intensidad se ajustaron a los correspondientes valores de intensidad de actina y luego se normalizaron con respecto al control, Con. * = $p < 0,05$ en tratamientos vs. control, • = $p < 0,05$ en tratamientos combinados vs. Tz/T-DM1, y ◦ = $p < 0,05$ en tratamientos combinados vs. Lp.

En las células SKBR3, tanto Tz como T-DM1 produjeron una reducción en la expresión de HER2 y FAK (Figura 30A-C), y sorprendentemente, un aumento en la expresión de SRC (Figura 30A-B). Sin embargo, las proteínas paxilina, vinculina y cortactina no experimentaron cambios significativos en su expresión luego del tratamiento con Tz o T-DM1 (Figura 30A, E-G). Por otro lado, el tratamiento de las células SKBR3 con Lp produjo una inhibición en la expresión de HER2, FAK y paxilina (Figura 30A, C-D), y no afectó el nivel de expresión de SRC, vinculina y cortactina en comparación con el control (Figura 30A-B, F-G). Las combinaciones (Tz + Lp y T-DM1 + Lp) mostraron efectos similares entre sí, inhibiendo la expresión de HER2, SRC, FAK y paxilina (Figura 30A-D). En los

tratamientos combinados fue donde se logró la mayor inhibición de la expresión de las proteínas de interés (*Figura 30A-D*).

En resumen, en las células SKBR3, al igual que lo que sucede con las células BT-474, los tratamientos con Tz, T-DM1 y las combinaciones (Tz + Lp y T-DM1 + Lp) exhiben efectos inhibitorios sobre la expresión de las proteínas de interés. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en BT-474, el tratamiento de Lp en células SKBR3, no muestra efectos inductores (*Figura 29-30*).

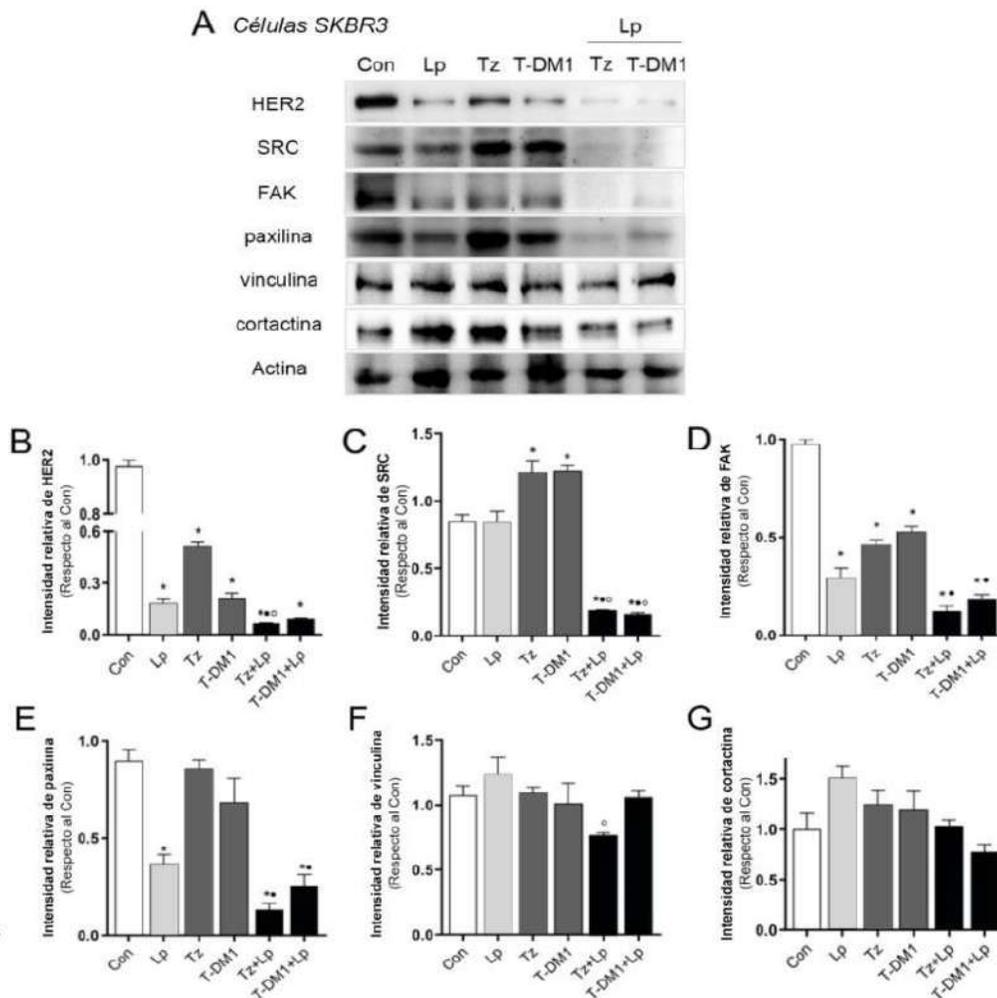


Figura 30: Efecto de tratamientos dirigidos contra HER2 sobre la expresión de proteínas moduladoras de la adhesión y migración en células SKBR3. (A) Las células SKBR3 se expusieron a Tz (1 µg/ml), T-DM1 (1 µg/ml), Lp (0,1 µg/ml) y sus combinaciones (Tz + Lp y T-DM1 + Lp) durante 72 horas, y se analizó la expresión de HER2, SRC, FAK, paxilina, vinculina y cortactina mediante ensayos de western blots. La expresión de actina se utilizó como control de carga. (B-G) Densitometrías de las bandas de HER2, SRC, FAK, paxilina, vinculina y cortactina respectivamente. Los valores de intensidad se ajustaron a los correspondientes valores de intensidad de actina y luego se normalizaron con respecto al control, Con. * = $p < 0,05$ en tratamientos vs. control, • = $p < 0,05$ en tratamientos combinados vs. Tz/T-DM1, y o = $p < 0,05$ en tratamientos combinados vs. Lp.

Conclusión parcial del tercer objetivo específico

Los resultados sugieren que las combinaciones de Tz + Lp y T-DM1 + Lp son eficientes regulando negativamente la expresión de proteínas implicadas en los procesos de adhesión y migración celular que subyacen a la metástasis (Figura 31).

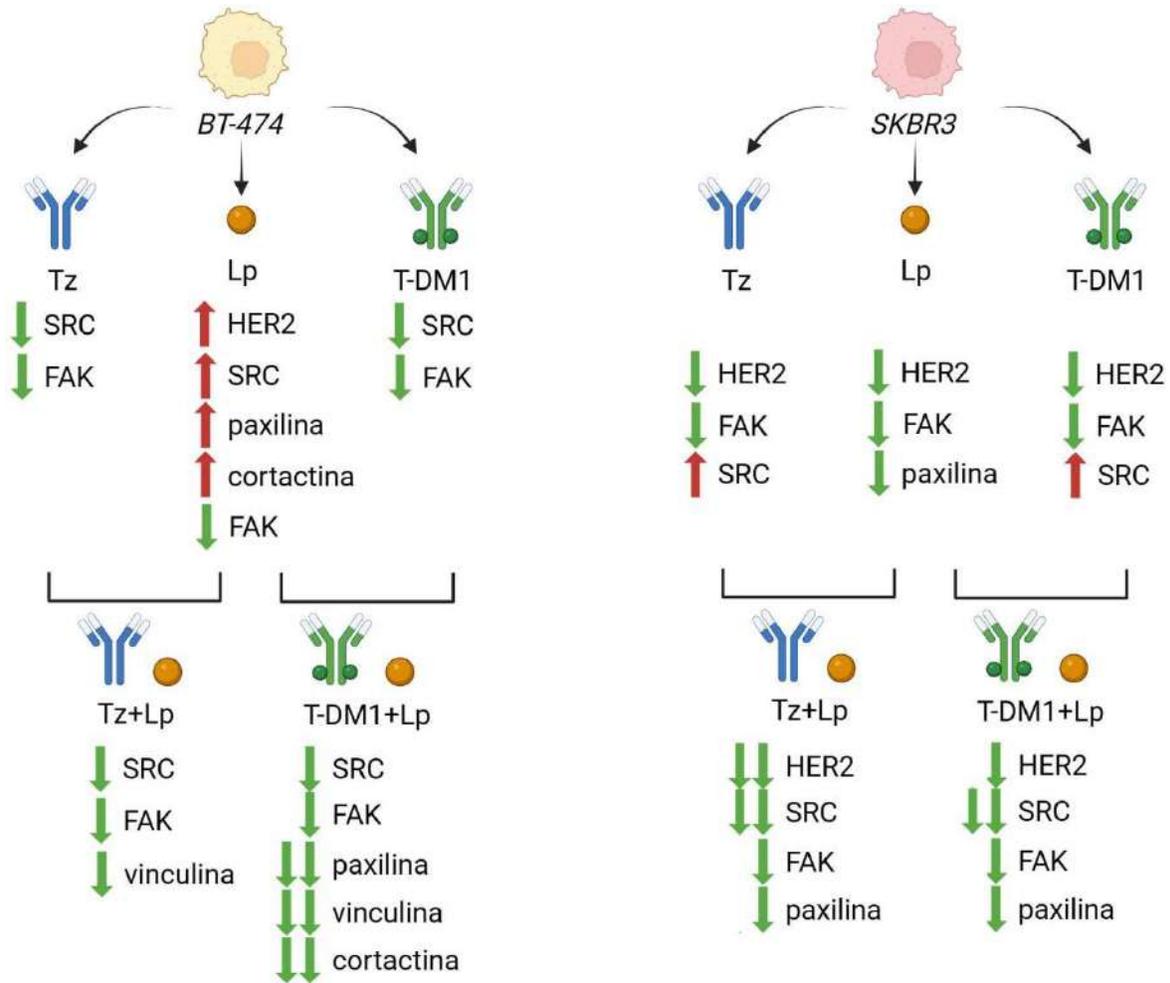


Figura 31: Esquema representativo de la conclusión parcial del tercer objetivo específico. Efectos de las combinaciones y las monodrogas sobre la expresión de proteínas implicadas en la adhesión y migración en células BT-474 y SKBR3. La doble flecha simboliza aquellos casos en los que los efectos de la combinación resultaron estadísticamente superior a ambas monodrogas.

Cuarto objetivo específico

Determinar en células tumorales mamarias HER2 positivas, luego del tratamiento con Tz/T-DM1, en combinación o no con Lp, la localización celular de proteínas claves.

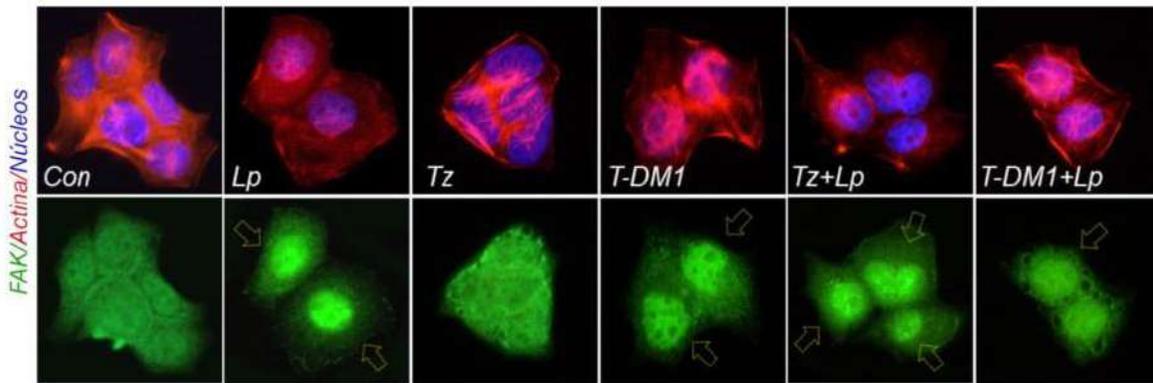
Efecto de terapias dirigidas contra HER2 sobre la localización celular de FAK en células SKBR3 y BT-474

La función de las proteínas depende en gran medida de su localización en la célula. Es por ello que mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta se evaluó el impacto de 1 $\mu\text{g/ml}$ de Tz, 1 $\mu\text{g/ml}$ de T-DM1 y 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de Lp, administrados individualmente o en combinación (Tz + Lp y T-DM1 +Lp), en la distribución de FAK. La quinasa FAK es un marcador de la migración celular, específicamente cumple un rol fundamental en la formación de las FA [108].

El estudio de la distribución subcelular de FAK reveló cambios significativos en respuesta a las terapias dirigidas contra HER2. En las células BT-474 sin tratar, controles, se visualizó una distribución homogénea de FAK en el citoplasma y el núcleo al igual que en la condición de Tz. En presencia de Lp, T-DM1 y las combinaciones Tz + Lp y T-DM1 + Lp se observó una translocación de FAK al núcleo (*Figura 32A, indicado con flechas*).

Similarmente, en las células SKBR3, se evidenció la translocación nuclear de FAK en todos los tratamientos con terapias dirigidas contra HER2, ya sea como monodrogas o en combinación (*Figura 32B, indicado con flechas*).

A Células BT-474



B Células SKBR3

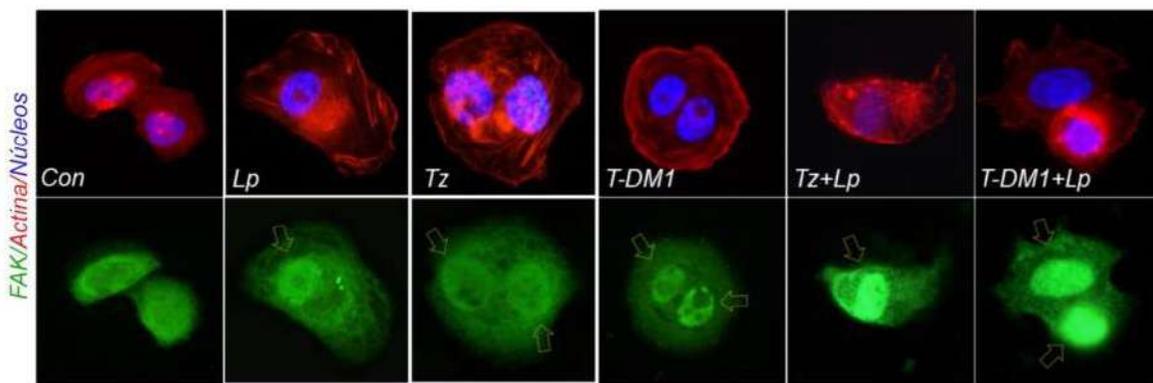


Figura 32: Redistribución de la localización celular de FAK tras los tratamientos dirigidos contra HER2. Luego de la administración con Tz (1 µg/ml), T-DM1 (1 µg/ml), Lp (0,1 µg/ml) y sus combinaciones (Tz + Lp y T-DM1 + Lp) durante 72 horas **(A)** las células BT-474 y **(B)** las células SKBR3 se sometieron a un ensayo de inmunofluorescencia indirecta marcando FAK con el fluoróforo Alexa Fluor 488 (verde), marcando los filamentos de actina con Texas Red-Phalloidin (rojo), y marcando los núcleos con DAPI (azul). Las flechas amarillas señalan la translocación nuclear de FAK.

La confirmación de la localización nuclear de FAK luego de los tratamientos dirigidos contra HER2 se obtuvo mediante ensayos de fraccionamiento celular. Este proceso implicó la aplicación de centrifugaciones a alta velocidad para separar, en células SKBR3 tratadas con terapias dirigidas contra HER2, ya sea de forma individual o en combinación, la fracción nuclear y la citoplasmática. Este enfoque permitió analizar la expresión de FAK en cada localización celular por separado. Se observó una disminución significativa de la expresión de FAK en la fracción citoplasmática con los tratamientos anti-HER2, mientras que se registró un aumento de su expresión en la fracción nuclear (*Figura 33A*). Este resultado confirma la redistribución nuclear de FAK inducida por las terapias dirigidas contra HER2.

A su vez, este hallazgo fue validado mediante microscopía confocal, la cual permite explorar múltiples planos focales de forma secuencial. Así, se confirmó la redistribución nuclear de FAK inducida por las terapias dirigidas contra HER2. Esto se evidencia en los gráficos de intensidad de fluorescencia vs. distancia (*Figura 33B-C*), donde se observa la colocalización de la fluorescencia verde (FAK-FITC) y azul (núcleo-DAPI) en los tratamientos que inducen la translocación (*Figura 33C*), en contraste con la falta de colocalización en el control (*Figura 33B*).

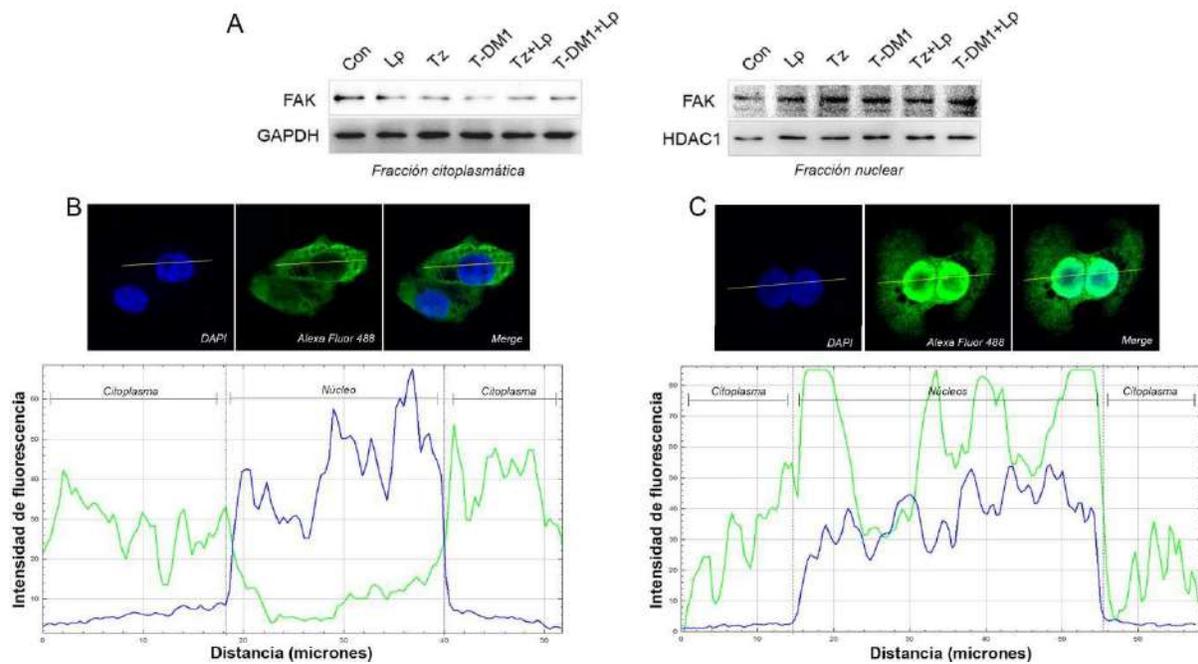


Figura 33: Distribución celular de FAK. (A) Se realizaron ensayos de fraccionamiento celular para separar la fracción nuclear de la citoplasmática para analizar en cada una de ellas la expresión de FAK mediante western blot para FAK. Como control de carga y pureza para la fracción citoplasmática se utilizó GAPDH, mientras que para la fracción nuclear se utilizó HDAC1. (B-C) Se muestran imágenes representativas tomadas con microscopio confocal de dos condiciones experimentales con comportamientos diferentes sobre la localización de FAK; (B) células SKBR3 del grupo control donde FAK se distribuye tanto en núcleo como en citoplasma, y (C) células SKBR3 de la condición experimental Tz + Lp, que al igual que en el resto de los tratamientos que implican una terapia dirigida contra HER2, FAK se encuentra enriquecido en la fracción nuclear.

