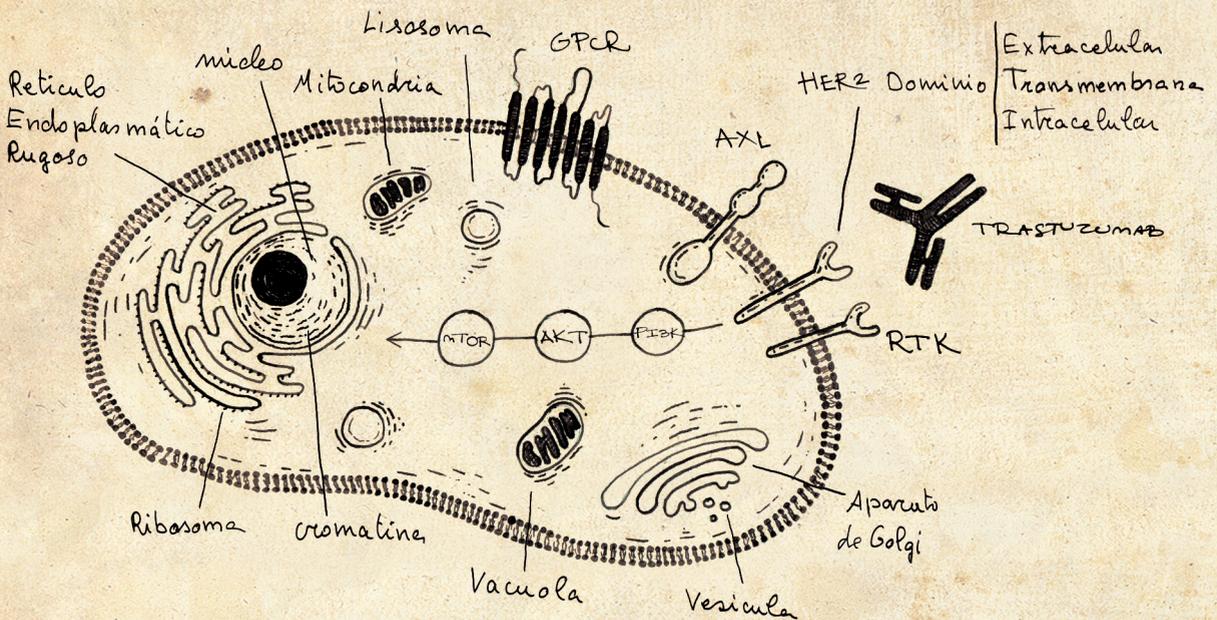




VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia  
Programa 3139 Departament de Medicina

# Nuevas vías moleculares implicadas en los mecanismos de resistencia primaria y adquirida en cáncer de mama HER2 positivo



Tesis Doctoral presentada por:  
**Juan Miguel Cejalvo Andújar**

Directores:

Prof. Ana Lluch Hernández

Dr. José Alejandro Pérez Fidalgo

Dra. Pilar Eroles Asensio

Valencia, enero 2018





VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

**Facultat de Medicina i Odontologia**  
Programa 3139 Departament de Medicina

**Nuevas vías moleculares implicadas en los mecanismos de resistencia  
primaria y adquirida en cáncer de mama HER2 positivo**

Tesis Doctoral presentada por:  
Juan Miguel Cejalvo Andújar

Directores:  
Prof. Ana Lluch Hernández  
Dr. José Alejandro Pérez Fidalgo (Prof. asociado)  
Dra. Pilar Eroles Asensio

Enero, 2018



Prof. Ana Lluch Hernández, Catedrática del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de València. Jefe de Servicio de Hematología y Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario de València.

Dr. José Alejandro Pérez Fidalgo, médico oncólogo adjunto del Hospital Clínico Universitario de València.

Dra. Pilar Eroles Asensio, Investigadora de la Fundación para la Investigación del Hospital Clínico Universitario de València /INCLIVA.

CERTIFICAN:

Que la presente tesis doctoral, titulada “NUEVAS VÍAS MOLECULARES IMPLICADAS EN LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA PRIMARIA Y ADQUIRIDA EN CÁNCER DE MAMA HER2 POSITIVO”, que presenta Don Juan Miguel Cejalvo Andújar para optar al Grado de Doctor por la Universidad de València, ha sido realizada bajo su dirección en el departamento de Medicina de la Facultad de Medicina dentro del programa de doctorado 3139 así como en el Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico Universitario de València (INCLIVA), y que se encuentra finalizada y lista para su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firman la presente en València, a 23 de Enero de 2018.

Fdo.: Prof. Ana Lluch Hernández

Fdo: Dr. José Alejandro Pérez Fidalgo

Fdo: Dra. Pilar Eroles Asensio



## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría poder agradecer a todas las personas que de una forma u otra han contribuido en este trabajo. Primero, quiero dar las gracias a mis directores de tesis:

A la Dra. Ana Lluch, no sé que podría decirte que no sepas. Gracias por confiar en mi desde el primer día, por motivarme y encender en mi la chispa de la investigación. Por haberme enseñado que lo más importante son los pacientes y darme la oportunidad de trabajar junto a ti. Tu capacidad de trabajo y dedicación han sido un ejemplo. No imagino una mejor mentor que tú, gracias.

Al Dr. Jose Alejandro Pérez-Fidalgo, gracias por tu disponibilidad. Has sido el motor de este trabajo, gracias por escucharme en los momentos de más bajo ánimo y por tu apoyo que ha hecho posible llevar a término la tesis.

A la Dra. Pilar Eroles, gracias por abrirme las puertas de tu laboratorio y haberme facilitado siempre todos los medios. Tu orientación ha sido clave para el desarrollo de la tesis. Gracias también a tu equipo (Eduardo, Anna y Begoña) por su paciencia infinita y por estar ahí siempre que los he necesitado.

Además, quería hacer una mención especial al Dr. Andrés Cervantes, gracias por tu generosidad, por haberme enseñado todo lo que sé en investigación clínica y traslacional y haberme dado la oportunidad de participar en la unidad de ensayos clínicos. Ha sido un placer aprender de un verdadero maestro, siempre dispuesto a ayudar. Trabajar con gente a la que admiras es un auténtico regalo.

A la Dra. Amparo Gisbert, gracias por transmitirme el valor de la bioética en nuestra profesión y la importancia de una medicina más humana. Eres todo un referente en la medicina paliativa y gracias a ti nuestros pacientes están mejor tratados.

A todo el equipo de Hematología y Oncología Médica del Hospital Clínico de València (médicos, enfermeras, data manager, “secres”, auxiliares...). Gracias por vuestra paciencia, por hacer fácil lo difícil. Sois un equipo de lujo.

A mis compañeros de residencia, gracias por todos los días y noches que hemos pasado juntos. A Noelia, un apoyo fundamental, tantos momentos vividos, tantos estreses compartidos, gracias por estar siempre ahí. A la italiana, Valentina, gracias por muchas cosas, entre otras, por los madrugones para ir al labo y poder llegar a las ocho de la mañana como clavos a la sesión, te debo mis primeros western blots. Al grupito de “nos vemos en las guardias”, porque sin vosotros me reiría mucho menos al día.

A mi familia: mis padres, Juan Miguel y María Ángeles, que siempre han luchado para darme la mejor educación e inculcarme valores fundamentales de la vida, su apoyo sostenido e incondicional ha hecho todo ésto posible. A mi hermana, M<sup>a</sup> José, por haber sido inspiradora, gracias por el ejemplo de tenacidad y energía, ella sembró mi interés por la medicina. A mis tíos y primos, en especial a Isabel, que espero se sientan orgullosos de mi trabajo y de mi. No quiero dejar de mencionar a mis abuelos: Ricardo que me enseñó a observar y a aprender de la naturaleza y Juliana que, además de ser una gran abuela con especial e intuitivo sentido de la vida, fue una amiga.

A mis amigos que me han ayudado y confiado en mi todo este tiempo. A mis “Olivas” que constituyen esas raíces profundas que sostiene nuestra pequeña familia tribal que año tras años cultivamos y cuidamos con esmero. A Alejo que le ha dado forma y diseño a la tesis y todo a contrareloj, gracias.

También quiero dar las gracias a mis compañeros de Barcelona que me han enseñado tanto y tanto de investigación básica, pero esto será capítulo de otro libro.

Por último a los pacientes y sus familiares, gracias porque sois un ejemplo diario de lucha, porque somos afortunados de poder aprender tantas cosas de vosotros y, sobre todo, a saber valorar las cosas importantes en la vida.

Este camino recorrido no habría sido posible sin todos vosotros... gracias! Seguiremos trabajando para mantener una sanidad pública de calidad y al acceso de todos.



*Si quieres hacer algo en la vida, no creas en la palabra imposible. Nada hay imposible para una voluntad enérgica. Si tratas de disparar una flecha, apunta muy alto, lo más alto que puedas; cuanto más alto apuntes más lejos irá.*

La lucha por la vida  
Pío Baroja (1872 - 1956)



# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	9
1. Epidemiología del cáncer y del cáncer de mama .....	11
2. Clasificación del cáncer de mama: Criterios anatomopatológicos y subtipos intrínsecos .....	13
2.1. Luminal A .....	13
2.2. Luminal B .....	14
2.3. HER2-Enriched .....	15
2.4. Basal-like .....	15
2.5. Normal-like .....	16
2.6. Claudin-Low .....	16
3. Cáncer de mama HER2 positivo y Familia HER .....	17
4. Tratamientos Anti-HER2 .....	22
4.1. Trastuzumab .....	23
4.2. Lapatinib .....	25
4.3. Pertuzumab .....	26
4.4. TDM-1 .....	27
5. Mecanismos de Resistencia a tratamiento anti-HER2 .....	28
5.1. p95HER2 .....	28
5.2. Expresión de mucina 4 .....	30
5.3. Vías de señalización alternativas .....	31
5.3.1. Vía PI3K/AKT/mTOR .....	32
A. Fisiología de la señalización PI3K .....	33
a. Señalización AKT .....	34
b. mTOR .....	34
B. Alteraciones de la vía PI3K en la carcinogénesis del ca. de mama .....	35
a. Activación de la vía PI3K a través de los receptores tirosina quinasa, RAS y GPCRs .....	35

b. Pérdida de <i>PTEN</i> .....	36
c. Activación <i>PIK3CA</i> .....	36
d. Desregulación <i>AKT</i> .....	37
C. Vía PI3K y ca. de mama HER2 positivo .....	38
5.3.2. <i>Cross-talk</i> con otros receptores .....	40
A. Receptores Tirosina quinasa .....	40
a. Transición Epitelio-Mesénquima: AXL y MET .....	40
b. Otros: IGFR, FGFR, RON, EphA2 .....	47
B. Receptores Hormonales .....	50
C. Otros receptores de la Familia HER .....	51
D. Polimorfismo FcYR .....	52
6. Mecanismos para superar las resistencias .....	53
6.1. <i>Switching</i> agente quimioterápico .....	53
6.2. <i>Switching</i> tratamiento anti-HER2 .....	55
6.3. Combinación de tratamiento anti-HER2 .....	55
6.4. Futuras estrategias .....	56
6.4.1. Neratinib .....	56
6.4.2. Inhibidores de la vía PI3K/AKT/mTOR .....	56
6.4.3. Inhibidores IGFR1 .....	58
6.4.4. Proteínas de Choque Térmico 90 (HSP90) .....	58
6.4.5. Inhibidores VEGFR .....	59
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	65
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	69
<b>1. Materiales</b> .....	71
1.1. Líneas celulares. Descripción .....	71
1.2. Tratamientos utilizados .....	71
1.3. Generación de la línea celular resistente (AU565-R) .....	72
1.4. Aparataje utilizado .....	73
1.5. Base de datos pública .....	74

<b>2. Métodos</b>	75
2.1. Cultivos celulares	75
2.1.1. Medios de cultivo	75
2.1.2. Mantenimiento de células	75
2.1.3. Inactivación de SBF (Suero Bovino Fetal)	75
2.1.4. Tratamiento con Tripsina-EDTA	75
2.1.5. Congelación	76
2.1.6. Descongelación	76
2.2. Método MTT para determinar viabilidad celular	77
2.2.1. Fundamento	77
2.2.2. Protocolo	77
2.3. Método para el análisis de mRNA: q-PCR	78
2.3.1. Extracción de RNA	78
2.3.2. RT-PCR en tiempo real	78
2.4. Método para el análisis de proteínas: Western Blot	79
2.4.1. Extracción de Proteína	79
2.4.2. Método para determinar la concentración de proteína ( <i>BCA protein assay</i> )	79
2.4.3. Western Blotting	80
2.5. Análisis estadístico de los resultados	81
<b>RESULTADOS</b>	85
1. Evaluación de la sensibilidad a trastuzumab y descripción morfológica de las líneas celulares	87
2. Aumento de expresión de los genes <i>AXL</i> y <i>MET</i> en las líneas celulares resistentes a trastuzumab	90
3. Aumento de las proteínas <i>AXL</i> y <i>MET</i> en las líneas celulares con resistencia a trastuzumab	91
4. La inhibición de <i>AXL</i> revierte resistencia adquirida a trastuzumab (AU565-R)	93

5. La inhibición de la vía PI3K mejora la sensibilidad a trastuzumab en las HCC1954 .....	95
6. Análisis <i>in silico</i> en la base de datos pública .....	97
<b>DISCUSIÓN</b> .....	103
<b>CONCLUSIONES</b> .....	113
<b>ANEXO 1: Publicaciones derivadas</b> .....	119
<b>ANEXO 2: Descripción clínica de la cohorte de pacientes del Hospital Clínico Universitario de València</b> .....	121
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	123
<b>EPÍLOGO</b> .....	135

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Resumen de 5 ensayos clínicos randomizados que muestran el beneficio del uso de trastuzumab en pacientes HER2+.