Efecto de terapias dirigidas contra HER2 sobre la localización celular de cortactina en células SKBR3

A continuación, se evaluó mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta la distribución celular de cortactina tras la exposición de las células SKBR3 a 1 µg/ml de Tz, 1 µg/ml de T-DM1 y 0,1 µg/ml de Lp, administrados individualmente o en combinación (Tz + Lp y T-DM1 +Lp) durante 72 horas. Cortactina es un marcador de la migración celular ya que actúa induciendo la nucleación actínica, necesaria para la formación de estructuras especializadas que facilitan el movimiento celular [165].

Se evidenció que cortactina se distribuye homogéneamente por toda la célula en la condición de control. Tras la exposición a los tratamientos con Tz, T-DM1 y Lp, se evidenció su redistribución hacia la región perinuclear. Este efecto de redistribución hacia la región perinuclear se observó potenciado en los tratamientos combinados (*Figura 34A-B*).

A Células SKBR3

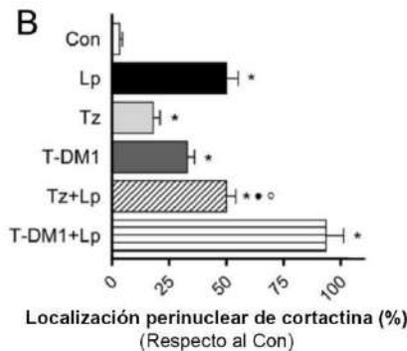
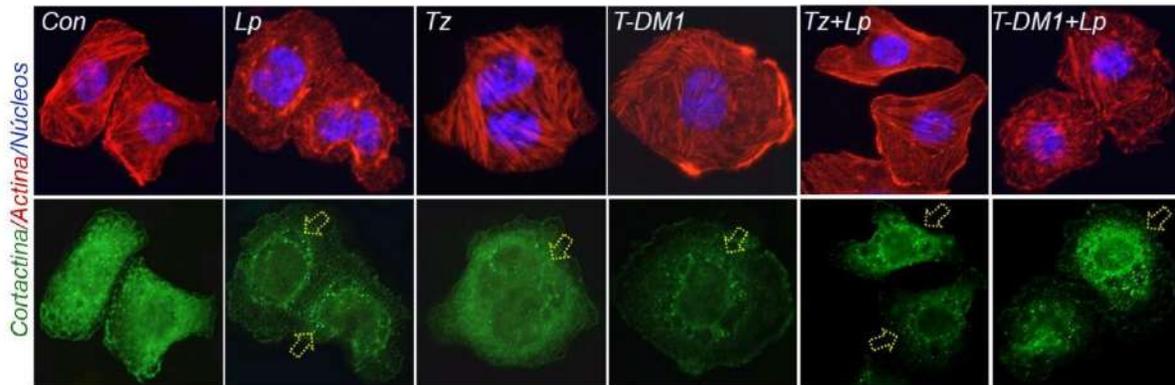


Figura 34: Redistribución de la localización celular de cortactina tras los tratamientos dirigidos contra HER2. (A) Se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta en células SKBR3, marcando cortactina con el fluoróforo Dylight 488 (verde), los filamentos de actina con Texas Red-Phalloidin (rojo), y los núcleos con DAPI (azul). Las flechas amarillas indican la redistribución perinuclear de cortactina. **(B)** Cuantificación de células con cortactina perinuclear en las diferentes condiciones, normalizada respecto al control, Con. Para realizar la cuantificación se analizó la localización de cortactina en 40 células para cada condición experimental. * = $p < 0,05$ tratamientos vs. control, • = $p < 0,05$ tratamientos combinados vs. Tz/T-DM1, y o = $p < 0,05$ tratamientos combinados vs. Lp.

Conclusión parcial del cuarto objetivo específico

Estos hallazgos sugieren que las terapias dirigidas contra HER2, y en mayor medida las combinaciones de estas, reducen la disponibilidad de FAK y cortactina en las FA. La ausencia de estas proteínas en las FA disminuye las posibilidades de movimiento celular, y por ende, de metástasis (*Figura 35*).

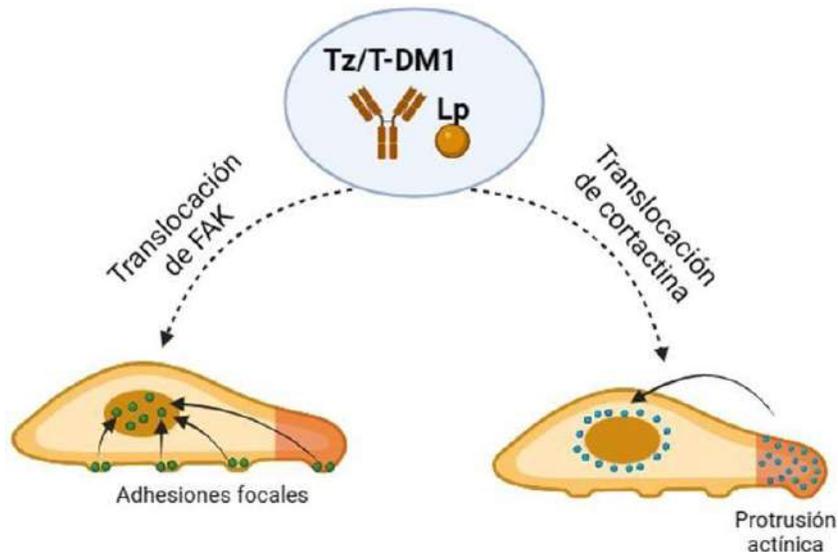


Figura 35: Esquema representativo de la conclusión parcial del cuarto objetivo específico. Efectos de las combinaciones respecto a las monodrogas sobre la localización celular de FAK y cortactina en células de cáncer de mama HER2 positivo.

Quinto objetivo específico

Validar en un modelo 3D los resultados obtenidos en cultivos en monocapa (2D).

Efecto de terapias dirigidas contra HER2 sobre la viabilidad de esferoides

Teniendo en cuenta que los cultivos 3D ofrecen una representación más precisa de la arquitectura tumoral y la respuesta a tratamientos que los cultivos en monocapa (2D), los efectos de las terapias dirigidas contra HER2 fueron también evaluados utilizando esferoides de la línea celular SKBR3. Con este fin, los esferoides fueron expuestos a diferentes concentraciones de Tz, T-DM1 y Lp (0,1-100 µg/ml), tanto de forma individual como en combinación, durante un periodo de 72 horas para posteriormente analizar sus efectos sobre la viabilidad celular a través del ensayo de MTT.

Se observó que Tz redujo la viabilidad de los esferoides en concentraciones superiores a 10 µg/ml (*Figura 36A*), mientras que T-DM1 sólo logró inhibir la viabilidad en la concentración más alta ensayada de 100 µg/ml (*Figura 36B*). Por otro lado, Lp como monodroga mostró un efecto inhibitorio sobre la viabilidad celular en todas las concentraciones evaluadas (0,1-100 µg/ml) de manera dependiente de la concentración (*Figura 36A-B*). En cuanto a las combinaciones, tanto Tz + Lp como T-DM1 + Lp, fueron eficientes en la inhibición de la viabilidad de los esferoides en todas las concentraciones testeadas, también de manera dependiente de la concentración (*Figura 36A-B*). Respecto a la potencia de los fármacos, se observó que la inhibición del 50% de la viabilidad fue

alcanzada únicamente por Lp en concentraciones superiores a 10 µg/ml, así como en los tratamientos combinados a las concentraciones de 10-1 µg/ml y 100-10 µg/ml (Figura 36A-B).

La comparación estadística de los efectos de las combinaciones frente al obtenido con las monodrogas, reveló que si bien se observa un mayor porcentaje de inhibición de la viabilidad celular con los tratamientos combinados, sólo la combinación de 1 µg/ml de Tz + 0,1 µg/ml de Lp resultó superior a ambas monodrogas. El efecto observado en los tratamientos combinados restantes es debido al efecto de Lp (Figura 36A).

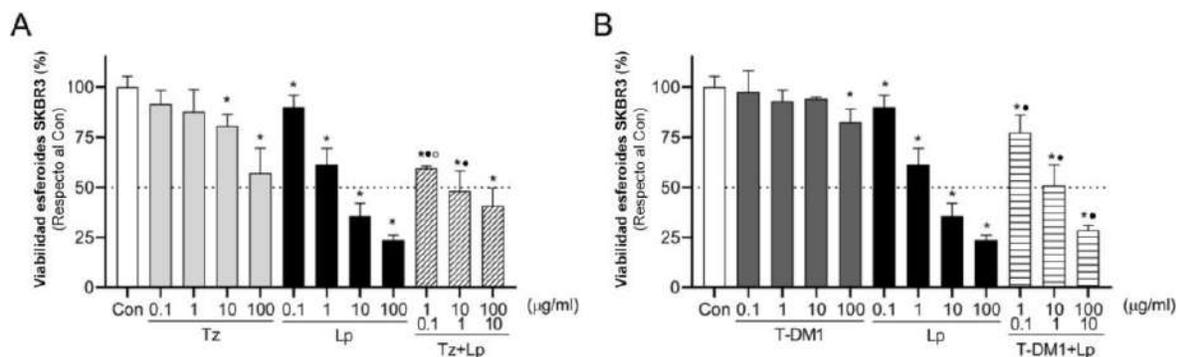


Figura 36: Efecto de las terapias dirigidas contra HER2 en la viabilidad celular a través del modelo 3D de esferoides. El ensayo de viabilidad se evaluó mediante el ensayo MTT en esferoides SKBR3. Los esferoides se trataron con concentraciones crecientes de (A) Tz (0,1-100 µg/ml), Lp (0,1-100 µg/ml), y su combinación Tz+Lp en una relación constante (10:1 µg/ml) durante 72 horas, o (B) T-DM1 (0,1-100 µg/ml), Lp (0. 1-100 µg/ml), y su combinación T-DM1+Lp en una relación constante de 10:1 µg/ml durante 72 horas. Los resultados se expresaron como porcentaje (%) de células viables en comparación con el control (Con, 100% de viabilidad). La línea de puntos en el eje y representa el 50% de inhibición de la viabilidad para cada condición experimental. * = $p < 0,05$ en tratamientos vs. control, • = $p < 0,05$ en tratamientos combinados vs. Tz/T-DM1, y ○ = $p < 0,05$ en tratamientos combinados vs. Lp.

Efecto de terapias dirigidas contra HER2 sobre la migración de esferoides

Considerando los resultados previos, se optó por utilizar concentraciones superiores a las probadas en el cultivo 2D para evaluar el efecto de las terapias dirigidas contra HER2 en la capacidad de migración en el modelo de esferoides. Por lo tanto, los esferoides fueron expuestos durante 72 horas a 10 µg/ml de Tz, 10 µg/ml de T-DM1, 1 µg/ml de Lp y sus combinaciones para analizar el halo de migración formado en cada caso.

Se observó que tanto Tz como T-DM1 produjeron un ligero efecto inhibitorio, disminuyendo la migración de las células tumorales en un 11% y 8%, respectivamente. En contraste, en las condición con Lp y en los tratamientos combinados, Tz + Lp y T-DM1 + Lp, no fue posible identificar el halo de migración, en su lugar se observó una desintegración del esferoide (Figura 37).

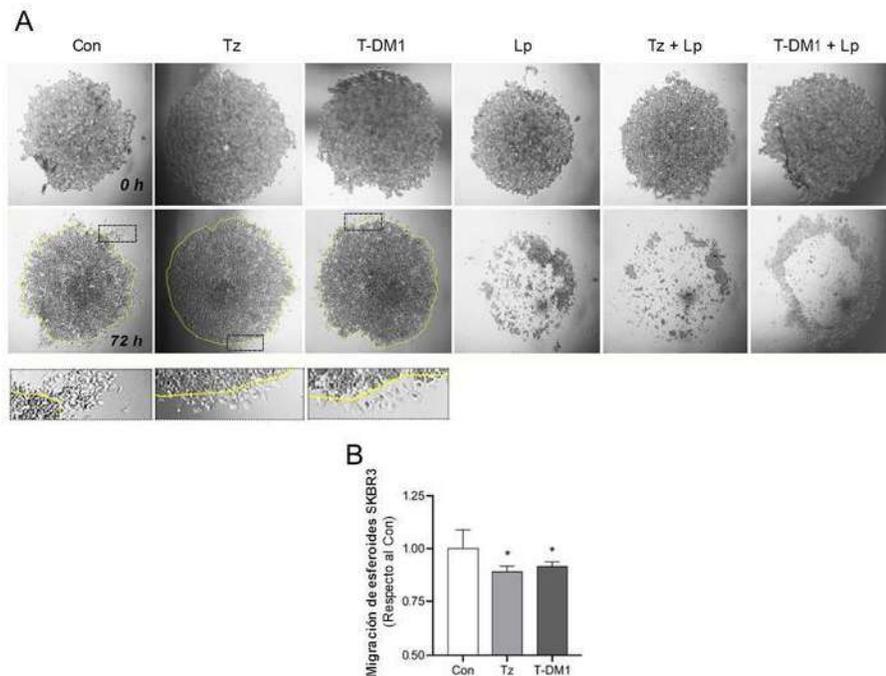


Figura 37: Efecto de las terapias dirigidas contra HER2 en la migración celular a través del modelo 3D de esferoides. (A) Los esferoides se trataron con 10 µg/ml Tz, 10 µg/ml T-DM1, 0,1 µg/ml de Lp y su combinación Tz+Lp y T-DM1+Lp durante 72 horas y se analizó su capacidad migratoria a partir de la medición del halo de migración. **(B)** Los resultados se expresaron como porcentaje (%) de migración en comparación con el control (Con, 100% de migración). * = $p < 0,05$ en tratamientos vs. control.

Conclusión parcial del quinto objetivo específico

Al igual que en el modelo 2D, los tratamientos combinados Tz + Lp y T-DM1 + Lp, lograron un efecto inhibitorio considerable sobre la viabilidad y migración celular. Además, se evidenció la necesidad de utilizar concentraciones más altas en el modelo 3D en comparación con el 2D para lograr un efecto inhibitorio similar.

Sexto objetivo específico

Mediante un estudio in silico, identificar genes candidatos a posibles biomarcadores pronósticos y predictivos en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo.

Identificación de potenciales biomarcadores pronóstico en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo

Los biomarcadores pronósticos son indicadores que predicen la progresión de la enfermedad, supervivencia, independientemente del tratamiento. En este estudio, utilizamos el software KM-plotter para evaluar la correlación entre la expresión génica de ERBB2 (HER2), SRC (SRC), PTK2 (FAK), PXN (paxilina), VCL (vinculina) y CTTN

(cortactina) y la supervivencia de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo. Para evaluar la supervivencia se utilizaron diferentes parámetros: RFS, OS, DMSF y PPS.

Al analizar la RFS (n= 285 pacientes), se evidenció que los genes ERBB2, SRC, PTK2 y PXN no mostraron valor pronóstico (*Figura 38A-D*). Se observó que las curvas de supervivencia del grupo de pacientes con alta expresión de VCL difieren significativamente de las del grupo con baja expresión, lo que sugiere una correlación entre la expresión génica de VCL y la RFS. En este sentido, las pacientes con niveles bajos de expresión presentaron una mayor probabilidad de RFS en comparación con el grupo de alta expresión (HR= 1,55; p= 0,028) (*Figura 38E, marcado en rojo*). Por otro lado, aunque la comparación de las curvas de supervivencia de los grupos con alta y baja expresión de CTTN no alcanzó la significancia estadística, se detectó una tendencia (p= 0,057), donde el grupo con menor expresión presenta una mayor probabilidad de RFS en comparación con el grupo con mayor expresión (HR= 1,43) (*Figura 38F*). Al analizar simultáneamente la expresión de todos los genes de interés (ERBB2, SRC, PTK2, PXN, VCL y CTTN) como una firma genética, se encontró una mayor capacidad pronóstica (HR= 1,9; p= 0,00085) (*Figura 38G, marcado en rojo*).

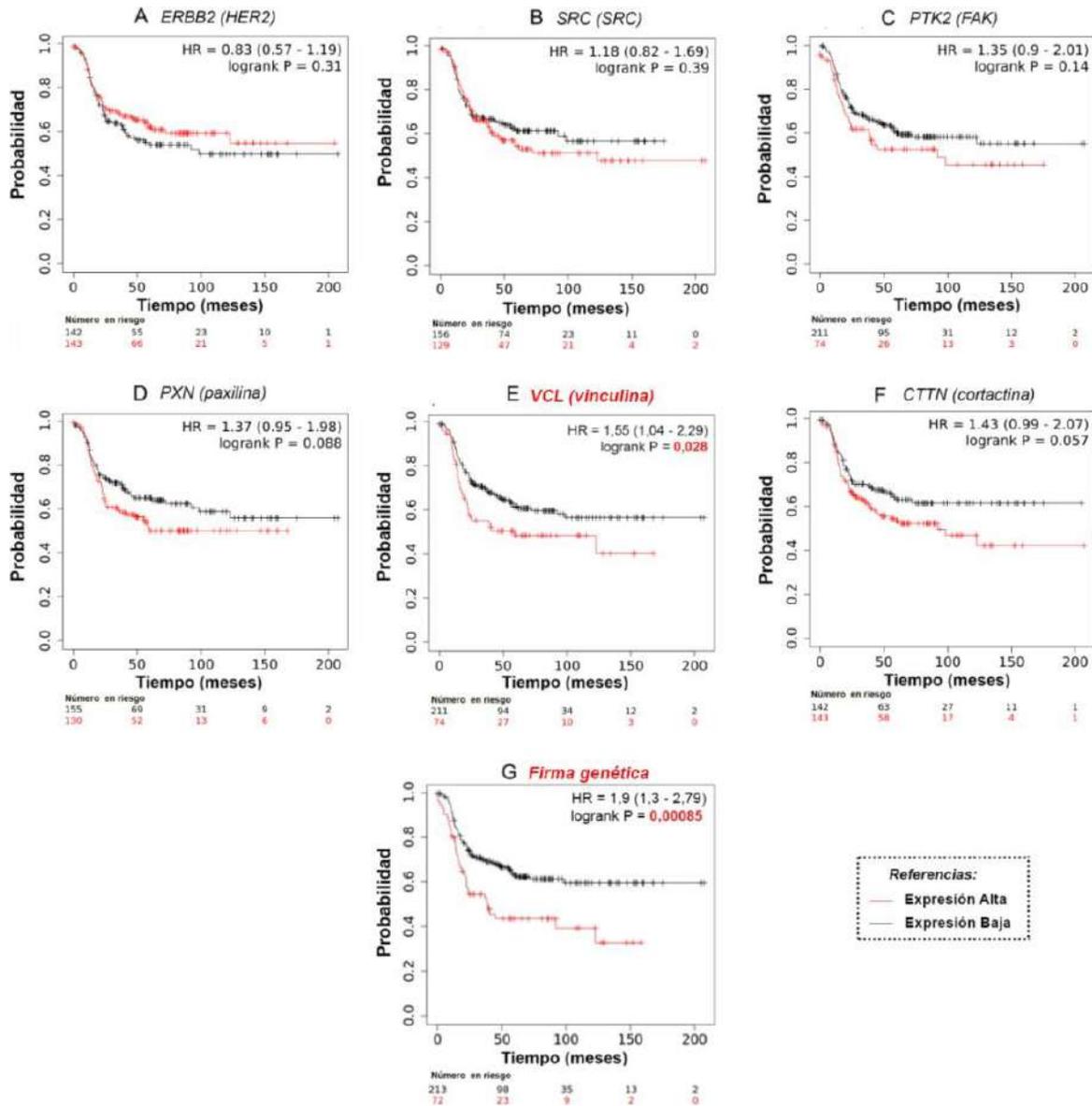


Figura 38: Correlación entre la expresión (ARNm) del conjunto de genes de interés y la supervivencia libre de recaída (RFS). Utilizando la plataforma KM-plotter se realizó el análisis bioinformático para evaluar la probabilidad de RFS de grupos de pacientes con alta y baja expresión de **(A)** HER2 (ERBB2); **(B)** SRC (SRC); **(C)** FAK (PTK2); **(D)** paxilina (PXN); **(E)** vinculina (VCL); **(F)** cortactina (CTTN), en cohortes de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo. Se indica en rojo la curva de supervivencia correspondiente al grupo de pacientes con alta expresión del gen y en negro la curva de supervivencia del grupo de supervivencia del grupo de baja expresión del gen. **(G)** El análisis también se realizó considerando la expresión media de todos los genes de interés en simultáneo como firma genética. En todos los casos se informa el número de pacientes en riesgo para cada grupo, los valores p de la prueba de log-rank y la tasa de riesgo (HR) con sus intervalos de confianza del 95%.