**Tabla 2.** Panel de las cuatro líneas celulares tratadas con trastuzumab. Se clasificaron como sensibles (S) o resistentes (R) evaluando la proliferación en presencia y ausencia de trastuzumab 15 µg/mL durante 7 días. La respuesta a trastuzumab se calculó con el *fold change* del ratio de crecimiento de las células tratadas con las células no tratadas. Si el *fold change* de descenso del crecimiento es  $\geq 1.2$  veces se consideraron sensibles y si  $\leq 1.2$  veces se consideraron resistentes.

**Tabla 3.** Viabilidad celular de las tres líneas celulares tratadas con trastuzumab, TP-0903 y la combinación.

**Tabla 4.** Co-expresión de genes con *AXL* implicados en la transición epitelio- mesénquima.

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Instituto Nacional de Estadística. Publicado el 30 de marzo de 2016.

**Figura 2.** Incidencia estimada de los tumores más frecuentes en España en mujeres en el año 2015.

**Figura 3.** Esquema receptor HER2.

**Figura 4.** Esquema vía PI3K/AKT/mTOR.

**Figura 5.** Esquema del receptor AXL.

**Figura 6.** Esquema del receptor MET.

**Figura 7.** Evaluación molecular de la línea celular parental sensible a trastuzumab (AU565-S) y la línea con resistencia adquirida (AU565-R).

**Figura 8.** Efecto de trastuzumab en la viabilidad de la línea celular BT-474 en dosis crecientes de 0.01 a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (A). Evaluación de resistencia a trastuzumab en las líneas BT-474, AU565-S, AU565-R y HCC1954 a dosis de 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de trastuzumab. Cada condición está comparada consigo misma con y sin tratamiento (B).

**Figura 9.** Imagen de la línea AU565-R con su parental AU565-S cultivadas en monocapa (Zazo, *et al.* 2016).

**Figura 10.** Imagen de la línea celular HCC1954.

**Figura 11.** WB de la proteína HER2 en las líneas AU565-S, AU565-R y HCC1954

**Figura 12.** Expresión mRNA mediante RT-qPCR sobre las líneas celulares AU565-S, AU565-R y HC1954: *AXL* (A), *MET* (B).

**Figura 13.** Expresión de la proteína AXL en las líneas celulares AU565-S, AU565-R y HC1954.

**Figura 14.** Expresión de la proteína MET en las líneas celulares AU565-S, AU565-R y HCC1954.

**Figura 15.** MTT de trastuzumab y TP-093 en las líneas celulares AU565-S, AU565-R y HCC1954.

**Figura 16.** Inhibidores de la vía PI3K/mTOR (A). IC<sub>50</sub> de BKM120, GDC-0980 y everolimus sobre HCC1954 (B).

**Figura 17.** MTT de trastuzumab y los fármacos inhibidores de la vía PI3K/mTOR

(BKM120, everolimus y GDC-0980) en la línea celular HCC1954. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

**Figura 18.** Análisis sobre la cohorte de datos pública: evaluación anatomopatológica de la expresión de receptores de estrógeno (A) y amplificación de HER2 (B). Distribución por subtipos intrínsecos de PAM50 (C).

**Figura 19.** Expresión de *AXL* mRNA en las base de datos estudiada. Expresión del gen a lo largo de toda la cohorte clasificada por subtipos intrínsecos de PAM50 (A). Análisis de los subtipos intrínsecos sobre las muestras donde *AXL* mRNA está *up-regulado* (B) y *down-regulado* (C)

**Figura 20.** Genes correlacionado positivamente con *AXL* mRNA: *TCF4*, *FBN1*, *COL5A2*, *PDGFRB*, *THY*, *COL6A2*, *MMP2*, *SERPINF1*, *TGFBIII*, *GAS7* y *VCAN*.



## **INTRODUCCIÓN**



## INTRODUCCIÓN

### 1. Epidemiología del cáncer de mama

Una de cada tres mujeres y uno de cada dos hombres serán diagnosticados de cáncer a lo largo de su vida. En España el cáncer es la principal causa de mortalidad para las personas de 40 a 79 años (44.1% del total), superando las tasa de muerte por las enfermedades cardiovasculares (*Figura 1*).

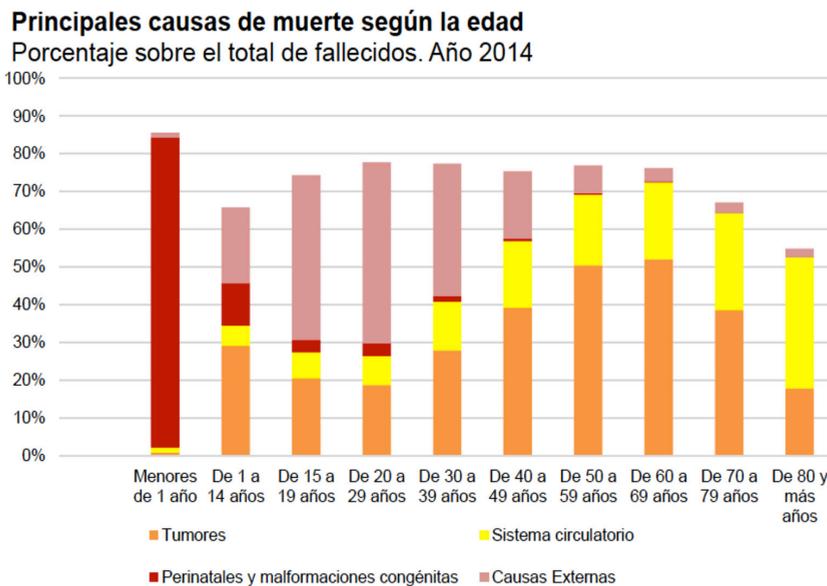


Figura 1. Instituto Nacional de Estadística. Publicado el 30 de marzo de 2016

Mientras que en las últimas décadas en los países occidentales la mortalidad cardiovascular ha disminuido en un 60%, la mortalidad por cáncer ha permanecido estable. A lo largo del siglo XX se ha observado un evidente aumento en la incidencia de las enfermedades tumorales, en gran parte debido a la mayor longevidad de la población, siendo la edad uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo del cáncer. El patrón de morbilidad y mortalidad de las sociedades desarrolladas ha cambiado; esto es debido en gran medida al mejor control de las infecciones y de los problemas derivados de la malnutrición. Por otro lado, las

nuevas tecnologías aplicadas al diagnóstico y el mejor acceso a la atención sanitaria facilitan el diagnóstico de tumores en estadios iniciales que, en otros momentos, no hubieran sido detectados.

Sin embargo, el incremento de la incidencia no es debido exclusivamente al envejecimiento poblacional, a las nuevas tecnologías o a los programas de cribado, sino a la influencia de otros factores de riesgo. Por ejemplo, la asociación del cáncer con factores ambientales está ampliamente aceptada, entendiéndose como tales desde los que afectan globalmente a poblaciones, como la contaminación atmosférica y los carcinógenos ocupacionales, hasta los factores relacionados con los hábitos de vida como el consumo de tabaco, alcohol, el tipo de dieta o la actividad física.

El cáncer de mama es el tumor más frecuente en la mujer, representa aproximadamente el 28% (Galceran J, *et al.* 2017) de todas las neoplasias (**Figura 2**) y la principal causa de muerte por cáncer en mujeres europeas, constituyendo un importante problema de salud pública. A pesar de la detección precoz y los avances en el tratamiento sistémico en etapas tempranas de la enfermedad, en estadios avanzados sigue siendo incurable con una supervivencia media de 2 – 3 años y una supervivencia global de 25% a los 5 años (Cardoso F, *et al.* 2017).

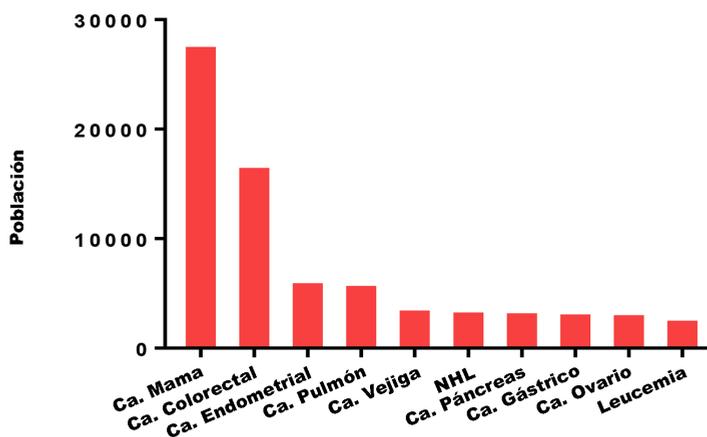


Figura 2. Incidencia estimada de los tumores más frecuentes en España en mujeres en el año 2015.

Pese a los avances en los conocimientos científicos, el origen del cáncer de mama es todavía hoy desconocido. Múltiples factores se han asociado como la edad, edad de la menarquia, edad del primer embarazo, edad a la menopausia, alcohol, obesidad, densidad de las mamas, etc.

## **2. Clasificación del cáncer de mama: Criterios anatomopatológicos y subtipos intrínsecos:**

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, los tumores muestran diferentes comportamientos biológicos con diferente capacidad de respuesta a los tratamientos. Clásicamente se ha clasificado el cáncer de mama en luminal A, luminal B, HER2 amplificado o triple negativo en función de criterios anatomopatológicos, donde se evalúa la expresión de: receptores hormonales (receptores estrógeno [RE], receptores progesterona [RPG]), índice de proliferación [Ki67] y la amplificación del gen HER2.

Esta diversidad fenotípica de los tumores es debido a diferentes patrones de expresión génica. En 2000, Perou y colaboradores publicaron el primer artículo que define los subtipos intrínsecos moleculares basándose en el perfil de expresión génica (Perou CM, *et al.* 2000). Desde entonces se ha identificado 6 subtipos de cáncer de mama: Luminal A, Luminal B, HER2-enriched [HER2-E], Basal-like, Claudin-low y Normal-like (Sorlie T, *et al.* 2001). Estos subtipos presentan una diferente incidencia (Millikan R, *et al.* 2008 y Anderson WF, *et al.* 2014), supervivencia (Prat A, *et al.* 2012, Prat A, *et al.* 2014 y Nielsen TO, *et al.* 2010) y respuesta a tratamientos (Usary J, *et al.* 2013).

### **2.1 Luminal A**

El cáncer de mama Luminal tiene un perfil de expresión génica similar al epitelio luminal normal de mama. El subtipo luminal A representa aproximadamente un 40% de los cánceres de mama. Se caracteriza por una alta expresión de genes activados por el RE como factor de transcripción (*GATA3*, *XBPI*, *TFF3*), que se encuentran

expresados en el epitelio de la luz de los ductos mamarios. Además, presenta una baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular (Eroles P, *et al.* 2012).

A nivel inmunohistoquímico se caracteriza por la expresión de RE, RPg, Bcl-2, CK8/18, bajo Ki67 y bajo grado histológico. El punto de corte de Ki67 para distinguir entre luminal A y B es 13.25% (Cheang MC, *et al.* 2009).

Este subtipo tumoral presenta un mejor pronóstico con una menor incidencia de recaídas y con mayor supervivencia en la enfermedad avanzada. Kennecke *et al.*, publicaron un estudio en 2010 que evaluaba el comportamiento de la enfermedad metastásica según el subtipo molecular de cáncer de mama en una cohorte de pacientes entre 1986 - 1992. El 70% de las pacientes luminales A estaban vivas a los 10 años y la tasa de recaída fue del 27.8% a los 15 años, siendo significativamente inferior al resto de subtipos. La mediana de supervivencia desde la recaída fue 2.2 años, siendo mayor que en el resto de subtipos. Presentan un patrón de metástasis diferente con un índice de recaídas a nivel óseo de 18.7%, siendo la tasa de incidencia de recaídas a nivel visceral (sistema nervioso central, hepático, pulmonar...) inferior al 10% (Kennecke H, *et al.* 2010).

El principal tratamiento para estas pacientes es el tratamiento hormonal tanto en estadios precoces como en la enfermedad avanzada. Existen tres estrategias: moduladores selectivos del RE (SERMs) como el tamoxifeno, los inhibidores de la aromataasa (IA) y antagonistas puros del RE como fulvestrant (Guarneri V, *et al.* 2009). Se caracterizan por presentar menor sensibilidad a los agentes citotóxicos tanto en la enfermedad temprana como metastásica.

## **2.2 Luminal B**

Los tumores de este perfil de expresión génica suponen un 15-20% de los tumores en total. Presentan un fenotipo más agresivo con un grado histológico mayor, un

Ki67 más alto (>13.25%) y un peor pronóstico que los luminales A. El 54.4% de las pacientes están libres de enfermedad a los 10 años con una tasa de recaída de 42.9% a los 15 años. La supervivencia desde el momento de la recaída es de 1.6 años (Eroles P, *et al.* 2012). La localización más frecuente de la metástasis es a nivel óseo, aproximadamente del 30%, sin embargo presentan mayor tasa de recidivas viscerales que el luminal A, sobre todo a nivel hepático con un 13.8%.