Los resultados del análisis en términos de OS (n= 150 pacientes) mostraron diferencias significativas en las curvas de KM para los grupos de alta y baja expresión de SRC, VCL y CTTN (Figura 39B, E-F, marcados con rojo). De manera sorprendente, se observó que las pacientes con una mayor expresión de SRC presentaron una mayor probabilidad de OS

(HR= 0,52; p= 0,033) (Figura 39B). Además, se encontró que las pacientes con baja expresión de VCL (HR= 1,89; p= 0,035) y CTTN (HR= 1,87; p= 0,047) mostraban una mayor probabilidad de OS (Figura 39E-F). Para el resto de los genes analizados no se encontró correlación significativa entre su expresión y la OS de las pacientes (Figura 39A, C-D). Al evaluar la expresión de todos los genes de interés en simultáneo como firma genética, no se encontró utilidad pronóstica (p= 0,16) (Figura 39G).

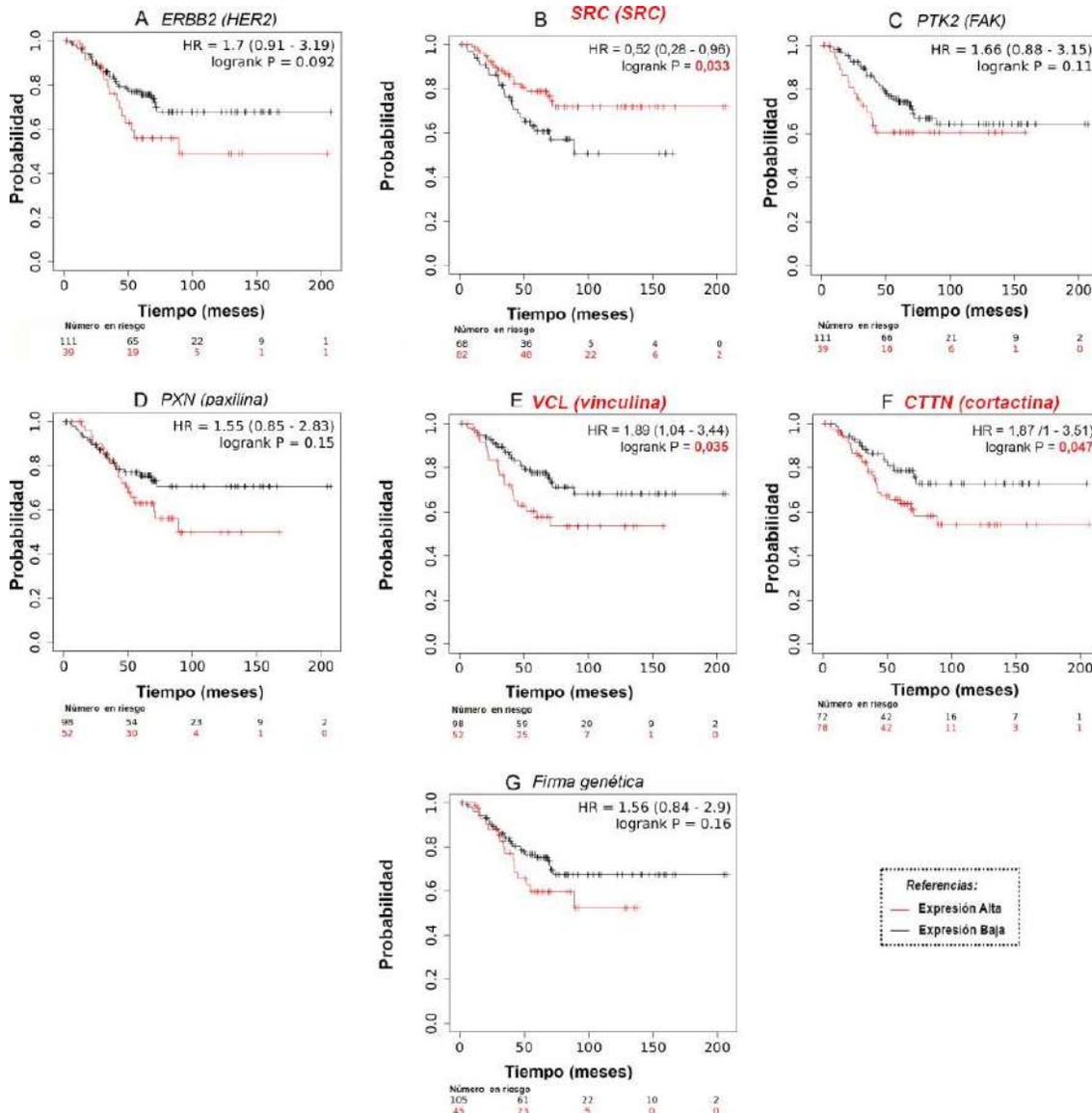


Figura 39 Correlación entre la expresión (ARNm) del conjunto de genes de interés y la supervivencia global (OS). Utilizando la plataforma KM-plotter se realizó el análisis bioinformático para evaluar la probabilidad de OS de grupos de pacientes con alta y baja expresión de (A) HER2 (ERBB2); (B) SRC (SRC); (C) FAK (PTK2); (D) paxilina (PXN); (E) vinculina (VCL); (F) cortactina (CTTN), en cohortes de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo. Se indica en rojo la curva de supervivencia correspondiente al grupo de pacientes con alta expresión del gen y en negro la curva de supervivencia del grupo de pacientes con baja expresión del gen. (G) El análisis también se realizó considerando la expresión media de todos los genes de interés en simultáneo

como firma genética. En todos los casos se informa el número de pacientes en riesgo para cada grupo, los valores p de la prueba de log-rank y la tasa de riesgo (HR) con sus intervalos de confianza del 95%.

Al realizar el análisis teniendo en cuenta la tasa de DMSF (n= 160 pacientes) en función de la expresión de los genes de interés, se observó correlación para PTK2 (HR= 1,71; p= 0,044), PXN (HR= 2,33; p= 0,012), VCL (HR= 2,14; p= 0,0042) y CTTN (HR= 2,11; p= 0,0066) (*Figura 40, marcados con rojo*). En todos los casos, el grupo de pacientes con bajos niveles de expresión de PTK2, PXN, VCL y CTTN presentaron una DMSF favorable en comparación con aquellos de alta expresión. En estos casos, en función de los valores de HR obtenidos (~ 2), se interpreta que en cualquier momento, aproximadamente el doble de pacientes en el grupo con alta expresión experimentan el evento de interés (muerte) en proporción al otro grupo (*Figura 40C-F*). Por otro lado, los niveles de ARNm de ERBB2 y SRC no demostraron valor pronóstico en términos de DMSF (*Figura 40A-B*). Al analizar la expresión de los genes de interés como una firma genética, se encontró que, si bien tiene valor pronóstico (HR= 2,02; p= 0,02) (*Figura 40G*), la potencia es mayor cuando se analiza la expresión de PXN, VCL y CTTN por separado (*Figura 40D-G*), no así para ERBB2, SRC y PTK2 (cuyos valores p son mayores a 0,02) (*Figura 40A-B, G*).

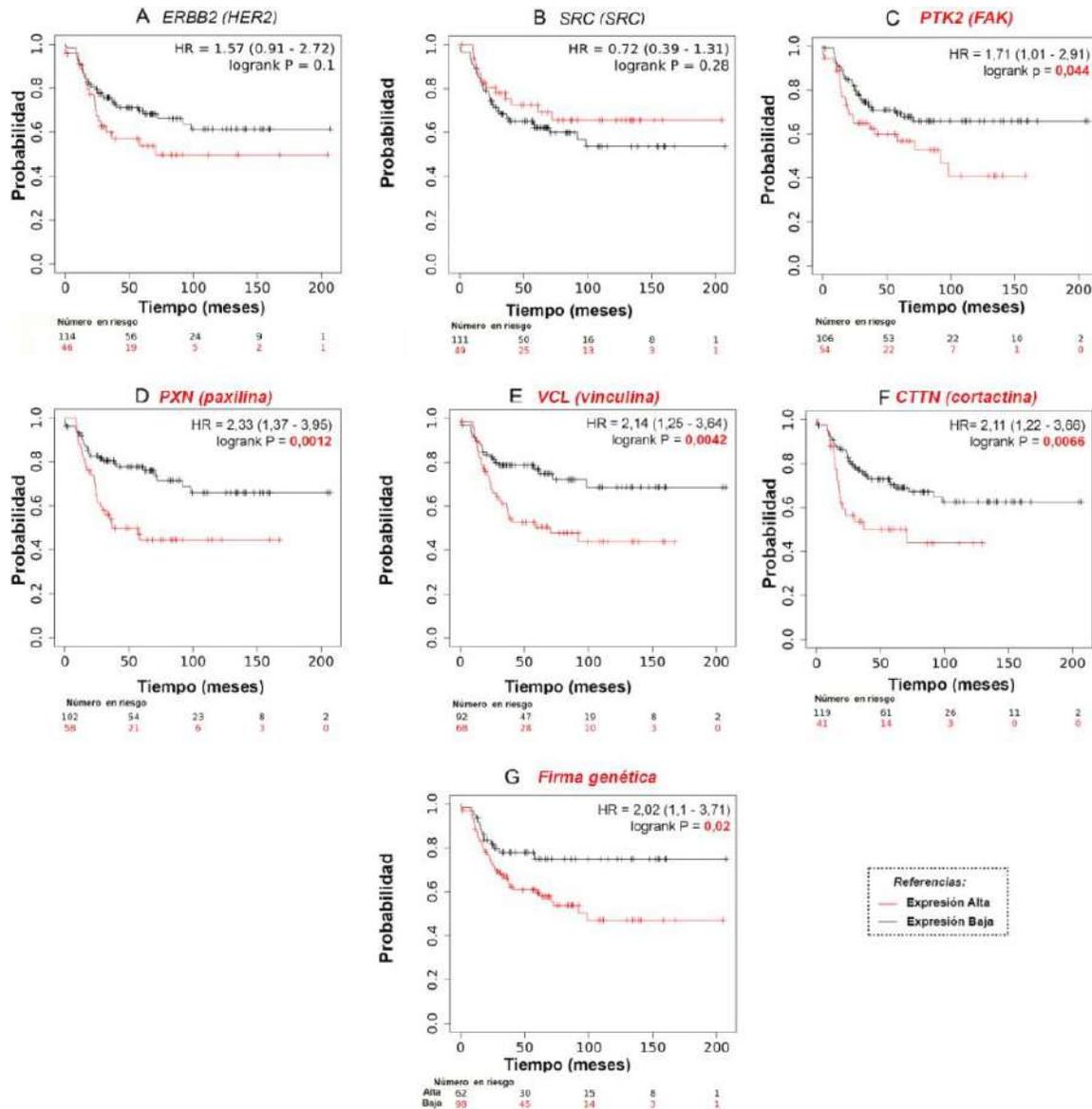


Figura 40: Correlación entre la expresión (ARNm) del conjunto de genes de interés y la supervivencia libre de metástasis a distancia (DMSF). Utilizando la plataforma KM-plotter se realizó el análisis bioinformático para evaluar la probabilidad de DMSF de grupos de pacientes con alta y baja expresión de **(A)** HER2 (ERBB2); **(B)** SRC (SRC); **(C)** FAK (PTK2); **(D)** paxilina (PXN); **(E)** vinculina (VCL); **(F)** cortactina (CTTN), en cohortes de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo. Se indica en rojo la curva de supervivencia correspondiente al grupo de pacientes con alta expresión del gen y en negro la curva de supervivencia del grupo de pacientes con baja expresión del gen. **(G)** El análisis también se realizó considerando la expresión media de todos los genes de interés en simultáneo como firma genética. En todos los casos se informa el número de pacientes en riesgo para cada grupo, los valores p de la prueba de log-rank y la tasa de riesgo (HR) con sus intervalos de confianza del 95%.

Se realizó además una evaluación del potencial pronóstico del conjunto de genes de interés en relación con la PPS (n= 36 pacientes) (Figura 41). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las curvas de supervivencia entre los grupos de pacientes con alta y baja expresión de VCL. Se encontró que el grupo con baja expresión

de VCL presentaba una mayor probabilidad de PPS en comparación con el grupo de alta expresión (HR= 2,32; p= 0,041) (Figura 41E, marcado en rojo). En cuanto al resto de los genes, no se observó un potencial pronóstico significativo, ya sea al analizarlos individualmente (Figura 41A-D, F) o como firma genética (Figura 41G).

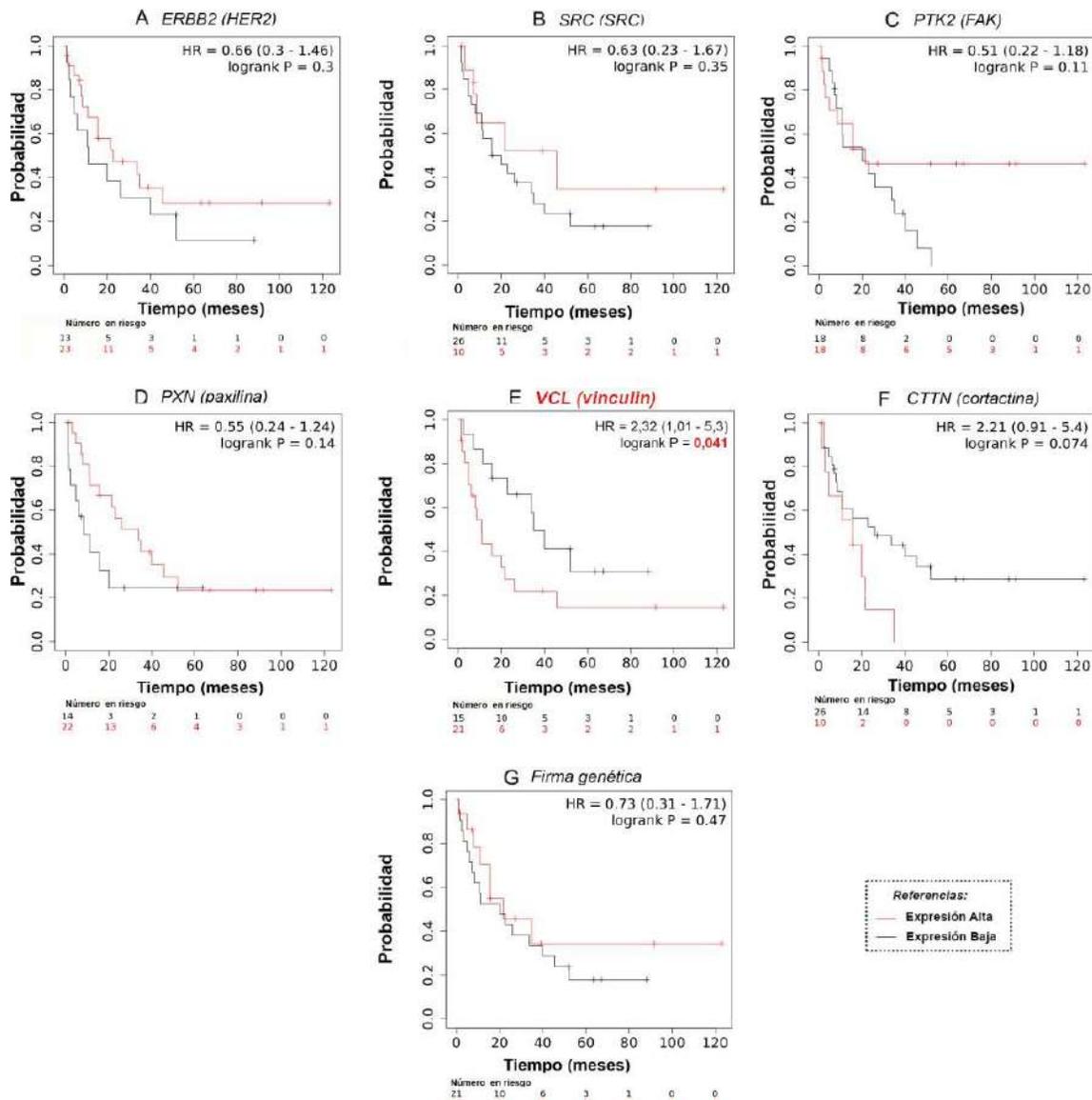


Figura 41: Correlación entre la expresión (ARNm) del conjunto de genes de interés y la supervivencia post-progresión (PPS). Utilizando la plataforma KM-plotter se realizó el análisis bioinformático para evaluar la probabilidad de PPS de grupos de pacientes con alta y baja expresión de (A) HER2 (ERBB2); (B) SRC (SRC); (C) FAK (PTK2); (D) paxilina (PXN); (E) vinculina (VCL); (F) cortactina (CTTN), en cohortes de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo. Se indica en rojo la curva de supervivencia correspondiente al grupo de pacientes con alta expresión del gen y en negro la curva de supervivencia del grupo de pacientes con baja expresión del gen. (G) El análisis también se realizó considerando la expresión media de todos los genes de interés en simultáneo como firma genética. En todos los casos se informa el número de pacientes en riesgo para cada grupo, los valores p de la prueba de log-rank y la tasa de riesgo (HR) con sus intervalos de confianza del 95%.