Se caracterizan por presentar una menor sensibilidad al tratamiento hormonal que el subtipo luminal A, sin embargo presenta una mejor tasa respuesta al tratamiento quimioterápico. Este subtipo de cáncer de mama supone un reto en la actualidad, porque presenta muchos interrogantes acerca de las vías de señalización que se encuentran activadas y conducen a su proliferación, supervivencia y capacidad de metastatización.

### **2.3 HER2-Enriched**

El subtipo HER2-E representa el 15-20% y se caracteriza a nivel de RNA y de proteínas con una alta expresión de HER2 y otros genes relacionados con el amplicón 17q como GRB7, nivel intermedio de expresión de genes luminales (*ESR1* y *PGR*) y baja expresión de genes relacionados con subtipo basal (*KRT5* y *FOXCI*). A nivel de DNA presentan un alto número de mutaciones a lo largo del genoma, un 72% y 39% de los tumores HER2-E presentan mutaciones en *TP53* y *PIK3CA* respectivamente. La mayoría (68%) de los tumores HER2-E tienen *HER2* amplificado (Prat A, *et al.* 2015). Clínicamente tiene peor pronóstico comparado con los tumores Luminal A y una mayor ploriferación.

### **2.4 Basal-Like**

El subtipo basal-like representa un 10-15% de los cánceres de mama. Expresan genes presentes en las células mioepiteliales de mama normal. Tienen una alta expresión de CK5, CK6 y CK17, laminina, FABP-7, P-cadherina, caveolina 1 y 2, nestina, CD44 y EGFR y alto índice de mutaciones en p53. Clínicamente es más

frecuente en mujeres jóvenes, en mujeres de origen africano, tamaño tumoral mayor al diagnóstico, grado histológico alto y una mayor frecuencia de afectación ganglionar (Bosch A, *et al.* 2010). A nivel morfológico suelen ser carcinomas ductales infiltrantes, presentan un elevado índice mitótico, necrosis tumoral, márgenes expansivos y una evidente respuesta linfocítica estromal (Livasy CA, *et al.* 2006).

Este subtipo tumoral presenta un peor pronóstico con una tasa mayor de recaídas durante los primeros tres años. Tiene un patrón de recaída agresivo con tendencia a metastatizar a nivel visceral, principalmente pulmonar, SNC y ganglionar (Smid M, *et al.* 2008 y Dent R, *et al.* 2007).

Las características más representativas son la ausencia de expresión de RE, RP y HER2. Por lo que en la práctica clínica se asimila el término basal-like al de triple negativo, sin embargo no son términos sinónimos, existe una discordancia del 30% entre ambos grupos (Kreike B, *et al.* 2007). Este subtipo también se caracteriza por una alta frecuencia de mutaciones en *BRCA1* e inestabilidad cromosómica.

## **2.5 Normal-like**

Este subtipo de tumores supone alrededor de un 5%, están mal caracterizados y se han agrupado dentro de la clasificación molecular junto con el tejido mamario normal. Muestran una expresión alta de genes característicos del tejido adiposo, de genes epiteliales basales y baja expresión de genes luminales. Presentan un pronóstico intermedio entre Luminal y Basal-like. Se cree que realmente no es un subtipo de cáncer de mama, si no una biopsia contaminada por tejido mamario sano.

## **2.6 Claudin-low**

Después de la clasificación inicial, se identificó este nuevo subtipo en 2007 que representa un 12-14% del total (Herschkowitz JL, *et al.* 2007). Se sitúa junto al subtipo Basal-like en la agrupación jerárquica, lo que indica que ambos comparten características en cuanto a la expresión génica como la baja expresión de HER2 y

genes luminales. Se caracteriza por la expresión de genes asociados a la transición epitelio-mesénquima. Esto incluye una baja expresión del grupo de genes de adhesión celular: genes relacionados con las uniones estrechas (claudinas 3, 4, 7, cingulina y ocludina) y la adhesión intercelular (E-cadherina).

Sobreexpresan un grupo de 40 genes relacionados con la respuesta del sistema inmune (genes expresados en linfocitos T y B), indicando una alta infiltración del tumor por el sistema inmune celular (Parker JS, *et al.* 2009 and Prat A, *et al.* 2010). Además, presentan genes relacionados con la comunicación celular (C-X-C motif), con la formación de matriz extracelular (Vimentina), genes relacionados con la migración (integrina  $\alpha 5$ ), con la angiogénesis y genes *stem-cell like*.

A pesar de una baja expresión de genes relacionados con proliferación celular, tienen un pronóstico desfavorable, ya que sobreexpresan un subgrupo de genes estrechamente ligados con la diferenciación mesenquimal y la transición epitelio-mesénquima. Esta característica se ha asociado con la adquisición de un fenotipo de *stem cell*. Clínicamente estos tumores suelen ser carcinomas ductales infiltrantes con diferenciación metaplásica o medular, presentan un alto grado histológico y por inmunohistoquímica son negativos para los receptores hormonales y HER2. Sin embargo, la concordancia entre triple negativo/claudin-low no es del 100%, alrededor de un 20% de tumores claudin-low pueden expresar positividad para receptores hormonales. Presentan un mal pronóstico a largo plazo y una pobre respuesta a quimioterapia (Hennessy BT, *et al.* 2009).

### **3. Cáncer de mama HER2 positivo y Familia HER**

El cáncer de mama HER2 positivo se caracteriza por la amplificación del gen HER2. En 1985 el oncogén *HER2/neu* fue descubierto de forma independiente por 2 grupos que lo llamaron *HER2* y *c-erbB-2*. En análisis posteriores se comprobó que ambos genes eran el mismo y fue rebautizado como *HER2/neu* (Schechter AL, *et al.* 1985, Semba K, *et al.* 1985 and King CR, *et al.* 1985).

El gen *HER2* codifica un receptor transmembrana tirosina quinasa de la familia de los receptores del factor de crecimiento epidérmico humano (HER). La proteína HER2 está formado por 1255 aminoácidos, una glicoproteína transmembrana de 185 KDa situado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q12). Estos receptores juegan un papel central en la patogénesis de diferentes tipos de cáncer humano ya que regulan procesos celulares fundamentales como el crecimiento, la supervivencia, la proliferación y la diferenciación celular a través de múltiples vías de transducción de señales.

Entre un 15 - 30% de los cánceres de mama presentan amplificación del gen *HER2*, lo que causa un incremento notable en la expresión del receptor en la superficie de la membrana (hasta 100 veces el nivel normal) (Burstein HJ, *et al.* 2005). La sobreexpresión de HER2 se ha definido por inmunohistoquímica (IHQ), siendo positivo (3+) cuando es alrededor de 2 millones el número de receptores, intensidad media (2+) cuando los niveles son de aproximadamente 500.000 y negativo (1+) cuando el número de receptores es de unos 20.000 por célula. En los casos de intensidad media se realiza la técnica FISH (*Fluorescence in Situ Hybridization*) analizando el ratio entre *HER2* y *CEP17* para determinar si esta HER2 amplificado.

La amplificación de dicho gen en el cáncer de mama tiene implicaciones pronósticas y predictivas de respuesta. En el análisis de Kennecke *et al.*, mostró que a los 10 años estaban vivas el 46% y el 48.1% de las pacientes Luminales/HER2 y HER2+, respectivamente. A los 15 años la tasa de recaída fue del 47.9% de las Luminales/HER2 y el 51.4% de las HER2+ y la mediana de supervivencia desde la recaída fue de 1.3 y 0.7, respectivamente.

Ya en 1987 Slamon *et al.*, pusieron de manifiesto que la sobreexpresión de dicho gen se correlacionaba con recaídas precoces y disminución de la supervivencia global. Realizó un estudio sobre 189 cánceres de mama primarios, donde la sobreexpresión de *HER2* fue un predictor significativo de la supervivencia global ( $p < 0.001$ ) y el

tiempo hasta la recaída ( $p < 0.0001$ ). Conservó su importancia, incluso cuando se realizaron ajustes por otros factores pronósticos, además tuvo mayor valor pronóstico comparado con otros factores como la expresión de receptores hormonales y la presencia de afectación ganglionar al diagnóstico (Slamon DJ, *et al.* 1987).

Press *et al.*, demostró en un estudio de 1993 que la sobreexpresión de HER2 es un indicador independiente de mal pronóstico en mujeres con cáncer de mama con ganglios negativos. En una cohorte de 704 pacientes, observó que el riesgo de recaída en las pacientes con cualquier nivel de sobreexpresión HER2 con ganglios negativos fue 3 veces mayor que en las mujeres HER2 negativo. Además, el grupo con alta sobreexpresión tenía un riesgo de recurrencia de 9.5 veces mayor que las pacientes con una expresión normal ( $p = 0.0001$ ). En el análisis de subgrupos (como estado menopáusico, tamaño tumoral o presencia de receptores hormonales) mantuvo un aumento significativo del riesgo de recurrencia (Press MF, *et al.* 1993).

Seshadri *et al.* en su estudio con 1056 pacientes con cáncer de mama en estadios I-III demostró que la amplificación de HER2 se asoció con una supervivencia libre de enfermedad significativamente más corta ( $p = 0.0027$ ). La amplificación de HER2 también se correlacionó significativamente con el estadio patológico de la enfermedad, el número de ganglios axilares afectados, tipo histológico y la ausencia de receptores hormonales (Seshadri R, *et al.* 1993).

Este subtipo tumoral presenta una mayor incidencia de metástasis a nivel visceral, especialmente a nivel del sistema nervioso central (SNC). Varios estudios han informado de un aumento del riesgo de metástasis en el SNC en pacientes tratadas con trastuzumab. Sin embargo, es poco probable que el tratamiento con trastuzumab *per se* aumenta el riesgo de metástasis cerebrales. Este comportamiento se ha atribuido principalmente a la incapacidad de trastuzumab para penetrar eficazmente la barrera hematoencefálica debido a su alto peso molecular (Stemmler HJ, *et al.* 2007). Además, este aumento de riesgo de recaída en el SNC puede estar asociada con

un mejor control sistémico de las metástasis extracerebrales y por tanto con una mayor supervivencia sin “protección” cerebral. Por otro lado, se ha postulado que la sobreexpresión de HER2 podría predisponer a las metástasis cerebrales, de tal forma que la migración de algunas células tumorales con receptores específicos podría ser estimulada por mecanismos paracrinós mediados por neuregulinas (miembros de la familia de ligandos EGFR), como por ejemplo, neuregulina-1 (Altaha R, *et al.* 2004).

La comprensión de la biología molecular de este subtipo tumoral y su abordaje terapéutico ha representado uno de los mayores avances en la oncología en la última década. El hecho de encontrar una vía oncogénica que poder inhibir ha revolucionado el campo de la terapéutica en oncología. De este modo, este subtipo tumoral de mal pronóstico presenta en la actualidad una clara mejora en la supervivencia tanto en enfermedad metastásica como en estadios iniciales. El desarrollo de tratamiento antiHER2 ha supuesto el paradigma de la medicina de precisión.

Los receptores trisoína quinasa (RTKs) son objetivos ideales para este enfoque, ya que con frecuencia son vías de señalización de tumorogénesis. La familia de receptores HER juega un papel importante en la oncogénesis, en la supervivencia celular y la proliferación. Está compuesta por cuatro miembros: HER1, HER2, HER3 y HER4 (también llamados ErbB1, ErbB2, ErbB3, y ErbB4, respectivamente). Estos receptores de membrana están formados por tres dominios (**Figura 3**):

- Dominio extracelular, formado a su vez por cuatro subdominios. Esta región presenta el sitio de unión del ligando, rico en cisteína.
- Dominio transmembrana, un dominio lipofílico.
- Dominio intracelular, con actividad catalítica tirosina quinasa.



receptores de la familia HER: tiene un dominio quinasa no funcional y contiene al menos 6 dominios de unión con p85 (subunidad reguladora de PI3K) (Mukohara T, *et al.* 2011), por lo que desencadena una señalización potente y en particular sobre la vía PI3K. Además, hay otros receptores de membrana que pueden ser “pareja de baile” para HER2 como por ejemplo el receptor del factor de crecimiento de la insulina 1 (IGFR-1).

Debido a esto, la familia HER se ha convertido en diana terapéutica contra el cáncer, principalmente se ha desarrollado dos estrategias para bloquear su acción que incluyen anticuerpos monoclonales dirigidos contra el dominio extracelular y pequeñas moléculas inhibitoras de la actividad tirosina quinasa del receptor.

Además, dentro del cáncer de mama HER2+ aproximadamente el 50% expresa receptores hormonales y aproximadamente 1/10 cánceres receptores hormonales positivo son también HER2+. En este subtipo, conocido como Luminal/HER2 existe un *cross talk* entre la señalización hormonal y HER2 que contribuye a la resistencia al tratamiento hormonal. Estas pacientes se benefician de un tratamiento dual anti-HER2 más hormonal (Kaufman B, *et al.* 2009).

#### **4. Tratamientos anti-HER2**

Paul Ehrlich fue un médico y bacteriólogo alemán del siglo XX galardonado con el premio Nobel de Medicina en 1908. Hizo por primera vez referencia a las terapias diana con la expresión “balas mágicas” y además acuñó el término quimioterapia. Por aquel entonces hablaba de compuestos que en función de su especial afinidad por microorganismos patógenos tenían poder destructor sobre ellos, a modo de proyectiles con mínima repercusión sobre las células sanas del huésped. Esta hipótesis es hoy una realidad en Oncología, los avances en la biología molecular y celular junto al desarrollo de las tecnologías de alto rendimiento nos ha permitido el desarrollo de fármacos dirigidos y específicos.