Identificación de genes candidatos a potenciales biomarcadores predictivos en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo

Los biomarcadores predictivos permiten predecir la eficacia de un tratamiento o la resistencia del tumor al mismo. Con el fin de identificar genes candidatos a potenciales biomarcadores predictivos de la respuesta a la terapia con Tz en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo se utilizó la plataforma ROC-plotter. El AUC en cada caso permitió determinar la posible utilidad predictiva de cada gen, siendo un AUC mayor a 0,6 favorable. La respuesta al tratamiento fue evaluada considerando dos parámetros: pCR y RFS a 5 años.

Al analizar la respuesta al tratamiento con Tz en términos de RFS, se observaron diferencias significativas en la expresión génica de ERBB2 y VCL entre pacientes respondedores y no respondedores (*Figura 42A, E, marcados en rojo*). Una baja expresión génica de ERBB2 (AUC= 0,611; p= 0,19) se asoció con una respuesta desfavorable a Tz (*Figura 42A*). Por otro lado, una baja expresión de VCL (AUC= 0,701; p= 0,038) se asoció con una respuesta favorable a Tz (*Figura 42E*). No se encontró correlación entre los niveles de ARNm de SRC, PTK2, PXN y CTTN y la respuesta a Tz (*Figura 42B-D, F*). Como firma genética, los genes de interés no mostraron potencial poder predictivo (*Figura 42G*).

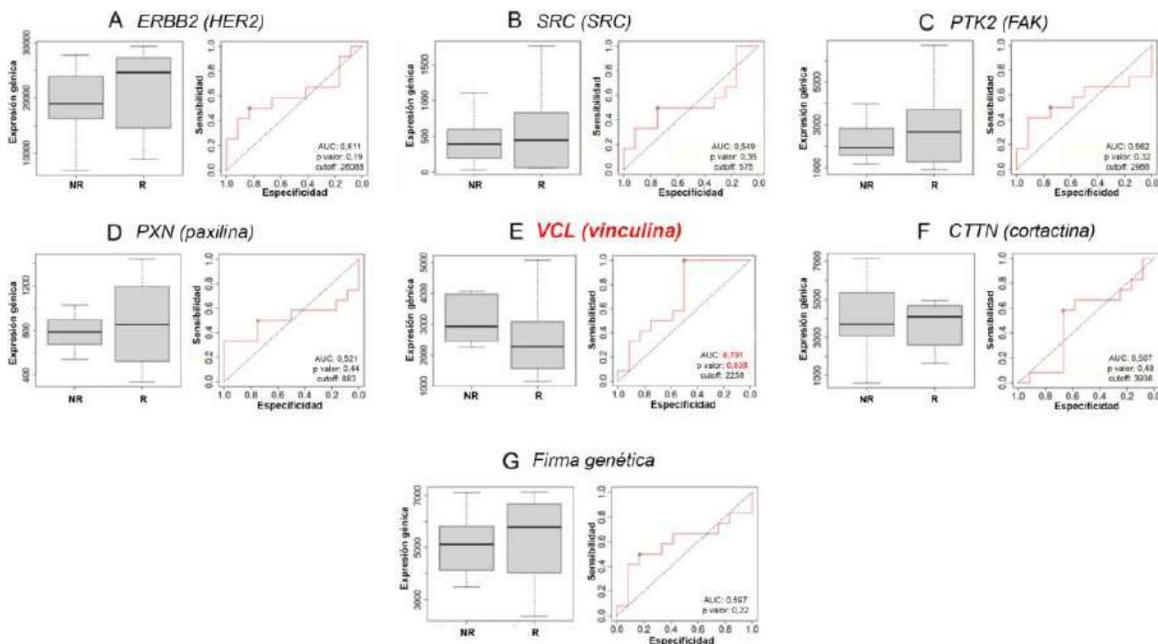


Figura 42: Relación entre la expresión génica y la respuesta a la terapia con Tz basada en la supervivencia libre de recaída, RFS. Utilizando la plataforma ROC-plotter se realizó el análisis para **(A)** ERBB2 (HER2); **(B)** SRC (SRC); **(C)** PTK2 (FAK); **(D)** PXN (paxilina); **(E)** VCL (vinculina); **(F)** CTTN (cortactina), en cohortes de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo que no respondieron (NR) y respondieron (R) a la terapia con Tz. **(G)** El análisis también se realizó considerando la expresión media de todos los genes de interés

como firma genética. En todos los casos se informan los valores p y AUC. Un AUC > a 0,6 indica un posible potencial como marcador predictivo.

Paralelamente, al considerar la pCR, se observó que la expresión génica de ERBB2, SRC, PTK2 y PXN no presenta potencial para predecir respuesta a Tz (*Figura 43A-D*). Los niveles de VCL (AUC= 0,624; p= 0,041) y CTTN (AUC= 0,634, p= 0,028) se correlacionaron con pCR. En particular, bajos niveles de VCL y CTTN se asociaron con una respuesta favorable a Tz (*Figura 43E-F, marcados en rojo*). Como firma genética, los genes de interés no mostraron potencial poder predictivo (*Figura 43F*).

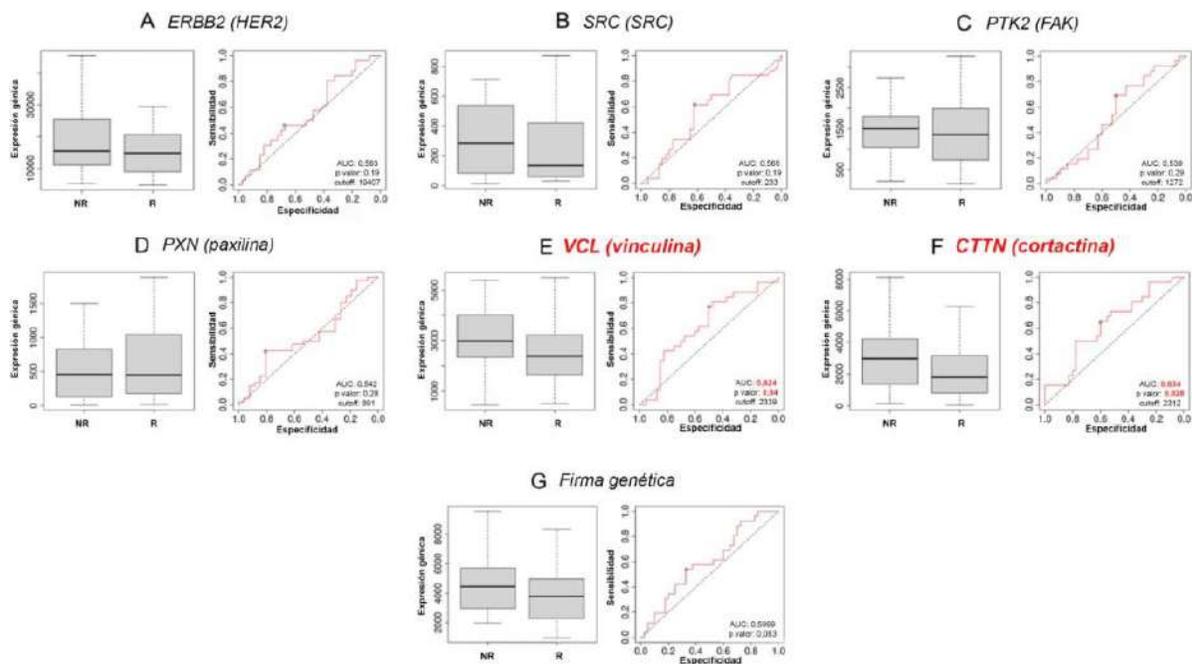


Figura 43: Relación entre la expresión génica y la respuesta patológica completa, pCR, a la terapia con Tz. Utilizando la plataforma ROC-plotter se realizó el análisis para (A) ERBB2 (HER2); (B) SRC (SRC); (C) PTK2 (FAK); (D) PXN (paxilina); (E) VCL (vinculina); (F) CTTN (cortactina), en cohortes de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo que no respondieron (NR) y respondieron (R) a la terapia. (G). El análisis también se realizó considerando la expresión media de todos los genes de interés como firma genética. En todos los casos se informan los valores p y AUC. Un AUC > 0,6 indica un posible potencial como marcador predictivo.

Rol de FAK, paxilina, vinculina y cortactina en la resistencia a Tz en un modelo celular de resistencia adquirida

Para respaldar y confirmar los resultados, se estableció en el laboratorio un modelo de resistencia adquirida a Tz, SKBR3-RTz, mediante la exposición sostenida durante 6 meses de las células SKBR3 a concentraciones moderadas de la droga Tz (10-15 µg/ml).

La resistencia a Tz fue evidenciada mediante ensayo de MTT donde se observó que concentraciones crecientes de Tz no afectaban la viabilidad celular respecto al grupo

control (*Figura 44A*). Además, para confirmar la adquisición de resistencia del modelo SKBR3-RTz, se analizó la expresión de proteínas que han sido relacionadas con la resistencia a Tz. AKT y mTOR son componentes de vías de señalización intracelulares que se activan en respuesta a la estimulación de HER2. Tz, actúa inhibiendo estas vías. Así, cuando las células desarrollan resistencia a Tz, estas vías pueden permanecer activas, permitiendo que las células cancerosas sobrevivan y proliferen a pesar del tratamiento [166]. Se observó un aumento en la fosforilación/activación de AKT y mTOR en las células resistentes en comparación con las células sensibles a Tz, sugiriendo la adquisición de resistencia a Tz (*Figura 44B*). También, para validar la resistencia a Tz, se evaluó la capacidad de las células SKBR3-RTz para adherirse a la ECM. Se trató a las células con los tratamientos que demostraron ser más eficaces en inhibir la adhesión celular en las células SKBR3 sensibles, es decir, Tz + Lp (1-0,1 µg/ml) y T-DM1 + Lp (0,1-1 µg/ml) (*Figura 26A, C*). Asimismo, se estudió la dependencia de las células resistentes SKBR3-RTz a la señalización HER2, evaluando el efecto de 1 nM de HRG. HRG es un ligando selectivo de HER3/ERBB3 que desencadena la actividad de HER2 a través de su dimerización [111]. Se observó que las células resistentes son drásticamente más agresivas en sus propiedades adhesivas que las sensibles, aumentando la adhesión celular a la ECM (*Figura 44C-D*). A diferencia de lo observado en las células sensibles SKBR3 (*Figura 26A, C*), en las células resistentes SKBR3-RTz, ningún tratamiento afectó el proceso de adhesión en comparación con el control (*Figura 44C-D*).

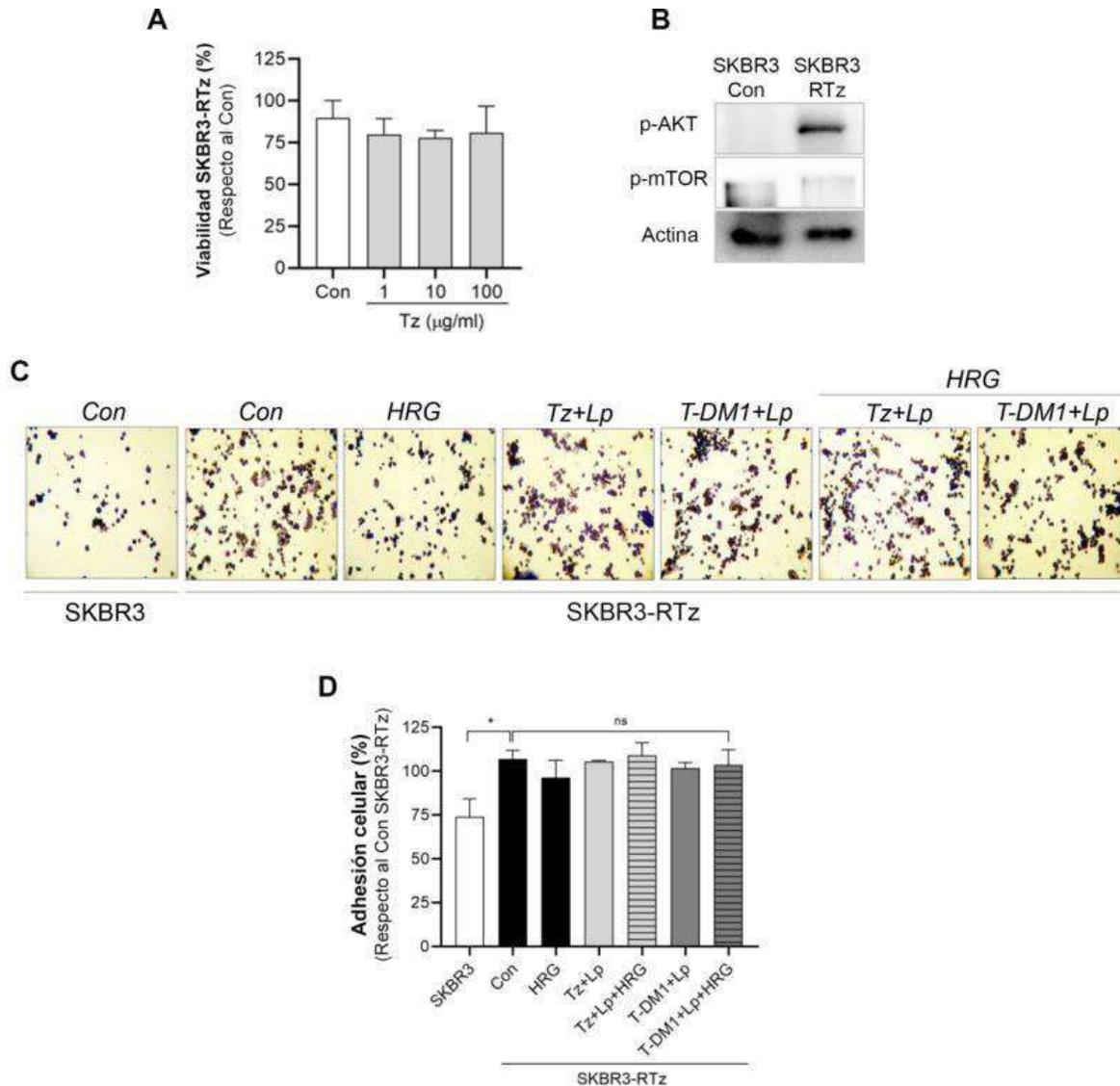


Figura 44: Modelo celular de resistencia adquirida a Tz. La resistencia a Tz de las células SKBR3-RTz se evaluó mediante **(A)** Ensayo de MTT, donde fueron expuestas a concentraciones crecientes de Tz (1-100 µg/ml) durante 72 horas. Los resultados se expresaron como porcentaje (%) de células viables en comparación con el control (Con, 100% de supervivencia); **(B)** Western Blot para analizar la expresión de p-AKT y p-mTOR, asociadas a la resistencia a Tz. La expresión de actina se utilizó como control de carga; y **(C)** Ensayo de adhesión a una matriz, comparando la capacidad de adhesión de SKBR3-RTz y células sensibles SKBR3. * indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Por otro lado, se comparó en las células SKBR3 sensibles a Tz y SKBR3-RTz resistentes la expresión de los genes candidatos a potenciales biomarcadores hallados previamente, que incluyen a FAK, paxilina, vinculina y cortactina. Se observó que tanto las células sensibles como las resistentes a Tz expresaban niveles comparables de FAK y paxilina (*Figura 45A*). Interesantemente, se evidenció que vinculina y cortactina tenían una expresión aumentada en las células SKBR3-RTz resistentes en comparación con las células SKBR3 sensibles (*Figura 45A*), lo que refuerza la idea de que podrían desempeñar

un rol en la resistencia a Tz y por ende, podrían tener potencial como marcadores de respuesta a este fármaco.

A continuación, mediante el uso de ARNsi específicos se perturbó la expresión de FAK, paxilina, vinculina y cortactina en las células SKBR3 sensibles y SKBR3-RTz resistentes, con el fin de determinar el rol de las mismas en la resistencia a Tz. Los silenciamientos génicos de FAK, paxilina, vinculina y cortactina fueron confirmados en la línea celular resistente, SKBR3-RTz, mediante ensayos de western blots (*Figura 45B-D*). Además, se evidenció que la expresión de vinculina se ve disminuida cuando FAK, paxilina y cortactina son silenciadas (*Figura 45E*).

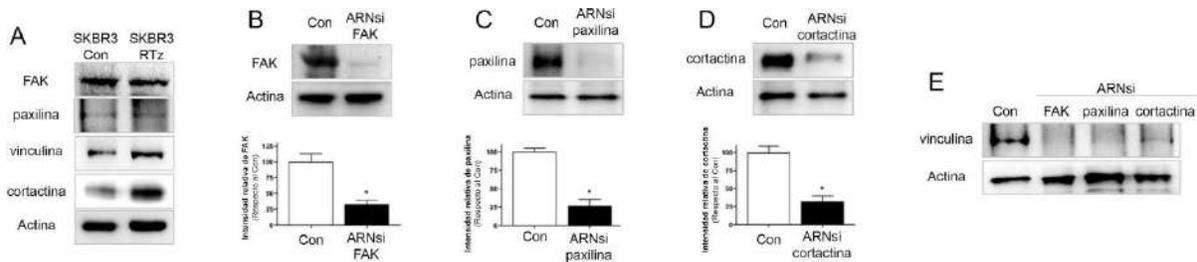


Figura 45: Silenciamiento génico de FAK, paxilina y cortactina. (A) Se comparó la expresión de los posibles biomarcadores: FAK, paxilina, vinculina y cortactina; entre células sensibles (SKBR3) y resistentes a Tz (SKBR3-RTz) mediante western blots. La expresión de actina fue utilizada como control de carga. (B-E) Para evaluar el rol de los posibles marcadores: FAK, paxilina, vinculina y cortactina en la respuesta a Tz, las células SKBR3 y SKBR3-RTz fueron transfectadas con ARNsi específicos para estas proteínas. La eficacia del silenciamiento se evaluó mediante western blots. * indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Luego, con las proteínas de interés silenciadas, se evaluó el rol de las mismas en la respuesta a Tz de las células SKBR3 y SKBR3-RTz mediante ensayos funcionales de adhesión y migración celular. Como se mencionó anteriormente, estos procesos son modulados por FAK, paxilina, vinculina y cortactina y, en el caso de la migración, afectados por Tz (*Figura 27*), constituyendo una forma adecuada de determinar su rol en la resistencia/respuesta a Tz.

A través de los ensayos de adhesión y migración en células SKBR3 sensibles, se encontró que el tratamiento con Tz, al igual que se observó en la *Figura 26-27*, no afectó la adhesión y disminuyó la migración de las células SKBR3. El silenciamiento de FAK, paxilina y cortactina redujo la capacidad de adhesión y migración de las mismas (*Figura 46A-B, D-E*). Mientras que, la combinación de Tz con los ARNsi de FAK, paxilina y cortactina, mostró una inhibición potenciada de estos procesos celulares (*Figura 46A-B, D-E*).