**4.1 Trastuzumab:** es un anticuerpo monoclonal humanizado (IgG1) que se une al dominio extracelular en el subdominio IV del receptor HER2, en la región yuxtamembrana. Este epítipo del receptor no está involucrado en la heterodimerización con otros receptores de la familia HER, de este modo inhibe la dimerización independiente de ligando, no siendo capaz de bloquear la heterodimerización inducida por ligando. Los mecanismos de acción descritos son:

- 1) La internalización y degradación del receptor tras su unión a trastuzumab.
- 2) Promueve la parada del ciclo celular y apoptosis: produce la inhibición del ciclo celular en la transición G1/S, acompañada por un aumento en el nivel de p27 y disminución de la ciclina D1 y de la actividad quinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2).
- 3) Inhibición de la señalización intracelular de la vía PI3K/AKT y MAPK. Se ha mostrado por técnicas de Western blot la disminución de los niveles de fosforilación de AKT y GSK3.
- 4) Disminuye la angiogénesis tumoral: disminuye los niveles de VEGF e induce TSP-1 (trombospondina 1, proteína con actividad antiangiogénica). Disminuye el crecimiento y densidad de los microvasos (Izumi Y, *et al.* 2002).
- 5) Induce el sistema inmune: mediante la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Se ha descrito como las células inmuno-efectoras como las células NK expresan el receptor Fc $\gamma$  y son capaces de reconocer y unirse al dominio Fc del anticuerpo trastuzumab IgG1, provocando la activación de las células NK para la lisis de las células tumorales. Gennari *et al.*, mostraron como había un aumento de infiltración linfocitaria en las muestras tumorales tratadas con trastuzumab con respecto a las biopsias pretratamiento, siendo este aumento mayor en las pacientes que lograban respuesta completa o parcial con respecto a las que no respondieron (Gennari R, *et al.* 2004).
- 6) Inhibe la reparación del DNA: *in vitro* se ha mostrado como por ejemplo,

trastuzumab reduce parcialmente la reparación del DNA (los aductos cisplatino-DNA) después de la exposición a cisplatino (Pietras RJ, *et al.* 1994).

La aprobación de este fármaco en 1998 se basó en la evidencia del aumento significativo de la supervivencia libre de enfermedad (DFS) en mujeres con cáncer de mama HER2 positivo y ganglios positivos que recibieron trastuzumab en combinación con quimioterapia (basada en antraciclinas y taxanos) como tratamiento adyuvante vs quimioterapia sola.

La Tabla 1 resume los cinco ensayos pivotaes que abarcan más de 10.000 mujeres que demostraron que un año de terapia con trastuzumab proporcionó un beneficio clínico significativo.

Estudio	Rama control	Rama Trastuzumab	Reducción Riesgo Relativo de Recurrencia	DFS Hazard Ratio
NSABP B-31 n=2700	AC→T	AC →TH	52%	0.48
NCCTG(N9831) n=3300	AC→T	AC →TH		
HERA n=5090	Elección del investigador	Trastuzumab 1 año	46%	0,54
BCIRG 006 n=3150	AC →D	AC →DH	40%	0.49
		DCH	33%	0.61
FINHer n=232	D →FEC V →FEC	DH →FEC VH →FEC		0.42
A: doxorubicina, C: ciclofosfamida, D: docetaxel, E: epirubicina, F: fluoroacilo, H: trastuzumab, T: paclitaxel, V: vinorelbina				

Tabla 1. Resumen de 5 ensayos clínicos randomizados que muestran el beneficio del uso de trastuzumab en pacientes HER2+.

El beneficio de trastuzumab también se ha demostrado en la enfermedad avanzada HER2 positivo. Slamon *et al*, demostró en Marzo de 2001 en un ensayo fase III de primera línea para enfermedad metastásica que añadir trastuzumab a la quimioterapia standard asociaba una mejoría significativa en el tiempo libre de progresión (PFS) (7.4 vs 4.6 meses;  $p < 0.001$ ), de la tasa de respuesta objetiva (50% vs 32%;  $p < 0.001$ ) y una menor tasa de muerte al año (22% vs 33%;  $p = 0.008$ ) en comparación con la quimioterapia sola (Slamon DJ, *et al*. 2001).

La duración del tratamiento es de un año en adyuvancia y hasta progresión o toxicidad en la enfermedad metastásica. Los efectos adversos más frecuentes observados con trastuzumab son fiebre, vómitos, reacciones a la infusión, diarrea, dolor de cabeza, fatiga, erupción cutánea, neutropenia y anemia. Los efectos adversos más graves son las miocardiopatías, la toxicidad pulmonar, reacciones a la infusión y la neutropenia febril. La fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) se debe evaluar en todos los pacientes antes y durante el tratamiento con trastuzumab.

**4.2 Lapatinib:** es un inhibidor dual tirosina quinasa reversible ATP competitivo del receptor HER1 y HER2. Inhibe el dominio de autofosforilación de ambos receptores, bloqueando la señalización *downstream*: vía ERK1-2 y PI3K-AKT. Presenta un mecanismo de acción diferente a trastuzumab sin resistencia cruzada con él.

Existe un ensayo fase III randomizado que compara lapatinib en combinación con capecitabina frente a capecitabina en monoterapia en pacientes con enfermedad avanzada que han progresado a esquemas de tratamiento que incluyen antraciclinas, taxanos y trastuzumab. Dicho estudio mostró que la combinación se asoció a un aumento en PFS que fue de 8.4 meses para la combinación frente 4.4 meses de capecitabina en monoterapia. El riesgo de progresión se redujo en un 51% ( $p < 0.001$ ) sin aumento de los efectos secundarios (Geyer CE, *et al*. 2006).

Lapatinib también está aprobado en combinación con inhibidores de la aromatasas para el tratamiento de mujeres postmenopáusicas en estadios avanzados con receptores hormonales y HER2 positivo. Un fase III randomizado doble ciego de lapatinib en combinación con letrozol como primera línea para enfermedad avanzada, mostró una disminución del riesgo de progresión de enfermedad en la rama experimental (HR: 0.71, 95% intervalo de confianza, 0.53- 0.96,  $p= 0.019$ ). El tiempo libre de progresión fue de 8.2 meses frente a 3 meses, la tasa de respuesta del 28% vs 15% y con un mayor beneficio clínico (48% vs 29%) (Schwartzberg LS, *et al.* 2010).

**4.3 Pertuzumab:** es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une al receptor HER2 en un epítipo del dominio extracelular (subdominio II) diferente al que se une trastuzumab (subdominio IV). Bloquea la activación del receptor HER2 obstaculizando la dimerización con otros receptores de la familia HER activados por ligando, destacando HER3. Como trastuzumab, pertuzumab también es capaz de estimular la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos.

Por lo tanto pertuzumab y trastuzumab, al unirse en diferentes epítipos de HER2, presentan mecanismos de acción complementarios. Estos dos fármacos cuando se administran conjuntamente, proporcionan un bloqueo más completo de la señalización HER2, dando lugar a una mayor actividad antitumoral. La aprobación de pertuzumab en combinación con trastuzumab y docetaxel en pacientes con cáncer de mama avanzado HER2 positivo en primera línea se basó en los resultados obtenidos en el ensayo clínico CLEOPATRA. Es un fase III randomizado comparado frente a placebo y con un intervalo libre de enfermedad de al menos 12 meses desde el tratamiento neo/adyuvante. Los resultados del estudio mostraron una mediana de supervivencia libre de progresión de 12.4 meses en el grupo control vs 18.5 meses en el grupo de pertuzumab (HR: 0.62; IC 95%, 0.51-0.75;  $p < 0.001$ ). La mediana de supervivencia global fue 56.6 meses en el grupo de pertuzumab y 40.8 meses en el de control, con una diferencia de 15.7 meses. El perfil de seguridad fue similar en los dos

grupos. En estadios tempranos de la enfermedad, la asociación también ha mostrado un beneficio. Por ejemplo, en adyuvancia hay un beneficio en términos de intervalo libre de enfermedad. A los tres años la DFS fue de 94.1% en el grupo de pertuzumab y 93.2% en el grupo placebo, este beneficio fue mayor en la cohorte de ganglios positivos (92.0% vs 90.2%, HR: 0.77, p= 0.02) (von Minchwtiz G, *et al.* 2017). En un ensayo de neoadyuvancia fase II (NeoSphere) se evidenció como la combinación de trastuzumab con pertuzumab más Docetaxel aumentaba significativamente las respuestas patológicas completas, alcanzando un 45.8% (Gianni L, *et al.* 2012). En el resto de ramas las tasas de respuesta patológica fueron: 29% para trastuzumab más docetaxel, 16.8% pertuzumab más trastuzumab y 24% pertuzumab más docetaxel.

**4.4 T-DM1:** Trastuzumab emtansine es un anticuerpo conjugado de trastuzumab con un citotóxico inhibidor de la polimerización de microtúbulos, la emtansina. Forman un enlace covalente mediante un grupo tiol (-SH), de media hay 3.5 moléculas de DM1 por anticuerpo de trastuzumab. T-DM1 tiene un mecanismo de acción dual por un lado su unión al dominio extracelular de HER2 produce la internalización del complejo antígeno-anticuerpo en el interior de la célula, donde el anticuerpo es degradado por proteasas y se produce la liberación del metabolito activo (lisina-N-MCC-DM1) en el citoplasma. Este metabolito es una molécula cargada por lo que es relativamente impermeable a la membrana celular, reduciendo así la posibilidad de que DM1 entre en las células vecinas, por lo que se limita aún más la toxicidad inespecífica. Por otro lado, trastuzumab conserva su capacidad citotóxica mediada por células dependientes de anticuerpo e inhibe la transducción de señales mediada por HER2. El objetivo es dirigirse a las células tumorales, minimizando el efecto tóxico sobre los tejidos sanos (Krop I, *et al.* 2014).

Un fase II publicado en *Journal of Clinical Oncology* en 2011 evaluó la eficacia y seguridad de T-DM1 (3.6 mg/ kg cada 3 semanas) en pacientes con cáncer de mama metastásico HER2 positivo que habían progresado a tratamiento quimioterápico previo y tratamiento antiHER2. Los resultados con un seguimiento de  $\geq 12$  meses

en 112 pacientes fueron: la tasa de respuesta objetiva (TRO) 25.9% (IC del 95%, 18.4% a 34.4%) y la mediana de PFS fue de 4.6 meses (IC del 95%, 3.9 a 8.6 meses). T-DM1 fue bien tolerado sin cardiotoxicidad limitante de la dosis (Burriss HA, *et al.* 2011). A raíz del ensayo clínico fase III EMILIA, T-DM1 ha sido aprobado en pacientes pretratadas con taxanos más trastuzumab. Se ha demostrado que mejora la supervivencia libre de progresión y supervivencia global comparado frente a lapatinib más capecitabina con una menor toxicidad. Los datos de PFS son de 9.6 vs 6.4 meses (HR 0.65; 95% IC, 0.55 a 0.85;  $p < 0.001$ ), una supervivencia global de 30.9 vs 25.1 meses y una tasa de respuesta de 43.6% vs 30.8% (Verma S, *et al.* 2012).

Además también ha demostrado su beneficio en el ensayo TH3RESA donde se comparaba T-DM1 frente a otros esquemas en pacientes que habían progresado a dos o más tratamientos antiHER2. Las pacientes presentaron una mejor supervivencia global (22.7 vs 15.8 meses, HR: 0.68,  $p = 0.0007$ ) (Krop IE, *et al.* 2017).

## **5. Mecanismos de Resistencia a tratamiento anti-HER2**

Como hemos visto, trastuzumab mejora los resultados tanto en estadios tempranos como en la enfermedad avanzada en el cáncer de mama HER2 positivo, sin embargo, no todas las pacientes responden a trastuzumab (resistencia HER2 primaria o *de novo*) o responden inicialmente presentando una progresión de enfermedad posterior (resistencia secundaria o adquirida).

Se han propuesto diversos mecanismos de resistencia al tratamiento antiHER2 que incluye: impedimentos de la unión trastuzumab-HER2, señalización por vías moleculares alternativas, *upregulación* de la señalización *downstream* de HER2 y fracaso para provocar una respuesta inmune asociada (Mohd Shariar MS, *et al.* 2012).

### **5.1 p95HER2:**

Un mecanismo de resistencia es la proteína truncada de HER2, conocido como p95HER2. Esta forma truncada del receptor se forma a través de dos mecanismos: por

proteólisis del dominio extracelular del receptor o por la traducción del mRNA que codifica la parte interna del receptor. Este receptor se encuentra constitutivamente activado en su dominio quinasa y conserva la capacidad de dimerizar con otros receptores miembros de la familia HER. Ocasiona resistencia a trastuzumab debido a que carece del sitio de unión a trastuzumab.

p95HER2 se encuentra aproximadamente en el 30% de los casos y está asociado con peor pronóstico (Saéz R, *et al.* 2006). Varios estudios muestran esta resistencia, Molina *et al.* examinaron p95HER2 y p185HER2 en 337 tumores primarios de mama y en 81 metástasis ganglionares. p95HER2 fue identificado en el 20.9% de los tumores primarios con ganglios negativos, en el 29.1% de pacientes con 1 ó 3 ganglios afectados y en el 36.7% de pacientes con 4 o más ganglios afectados ( $p= 0.027$ ). p95HER2 se detectó en el 48.8% de ganglios negativos vs en el 73.5% de ganglios positivos ( $p= 0.03$ ), mientras que la sobreexpresión de p185HER2 no se relacionó con la enfermedad ganglionar ( $p= 0.63$ ). Además, p95HER2 fue más frecuente en las metástasis ganglionares que en el tumor primario (45.7% vs 26.7%,  $p= 0.0009$ ), mientras que la sobreexpresión de p185HER2 fue similar en ambos (22.3% vs 23.5%,  $p= 0.933$ ). Por lo que el receptor truncado está relacionado con la afectación ganglionar sugiriendo un importante papel en la metástasis. p95HER2 no se correlacionó de forma significativa con características clinicopatológicas como la edad, tamaño tumoral, estadio, histología o la expresión de receptores hormonales (Molina MA, *et al.* 2002).

Xia *et al* mostraron sobre líneas celulares BT-474 de cáncer de mama HER2+ como p95HER2 formaba heterodímeros con HER3, pero no con HER1. La predilección por HER3 se puede deber al papel de la heregulina que permite la transfosforilación entre ambos receptores. Esta activación pudo ser inhibida con lapatinib pero no con trastuzumab (Xia W, *et al.* 2004).

En el trabajo de Scaltriti se muestra como la expresión de p95HER2 en líneas celulares ofrece resistencia a tratamiento con trastuzumab, manteniendo la sensibilidad a lapatinib. Analizaron las respuesta a trastuzumab en una serie retrospectiva de 46 pacientes con cáncer de mama metastásico HER2+, sólo 1/9 (11.1%) que expresaba p95HER2 respondió a trastuzumab (con una respuesta parcial), mientras que 19/37 pacientes (51.4%) con expresión de HER2 se logró respuesta, siendo completa en 5 pacientes y parcial en 14 ( $p = 0.029$ ) (Scaltriti M, *et al.* 2007).

En 2010 Sperinde *et al.*, correlacionó el alto nivel de expresión de p95HER2 analizado en tumor metastásico con una menor DFS y supervivencia global (OS) de forma significativa, en una cohorte de pacientes metastásicas con cáncer de mama HER2+ tratadas con trastuzumab (Sperinde J, *et al.* 2010).

## 5.2 Expresión de mucina 4

La glicoproteína mucina 4 (MUC4), es un miembro de la familia de las mucinas que forman una barrera protectora de las células epiteliales, incluyendo el epitelio mamario. Los niveles de MUC4 se han visto incrementados en las células resistentes a trastuzumab, enmascarando las proteínas de membrana, lo que produce una disminución de la capacidad de trastuzumab para unirse al receptor HER2. Esto ha hecho que se considere como un mecanismo de resistencia primaria a trastuzumab.

Nagy *et al.*, comparó líneas celulares sensibles a trastuzumab (SKBR-3 y BT-474) con la línea celular JIMT-1 que presenta amplificación de HER2 y resistencias primarias a trastuzumab. Los resultados mostraron una disminución en el número de uniones entre trastuzumab y JIMT-1 en comparación con las células sensibles. Además, estas uniones aumentaban cuando eran pretratadas con metaloproteasas. Por lo que los autores confirmaron la hipótesis de que existía un bloqueo molecular que obstaculizaba la unión entre trastuzumab y el epítipo IV de HER2. Mostraron que la línea celular JIMT-1 expresaba altos niveles de MUC4 en comparación con las células sensibles y que existía una correlación inversa entre la densidad de MUC4 y

la unión de trastuzumab-HER2. Además al transfectar las células con RNAi\_MUC4, aumentó significativamente la unión. Todos estos resultados evidenciaron que la expresión de MUC4 era un mecanismo de resistencia al dificultar la unión entre el fármaco y el receptor. Otra de las características observadas en esta línea celular es que a pesar de tener sobreexpresado HER2 presentaban menores niveles de fosforilación de los residuos tirosinquinasa de HER2.

Con todos estos datos propusieron el siguiente modelo celular sobre JIMT-1: en el que HER2 se sobreexpresa en etapas tempranas y proporciona ventajas en la supervivencia y proliferación, posteriormente sobreexpresa MUC4, aumentando así el potencial metastásico de las células y protegiéndolas del sistema inmune. Debido a que MUC4 impide la interacción de HER2 con sus compañeros habituales, JIMT-1 requiere vías alternativas que conduzcan a la activación de PI3K y MAPK (Nagy P, *et al.* 2005). Por otra parte, se ha sugerido que MUC4 podría interactuar como un ligando para HER2 desencadenando la fosforilación en el residuo Tyr1248. La MUC4 está formada por dos glicoproteínas: ASGP-1 y ASGP-2, siendo esta última la que actuaría como un factor de crecimiento epidérmico EGF-like (Price-Schiavi SA, *et al.* 2002).

### 5.3 Vías de señalización alternativas

Las células tumorales adquieren capacidades biológicas durante su desarrollo que las diferencian de las células normales. Éstas comprenden: el mantenimiento de la señalización proliferativa, evitar la respuesta inmunitaria, promover la inflamación, la invasión y colonización, inducir la angiogénesis y evadir la muerte celular. Además, tienen la capacidad de reclutar células normales que contribuyen a la adquisición del microambiente tumoral (Hanahan D, *et al.* 2011).

Todo esto lo llevan a cabo a través de vías de señalización. Uno de los mecanismos de resistencia a fármacos es utilizar vías de señalización alternativas que se seleccionan mediante la presión clonal que ejerce los diferentes tratamientos.

Por ejemplo, se ha descrito la pérdida de amplificación de *HER2* después de una exposición a tratamiento anti-*HER2* durante la neoadyuvancia. Hasta un tercio de las pacientes podrían perder la expresión al comparar la biopsia diagnóstica con el tumor residual de la cirugía. Estas pacientes presentan un peor pronóstico con mayor índice de recaídas (Mittendorf EA, *et al.* 2009).

### 5.3.1 Vía PI3K/AKT/mTOR:

Una de las vías de señalización oncogénica más importantes implicadas en cáncer de mama es la vía de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) (Cejalvo JM, *et al.* 2016). Regula comportamientos celulares clave tales como: el crecimiento, supervivencia, proliferación, división, apoptosis, migración y el metabolismo celular (**Figura 4**).

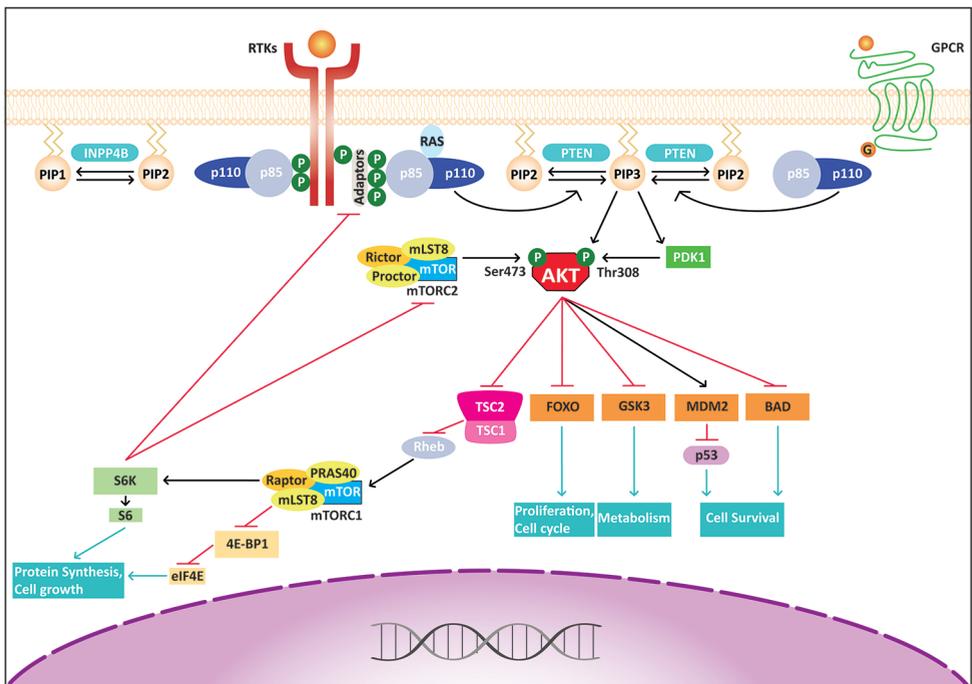


Figura 4. Esquema vía PI3K/AKT/mTOR.

## A. Fisiología de la señalización PI3K

PI3K es un componente de la membrana celular que se agrupa en tres clases dependiendo de la estructura de sus subunidades, de los sustratos y de su regulación. Además cada clase tiene diferentes isoformas, la clase II está implicada en la regulación del tráfico transmembrana, la clase III regula la autofagia y la clase I es la única implicada en cáncer (Leonel F, *et al.* 2011).

PI3K es una proteína heterodímera formada por una subunidad reguladora (p85) y una subunidad catalítica (p110). Los genes *PIK3R1*, *PIK3R2* y *PIK3R3* codifican las diferentes isoformas de p85 (p85 $\alpha$ , p85 $\beta$ , p85 $\gamma$ , respectivamente); mientras los genes *PIK3CA*, *PIK3CB* y *PIK3CD* codifican las isoenzimas p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , and p110 $\delta$ , respectivamente.

Estos genes pueden sufrir mutaciones somáticas que causan hiperactivación constitutiva de la vía. Además, también puede ser activada a través de RTKs como HER2, que interactúan con p85 de forma directa o indirecta a través de adaptadores moleculares (Jiang BH, *et al.* 2009 y Chapuis N, *et al.* 2010). Otro mecanismo descrito es a través de RAS, el principal efector de la vía MAPK, existiendo un *cross-talk* entre ambas vías. De hecho, RAS activa la clase IA de PI3K de forma directa uniéndose a la subunidad catalítica p110 y de forma indirecta por mecanismos todavía no bien definidos (Chan TO, *et al.* 2002).

Otro mecanismo de activación es a través de los receptores de proteína G acoplada (GPCRs), los cuales son activados por diferentes ligandos involucrados en el metabolismo, proliferación y supervivencia celular. Tras la interacción ligando-receptor activan p110, iniciando la señalización (Guillemet-Guibert J, *et al.* 2008).

La activación de p85 (la subunidad reguladora) elimina la inhibición sobre p110 lo que provoca la activación completa de PI3K. Los lípidos de membrana

fosfatidilinositol (PIP) actúan como segundos mensajeros intracelulares de señalización. De este modo PI3K activado cataliza la conversión de fosfatidilinositol-3,4,5-difosfato (PIP2) a fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). La generación de este segundo mensajero (PIP3) juega un papel importante en la señalización a través de diversas proteínas efectoras incluyendo AKT y PDK1.

Existen mecanismos de autoregulación negativa como *INPP4B* y *PTEN* (genes supresores de tumores) que desfosforilan PIP2 y PIP3, respectivamente (Miller TW, *et al.* 2011 y Gewinner Ch, *et al.* 2009).

### **Señalización AKT**

AKT tiene tres isoformas: AKT1, AKT2 y AKT3. Las tres comparten características estructurales, pero con diferente relevancia biológica. Juega un papel crítico en la regulación del crecimiento, proliferación, supervivencia y apoptosis a través de la fosforilación de diferentes sustratos como: BAD, FOXO, BAX y TSC1-TSC2 (Pal SK, *et al.* 2010 y Irie HY, *et al.* 2010, Datta SR, *et al.* 1997, Brunet A, *et al.* 1999 y Rena G, *et al.* 1999).

AKT es activado por pasos secuenciales de fosforilación. En el dominio Thr308 por PIP3 y en el dominio Ser473 por mTOR2, lo que produce su activación completa. Se ha propuesto que la fosforilación del dominio Ser473 estabiliza la fosforilación de Thr308 y así mejorar la actividad catalítica de AKT (Sarbasov DD, *et al.* 2005). Este proceso está regulado negativamente por PHLPP que se encarga de desfosforilar AKT (Gao T, *et al.* 2005, Mendoza MC, *et al.* 2007 y Liu J, *et al.* 2011).

### **mTOR**

mTOR está formado por dos complejos proteicos (Efeyan A, *et al.* 2009):

- El complejo mTORC1 contiene: mTOR, Raptor, mLST8 y PRAS40. Regula la síntesis de proteínas involucradas en el metabolismo celular, proliferación y angiogénesis. Fosforila dos principales dianas: S6K y 4EBP,

que estimulan la traducción del mRNA y, en última instancia, el crecimiento y la proliferación celular (Fingar DC, *et al.* 2004).

- El complejo mTORC2 que fosforila AKT y contiene: mTOR, Rictor, mSin1, Protor y mLST8.

En condiciones normales esta señalización está regulada por mecanismos de *feedback* negativo.

### **B. Alteraciones de la vía PI3K en la carcinogénesis del ca de mama**

Esta compleja red de señalización PI3K se ve afectada a diferentes niveles incluyendo amplificación, sobreexpresión, translocación y mutaciones que desempeñan un papel fundamental en el desarrollo y mantenimiento del cáncer, además de poder contribuir a la resistencia terapéutica (Cizkova M, *et al.* 2010). Se ha encontrado alteraciones de la vía en un 70% de los tumores de mama en al menos un componente. La pérdida de *PTEN*, mutaciones *PIK3CA* y otras alteraciones como a nivel de *PDK1* y *AKT* son algunos de los mecanismos conocidos que activan la vía (Lopez-knowles E, *et al.* 2010).