En las células resistentes (SKBR3-RTz), se observó que Tz no afectó la adhesión ni la migración, evidenciando la incapacidad de respuesta a este fármaco por parte de las células SKBR3-RTz (Figura 46C, F). Respecto a los tratamientos con los ARNsi, se encontró que sólo el silenciamiento de FAK redujo la adhesión y migración celular. Por otro lado, la combinación de Tz con los ARNsi específicos de FAK, paxilina y cortactina inhibió ambos procesos celulares (Figura 46C, F).

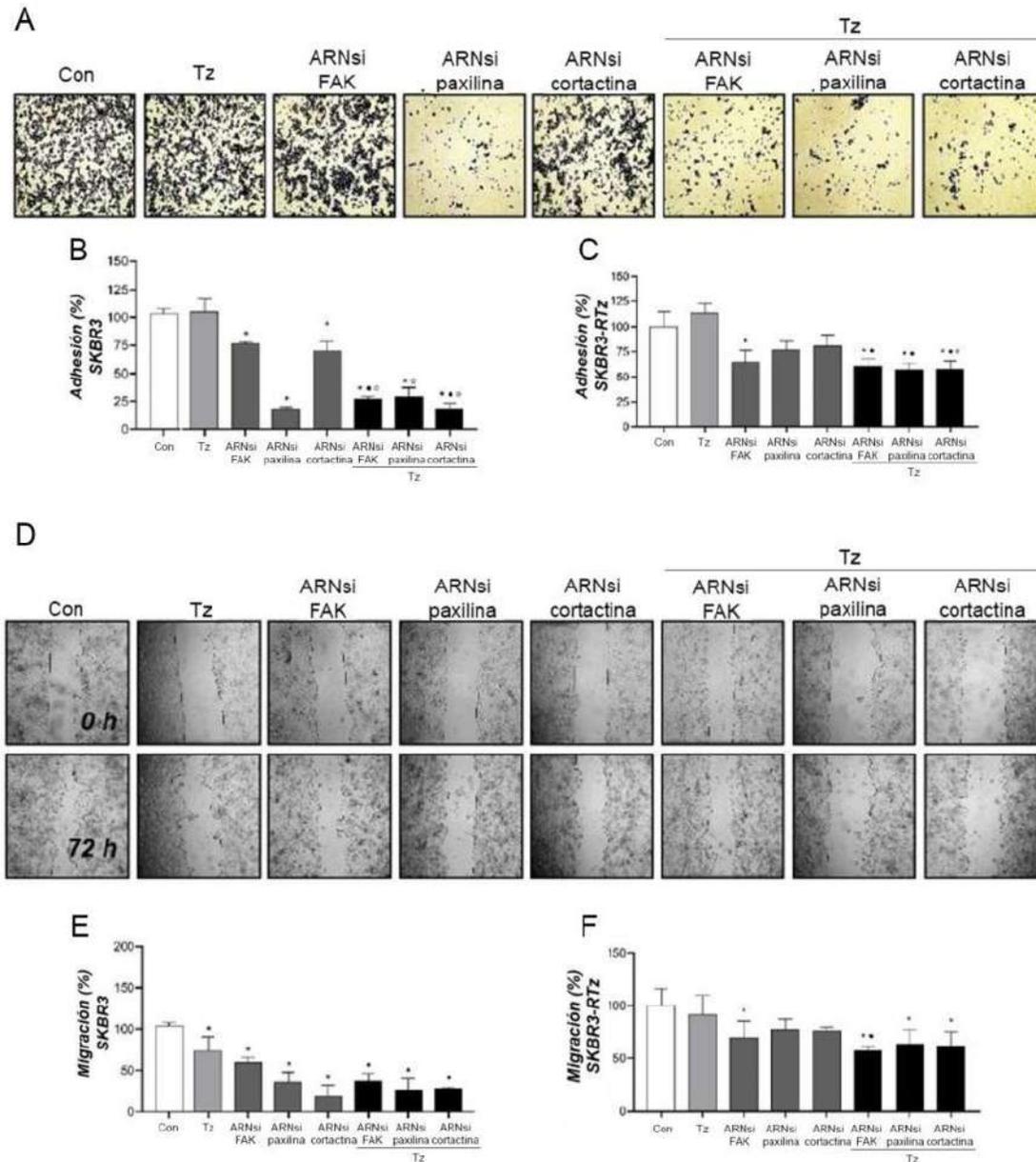


Figura 46: Vinculina y cortactina como biomarcadores predictivos de sensibilidad/resistencia a Tz. Evaluación de la capacidad de (A-C) adhesión y (D-F) migración de las células SKBR3 y SKBR3-RTz tras ser tratadas con Tz, ARNsi específicos y la combinación Tz+ARNsi. Los resultados de adhesión/migración se expresaron como porcentaje (%) de células adheridas/migradas en comparación a las células control (Con, 100%)

de adhesión/migración). Se muestran imágenes representativas de los ensayos funcionales realizados en células SKBR3. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) se indican como "*" en tratamientos vs. Control; "•" en ARNsi+Tz vs. Tz, y "o" en ARNsi+Tz vs. ARNsi.

Conclusiones parciales del sexto objetivo específico

Los hallazgos del sexto objetivo específico sugieren que VCL/vinculina y CTTN/cortactina pueden desempeñar un papel crucial en la resistencia al tratamiento con Tz en el cáncer de mama HER2 positivo. Y por lo tanto, son candidatos prometedores a ser estudiados con mayor profundidad en la identificación de biomarcadores para predecir respuesta a la terapia con Tz.

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

Discusión

La terapia con Tz ha mejorado significativamente los resultados en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo [81], sin embargo, la resistencia y las toxicidades asociadas siguen siendo desafíos importantes en el manejo de la enfermedad [40, 47]. Además, la falta de biomarcadores complica la identificación de pacientes que pueden beneficiarse de este tratamiento o que podrían desarrollar resistencia [167]. Dada la evidente importancia de contar con biomarcadores, este estudio investigó el efecto de terapias dirigidas contra HER2 (Tz, T-DM1 y Lp), solas o combinadas, en la progresión tumoral con el objetivo de evaluar qué estrategia es la más eficaz *in vitro* y para identificar genes candidatos a ser potenciales biomarcadores pronósticos y predictivos de respuesta a Tz.

Inicialmente, el estudio de expresión génica diferencial mediante análisis bioinformático permitió la identificación de genes potencialmente vinculados con la resistencia a las terapias dirigidas contra HER2 y la progresión metastásica en el cáncer de mama HER2 positivo. Al comparar modelos resistentes a Tz (BT-RTz) y T-DM1 (BT-RT-DM1) con células sensibles (BT-474), se observó una consistencia en la desregulación de genes relacionados con procesos de adhesión y migración, fundamentales para la progresión metastásica. En este sentido, anteriormente Diaz-Rodriguez *et al.* (2019) reportaron que células resistentes a Tz presentaban alteraciones funcionales relacionadas con muerte, metabolismo, migración, respuesta al daño del ADN, ciclo celular, transcripción, diferenciación y adhesión celular [129]. Específicamente, en esta tesis se detectó por bioinformática una regulación a la baja de PXN en los modelos resistentes en comparación con las células sensibles. PXN es el gen que codifica para paxilina, una proteína andamio que regula la dinámica de las FA, y por lo tanto, la adhesión y la migración de las células cancerosas [158], procesos que en este estudio y en otros se han informado como alterados en células resistentes a Tz [129, 168]. Resultó intrigante para este estudio encontrar a PXN regulada negativamente en los fenotipos resistentes a Tz y T-DM1, especialmente considerando estudios previos del grupo y otros autores que vinculan a paxilina con fenotipos agresivos en cáncer de mama [112, 115, 158, 169]. Esta aparente discrepancia puede deberse a que el nivel de ARNm no siempre coincide con la expresión

proteica debido a regulaciones en el proceso de traducción, en la degradación de proteínas y otros factores contextuales. Esto implica que las proteínas no siempre se producen o están en cantidades proporcionales a sus ARNm [170]. Además, una regulación a la baja de PXN no brinda información sobre su estado de fosforilación/activación, es decir, sobre la funcionalidad de paxilina en los procesos que modula [158]. Boyer *et al.* (2013) reportaron que la señalización asociada a la resistencia a Tz es dependiente del contexto. Mediante estudios de fosfoproteómica cuantitativa, observaron que los niveles de PXN eran opuestos en las líneas BT-474 y SKBR3 resistentes a Tz bajo las mismas condiciones experimentales. Similar a este estudio, encontraron que PXN se encontraba regulada negativamente en células BT-474 resistentes a Tz [160]. Además, Deakin *et al.* (2011) informó que una regulación a la baja de PXN favorece mecanismos alternativos de migración que no dependen de paxilina [162]. Es posible que estos resultados reflejen una reprogramación de las vías de señalización distinta entre diferentes líneas celulares resistentes a Tz.

Considerando estos antecedentes, los resultados obtenidos del estudio *in silico* sugieren que PXN (paxilina), podría estar implicada en el desarrollo de resistencia a Tz y en la progresión metastásica en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo. Al desregularse paxilina/PXN en los fenotipos resistentes, se perturban también las interacciones con otras proteínas asociadas como: HER2 (ERBB2), SRC (SRC), FAK (PTK2), vinculina (VCL) y cortactina (CTTN), todas ellas con funciones clave en la progresión tumoral, como ha sido ampliamente demostrado por este grupo de investigación [112, 115, 169]. Por lo tanto considerar estos seis genes/proteínas como conjunto de interés en este estudio proporciona una estrategia prometedora para identificar nuevos blancos terapéuticos e identificar candidatos a potenciales biomarcadores.

Paralelamente, se encontró que Tz, T-DM1 y sobre todo Lp como monodrogas reducen la viabilidad celular. En concordancia con estos resultados otros autores han reportado el efecto de Tz y T-DM1 en la inhibición de la viabilidad en células de cáncer de mama HER2 positivas [78, 171, 172]. El mecanismo por el cuál estas drogas dirigidas contra HER2 inhiben la viabilidad celular implica principalmente la detención del ciclo celular, la citotoxicidad dependiente de anticuerpos y la inducción de apoptosis [44, 77, 173, 174]. Además, los resultados mostraron que el efecto inhibitorio de Lp en la inhibición de la viabilidad celular es superior al de Tz y T-DM1. La superioridad de Lp sobre Tz en la inhibición del crecimiento de las células BT-474 y SKBR3 también ha sido reportada por

Konecny *et al.* (2006) [71]. Sin embargo, es importante mencionar que aunque Lp *in vitro* muestra una „performance“ prometedora en cuanto a sus efectos antitumorales, no ha logrado demostrar la misma eficacia *in vivo* [74]. Además, se debe destacar que la acción de Tz y T-DM1 en este estudio se encuentra subestimada, ya que el modelo experimental utilizado, es decir los cultivos homotípicos de líneas celulares y esferoides, no considera el principal mecanismo de acción de estas drogas que es la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos [28, 32].

Asimismo, se observó que la combinación de Tz o T-DM1 con Lp produce una inhibición significativa de la viabilidad celular respecto al control. A continuación, se evaluó el tipo de interacción farmacológica utilizando dos estrategias: una basada en efectos (Método de Combinación de Umbrales Subyacentes mediante comparaciones estadísticas) y otra basada en dosis-efecto (Método Chou-Talalay mediante el índice de combinación, CI). El Método de Combinación de Umbrales Subyacentes únicamente evidenció sinergismo en las condiciones de T-DM1+Lp, en todas las concentraciones testeadas en BT-474 y solo en la máxima concentración (100:10 µg/ml) en SKBR3. Por otro lado, el Método Chou-Talalay, a partir del mismo conjunto de datos, informó interacciones favorables, aditivas (CI \approx 1) o sinérgicas (CI < 1), para todas las combinaciones excepto para 100 µg/ml de T-DM1 + 10 µg/ml de Lp en SKBR3. Estas diferencias en los resultados según la estrategia empleada pueden deberse a las limitaciones del método basado en efectos, que no permite detectar sinergismos modestos y no es aplicable a drogas que no presentan un comportamiento lineal [148], lo que podría estar sucediendo en este estudio. A pesar de obtener resultados distintos según la estrategia empleada, la bibliografía coincide con los datos obtenidos por el Método Chou-Talalay, informando interacciones sinérgicas para la combinación de Tz+Lp en células BT-474 y SKBR3 (CI= 0,34 y 0,66 respectivamente) [71].

Teniendo esto en cuenta, el efecto inhibitorio superior de los tratamientos combinados se debe a la interacción favorable, ya sea sinérgica o aditiva, que exhiben las drogas que se combinan a las concentraciones testeadas, evidenciada por valores de CI menores o cercanos a 1 obtenidos. Este tipo de interacción favorable puede estar relacionado con la inhibición dual del receptor HER2 mediante mecanismos de acción distintos: Tz/T-DM1 desde la porción extracelular impidiendo la homodimerización [28, 32], y Lp desde la porción citoplasmática impidiendo la actividad quinasa de HER2 [36]. Además, los efectos potenciados de las combinaciones pueden estar influenciados por la inhibición simultánea

de los receptores oncogénicos HER2 y EGFR/HER1 por Lp [36]. En este sentido, Scaltriti *et al.* (2009) propusieron que Lp potencia los efectos de Tz inhibiendo la fosforilación de HER2 y reduciendo la degradación del receptor. Esto hace que Lp induzca la acumulación de dímeros inactivos de HER2 en membrana, aumentando la unión de Tz al receptor HER2 y sus posteriores efectos [175]. Además, teniendo en cuenta la similitud de estructura entre Tz y T-DM1, es probable que ocurra lo mismo con T-DM1.

Por otro lado, los efectos de Tz, T-DM1 y Lp como monodrogas en la reducción de la adhesión y la migración han sido reportados en células de cáncer de mama con sobreexpresión de HER2 [111, 114, 176, 177]. Sin embargo, poco se conoce sobre sus efectos como tratamientos combinados a pesar de que Tz + Lp sea actualmente indicado en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo que han progresado durante el tratamiento con Tz sólo o en combinación con quimioterapia. En este trabajo, los efectos antitumorales de las terapias anti-HER2, solas o en combinación, también se observó en la inhibición de la adhesión y la migración, procesos celulares críticos asociados con la agresividad y el potencial metastásico del cáncer. La combinación Tz+Lp (1-0.1 µg/ml) siempre fue superior estadísticamente a las monodrogas en la inhibición de estos procesos. Si bien la combinación T-DM1+Lp no resultó estadísticamente significativa al efecto de ambas monodrogas en la inhibición de la adhesión y migración de células SKBR3, observándose en estos casos principalmente el efecto de Lp, siempre logró un porcentaje de inhibición considerable y significativo respecto al control. En este sentido, es importante tener en cuenta una vez más, que Lp como monodroga no ha logrado demostrar la misma eficacia *in vivo* [74], que el uso de monodrogas es más propenso a dar lugar a eventos de resistencia, y que parte de la comunidad científica sostiene que es imposible evaluar sinergismo mediante comparaciones estadísticas convencionales [163].

Por otro lado, se ha propuesto que la heterogeneidad intratumoral puede influir en la resistencia a los fármacos, afectando su penetración, internalización y eficacia [178]. Los modelos 2D tradicionales no logran replicar la heterogeneidad de los tumores *in vivo*, por lo que el cultivo celular 3D se considera una alternativa más adecuada [179]. Por ello, en esta tesis se evaluó los efectos de las terapias dirigidas contra HER2 también en esferoides de células SKBR3. Estadísticamente, solo la combinación 1 µg/ml Tz + 0,1 µg/ml Lp mostró ser superior a ambas monodrogas en la inhibición de la viabilidad celular. A su vez, se observó nuevamente que los tratamientos más eficientes son aquellos basados en Lp, ya sea como monodroga o en las combinaciones Tz+Lp y T-DM1+Lp. Sin embargo, en este

caso se necesitaron concentraciones más altas para lograr una inhibición significativa en comparación con el modelo 2D. Mientras que en el cultivo 2D la inhibición del 50% de la viabilidad se logró con concentraciones $> 1 \mu\text{g/ml}$ de Lp, a partir de $10^{-1} \mu\text{g/ml}$ en Tz + Lp y todas las concentraciones de T-DM1 + Lp; en el modelo 3D se alcanzó únicamente con concentración de Lp $> 10 \mu\text{g/ml}$, y en el caso de las combinaciones se logró únicamente a la mayor concentración testada ($100-10 \mu\text{g/ml}$). Estas diferencias podrían deberse a la estructura de los esferoides, que se asemeja a un tumor *in vivo*, donde las terapias se unen sólo a HER2 en las células de la periferia. En línea con estos resultados, otros estudios han demostrado que las células en cultivo 3D pierden la sensibilidad a Tz y T-DM1 en comparación con las células en monocapa [180, 181].

Además, se observó que, mientras Tz y T-DM1 tienen un efecto débil en la migración de esferoides, Lp y las combinaciones logran una inhibición completa. Es importante considerar que el efecto que se observó puede estar sobreestimado debido a la citotoxicidad de los fármacos y a la inhibición de la adhesión que provoca el desprendimiento celular y, en consecuencia, la muerte por anoikis. En estos casos, donde ocurre muerte celular tampoco se observa halo de migración, sin embargo no se debe a un efecto directo sobre las vías de migración. Independientemente de la causa, estos efectos (ya sea muerte celular y/o inhibición de la migración), son deseables en los tratamientos contra el cáncer. Es importante recalcar que los efectos de las combinaciones Tz + Lp y T-DM1 + Lp en la viabilidad y migración de esferoides no han sido reportados en la bibliografía.

En conjunto, los resultados sugieren que la inhibición dual de HER2 mediante fármacos que interfieren con el receptor HER2 simultáneamente desde la porción extracelular (Tz/T-DM1) y la porción intracelular (Lp) permite un mejor bloqueo de la señalización y puede ser una estrategia prometedora para potenciar la actividad de los fármacos y disminuir los eventos de resistencia. Sin embargo, clínicamente en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo no se ha determinado de forma concluyente la superioridad de Tz + Lp frente a Tz solo. El ensayo NeoALTTO demostró que Tz + Lp mejoraba significativamente las tasas de pCR, en comparación con cualquiera de los dos fármacos solos [182]. En cambio, el ensayo ALTTO no mostró diferencias marcadas entre los grupos Tz + Lp, Tz y Lp en cuanto a la DFS y la OS [74]. Debido a estas controversias, recientemente Yuan *et al.* (2022) han realizado un meta-análisis considerando trece ensayos clínicos (trials) controlados y aleatorizados para comparar la eficacia de Tz + Lp frente a las monoterapias.

En línea con los resultados de esta tesis, Yuan *et. al* (2022) concluyeron que la terapia combinada es superior a la monoterapia en lo que respecta a OS, pCR, RFS y DFS [183].

Por otro lado, se evaluó el efecto de las terapias dirigidas contra HER2, tanto en forma individual como combinada, sobre el conjunto de proteínas de interés relacionadas con la cascada metastásica y la vía de señalización HER2, que incluye a HER2, SRC, FAK, paxilina, vinculina y cortactina. En las células BT-474, se observó que Lp indujo la regulación al alza de HER2, SRC, paxilina y cortactina. Este comportamiento puede explicarse por la capacidad de Lp para inhibir la fosforilación de HER2 y prevenir su ubiquitinación y degradación subsiguiente, lo que resulta en una acumulación significativa de HER2 inactivo en la superficie celular [175]. Sin embargo, en la línea celular SKBR3, se observó un efecto contrario, donde Lp provocó una regulación a la baja de HER2, FAK y paxilina. Esta disparidad en el comportamiento entre las líneas celulares puede atribuirse a la diferente expresión de receptores HER, RE y ubiquitin-ligasas implicadas en la degradación de HER2, entre las células BT-474 y SKBR3, reportado previamente por Junko Suga *et al.* (2018) [184].

En relación a los efectos de Tz y T-DM1 como monoterapias, se observó que estos tratamientos regulan a la baja la expresión de HER2 en las células SKBR3. En las células BT-474, aunque se observó una tendencia a la disminución de la expresión de HER2, esta no alcanzó significancia estadística en comparación con el control. Este comportamiento puede atribuirse a que en este estudio se han utilizado concentraciones bajas equivalentes a 1 µg/ml de Tz/T-DM1. En este sentido, existen artículos, incluso de este grupo de investigación, que han reportado una regulación a la baja de HER2 en células BT-474 con concentraciones mayores, 10 µg/ml de Tz/T-DM1 [114, 185]. Por otro lado, se observó que tanto Tz como T-DM1 inhiben la expresión de FAK, lo cual concuerda con hallazgos previos [114, 186].

Un hallazgo importante de este trabajo es que, en ambas líneas celulares, los tratamientos combinados inducen una marcada inhibición de la expresión de proteínas ligadas a la metástasis. En SKBR3 las combinaciones inhibieron la expresión de HER2, SRC, FAK y paxilina. En BT-474, se produjo una regulación a la baja de SRC, FAK, paxilina, e incluso de proteínas distantes en la vía, como vinculina y cortactina. En BT-474, en las combinaciones, la expresión de HER2 no se vio afectada, probablemente debido a la compensación de los efectos inhibitorios de Tz/T-DM1 y los efectos inductores de Lp. Este

resultado subraya la importancia de considerar las terapias combinadas como estrategias potenciales para abordar el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo en estadios avanzados de la enfermedad.

Dado que la actividad de las proteínas depende en gran medida de su localización celular, se analizó mediante inmunofluorescencia la distribución de proteínas críticas que modulan diferentes pasos de la adhesión y migración celular, como FAK y cortactina. FAK actúa a nivel de las FA [159], mientras que cortactina actúa a nivel de la nucleación actínica para llevar a cabo la formación de protrusiones de membrana para el movimiento celular [187]. En el presente estudio, se encontró que los tratamientos con Lp, T-DM1 y las combinaciones Tz + Lp y T-DM1 + Lp inducen la translocación nuclear de FAK en las células BT-474 y SKBR3. La redistribución de FAK desde el citoplasma al núcleo en respuesta a agentes estresores ha sido previamente reportada por el grupo [110, 113, 114] y por otros autores [188, 189]. El reclutamiento de FAK hacia las FA es un paso esencial para llevar a cabo el movimiento celular, por lo que su ausencia en estos sitios, como se observó en este estudio tras los tratamientos con terapias dirigidas contra HER2, reduciría las posibilidades de la célula de migrar.

Además, se observó que las terapias dirigidas contra HER2 (Tz, T-DM1 y Lp) aumentan la localización de cortactina en la región perinuclear, siendo este efecto más pronunciado en los tratamientos combinados. La distribución de cortactina en la región perinuclear también ha sido visualizada por otros autores [190, 191]. Para que ocurra la migración celular, cortactina debe ser reclutada desde estructuras puntiformes citoplasmáticas concentradas en la región perinuclear hacia las FA, donde promueve la nucleación actínica y así, la migración celular [190, 191]. Por lo tanto, nuevamente, su ausencia en las FA, como se observó en este estudio tras los tratamientos con terapias dirigidas contra HER2, reduciría las posibilidades de la célula de migrar. En conjunto, estos hallazgos sugieren que los tratamientos combinados Tz + Lp y T-DM1 + Lp son más potentes que las monodrogas, disminuyendo la expresión e induciendo la redistribución celular de proteínas clave, alterando así los procesos de adhesión y migración celular.

Un hallazgo notable de este estudio es la evidencia de efectos antitumorales considerables tras la administración de *bajas concentraciones* de las terapias combinadas Tz+Lp y T-DM1+Lp. Aunque el presente estudio no aborda ensayos de toxicidad, este resultado es prometedor porque podría dar lugar a una mejor relación beneficio/toxicidad, lo

que resulta crucial en terapias contra el cáncer que conllevan a toxicidades severas [47]. Son escasas las publicaciones que han abordado este tipo de estudios. Rimawi *et al.* (2011) evidenció en un modelo *in vivo* de xenoinjertos, que una reducción de dosis de Tz+Lp a la mitad de lo que se la utiliza habitualmente en este modelo, resulta igualmente efectiva que el tratamiento a dosis completa. En ambos grupos experimentales se logró una regresión completa en el 93% de los ratones tratados [72]. Por otro lado, Po-Hung Hsieh *et al.* (2022) demostraron que Tz a concentraciones bajas es eficaz en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo en estadios tempranos de la enfermedad, siendo factible reducir significativamente la utilización total de fármaco [192] y posiblemente su toxicidad. Estos autores, respaldan nuestra idea de la necesidad de ensayos clínicos prospectivos que evalúen la administración de concentraciones bajas de estas terapias dirigidas contra HER2.

A continuación, el estudio adoptó un enfoque traslacional al utilizar herramientas bioinformáticas y bases de datos de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo para evaluar la capacidad del conjunto de genes/proteínas de interés (ERBB2/HER2, SRC/SRC, PTK2/FAK, PXN/paxilina, VCL/vinculina y CTTN/cortactina) como biomarcadores pronóstico. Se encontró que la expresión del ARNm de VCL/vinculina permite predecir la supervivencia considerando RFS, OS, DMSF y PPS. De manera similar, los niveles de expresión del ARNm de CTTN/cortactina mostraron valor pronóstico para predecir OS y DMSF, mientras que para RFS y PPS mostraron una tendencia ($p= 0,057$ y $0,074$ respectivamente). Es posible que esta tendencia no alcanzara la significancia estadística debido al tamaño limitado de la muestra (RFS: 285 pacientes, PPS: 36 pacientes). En cuanto al parámetro de mayor relevancia en este estudio, la DMSF, la mayoría de los genes/proteínas analizados mostraron potencia pronóstica, incluyendo a PTK2/FAK, PXN/paxilina, VCL/vinculina y CTTN/cortactina. Además, se encontró que como firma genética, los seis genes/proteínas involucrados en este estudio tienen capacidad para predecir tanto RFS como DMSF. En todos los casos donde se encontró poder pronóstico, salvo para SRC, se observó que una baja expresión de los ARNm predice tasas de supervivencia favorables. Este hallazgo no es sorprendente, dado que varios estudios han reportado una asociación entre la sobreexpresión de PTK2/FAK, PXN/paxilina, VCL/vinculina y CTTN/cortactina y la agresividad tumoral [119, 158, 191, 193]. Incluso, otros autores han evaluado el potencial de PTK2/FAK, PXN/paxilina, VCL/vinculina y CTTN/cortactina como biomarcadores pronósticos en distintos tipos de cáncer con resultados similares a los obtenidos en este estudio [121, 194-196].

Paralelamente, utilizando la plataforma ROC-plotter se evaluó el set de interés para identificar posibles genes candidatos a potenciales biomarcadores predictivos de respuesta a Tz. Se encontró que niveles bajos de ARNm de VCL/vinculina se asocian con una respuesta favorable a Tz, basada en RFS y pCR, mientras que los niveles bajos de expresión de ARNm de CTTN/cortactina se asocian con una pCR favorable. Reforzando estos hallazgos, Moon *et al.* (2023) demostraron recientemente tanto *in vivo* como *in vitro* que la sobreexpresión de CTTN confiere resistencia al Tz [197]. Utilizar la herramienta ROC-Plotter es un buen primer paso para identificar posibles biomarcadores predictivos. Sin embargo, para afirmar con mayor certeza y robustez que un biomarcador es predictivo, se requieren de análisis estadísticos más robustos como el modelo de Cox multivariado, que permite ajustar por posibles factores de confusión y evaluar la independencia de las variables en estudio. Por el contrario, ROC-plotter sólo evalúa la capacidad discriminativa de un gen en función de la sensibilidad y especificidad para diferenciar entre respondedores y no respondedores. Esto es *insuficiente* para afirmar que los genes propuestos tienen capacidad predictiva, siendo esta la principal limitación del estudio.

Por último, para evaluar *in vitro* el potencial del conjunto de genes/proteínas de interés como biomarcadores de respuesta a Tz, se estableció un modelo de resistencia adquirida a Tz, SKBR3-RTz, mediante exposición sostenida de las células a esta droga. Se observó que las células SKBR3-RTz presentan un fenotipo más agresivo en comparación con las células parentales sensibles a Tz, SKBR3, como se evidenció en su capacidad incrementada de adhesión. En el contexto metastásico de la enfermedad, donde células tumorales se encuentran en circulación sanguínea o linfática, una mayor capacidad de adhesión les otorga una mayor habilidad para colonizar y formar metástasis [198].

Por otro lado, sobre el par SKBR3 y SKBR3-RTz, se evaluó la expresión de FAK, paxilina, vinculina y cortactina mediante western blots. Si bien el objetivo 1, a partir de datos transcriptómicos (ARNm) de células BT-474 resistentes a Tz y T-DM1, mostró una regulación a la baja del gen que codifica para paxilina (PXN), esto no se correspondió con los niveles de la proteína en el modelo de resistencia adquirido establecido en el laboratorio. Al contrario, se observó que la expresión de paxilina es similar entre el modelo resistente a Tz, SKBR3-RTz, y sus parentales. Esto concuerda con el comportamiento opuesto respecto a la expresión de PXN entre células SKBR3 resistentes a Tz y células BT-474 resistentes a Tz reportado por Boyer *et al.* (2013) [160]. Incluso, ellos confirman mediante ensayos de western blot e inmunoprecipitación que en la línea SKBR3 resistente aumenta la

fosforilación pero no se ve afectada la expresión wild-type respecto a la línea parental. Los autores concluyen que los cambios en las vías de señalización en respuesta a la resistencia a Tz son contexto-dependientes [160]. Si bien tanto SKBR3 como BT-474 sobreexpresan HER2, presentan distintos orígenes y expresión de receptores hormonales que pueden explicar las diferencias observadas [160].

De manera similar, se observó que la expresión de FAK no se veía modificada entre control y resistentes. Esto hizo que FAK y paxilina finalmente no fueran consideradas como potenciales candidatas a biomarcadores de respuesta a Tz. Por otro lado, en este estudio se observó que vinculina y cortactina se encontraban reguladas al alza, sugiriendo su contribución en el desarrollo de resistencia. Considerando que la sobreexpresión de proteínas como vinculina y cortactina se ha asociado con un comportamiento agresivo en células cancerosas [191, 193], los resultados obtenidos en este estudio son esperables. Se ha demostrado que estas proteínas están involucradas en la regulación de procesos clave relacionados con la cascada metastásica [191, 193]. Por lo tanto, una regulación al alza de vinculina y cortactina en las células resistentes al tratamiento, y por ende más agresivas, es coherente con su función conocida en la progresión tumoral. Además, la regulación al alza de vinculina y cortactina en las células SKBR3-RTz es predecible teniendo en cuenta que las curvas ROC indicaron que niveles altos de VCL/vinculina y CTTN/cortactina se asocian a una respuesta desfavorable al Tz.

Por otro lado, se silenció la expresión de FAK, paxilina, vinculina y cortactina mediante el uso de ARNsi, y se evaluó su papel en la respuesta a Tz mediante el análisis de sus efectos en ensayos de adhesión y migración celular. Inicialmente, se observó que la expresión de vinculina está regulada por la presencia de FAK, paxilina y cortactina. Esta regulación coordinada resalta la interacción entre estas proteínas para controlar la dinámica del citoesqueleto actínico y los complejos de adhesión focal [199]. Por otro lado, se observó que en células SKBR3 sensibles, los ARNsi específicos de FAK/paxilina/cortactina disminuyen la adhesión y la migración celular, y la combinación Tz + ARNsi específicos potencian la inhibición aumentando la respuesta a Tz. Por el contrario, en células SKBR3-RTz resistentes, Tz y el silenciamiento de paxilina y cortactina no afectan la adhesión ni la motilidad celular. En cambio, el silenciamiento de FAK demostró ser eficaz en reducir significativamente ambos procesos celulares. Este descubrimiento es prometedor, ya que sugiere que FAK podría ser un objetivo terapéutico relevante en el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo resistente a Tz. De hecho, investigaciones previas respaldan esta

idea, señalando que FAK desempeña un papel crucial en varios procesos cancerígenos y mecanismos de resistencia [200, 201]. Asimismo, se ha informado que la inhibición de FAK tiene el potencial de mejorar la respuesta a Tz en el cáncer de mama HER2 positivo [201]. Finalmente, también se evidenció que la combinación de Tz junto con el ARN de interferencia específico para FAK/paxilina/cortactina, reducen o inhiben la adhesión y la migración, debilitando/revirtiendo la resistencia a Tz, sugiriendo que los ARNs específicos para FAK/paxilina/cortactina sensibilizan a las células resistentes a los efectos del Tz. En concordancia con este resultado, un estudio reciente indicó que la cortactina puede generar resistencia al Tz a través de la señalización DKK-1/WNT en el cáncer de mama HER2 positivo [197]. La sensibilización de las células resistentes a través de la inhibición específica de estas proteínas ofrece nuevas perspectivas para el desarrollo de terapias más efectivas y personalizadas contra el cáncer de mama HER2 positivo.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIÓN

Conclusión

Este trabajo de tesis doctoral ha demostrado que las terapias combinadas (Tz/T-DM1 + Lp) interaccionan favorablemente y ofrecen un enfoque prometedor al lograr un bloqueo más completo de la señalización de HER2 debido a sus diferentes mecanismos de acción. Esta estrategia terapéutica logró la inhibición de la viabilidad, adhesión y migración celular incluso a concentraciones bajas. Además, se observó que los tratamientos combinados inhiben eficazmente los procesos metastásicos al regular a la baja y afectar la localización de proteínas involucradas en la modulación de estos procesos celulares. Asimismo, se identificó a vinculina y cortactina como potenciales biomarcadores pronósticos y como candidatas a potenciales biomarcadores predictivos de respuesta a Tz. Estos hallazgos son alentadores para avanzar hacia un tratamiento más personalizado del cáncer de mama HER2 positivo. Al mismo tiempo, se sugiere que vinculina y cortactina podrían desempeñar un papel en el desarrollo de la resistencia a Tz, lo que las convierte en blancos terapéuticos a ser considerados en el abordaje de la resistencia a Tz en este tipo de cáncer.

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS

Referencias

1. Feng, Y., et al., *Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis*. *Genes Dis*, 2018. **5**(2): p. 77-106.
2. Osborne, C., P. Wilson, and D. Tripathy, *Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications*. *Oncologist*, 2004. **9**(4): p. 361-77.
3. Arnold, M., et al., *Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040*. *Breast*, 2022. **66**: p. 15-23.
4. Stingl, J. and C. Caldas, *Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis*. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(10): p. 791-9.
5. Cserni, G., *Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time*. *Pathologica*, 2020. **112**(1): p. 25-41.
6. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. *Nature*, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
7. Tsang, J.Y.S. and G.M. Tse, *Molecular Classification of Breast Cancer*. *Adv Anat Pathol*, 2020. **27**(1): p. 27-35.
8. Akaza, H., *[TNM classification]*. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi*, 1994. **85**(2): p. 229-41.
9. Edge, S.B. and C.C. Compton, *The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM*. *Ann Surg Oncol*, 2010. **17**(6): p. 1471-4.
10. Wolff, A.C., et al., *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: ASCO-College of American Pathologists Guideline Update*. *J Clin Oncol*, 2023. **41**(22): p. 3867-3872.
11. Payne, S.J., et al., *Predictive markers in breast cancer--the present*. *Histopathology*, 2008. **52**(1): p. 82-90.
12. Mitri, Z., T. Constantine, and R. O'Regan, *The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy*. *Chemother Res Pract*, 2012. **2012**: p. 743193.
13. Arteaga, C.L. and J.A. Engelman, *ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics*. *Cancer Cell*, 2014. **25**(3): p. 282-303.
14. Wieduwilt, M.J. and M.M. Moasser, *The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics*. *Cell Mol Life Sci*, 2008. **65**(10): p. 1566-84.
15. Atalay, G., et al., *Novel therapeutic strategies targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR) family and its downstream effectors in breast cancer*. *Ann Oncol*, 2003. **14**(9): p. 1346-63.
16. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(2): p. 127-37.
17. Tzahar, E., et al., *A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(10): p. 5276-87.
18. Oda, K., et al., *A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling*. *Mol Syst Biol*, 2005. **1**: p. 2005 0010.
19. Roskoski, R., Jr., *The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer*. *Pharmacol Res*, 2014. **79**: p. 34-74.
20. Slamon, D.J., et al., *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. *Science*, 1987. **235**(4785): p. 177-82.
21. Slamon, D.J., et al., *Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer*. *Science*, 1989. **244**(4905): p. 707-12.
22. Schwartz, R.S. and J.K. Erban, *Timing of Metastasis in Breast Cancer*. *N Engl J Med*, 2017. **376**(25): p. 2486-2488.
23. Burgess, A.W., *EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets*. *Growth Factors*, 2008. **26**(5): p. 263-74.