### **Activación de la vía PI3K a través de los receptores tirosina quinasa, RAS y GPCRs.**

Es frecuente en las células cancerosas que los RTKs estén mutados, amplificados o sobreexpresados causando la activación constitutiva de la vía en ausencia de factores de crecimiento. Por otro lado, la mutación de *RAS* conducen también a la activación constitutiva de la vía (Kyriakis JM, *et al.* 2009).

Otro de los mecanismos son los GPCRs que están altamente expresados en el cáncer de mama y en la metástasis. Müller *et al.*, han identificado altos niveles de expresión de sus ligandos en órganos destino de las metástasis del cáncer de mama. Además, cuando *in vivo* se neutralizan las interacciones ligando-receptor

se disminuye significativamente las metástasis (Katoh M, *et al.* 2010 y Müller A, *et al.* 2001).

### **Pérdida de *PTEN***

La pérdida de *PTEN* es una de las alteraciones genéticas más común de la señalización PI3K. La pérdida de su *feedback* negativo provoca la acumulación de PIP3 y por tanto activa la fosforilación de AKT. La pérdida de *PTEN* se produce a través de diferentes maneras, incluyendo mutaciones somáticas, pérdida de heterocigosidad y metilación del promotor que conduce a silenciamiento génico.

Las mutaciones de *PTEN*, la mayoría esporádicas, son relativamente poco comunes en el cáncer de mama (<5%). Sin embargo, la metilación del promotor, la pérdida de heterocigosidad y la regulación a nivel de RNA o proteína son más frecuentes (30%) (Stemke-Hale K, *et al.* 2008).

La asociación entre la pérdida de *PTEN* con marcadores clínico-patológicas y pronóstico no está clara. Sin embargo, algunos estudios han demostrados su asociación con alto grado, tamaño tumoral, ganglios linfáticos afectos, metástasis, receptores hormonales negativos, aumento de la angiogénesis tumoral y mal pronóstico (Lee JS, *et al.* 2004).

### **Activación *PIK3CA***

Las mutaciones somáticas del gen *PIK3CA* también causan la señalización constitutiva de la vía. Por lo tanto, la presencia de estas mutaciones confieren resistencia a las terapias dirigidas a RTKs (Courtney KD, *et al.* 2010).

Las mutaciones con ganancia de función ocurren con frecuencia en tres *hot spots* en los exones 9 y 20 que corresponden a los dominios helicoidales y catalíticas de p110 $\alpha$  (Baselga J, *et al.* 2011). Algunos estudios muestran que las mutaciones en el exón 20 (dominio catalítico) son los más comunes en el cáncer de mama y producen

la activación constitutiva del dominio quinasa. Mientras que las mutaciones en el exón 9 anulan la interacción intermolecular inhibitoria entre p85 y p110 (Miled N, *et al.* 2007 y Huang CH, *et al.* 2007). La biología subyacente de las dos mutaciones no son equivalentes (Coughlin CM, *et al.* 2010), Además, no son mutuamente excluyentes y actúan de forma sinérgica cuando ambas están presentes (Zhao L, *et al.* 2008).

Las mutaciones *PIK3CA* se han descrito en aproximadamente un tercio del cáncer de mama: 34.5% en receptores hormonales, 22.7% en HER2 positivo y 8.3% en los tumores de tipo basal (Stemke-Hale K, *et al.* 2008). La implicación pronóstica de estas mutaciones es todavía incierta, Kalinsky y su equipo analizaron 590 muestras de tumores primarios de mama con una mediana de seguimiento de 12.8 años. Mostraron como la mutación *PIK3CA* se asociaba significativamente con la edad avanzada al momento del diagnóstico, receptores hormonales positivos, HER2 negativo, tumor de bajo grado histológico y ganglios linfáticos negativos. Las pacientes que presentaban la mutación tenían una mejora significativa de la supervivencia global y supervivencia específica del cáncer de mama. La mutación H1047R se asoció con ganglios negativos, mientras que las mutaciones del dominio helicoidal se asociaron con mayor edad al momento del diagnóstico (Kalinsky K, *et al.* 2009).

Estas mutaciones contribuyen a la carcinogénesis a través de mecanismos dependientes e independientes de AKT (Vasudevan KM, *et al.* 2009). Además, en cáncer de mama existen otras alteraciones menos frecuentes como la amplificación de *PIK3CA*.

### **Desregulación de *AKT***

La hiperactivación de la señalización AKT es una de las características más comunes en el cáncer de mama, López-Knowles *et al.* ha encontrado una asociación positiva de AKT con alto grado tumoral, receptores hormonales negativos, HER2 positivo y mortalidad por cáncer de mama.

Las diferentes isoformas de AKT tienen funciones distintas, por ejemplo la sobreexpresión AKT2 está implicado en la diseminación metastásica, en líneas celulares HER2 aumenta la invasividad *in vitro* y metástasis en modelos animales (Arboleda MJ, *et al.* 2003). Diferentes estudios han demostrado que AKT2 promueve características mesenquimales e invasividad celular. Mientras que la sobreexpresión de AKT1 promueve la supervivencia y crecimiento celular y reduce la migración y la invasión (Chin YR, *et al.* 2011).

Se ha descrito una mutación somática en *AKT1* que conduce a su activación constitutiva con la fosforilación en Ser473, incluso en la ausencia de PIP3. Esta mutación ha sido identificada en el 8% de los cánceres de mama, otras alteraciones como amplificación y sobreexpresión de *AKT1* también se han observado en un subgrupo más pequeño. La amplificación de *AKT2* se ha detectado en el 4%, mientras que la sobreexpresión se encontró en el 10-20% (Cidado J, *et al.* 2012)

### **C. VÍA PI3K Y CA. DE MAMA HER2 POSITIVO**

La activación de la vía PI3K es uno de los mecanismo descritos como resistencia al tratamiento anti-HER2. La frecuencia y el tipo de aberraciones de la vía depende del subtipo de cáncer de mama, de forma global entre un 20-25% presentan mutaciones. En el cáncer de mama HER2 positivo representa entre un 15-23%, siendo la pérdida de *PTEN* una de las alteraciones más frecuente (20-25%).

Berns *et al.* demostraron como en las células BT-474 *knockdown* para *PTEN* disminuía la sensibilidad a trastuzumab. También estudió el papel de la mutación H1047R del gen *PIK3CA* en la resistencia a trastuzumab mediante la transfección del gen mutado en la línea celular SKBR-3 y BT-474, mostrando una disminución de sensibilidad con respecto a las células *wild type* (Berns K, *et al.* 2007).

Estos hallazgos encontrados en líneas celulares también se han reproducido en pacientes, donde tanto la pérdida de *PTEN* como las mutaciones *PIK3CA* se

han correlacionado con periodos de supervivencia más cortos y peor respuesta a tratamientos con trastuzumab en enfermedad metastásica (Esteva FJ, *et al.* 2010, Nagata Y, *et al.* 2004 y Wang L, *et al.* 2011). Sin embargo, los estudios en líneas celulares con lapatinib son controvertidos, han puesto de manifiesto que mientras que las mutaciones en *PIK3CA* predicen resistencia, la pérdida de *PTEN* podría no tener papel. Dave *et al.*, confirmaron en la neoadyuvancia como la pérdida de *PTEN* o mutación en *PIK3CA* fueron factores de resistencia al tratamiento con trastuzumab ( $p= 0.015$ ), mientras la pérdida de *PTEN* se asoció con una alta tasa de respuesta patológica completa (RPC) en las pacientes tratadas con lapatinib ( $p= 0.007$ ). Estos datos sugieren su potencial como biomarcadores de pronóstico (Dave B, *et al.* 2011).

En 2013 se publicó un análisis sobre el tejido tumoral de archivo del estudio EMILIA que confirma que las pacientes con mutación en *PIK3CA* dentro de la rama de capecitabina/lapatinib tuvieron una PFS y OS más cortos en comparación con las pacientes sin mutación. Por el contrario, las pacientes asignadas al grupo de T-DM1 tuvieron progresiones y supervivencias similares, independientemente de la presencia de la mutación. Estos datos sugieren que el mecanismo de acción de T-DM1 podría superar la resistencia de la mutación *PIK3CA* (Baselga J, *et al.* 2013).

Recientemente se ha publicado el resultado de la asociación de la RPC y de las mutaciones *PIK3CA* en el exón 9 y 20 en pacientes con cáncer primario de mama HER2 positivo que recibieron trastuzumab o lapatinib o la combinación más quimioterapia basada en antraciclinas y taxanos. El estudio informa que las pacientes con mutaciones en *PIK3CA* tienen menos probabilidades de lograr una RPC después de tratamiento neoadyuvante, incluso aunque recibiesen un tratamiento dual anti-HER2 (Loibl S, *et al.* 2014).

### 5.3.2 *Cross-talk* con otros receptores:

#### A. Receptores Tirosina quinasa:

##### a. Transición Epitelio-Mesénquima (EMT): AXL y MET

El fenómeno de la transición epitelio-mesénquima (EMT) ha sido descrito como mecanismo en el proceso de metastatización de los tumores epiteliales como el cáncer de mama. La principal característica de la transición epitelio-mesénquima es la pérdida de las uniones intercelulares y del contacto célula-célula y como consecuencia se adquiere un fenotipo mesenquimal y pérdida del epitelial. Estas células presentan una mayor motilidad celular y capacidad de generar colonias metastásicas en órganos a distancia. Este fenotipo mesenquimal les dota de un incremento en la capacidad de auto-renovación celular y aumento de la heterogeneidad celular, adquiriendo una subpoblación celular con rasgos *stem-like*.

La EMT es un proceso reversible, de hecho, las células deben someterse a una transición mesénquima-epitelio (MET) para poder desarrollar las macrometástasis. La plasticidad celular permite estos dos procesos de transición que representan dos estados finales de un proceso dinámico. La reversibilidad de esta transición hace que la evidencia de este proceso a nivel de anatomía patológica en las biopsias sea complicada, debido a que cuando analizamos la enfermedad metastásica mediante las biopsias, muchas de estas células se han sometido al proceso MET y la subpoblación que mantiene características mesenquimales son difícilmente distinguibles de los fibroblastos. Para adquirir el fenotipo mesenquimal las células deben presentar múltiples cambios moleculares y una expresión de genes diferencial, siendo un proceso complejo que implica a múltiples vías de señalización molecular (Wu Y, *et al.* 2016). Las células sufren un proceso denominado *cadherin switching*, sobreexpresando proteínas como N-cadherina, vimentina y fibronectina y disminuyendo la expresión de proteínas de adhesión como E-cadherina. Además, se han descrito otros biomarcadores como los factores de transcripción: Snail, Slug y Twist.

La transición epitelio-mesénquima se ha relacionado como mecanismo de resistencia a diferentes tratamientos por lo que el estudio de los diferentes mecanismos moleculares que intervienen en este proceso son clave para el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas. Se han descrito algunos receptores de membrana implicados en la transición epitelio-mesénquima y en mecanismos de resistencia a tratamientos tales como:

**AXL:** El gen *AXL* se encuentra en el cromosoma 19q13.2, codificado por 20 exones. Es un receptor transmembrana de la familia TAM con actividad tirosina quinasa formado por (**Figura 5**):

- Dominio extracelular: con dos dominios inmunoglobulina-like N-terminal (dominio Ig-like) y dos dominios de fibronectina tipo III (FNIII). Implicados en la unión al ligando Gas6 (growth arrest-specific 6).
- Dominio transmembrana.
- Dominio intracelular: donde se localiza la actividad tirosina quinasa.

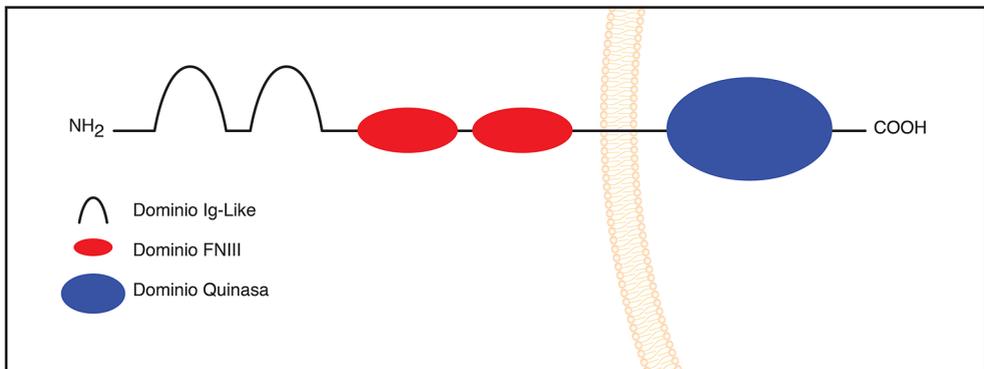


Figura 5. Esquema del receptor AXL

Su potencial oncogénico se debe al dominio tirosina quinasa que puede estar activado de forma dependiente o independiente de ligando. Su ligando, Gas6, se une al dominio extracelular (2:2) induciendo la homodimerización del receptor y la trans-autofosforilación. La activación independiente de ligando (Gas6 independiente) se produce por una sobreexpresión del receptor que causa uniones homofílicas entre sus dominios extracelulares y con ello la activación del dominio intracelular o por heterodimerización con otros receptores como EGFR, MET y HER2.