24. Mayer, I.A. and C.L. Arteaga, *The PI3K/AKT Pathway as a Target for Cancer Treatment*. Annu Rev Med, 2016. **67**: p. 11-28.
25. Swain, S.M., M. Shastry, and E. Hamilton, *Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions*. Nat Rev Drug Discov, 2023. **22**(2): p. 101-126.
26. Mendelsohn, J. and J. Baselga, *Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer*. J Clin Oncol, 2003. **21**(14): p. 2787-99.
27. Maximiano, S., et al., *Trastuzumab in the Treatment of Breast Cancer*. BioDrugs, 2016. **30**(2): p. 75-86.
28. Baselga, J., et al., *Mechanism of action of trastuzumab and scientific update*. Semin Oncol, 2001. **28**(5 Suppl 16): p. 4-11.
29. Pegram, M., et al., *Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers*. Oncogene, 1999. **18**(13): p. 2241-51.
30. Ishii, K., N. Morii, and H. Yamashiro, *Pertuzumab in the treatment of HER2-positive breast cancer: an evidence-based review of its safety, efficacy, and place in therapy*. Core Evid, 2019. **14**: p. 51-70.
31. Thomas, A., B.A. Teicher, and R. Hassan, *Antibody-drug conjugates for cancer therapy*. Lancet Oncol, 2016. **17**(6): p. e254-e262.
32. Peddi, P.F. and S.A. Hurvitz, *Ado-trastuzumab emtansine (T-DM1) in human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive metastatic breast cancer: latest evidence and clinical potential*. Ther Adv Med Oncol, 2014. **6**(5): p. 202-9.
33. Ogitani, Y., et al., *DS-8201a, A Novel HER2-Targeting ADC with a Novel DNA Topoisomerase I Inhibitor, Demonstrates a Promising Antitumor Efficacy with Differentiation from T-DM1*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(20): p. 5097-5108.
34. Schroeder, R.L., C.L. Stevens, and J. Sridhar, *Small molecule tyrosine kinase inhibitors of ErbB2/HER2/Neu in the treatment of aggressive breast cancer*. Molecules, 2014. **19**(9): p. 15196-212.
35. Rios-Luci, C., et al., *Adaptive resistance to trastuzumab impairs response to neratinib and lapatinib through deregulation of cell death mechanisms*. Cancer Lett, 2020. **470**: p. 161-169.
36. Xia, W., et al., *Anti-tumor activity of GW572016: a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/erbB2 and downstream Erk1/2 and AKT pathways*. Oncogene, 2002. **21**(41): p. 6255-63.
37. Dhritlahre, R.K. and A. Saneja, *Recent advances in HER2-targeted delivery for cancer therapy*. Drug Discov Today, 2021. **26**(5): p. 1319-1329.
38. Giordano, S.H., et al., *Systemic Therapy for Advanced Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer: ASCO Guideline Update*. J Clin Oncol, 2022. **40**(23): p. 2612-2635.
39. Gennari, A., et al., *ESMO Clinical Practice Guideline for the diagnosis, staging and treatment of patients with metastatic breast cancer*. Ann Oncol, 2021. **32**(12): p. 1475-1495.
40. Pohlmann, P.R., I.A. Mayer, and R. Mernaugh, *Resistance to Trastuzumab in Breast Cancer*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(24): p. 7479-7491.
41. Swain, S.M., et al., *Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer*. N Engl J Med, 2015. **372**(8): p. 724-34.
42. Dieras, V., et al., *Trastuzumab emtansine versus capecitabine plus lapatinib in patients with previously treated HER2-positive advanced breast cancer (EMILIA): a descriptive analysis of final overall survival results from a randomised, open-label, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2017. **18**(6): p. 732-742.
43. Cortes, J., et al., *Trastuzumab Deruxtecan versus Trastuzumab Emtansine for Breast Cancer*. N Engl J Med, 2022. **386**(12): p. 1143-1154.
44. Diaz-Gil, L., et al., *Modelling hypersensitivity to trastuzumab defines biomarkers of response in HER2 positive breast cancer*. J Exp Clin Cancer Res, 2021. **40**(1): p. 313.
45. Chien, A.J. and H.S. Rugo, *The cardiac safety of trastuzumab in the treatment of breast cancer*. Expert Opin Drug Saf, 2010. **9**(2): p. 335-46.
46. De Keulenaer, G.W., K. Doggen, and K. Lemmens, *The vulnerability of the heart as a pluricellular paracrine organ: lessons from unexpected triggers of heart failure in targeted ErbB2 anticancer therapy*. Circ Res, 2010. **106**(1): p. 35-46.
47. Copeland-Halperin, R.S., J.E. Liu, and A.F. Yu, *Cardiotoxicity of HER2-targeted therapies*. Curr Opin Cardiol, 2019. **34**(4): p. 451-458.

48. Vernieri, C., et al., *Resistance mechanisms to anti-HER2 therapies in HER2-positive breast cancer: Current knowledge, new research directions and therapeutic perspectives*. Crit Rev Oncol Hematol, 2019. **139**: p. 53-66.
49. Ozkavruk Eliyatkin, N., et al., *The role of p95HER2 in trastuzumab resistance in breast cancer*. J BUON, 2016. **21**(2): p. 382-9.
50. Mercogliano, M.F., et al., *TNFalpha-Induced Mucin 4 Expression Elicits Trastuzumab Resistance in HER2-Positive Breast Cancer*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(3): p. 636-648.
51. Palyi-Krekk, Z., et al., *Hyaluronan-induced masking of ErbB2 and CD44-enhanced trastuzumab internalisation in trastuzumab resistant breast cancer*. Eur J Cancer, 2007. **43**(16): p. 2423-33.
52. Dave, B., et al., *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, 2011. **29**(2): p. 166-73.
53. Zhang, S., et al., *Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways*. Nat Med, 2011. **17**(4): p. 461-9.
54. Scaltriti, M., et al., *Cyclin E amplification/overexpression is a mechanism of trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer patients*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(9): p. 3761-6.
55. De Laurentiis, M., et al., *A meta-analysis on the interaction between HER-2 expression and response to endocrine treatment in advanced breast cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(13): p. 4741-8.
56. Tortora, G., *Mechanisms of resistance to HER2 target therapy*. J Natl Cancer Inst Monogr, 2011. **2011**(43): p. 95-8.
57. Arpino, G., et al., *Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance*. Endocr Rev, 2008. **29**(2): p. 217-33.
58. Johnston, S., et al., *Lapatinib combined with letrozole versus letrozole and placebo as first-line therapy for postmenopausal hormone receptor-positive metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(33): p. 5538-46.
59. Lu, Y., et al., *Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin)*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(24): p. 1852-7.
60. Shattuck, D.L., et al., *Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast cancer cells*. Cancer Res, 2008. **68**(5): p. 1471-7.
61. Zhuang, G., et al., *Elevation of receptor tyrosine kinase EphA2 mediates resistance to trastuzumab therapy*. Cancer Res, 2010. **70**(1): p. 299-308.
62. Hou, Y., et al., *HER2 intratumoral heterogeneity is independently associated with incomplete response to anti-HER2 neoadjuvant chemotherapy in HER2-positive breast carcinoma*. Breast Cancer Res Treat, 2017. **166**(2): p. 447-457.
63. Derakhshani, A., et al., *Overcoming trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer using combination therapy*. J Cell Physiol, 2020. **235**(4): p. 3142-3156.
64. Ayoub, N.M., *Editorial: Novel Combination Therapies for the Treatment of Solid Cancers*. Front Oncol, 2021. **11**: p. 708943.
65. Bukowska, B., A. Gajek, and A. Marczak, *Two drugs are better than one. A short history of combined therapy of ovarian cancer*. Contemp Oncol (Pozn), 2015. **19**(5): p. 350-3.
66. Palmer, A.C., C. Chidley, and P.K. Sorger, *A curative combination cancer therapy achieves high fractional cell killing through low cross-resistance and drug additivity*. Elife, 2019. **8**.
67. Narayan, R.S., et al., *A cancer drug atlas enables synergistic targeting of independent drug vulnerabilities*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 2935.
68. Garcia-Fuente, A., et al., *CISNE: An accurate description of dose-effect and synergism in combination therapies*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 4964.
69. Hutchinson, L., *Targeted therapies: Lapatinib is effective in patients with p95HER2-positive tumors*. Nat Rev Clin Oncol, 2010. **7**(7): p. 358.
70. Lin, N.U., et al., *Phase II trial of lapatinib for brain metastases in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(12): p. 1993-9.
71. Konecny, G.E., et al., *Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells*. Cancer Res, 2006. **66**(3): p. 1630-9.

72. Rimawi, M.F., et al., *Reduced dose and intermittent treatment with lapatinib and trastuzumab for potent blockade of the HER pathway in HER2/neu-overexpressing breast tumor xenografts*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(6): p. 1351-61.
73. Baselga, J., et al., *Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial*. Lancet, 2012. **379**(9816): p. 633-40.
74. Moreno-Aspitia, A., et al., *Updated results from the international phase III ALTTO trial (BIG 2-06/Alliance N063D)*. Eur J Cancer, 2021. **148**: p. 287-296.
75. Wang, Y.C., et al., *Different mechanisms for resistance to trastuzumab versus lapatinib in HER2-positive breast cancers--role of estrogen receptor and HER2 reactivation*. Breast Cancer Res, 2011. **13**(6): p. R121.
76. Giuliano, M., et al., *Upregulation of ER Signaling as an Adaptive Mechanism of Cell Survival in HER2-Positive Breast Tumors Treated with Anti-HER2 Therapy*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(17): p. 3995-4003.
77. Barok, M., H. Joensuu, and J. Isola, *Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance*. Breast Cancer Res, 2014. **16**(2): p. 209.
78. Barok, M., et al., *Trastuzumab-DM1 causes tumour growth inhibition by mitotic catastrophe in trastuzumab-resistant breast cancer cells in vivo*. Breast Cancer Res, 2011. **13**(2): p. R46.
79. Lewis Phillips, G.D., et al., *Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate*. Cancer Res, 2008. **68**(22): p. 9280-90.
80. Hurvitz, S.A., et al., *Phase II randomized study of trastuzumab emtansine versus trastuzumab plus docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2013. **31**(9): p. 1157-63.
81. Slamon, D.J., et al., *Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2*. N Engl J Med, 2001. **344**(11): p. 783-92.
82. Marty, M., et al., *Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group*. J Clin Oncol, 2005. **23**(19): p. 4265-74.
83. Cortes, J., et al., *Efficacy and Safety of Trastuzumab Emtansine Plus Capecitabine vs Trastuzumab Emtansine Alone in Patients With Previously Treated ERBB2 (HER2)-Positive Metastatic Breast Cancer: A Phase 1 and Randomized Phase 2 Trial*. JAMA Oncol, 2020. **6**(8): p. 1203-1209.
84. Perez, E.A., et al., *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, 2019. **125**(22): p. 3974-3984.
85. Marchio, C., et al., *Evolving concepts in HER2 evaluation in breast cancer: Heterogeneity, HER2-low carcinomas and beyond*. Semin Cancer Biol, 2021. **72**: p. 123-135.
86. Morris, L.G., et al., *Pan-cancer analysis of intratumor heterogeneity as a prognostic determinant of survival*. Oncotarget, 2016. **7**(9): p. 10051-63.
87. Hoeben, A., E.A.J. Joosten, and M.H.J. van den Beuken-van Everdingen, *Personalized Medicine: Recent Progress in Cancer Therapy*. Cancers (Basel), 2021. **13**(2).
88. Schneider, D., et al., *Establishing the Evidence Bar for Molecular Diagnostics in Personalised Cancer Care*. Public Health Genomics, 2015. **18**(6): p. 349-58.
89. Yates, L.R., et al., *The European Society for Medical Oncology (ESMO) Precision Medicine Glossary*. Ann Oncol, 2018. **29**(1): p. 30-35.
90. Normanno, N., et al., *Cancer Biomarkers in the era of precision oncology: Addressing the needs of patients and health systems*. Semin Cancer Biol, 2022. **84**: p. 293-301.
91. Lambert, A.W., D.R. Pattabiraman, and R.A. Weinberg, *Emerging Biological Principles of Metastasis*. Cell, 2017. **168**(4): p. 670-691.
92. Mina, L.A. and G.W. Sledge, Jr., *Rethinking the metastatic cascade as a therapeutic target*. Nat Rev Clin Oncol, 2011. **8**(6): p. 325-32.
93. Burridge, K. and M. Chrzanowska-Wodnicka, *Focal adhesions, contractility, and signaling*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1996. **12**: p. 463-518.
94. Schlaepfer, D.D., S.K. Mitra, and D. Ilic, *Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1692**(2-3): p. 77-102.

95. Wehrle-Haller, B., *Assembly and disassembly of cell matrix adhesions*. *Curr Opin Cell Biol*, 2012. **24**(5): p. 569-81.
96. Katsumi, A., et al., *Integrins in mechanotransduction*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(13): p. 12001-4.
97. Lo, C.M., et al., *Cell movement is guided by the rigidity of the substrate*. *Biophys J*, 2000. **79**(1): p. 144-52.
98. Schlaepfer, D.D., C.R. Hauck, and D.J. Sieg, *Signaling through focal adhesion kinase*. *Prog Biophys Mol Biol*, 1999. **71**(3-4): p. 435-78.
99. Shi, Q. and D. Boettiger, *A novel mode for integrin-mediated signaling: tethering is required for phosphorylation of FAK Y397*. *Mol Biol Cell*, 2003. **14**(10): p. 4306-15.
100. Mitra, S.K., D.A. Hanson, and D.D. Schlaepfer, *Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**(1): p. 56-68.
101. Parsons, J.T., A.R. Horwitz, and M.A. Schwartz, *Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. **11**(9): p. 633-43.
102. Wozniak, M.A., et al., *Focal adhesion regulation of cell behavior*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1692**(2-3): p. 103-19.
103. Hou, J., et al., *HER2 reduces breast cancer radiosensitivity by activating focal adhesion kinase in vitro and in vivo*. *Oncotarget*, 2016. **7**(29): p. 45186-45198.
104. Vadlamudi, R.K., et al., *Heregulin and HER2 signaling selectively activates c-Src phosphorylation at tyrosine 215*. *FEBS Lett*, 2003. **543**(1-3): p. 76-80.
105. Kirchner, J., et al., *Live-cell monitoring of tyrosine phosphorylation in focal adhesions following microtubule disruption*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 6): p. 975-86.
106. Wu, J.C., et al., *Focal adhesion kinase-dependent focal adhesion recruitment of SH2 domains directs SRC into focal adhesions to regulate cell adhesion and migration*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 18476.
107. Maziveyi, M. and S.K. Alahari, *Cell matrix adhesions in cancer: The proteins that form the glue*. *Oncotarget*, 2017. **8**(29): p. 48471-48487.
108. Le Coq, J., et al., *New insights into FAK structure and function in focal adhesions*. *J Cell Sci*, 2022. **135**(20).
109. Uruno, T., et al., *Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin*. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(3): p. 259-66.
110. Castro-Guijarro, A.C., et al., *Combination Treatment of Retinoic Acid Plus Focal Adhesion Kinase Inhibitor Prevents Tumor Growth and Breast Cancer Cell Metastasis*. *Cells*, 2022. **11**(19).
111. Mondaca, J.M., et al., *Heregulin-induced cell migration is prevented by trastuzumab and trastuzumab-emtansine in HER2+ breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2021. **186**(2): p. 363-377.
112. Mondaca, J.M., et al., *Molecular Basis of LH Action on Breast Cancer Cell Migration and Invasion via Kinase and Scaffold Proteins*. *Front Cell Dev Biol*, 2020. **8**: p. 630147.
113. Sanchez, A.M., et al., *Retinoic acid induces nuclear FAK translocation and reduces breast cancer cell adhesion through Moesin, FAK, and Paxillin*. *Mol Cell Endocrinol*, 2016. **430**: p. 1-11.
114. Vanderhoeven, F., et al., *Synergistic antitumor activity by combining trastuzumab with retinoic acid in HER2 positive human breast cancer cells*. *Oncotarget*, 2018. **9**(41): p. 26527-26542.
115. Uzair, I.D., et al., *Molecular Actions of Thyroid Hormone on Breast Cancer Cell Migration and Invasion via Cortactin/N-WASP*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019. **10**: p. 139.
116. Thakur, R., et al., *Inhibition of STAT3, FAK and Src mediated signaling reduces cancer stem cell load, tumorigenic potential and metastasis in breast cancer*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 10194.
117. Mousson, A., et al., *Inhibiting FAK-Paxillin Interaction Reduces Migration and Invadopodia-Mediated Matrix Degradation in Metastatic Melanoma Cells*. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(8).
118. Wang, W., Y. Liu, and K. Liao, *Tyrosine phosphorylation of cortactin by the FAK-Src complex at focal adhesions regulates cell motility*. *BMC Cell Biol*, 2011. **12**: p. 49.
119. Lark, A.L., et al., *High focal adhesion kinase expression in invasive breast carcinomas is associated with an aggressive phenotype*. *Mod Pathol*, 2005. **18**(10): p. 1289-94.
120. Liu, W., et al., *The Role of Paxillin Aberrant Expression in Cancer and Its Potential as a Target for Cancer Therapy*. *Int J Mol Sci*, 2023. **24**(9).

121. Li, H., et al., *High expression of vinculin predicts poor prognosis and distant metastasis and associates with influencing tumor-associated NK cell infiltration and epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer*. Aging (Albany NY), 2021. **13**(4): p. 5197-5225.
122. Son, H., et al., *Effects of Cortactin Expression on Prognosis in Patients with Breast Cancer*. Diagnostics (Basel), 2023. **13**(18).
123. Irby, R.B. and T.J. Yeatman, *Role of Src expression and activation in human cancer*. Oncogene, 2000. **19**(49): p. 5636-42.
124. Yan, P., et al., *In silico analyses for potential key genes associated with gastric cancer*. PeerJ, 2018. **6**: p. e6092.
125. Guo, T., H. Ma, and Y. Zhou, *Bioinformatics analysis of microarray data to identify the candidate biomarkers of lung adenocarcinoma*. PeerJ, 2019. **7**: p. e7313.
126. Le, Y., *Screening and identification of key candidate genes and pathways in myelodysplastic syndrome by bioinformatic analysis*. PeerJ, 2019. **7**: p. e8162.
127. Barrett, T., et al., *NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Database issue): p. D991-5.
128. Russo, G., C. Zegar, and A. Giordano, *Advantages and limitations of microarray technology in human cancer*. Oncogene, 2003. **22**(42): p. 6497-507.
129. Diaz-Rodriguez, E., et al., *TRAIL receptor activation overcomes resistance to trastuzumab in HER2 positive breast cancer cells*. Cancer Lett, 2019. **453**: p. 34-44.
130. Rios-Luci, C., et al., *Resistance to the Antibody-Drug Conjugate T-DM1 Is Based in a Reduction in Lysosomal Proteolytic Activity*. Cancer Res, 2017. **77**(17): p. 4639-4651.
131. Davis, S. and P.S. Meltzer, *GEOquery: a bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor*. Bioinformatics, 2007. **23**(14): p. 1846-7.
132. Smyth, G.K., *limma: Linear Models for Microarray Data*. In: Gentleman, R., Carey, V.J., Huber, W., Irizarry, R.A., Dudoit, S. (eds) *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor. Statistics for Biology and Health*. Springer, 2005.
133. Ritchie, M.E., et al., *limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(7): p. e47.
134. Aubert, J., et al., *Determination of the differentially expressed genes in microarray experiments using local FDR*. BMC Bioinformatics, 2004. **5**: p. 125.
135. Szklarczyk, D., et al., *STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets*. Nucleic Acids Res, 2019. **47**(D1): p. D607-D613.
136. Szklarczyk, D., et al., *The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(D1): p. D362-D368.
137. Mirabelli, P., L. Coppola, and M. Salvatore, *Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research*. Cancers (Basel), 2019. **11**(8).
138. Diermeier-Daucher, S., et al., *Modular anti-EGFR and anti-Her2 targeting of SK-BR-3 and BT474 breast cancer cell lines in the presence of ErbB receptor-specific growth factors*. Cytometry A, 2011. **79**(9): p. 684-93.
139. Watanabe, S., et al., *Targeting of the HER2/HER3 signaling axis overcomes ligand-mediated resistance to trastuzumab in HER2-positive breast cancer*. Cancer Med, 2019. **8**(3): p. 1258-1268.
140. Liu, H., et al., *Trastuzumab-resistant breast cancer cells-derived tumor xenograft models exhibit distinct sensitivity to lapatinib treatment in vivo*. Biol Proced Online, 2023. **25**(1): p. 19.
141. Dana, H., et al., *Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA*. Int J Biomed Sci, 2017. **13**(2): p. 48-57.
142. Cardarelli, F., et al., *The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 25879.
143. Zazo, S., et al., *Generation, characterization, and maintenance of trastuzumab-resistant HER2+ breast cancer cell lines*. Am J Cancer Res, 2016. **6**(11): p. 2661-2678.
144. Korpál, M., et al., *Implementation of In Vitro Drug Resistance Assays: Maximizing the Potential for Uncovering Clinically Relevant Resistance Mechanisms*. J Vis Exp, 2015(106): p. e52879.