AXL puede señalar a través de diferentes vías como PI3K/AKT, ERK y NF- $\kappa$ B modulando importantes procesos como la invasión, angiogénesis, supervivencia y proliferación celular (Torka R, *et al.* 2014).

Este receptor se ha relacionado con la transición epitelio-mesénquima, la promoción de la supervivencia celular, resistencia anoikis, invasión y metástasis y a peor pronóstico en diferentes tipos de tumores. Por ejemplo, en el tumor de GIST se ha descrito como mecanismo de resistencia a imatinib mediante la sobreexpresión del ligando Gas6. También ha sido descrito una mayor activación de AXL en modelos de cáncer de pulmón con resistencia adquirida a erlotinib e inducción de la transición epitelio-mesénquima (Zhang Z, *et al.* 2012). Brand *et al.*, mostraron como AXL estaba involucrado en la resistencia adquirida a cetuximab en modelos de carcinoma escamoso de cabeza y cuello (Brand TM, *et al.* 2014). En una cohorte de pacientes con cáncer colorectal (n=223) AXL y Gas6 estaban presentes en los tumores menos diferenciados y Gas6 se encontraba asociado a la afectación ganglionar mostrando una mayor expresión en la enfermedad avanzada (Martinelli E, *et al.* 2015). Además, Dunne *et al.*, asociaron AXL como un factor de mal pronóstico independiente en estadios temprano de cáncer colorectal (Dunne PD, *et al.* 2014). En modelos ortotópicos *in vivo* de cáncer de mama con la línea celular MDA-MB-231 se ha objetivado como la inhibición de AXL disminuye la migración y metástasis pulmonares, subrayando el papel de AXL en la promoción del crecimiento tumoral y metástasis (Li Y, *et al.* 2009).

En el caso del cáncer de mama, por ejemplo Asiedu *et al*, muestran como AXL induce la transición epitelio-mesénquima y regula la función de las *stem cells*. Además encontraron como su expresión estaba relacionada con genes reguladores de metástasis, aumento de tumorigénesis, invasión y migración. Por otra parte, la inactivación de AXL redujo la formación de tumores *in vivo* (Asiedu MK, *et al.* 2013). Gjerdrum *et al*, también confirmaron el papel de AXL en la transición epitelio-mesénquima y su papel en la formación de metástasis en modelos *in vivo* con la línea celular MDA-MB-231, además validaron en una cohorte de pacientes (n= 190) como la expresión de AXL era un factor pronóstico negativo independiente asociado a un reducción en la supervivencia global y estaba significativamente elevado en la metástasis comparado de forma pareada con el tumor primario (Gjerdrum C, *et al.* 2010).

Vuoriluoto *et al*, han estudiado la relación de la vimentina (VIM) en la regulación de AXL sobre líneas celulares de cáncer de mama Basal-like. Describen como VIM regula la expresión de varios genes implicados en la transición epitelio-mesénquima y validan los resultados con una cohorte de pacientes. Muestran una importante relación entre la expresión de VIM y de AXL, sugiriendo a AXL como un mediador *downstream* de los efectos inducidos por vimentina sobre la motilidad celular. Tras silenciar la expresión de VIM se produce una *down-regulación* tanto de los niveles de mRNA como de proteína de AXL y como consecuencia una inhibición en la motilidad celular. Además también han objetivado en modelos *in vivo* de ratones como AXL contribuye a la extravasación de las células del torrente circulatorio (Vuoriluoto K, *et al.* 2011).

En cuanto al cáncer de mama HER2 positivo, Li Liu *et al*, han trabajado sobre líneas sensibles y con resistencia adquirida a lapatinib en células de cáncer de mama HER2+ y RE+. Muestran como la sobreexpresión de AXL desempeña un papel en la resistencia adquirida a lapatinib. La línea celular BT-474 lapatinib resistente presentaba una mayor expresión de AXL que la línea celular BT474 lapatinib

sensible. Cuando las células fueron tratadas con GSK1363089 (un inhibidor potente de AXL, MET y VEGFR), se consiguió restaurar la sensibilidad a lapatinib, sin embargo los inhibidores de MET y de la familia de VEGFR no tuvieron este mismo efecto. Además al tratar las células con siRNA\_AXL se restauró la sensibilidad a lapatinib en las células resistentes. También correlacionaron la expresión de AXL con la expresión de RE, el tratamiento hormonal (con letrozol o fulvestrant) redujo los niveles AXL e inhibió el crecimiento celular en combinación con lapatinib. Además los suplementos de estrógenos restauraron la sobreexpresión de AXL y por tanto la resistencia de las células a lapatinib (Liu Li, *et al.* 2009).

**MET:** MET es un proto-oncogen localizado en el cromosoma 7q21-31, es un RTK cuyo ligando es HGF (factor de crecimiento de hepatocito). Está formado por (*Figura 6*):

- Dominio extracelular que incluye dominio semaphorin N-terminal (SEMA), un dominio integrina (PSI) y cuatro dominios Ig-like (IPT).
- Dominio transmembrana.
- Dominio intracelular formado por un dominio yuxtamembrana (JM) y una región catalítica con actividad tirosina quinasa. Finaliza en una cadena c-terminal (MFDS) responsable de reclutar moléculas transductoras y adaptadores citoplasmáticos.

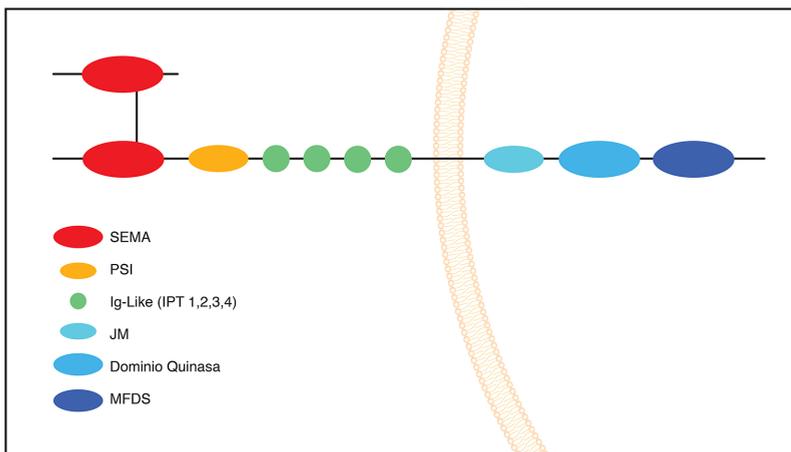


Figura 6. Esquema del receptor MET

AXL y MET comparten una serie de características y desempeñan un papel similar. MET juega un papel importante en las vías de señalización en el proceso de oncogénesis, ya que regula la proliferación e invasión celular, la angiogénesis y la regulación de las *stem cell* del cáncer. Desempeña un papel central en la remodelación y morfogénesis del tejido epitelial, contribuyendo a la transición epitelio-mesénquima.

En circunstancias normales se produce una homodimerización mediada por ligando resultando la autofosforilación de los residuos de tirosina quinasa y activando diferentes proteínas de señalización esenciales para las actividades biológicas mediadas por MET que conducen a la activación de vías *downstream* como MAPK y PI3K/AKT.

MET también interacciona con otras proteínas de membrana para modular diferentes señales, como por ejemplo: las integrinas y plexinas de clase B que contribuyen a la migración e invasión; CD44 que conduce a la activación de la vía MAPK; y los RTK como AXL, VEGFR y la familia HER contribuyendo con este *cross-talk* a resistencia a terapias dirigidas.

MET se encuentra desregulado en múltiples tipos de cáncer, se han descrito diferentes alteraciones como mutaciones en el receptor a nivel del dominio quinasa, yuxtamembrana y dominio extracelular; amplificación del gen; aumento de expresión de la proteína; aumento de expresión del ligando; y alteraciones moleculares en otros componentes de la vía que activan MET como la pérdida de fosfatasa específicas de MET o mutaciones en c-Cbl que está implicado en la ubiquitinación de MET (Maroun CR, *et al.* 2014).

Este receptor y su ligando están frecuentemente sobreexpresados en el cáncer de mama y se ha correlacionado con una menor DFS y OS, siendo identificado como un predictor independiente de mal pronóstico. MET y HER2 han mostrado un efecto

sinérgico en promover la invasión celular, sugiriendo que los tumores que expresan ambos receptores podrían ser más agresivos (Khoury H, *et al.* 2005).

Además datos preclínicos muestran como MET contribuye a la resistencia a trastuzumab en líneas celulares de cáncer de mama HER2. En el trabajo de Shattuck *et al.*, identificaron como MET contribuye a la resistencia a trastuzumab en líneas celulares de cáncer de mama HER2+ (BT474, SKBR3). Al bloquear MET con RNA interferente o con un inhibidor de MET (SU11274), hubo una sensibilización de las células mejorando significativamente la respuesta a trastuzumab (Shattuck DL, *et al.* 2008).

Minuti *et al.*, han correlacionado la amplificación del gen *MET* y *HGF* con mal pronóstico y resistencia a trastuzumab en cáncer de mama metastásico HER2 positivo. En un estudio retrospectivo con una cohorte de 130 pacientes con cáncer de mama metastásico HER2 positivo, analizaron en el tumor primario (obtenido de la cirugía sin haber recibido ningún tratamiento previo) el número de copias de genes de *MET* y *HGF* por FISH. Las pacientes fueron tratadas con trastuzumab en monoterapia o en combinación con quimioterapia. Se identificó 36 pacientes con FISH+ para MET que presentaban de forma significativa una mayor tasa de fracaso a trastuzumab (44.4% vs 16%,  $p=0.001$ ) y una menor PFS (5.7 vs 9.9 meses, HR 1.74;  $p=0.006$ ) que las pacientes ( $n=94$ ) con FISH negativo. La ganancia del número de copias del gen *HGF* fue evaluado en 84 casos (64.4%), siendo positivo en 33 pacientes y estuvo asociado con mayor riesgo de fracaso a trastuzumab comparado con las pacientes FISH negativo (30.3% vs 7.8%,  $p=0.007$ ). Aunque la activación de MET puede ser independiente o dependiente de ligando, estos resultados sugieren que la activación de MET dependiente de ligando podría representar un mecanismo de resistencia importante en el cáncer de mama HER2 positivo, lo que indica un posible papel de tratamiento combinado anti-MET y anti-HER2 (Minuti G, *et al.* 2012).

Del ensayo EGF20009 se evaluó la expresión de MET en una cohorte de 60 pacientes con cáncer de mama metastásico HER2 positivo tratadas con lapatinib en monoterapia como primera línea. La sobreexpresión fue evaluada por FISH en tumor primario o metastásico. Las pacientes con altos niveles de MET mostraron peor PFS con respecto a las pacientes con bajos niveles (19.29 vs 28.14 semanas,  $p < 0.0225$ ) (Liu L, *et al.* 2011). En otros modelos preclínicos con líneas celulares de cáncer gástrico HER2 positivo también se ha descrito MET como mecanismo de resistencia a lapatinib a través de la activación de ERK y AKT (Chen C, *et al.* 2012).

Paulson *et al.*, han puesto en relieve la gran heterogeneidad intratumoral en la expresión de diferentes RTKs entre las diferentes subpoblaciones celulares. Para elucidar la relación entre MET y HER2 en cáncer de mama, analizaron sobre líneas celulares MET+/HER+ como afecta la pérdida de MET o HER2. Al silenciar MET se produjo un aumento de HER2 y al silenciar HER2 aumentó la activación de MET. La pérdida de HER2 y MET ocasionó además una disminución de la señal PI3K/AKT y aumento de la dependencia de MAPK (Paulson AK, *et al.* 2013).

#### **b. Otros: IGFR, FGFR, RON, EphA2**

**IGFR:** La sobreexpresión de IGFR y el aumento de los niveles de la heterodimerización de HER2/IGFR incrementan la señalización a través de PI3K produciendo resistencia a trastuzumab. Lu *et al.* mostraron como líneas celulares con sobreexpresión de HER2 y IGFR-1 presentaban resistencia a trastuzumab y como esta resistencia era vencida al combinar trastuzumab con anticuerpos anti IGFR-1 o IGFBP-3 (proteína de unión 3 factor de crecimiento de la insulina) (Lu Y, *et al.* 2001). Tres años más tarde, mostraron como la señalización a través de IGF-1 aumentaba los niveles de SKP2, una ubiquitina ligasa para p27. Por lo que se produce una disminución de p27 y evita la parada del ciclo celular en G1/S, incluso en presencia de trastuzumab (Lu Y, *et al.* 2004).

El grupo de Nahta muestran como IGFR-1 se sobreexpresa en una clona celular resistente a trastuzumab. El *cross-talk* entre IGFR-1 y HER2 se pone en evidencia ya que la estimulación de IGF-1 produce un aumento de la fosforilación de HER2 y además tras el tratamiento con un inhibidor TK del receptor produce una disminución de la fosforilación de HER2 en dicha línea celular resistente. Además, la inhibición de la actividad TK de IGFR-1 aumenta la sensibilidad a trastuzumab de las células resistentes. La interacción HER2-IGFR fue interrumpida con la exposición a un anticuerpo anti-IGFR-1 y en menor medida con pertuzumab. Esta disrupción del heterodímero restauró la sensibilidad a trastuzumab. Ha sido la primera vez que se describe como pertuzumab inhibe la dimerización de HER2 con un receptor que no es de la familia HER. Estos autores también mostraron que las vías PI3K/AKT y MAPK pueden ser activadas más rápidamente por la estimulación de IGF-1 en las células resistentes que en las sensibles (Nahta T, *et al.* 2005).