145. Florento, L., et al., *Comparison of Cytotoxic Activity of Anticancer Drugs against Various Human Tumor Cell Lines Using In Vitro Cell-Based Approach*. Int J Biomed Sci, 2012. **8**(1): p. 76-80.
146. van Meerloo, J., G.J. Kaspers, and J. Cloos, *Cell sensitivity assays: the MTT assay*. Methods Mol Biol, 2011. **731**: p. 237-45.
147. Foucquier, J. and M. Guedj, *Analysis of drug combinations: current methodological landscape*. Pharmacol Res Perspect, 2015. **3**(3): p. e00149.
148. Duarte, D. and N. Vale, *Evaluation of synergism in drug combinations and reference models for future orientations in oncology*. Curr Res Pharmacol Drug Discov, 2022. **3**: p. 100110.
149. Chou, T.C., *Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method*. Cancer Res, 2010. **70**(2): p. 440-6.
150. Chou, T.C. and P. Talalay, *Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors*. Adv Enzyme Regul, 1984. **22**: p. 27-55.
151. Okegawa, T., et al., *The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy*. Acta Biochim Pol, 2004. **51**(2): p. 445-57.
152. Bouchalova, P. and P. Bouchal, *Current methods for studying metastatic potential of tumor cells*. Cancer Cell Int, 2022. **22**(1): p. 394.
153. Andrews, N.C. and D.V. Faller, *A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(9): p. 2499.
154. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
155. Gyorffy, B., *Transcriptome-level discovery of survival-associated biomarkers and therapy targets in non-small-cell lung cancer*. Br J Pharmacol, 2024. **181**(3): p. 362-374.
156. Soreide, K., *Receiver-operating characteristic curve analysis in diagnostic, prognostic and predictive biomarker research*. J Clin Pathol, 2009. **62**(1): p. 1-5.
157. Fekete, J.T. and B. Gyorffy, *ROCplot.org: Validating predictive biomarkers of chemotherapy/hormonal therapy/anti-HER2 therapy using transcriptomic data of 3,104 breast cancer patients*. Int J Cancer, 2019. **145**(11): p. 3140-3151.
158. Alpha, K.M., W. Xu, and C.E. Turner, *Paxillin family of focal adhesion adaptor proteins and regulation of cancer cell invasion*. Int Rev Cell Mol Biol, 2020. **355**: p. 1-52.
159. Hu, Y.L., et al., *FAK and paxillin dynamics at focal adhesions in the protrusions of migrating cells*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 6024.
160. Boyer, A.P., et al., *Quantitative proteomics with siRNA screening identifies novel mechanisms of trastuzumab resistance in HER2 amplified breast cancers*. Mol Cell Proteomics, 2013. **12**(1): p. 180-93.
161. Friedl, P. and K. Wolf, *Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(5): p. 362-74.
162. Deakin, N.O. and C.E. Turner, *Distinct roles for paxillin and Hic-5 in regulating breast cancer cell morphology, invasion, and metastasis*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(3): p. 327-41.
163. Caudle, R.M. and G.M. Williams, *The misuse of analysis of variance to detect synergy in combination drug studies*. Pain, 1993. **55**(3): p. 313-317.
164. Bravo-Cordero, J.J., L. Hodgson, and J. Condeelis, *Directed cell invasion and migration during metastasis*. Curr Opin Cell Biol, 2012. **24**(2): p. 277-83.
165. Kirkbride, K.C., et al., *Cortactin: a multifunctional regulator of cellular invasiveness*. Cell Adh Migr, 2011. **5**(2): p. 187-98.
166. Nahta, R., *Pharmacological strategies to overcome HER2 cross-talk and Trastuzumab resistance*. Curr Med Chem, 2012. **19**(7): p. 1065-75.
167. Patani, N., L.A. Martin, and M. Dowsett, *Biomarkers for the clinical management of breast cancer: international perspective*. Int J Cancer, 2013. **133**(1): p. 1-13.
168. Novikov, N.M., et al., *Mutational drivers of cancer cell migration and invasion*. Br J Cancer, 2021. **124**(1): p. 102-114.
169. Shortrede, J.E., et al., *Paxillin, a novel controller in the signaling of estrogen to FAK/N-WASP/Arp2/3 complex in breast cancer cells*. Mol Cell Endocrinol, 2016. **430**: p. 56-67.
170. Buccitelli, C. and M. Selbach, *mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control*. Nat Rev Genet, 2020. **21**(10): p. 630-644.

171. Maadi, H. and Z. Wang, *A Novel Mechanism Underlying the Inhibitory Effects of Trastuzumab on the Growth of HER2-Positive Breast Cancer Cells*. *Cells*, 2022. **11**(24).
172. Matsumoto, A., et al., *Antitumor effect of lapatinib and cytotoxic agents by suppression of E2F1 in HER2-positive breast cancer*. *Molecular Medicine Reports*, 2018.
173. Liu, L., et al., *Effects of lapatinib on cell proliferation and apoptosis in NB4 cells*. *Oncol Lett*, 2018. **15**(1): p. 235-242.
174. Albanell, J., et al., *Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4*. *Adv Exp Med Biol*, 2003. **532**: p. 253-68.
175. Scaltriti, M., et al., *Lapatinib, a HER2 tyrosine kinase inhibitor, induces stabilization and accumulation of HER2 and potentiates trastuzumab-dependent cell cytotoxicity*. *Oncogene*, 2009. **28**(6): p. 803-14.
176. Le, X.F., et al., *Modulation of MicroRNA-194 and cell migration by HER2-targeting trastuzumab in breast cancer*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e41170.
177. Chintalaramulu, N., et al., *Lapatinib inhibits doxorubicin induced migration of HER2-positive breast cancer cells*. *Inflammopharmacology*, 2020. **28**(5): p. 1375-1386.
178. Koren, S. and M. Bentires-Alj, *Breast Tumor Heterogeneity: Source of Fitness, Hurdle for Therapy*. *Mol Cell*, 2015. **60**(4): p. 537-46.
179. Yamada, K.M. and E. Cukierman, *Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D*. *Cell*, 2007. **130**(4): p. 601-10.
180. Boyer, J.Z., et al., *Activity of trastuzumab emtansine (T-DM1) in 3D cell culture*. *Breast Cancer Res Treat*, 2021. **188**(1): p. 65-75.
181. Gangadhara, S., et al., *3D culture of Her2+ breast cancer cells promotes AKT to MAPK switching and a loss of therapeutic response*. *BMC Cancer*, 2016. **16**: p. 345.
182. de Azambuja, E., et al., *Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): survival outcomes of a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial and their association with pathological complete response*. *Lancet Oncol*, 2014. **15**(10): p. 1137-46.
183. Yuan, Y., et al., *Lapatinib and lapatinib plus trastuzumab therapy versus trastuzumab therapy for HER2 positive breast cancer patients: an updated systematic review and meta-analysis*. *Syst Rev*, 2022. **11**(1): p. 264.
184. Suga, J., et al., *Estradiol promotes rapid degradation of HER3 in ER-positive breast cancer cell line MCF-7*. *Biochem Biophys Rep*, 2018. **16**: p. 103-109.
185. Endo, Y. and W.J. Wu, *Tumor Extrinsic Factors Mediate Primary T-DM1 Resistance in HER2-Positive Breast Cancer Cells*. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(10).
186. Junttila, T.T., et al., *Trastuzumab-DM1 (T-DM1) retains all the mechanisms of action of trastuzumab and efficiently inhibits growth of lapatinib insensitive breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. **128**(2): p. 347-56.
187. Higgs, H.N., *Actin nucleation: cortactin caught in the act*. *Curr Biol*, 2002. **12**(17): p. R593-5.
188. Lim, S.T., et al., *Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation*. *Mol Cell*, 2008. **29**(1): p. 9-22.
189. Zhou, J., Q. Yi, and L. Tang, *The roles of nuclear focal adhesion kinase (FAK) on Cancer: a focused review*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019. **38**(1): p. 250.
190. Weed, S.A. and J.T. Parsons, *Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly*. *Oncogene*, 2001. **20**(44): p. 6418-34.
191. Yin, M., W. Ma, and L. An, *Cortactin in cancer cell migration and invasion*. *Oncotarget*, 2017. **8**(50): p. 88232-88243.
192. Hsieh, P.H., et al., *Alternative trastuzumab dosing strategies in HER2-positive early breast cancer are associated with patient out-of-pocket savings*. *NPJ Breast Cancer*, 2022. **8**(1): p. 32.
193. Rubashkin, M.G., et al., *Force engages vinculin and promotes tumor progression by enhancing PI3K activation of phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate*. *Cancer Res*, 2014. **74**(17): p. 4597-611.
194. Aref, S., et al., *Cortactin Expression is a Novel Biomarker for Risk Stratification of T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2021. **43**(6): p. e798-e803.
195. Qiao, W., et al., *Prognostic and clinical significance of focal adhesion kinase expression in breast cancer: A systematic review and meta-analysis*. *Transl Oncol*, 2020. **13**(11): p. 100835.

196. Short, S.M., et al., *The expression of the cytoskeletal focal adhesion protein paxillin in breast cancer correlates with HER2 overexpression and may help predict response to chemotherapy: a retrospective immunohistochemical study.* Breast J, 2007. **13**(2): p. 130-9.
197. Moon, S.J., et al., *CTTN Overexpression Confers Cancer Stem Cell-like Properties and Trastuzumab Resistance via DKK-1/WNT Signaling in HER2 Positive Breast Cancer.* Cancers (Basel), 2023. **15**(4).
198. Steeg, P.S., *Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges.* Nat Med, 2006. **12**(8): p. 895-904.
199. Schiller, H.B. and R. Fassler, *Mechanosensitivity and compositional dynamics of cell-matrix adhesions.* EMBO Rep, 2013. **14**(6): p. 509-19.
200. Metsiou, D.N., et al., *Adhesion strength and anti-tumor agents regulate vinculin of breast cancer cells.* Front Oncol, 2022. **12**: p. 811508.
201. Lazaro, G., et al., *Targeting focal adhesion kinase in ER+/HER2+ breast cancer improves trastuzumab response.* Endocr Relat Cancer, 2013. **20**(5): p. 691-704.

CAPÍTULO 8: ANEXO

Publicaciones

El presente trabajo ha sido recientemente publicado:

- Castro-Guijarro AC, Sanchez AM, Flamini MI. Potential Biomarkers Associated with Prognosis and Trastuzumab Response in HER2+ Breast Cancer. *Cancers*. 2023; 15(17):4374. <https://doi.org/10.3390/cancers15174374>. *Oncology Q1, Cancer Research Q2*. Impact factor: 4.553 (Scimago).



Article

Potential Biomarkers Associated with Prognosis and Trastuzumab Response in HER2+ Breast Cancer

Ana Carla Castro-Guijarro ^{1,2}, Angel Matias Sanchez ^{2,*} and Marina Inés Flamini ^{1,*}



Citation: Castro-Guijarro, A.C.;

Sanchez, A.M.; Flamini, M.I.

Potential Biomarkers Associated with Prognosis and Trastuzumab Response in HER2+ Breast Cancer. *Cancers* 2023, 15, 4374. <https://doi.org/10.3390/cancers15174374>

Academic Editor: Christoph FA. Vogel

Received: 12 June 2023

Revised: 16 August 2023

Accepted: 29 August 2023

Published: 1 September 2023

¹ Laboratorio de Biología Tumoral, Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad Nacional de Cuyo, M5500 Mendoza, Argentina

² Laboratorio de Transducción de Señales y Movimiento Celular, Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad Nacional de Cuyo, M5500 Mendoza, Argentina

* Correspondence: amsanchez@mendoza-conicet.gov.ar (A.M.S.); mflamini@mendoza-conicet.gov.ar (M.I.F.); Tel.: +54-261-524-4192 (ext. 4371) (A.M.S.); +54-261-524-4142 (ext. 4371) (M.I.F.); Fax: +54-261-524-4001 (A.M.S. & M.I.F.)

Simple Summary: Breast cancer is the most common cancer among women worldwide. Overexpression of the HER2 receptor is associated with a worse prognosis and poorer survival. Consequently, several anti-HER2 therapies have been developed, such as trastuzumab. However, resistance still affects a significant population and is currently a major challenge in clinical oncology. Therefore, this study aims to identify biomarkers to predict disease progression and anticipate the efficacy of therapy to avoid therapeutic failure. We identified deregulated genes in trastuzumab-resistant cells associated with cell adhesion and migration. We demonstrate that combined anti-HER2 therapies are encouraging since low doses exhibit a synergism interaction and efficiently inhibit cell adhesion and migration critical process in cancer metastasis. We found deregulated proteins in resistant cells that may be potential biomarkers of response to therapy and may be involved in therapy resistance, useful to predict survival and response to trastuzumab therapy in HER2-positive breast cancer patients. These findings are promising for personalized breast cancer management to mitigate resistance and maximize the safety and efficacy of anti-HER2 therapies.

Presentaciones a Congresos

Este trabajo de tesis ha sido presentado en diferentes congresos tanto nacionales como internacionales:

- Redondo AL, Castro-Guijarro AC, Sanchez AM, Flamini MI. Potential Biomarkers Associated with Prognosis and Trastuzumab Response in HER2+ Breast Cancer. Simposio

Internacional Medicina Traslacional. Presentación de video audiovisual y comunicación oral. (2023).

- Castro-Guijarro, Ana Carla; Sanchez, Angel Matias; Flamini, Marina Ines. Hacia una terapia personalizada: Identificación de potenciales biomarcadores pronósticos y predictivos en cáncer de mama HER2 positivo. VII Pre Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo - AUGM - Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Exposición de póster. (2023).
- Castro-Guijarro, Ana Carla; Sanchez, Angel Matias; Flamini, Marina Ines. Hacia una terapia personalizada: Identificación de potenciales biomarcadores pronósticos y predictivos en cáncer de mama HER2 positivo. Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo - AUGM. Paraguay. Exposición de póster. (2023).
- Castro-Guijarro AC, Mondaca JM, Vanderhoeven F, Redondo A, Sanchez AM, Flamini MI. Potential biomarkers associated with prognosis and trastuzumab response in HER2+ breast cancer. Symposium Frontiers in Bioscience 4. Buenos Aires. Exposición de póster. (2023).
- Castro A, Fernandez J, Vanderhoeven F, Mondaca J, Redondo A, Sanchez A, Flamini M. Sensibilidad y resistencia frente a estrategias terapéuticas combinadas en cáncer de mama HER2+. XX Congreso Argentino de Cancerología, Buenos Aires. Exposición de Póster y publicación en Revista Argentina de Cancerología.(2022).
- Mondaca, J.M.; Castro A.C.; Uzair, I.D.; Vanderhoeven F.; Flamini, M.I; Sánchez, A.M. Rol de heregulina sobre trastuzumab y trastuzumab-emtansine en la migración de células de cáncer de mama HER-2+. I Congreso Interuniversitario I+D+i Mendoza. Exposición de póster. (2021).
- Castro A., Redondo A., Sanchez A., Flamini M. Terapias antiHER2 en cáncer de mama: efecto en la viabilidad y adhesión celular. XIX Congreso Argentino de Cancerología, Buenos Aires. Exposición de póster y publicación en Revista Argentina de Cancerología. (2020).
- Mondaca J., Castro A., Flamini M.I., Sanchez A.M. Accionar inhibitorio de Trastuzumab y Trastuzumab-emtansine sobre proteínas targets de la migración celular en cáncer de mama HER2+. XIX Congreso Argentino de Cancerología, Buenos Aires. Exposición de Póster, comunicación oral y publicación en Revista Argentina de Cancerología. (2020).
- Castro Guijarro AC, Sánchez AM, Flamini MI. Analysis of anti-HER2 drug interaction in HER2- positive human breast cancer cells: SK-BR-3 and BT-474. XXXVII Reunión Científica Anual. Sociedad de Biología de Cuyo, San Luis. Exposición de poster y publicación en Revista Biocell. (2019).

Premios y Distinciones

Además, ha recibido premios y distinciones en diferentes eventos científicos:

- **Trabajo distinguido “Mención Especial”**

Trabajo: “Potential Biomarkers Associated with Prognosis and Trastuzumab Response in HER2+ Breast Cancer”. Autores: Redondo AL, Castro-Guijarro AC, Sanchez AM, Flamini MI. Evento: III Simposio Internacional Medicina Traslacional. 12/10/2023. Descripción: Distinción al mejor trabajo en la categoría Joven Investigador.

- **“Trabajo seleccionado para representar a la Universidad Nacional de Cuyo en las VII Pre Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo - AUGM en Paraguay**

Trabajo: “Hacia una terapia personalizada: Identificación de potenciales biomarcadores pronósticos y predictivos en cáncer de mama HER2 positivo”. Autores: Castro-Guijarro AC, Sanchez Angel Matias, Flamini, Marina Ines. Evento: VII Pre Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo - AUGM - Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. 1/08/23 (Pre Jornada) y del 10/10/23 al 14/10/23 (Jornada). Descripción: El premio consistió en una beca de alojamiento y traslado a Paraguay.

- **“Trabajo seleccionado para ser presentado en el Simposio Internacional Frontiers in Bioscience 4”**

Trabajo: “Potential biomarkers associated with prognosis and trastuzumab response in HER2+ breast cancer”. Autores: Castro-Guijarro AC, Mondaca JM, Vanderhoeven F, Redondo A, Sanchez AM, Flamini MI. Evento: Symposium Frontiers in Bioscience 4, Buenos Aires. Del 13/09/23 al 22/09/23. Descripción: El premio consistió en una beca de alojamiento y traslado a Buenos Aires.

- **“Premio Dra. Silvia Jovtis”**

Trabajo: Accionar inhibitorio de Trastuzumab y Trastuzumab-emtansine sobre proteínas targets de la migración celular en cáncer de mama HER2+. Autores: Mondaca J., Castro A., Flamini M.I. Evento: XIX Congreso Argentino de Cancerología, Buenos Aires. Descripción: Reconocimiento a los mejores trabajos en investigación en cáncer del evento. El premio Doctora Silvia Jovtis consistió en un estímulo económico para los autores.