Sin embargo, a pesar de estos datos preclínicos, los resultados en la clínica sobre el papel de IGFR-1 en la resistencia a trastuzumab son inconsistentes. Kostler *et al*, evaluó por IHQ la expresión de IGFR-1 en muestras de cáncer de mama metastásico HER2 positivo de 72 pacientes tratadas con esquemas basados en trastuzumab. No se encontró correlación entre la expresión del receptor con la respuesta, PFS, OS, beneficio clínico, ni tampoco con características clínicas o biológicas (Kostler WJ, *et al.* 2006). Y más recientemente, Edith Perez ha publicado como la expresión de IGF1R no está asociada con diferente beneficio a trastuzumab en adyuvancia (Reinholz M, *et al.* 2017). La expresión de IGF1R fue evaluado por IHQ, siendo el 41% de las paciente (708/1734) IGF1R+. La expresión del receptor fue asociada: a pacientes jóvenes (mediana de 48 vs 51 años,  $p= 0.007$ ), a expresión de receptores hormonales (78% vs 35%,  $p< 0.001$ ), afectación ganglionar (89% vs 83%,  $p< 0.001$ ) y tumores  $\geq 2$  cm (72% vs 67%,  $p=0.02$ ). Sin embargo la expresión de IGF1R no afectó a DFS, por lo que no predijo resistencia a tratamiento con trastuzumab.

**FGFR:** pertenece a la familia de receptores tirosina quinasa, está formado por 4 receptores y 23 ligandos. La amplificación y sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento 2 (FGFR2) se ha observado en cáncer de mama, además un polimorfismo de FGFR2 se ha asociado al aumento del riesgo de padecer cáncer de mama. Por lo que este gen podría actuar como un *driver* en la oncogénesis y ser una potencial diana de tratamiento. En el caso de FGFR2 mediante la unión a ligando se produce su dimerización y autofosforilación desencadenando la activación y señalización a través de AKT y ERK. Azuma *et al*, establecieron una línea celular resistente a lapatinib (UACC812/LR) mediante la exposición continua a lapatinib en una línea parenteral HER2+ lapatinib sensible. En la población resistente el gen *FGFR2* fue altamente amplificado, acompañado de su sobreexpresión y la disminución de la expresión de HER2, en el ensayo de proliferación se mostró como la IC50 de PD173074 (un inhibidor tirosina quinasa de molécula pequeña de FGFR) era 10.000 veces menor en la población resistente que en la parenteral. Este fármaco disminuyó la fosforilación de FGFR2 e indujo la apoptosis en las células UACC812/LR, pero no en las células sensibles (Azuma K, *et al*. 2011). Estos datos proponen que FGFR2 podría ser una molécula fundamental en la supervivencia de UACC812/LR e independiente de la vía de HER2, sugiriendo que se produce un *switch* desde la vía HER2 a FGFR2 que permite a las células ser resistentes al tratamiento anti-HER2.

Hanker *et al*, a partir de la línea parenteral BT-474 desarrollaron una línea con resistencia a lapatinib + trastuzumab. Observaron un incremento en el número de copias de FGF3/4/19 junto con un incremento de la fosforilación de FGFR. Además el tratamiento con inhibidores tirosina quinasa de FGFR revirtió la resistencia adquirida sobre esta línea celular.

En una cohorte de pacientes del ensayo FinHer (donde se randomizaba tras cirugía a quimioterapia +/- trastuzumab) se ha relacionado la alta expresión de FGFR1 con una disminución del beneficio de trastuzumab en adyuvancia en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo. Además en las pacientes del ensayo NeoALTTO, se

correlacionó la amplificación de FGFR1 y FGF3 con una menor respuesta patológica completa (Hanker AB, *et al.* 2017).

**RON:** El receptor RON (Receptor d'Origine Nantais) pertenece a la familia de receptores tirosina quinasa, miembro de la familia de MET. Wang *et al.*, mostraron como en la línea celular SKBR3 con resistencia adquirida a lapatinib se revirtió dicha resistencia tras tratamiento con inhibidores del receptor RON y con siRNA\_RON (Wang Q, *et al.* 2013).

**EphA2:** EphA2 también es un RTK de la familia Eph. Tras el contacto célula-célula, los receptores Eph interactúan con sus ligandos llamados efrinas. Se ha relacionado con la oncogénesis y la progresión metastásica, se ha detectado en la neovasculatura tumoral desempeñando un papel en la angiogénesis tumoral. Su función en la oncogénesis parece ser independiente de ligando, su señalización parece mediada a través del *cross-talk* con otros receptores de membrana celular.

En pacientes con cáncer de mama HER2 se ha correlacionado la sobreexpresión de EphA2 con una disminución en DFS y OS. EphA2 forma un complejo con HER2 aumentando la señal MAPK y RhoA GTPasa, aumentando la proliferación y movilidad celular. El estudio de Zhuang *et al.*, muestra que niveles elevados de EphA2 es un importante contribuyente a la resistencia a trastuzumab primaria y secundaria. Además inhibiendo EphA2, *in vivo* y sobre líneas celulares resistentes a trastuzumab con sobreexpresión de EphA2, se puede restaurar la sensibilidad a trastuzumab (Zhuang G, *et al.* 2010).

## **B. Receptores Hormonales**

Las pacientes luminales/HER2+ presentan dos vías de señalización importantes la de HER2 y la de los receptores de estrógeno. Se sabe que existe un *cross-talk* entre ambas vías que contribuyen a la resistencia de los tratamientos, por ello es necesario bloquear ambas señalizaciones. Existen estudios preclínicos que evidencian como

la señalización HER2 contribuye a la resistencia del tratamiento hormonal, además la combinación de trastuzumab a tamoxifeno o fulvestrant restaura la sensibilidad a la hormonoterapia e inhibe el crecimiento tumoral. Hay diversos ensayos clínicos que muestran como la asociación de ambos tratamientos es más efectiva que la monoterapia. Existe un fase III en enfermedad avanzada (ensayo clínico TAnDEM) (Kaufman B, *et al.* 2009) que combina anastrozol con trastuzumab en pacientes postmenopáusicas RE+/HER2+, evidenciando una mejora en términos de PFS en la rama de la combinación con respecto a anastrozol en monoterapia (4.8 vs 2.4 meses,  $p= 0.0016$ ). Además en estudios de neoadyuvancia con tratamiento anti-HER2 las pacientes con expresión de RE+ presentaban menores tasas de respuesta completa (De Azambuja E, *et al.* 2014).

### C. Otros receptores de la familia HER

Otros miembros de la familia HER pueden desempeñar un papel oncogénico. Se ha descrito como los tumores pueden expresar múltiples receptores de la familia y diferentes ligandos (Smith BL, *et al.* 2004). Los ligandos se pueden agrupar en tres clases:

- EGF, Amfiregulina, TGF $\alpha$ : se unen a HER1.
- BTC, heparin-binding EGF y Epiregulina: se unen tanto a HER1 como HER4.
- Neuregulinas que se unen a HER3 y HER4 (Motoyama AB, *et al.* 2002).

En la clínica existen datos de una correlación positiva entre los niveles de expresión del homodímero HER2/HER2 con las tasas de respuesta y supervivencia en pacientes con cáncer de mama HER2 tratadas con trastuzumab (Desmedt C, *et al.* 2009 y Toi M, *et al.* 2010). Pero como hemos descrito anteriormente, HER2 puede formar heterodímeros tras la unión del ligando. Esta heterodimerización induce la actividad intrínseca del dominio tirosina quinasa y con ello la transducción de señal, promoviendo la resistencia a trastuzumab, ya que dicho fármaco es incapaz de bloquear los heterodímeros (Garrett JT, *et al.* 2011).

Ritter *et al*, demostró como las células con resistencia adquirida a trastuzumab presentaban altos niveles de EGFR fosforilado (pEGFR) y heterodímeros EGFR/HER2, así como sobreexpresión a nivel de RNA de TGF $\alpha$ , heregulina y heparin-binding EGF con respecto a las células sensibles. Erlotinib y gefitinib inhibieron la fosforilación de HER2, además gefitinib también inhibió la asociación de p85 con pHER3. Ambos inhibidores de EGFR y lapatinb indujeron apoptosis e inhibieron *in vivo* el crecimiento de las células resistentes (Ritter CA, *et al.* 2007).

Para evaluar el papel de TGF $\alpha$  en la resistencia a trastuzumab, Valabrega *et al*, mostraron *in vitro* como las células transfectadas con cDNA TGF $\alpha$  se hicieron resistentes a trastuzumab, se redujo la proporción de receptores internalizados y degradados. Además compararon tres muestras tumorales antes del inicio de tratamiento con trastuzumab y tras la progresión, evidenciando altos niveles de TGF $\alpha$  en la progresión con respecto a las muestras iniciales (Valabrega G, *et al.* 2005).

#### **D. Polimorfismo Fc $\gamma$ R**

Trastuzumab al tratarse de un anticuerpo monoclonal humanizado IgG1 se une primero a las células tumorales contra el receptor HER2 y después se une a las células efectoras a través de sus IgG Fc receptores (Fc $\gamma$ Rs). Estos Fc $\gamma$ Rs se expresan en los leucocitos y se clasifican en tres clases: Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII. Las dos últimas clases se subdividen en Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb, Fc $\gamma$ RIIIa y Fc $\gamma$ RIIIb. Los receptores se diferencian por su afinidad por IgG. Fc $\gamma$ RI tiene una alta afinidad por IgG y puede unirse a IgG monomérico, a diferencia de Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII que presentan una afinidad más débil y por lo tanto sólo pueden unirse eficazmente con complejos multiméricos. Además, Fc $\gamma$ RIIb y Fc $\gamma$ RIIIb no tienen actividad ADCC, sin embargo Fc $\gamma$ RIIa y Fc $\gamma$ RIIIa activan Fc $\gamma$ Rs que se expresan en los monocitos, macrófagos y células NK.

En Fc $\gamma$ RIIa existe un polimorfismo en la posición 131 de un único nucleótido de histidina (H)/ arginina (R) y en Fc $\gamma$ RIIIa en la posición 158 de Valina (V)/fenilalanina

(F). Se sabe que FcγRIIIa con el alelo V tiene mayor afinidad por IgG1 que el alelo F y desencadenan una respuesta ADCC más eficaz. Musolino *et al*, analizaron los polimorfismos de FcγRIIIa, FcγRIIa y FcγRIIb y su correlación con la eficacia clínica a tratamientos basados en trastuzumab en 54 pacientes con cáncer de mama metastásico HER2. El genotipo V/V de FcγRIIIa se correlacionó significativamente con tasa de respuesta y PFS, también hubo una tendencia significativa en el genotipo H/H de FcγRIIa. Estos datos sugieren que FcγR mediante ADCC juega un papel importante en la eficacia clínica de trastuzumab (Musolino A, *et al*. 2008).

## 6. Mecanismos para superar las resistencias

Todos estos mecanismos de las resistencias a los tratamientos anti-HER2 son objetivos potenciales para el desarrollo de nuevos fármacos para superar dichas resistencias. Hoy en día, existen en la clínica diversas estrategias.

### 6.1 *Switching* agente quimioterápico:

Una de las estrategias es proseguir con trastuzumab y cambiar el agente quimioterápico asociado. Aunque la duración óptima del tratamiento con trastuzumab es todavía controvertida, existen datos de estudios preclínicos que muestran un efecto aditivo o sinérgico de trastuzumab con quimioterápicos, lo que ha llevado en la práctica clínica a continuar con trastuzumab más allá de la progresión en combinación con una segunda o tercera línea de quimioterapia.

El grupo de von Minckwitz publicó en 2009 un ensayo clínico fase III que evalúa el beneficio de mantener trastuzumab más allá de la progresión con una segunda línea de quimioterapia con capecitabina frente a capecitabina en monoterapia, el objetivo principal fue PFS. Se randomizaron 1:1 a 156 pacientes (78 tratadas con capecitabina más trastuzumab y 78 con capecitabina en monoterapia). La mediana de PFS fue de 5.6 meses en el grupo de capecitabina vs 8.2 meses en el grupo de capecitabina más trastuzumab (HR 0.69, 95% IC, 0.48 a 0.97, p=0.0338). La OS fue de 20.4 vs 25.5 meses (p= 0.257), la tasa de respuesta de 27.0% vs 48.1% (odds ratio

2.50,  $p= 0.0115$ ) a favor de la combinación, sin aumentar la toxicidad. Por lo que la combinación de trastuzumab más capecitabina mostró una mejora significativa en la tasa de respuesta global y el tiempo hasta la progresión en comparación con capecitabina en monoterapia en mujeres HER2 positivo que presentan progresión durante el tratamiento con trastuzumab (von Minckwitz G, *et al.* 2009).

En un pequeño estudio retrospectivo con 58 pacientes se muestra como trastuzumab puede tener actividad en pacientes multitratadas. En primera línea se obtuvo un respuesta global de 39.7% y enfermedad estable en 29.3% con un beneficio clínico de 69%. La mediana del tiempo a la progresión fue de 6 meses (con un rango de 1 a más de 39 meses). Un 53.4% recibió una segunda línea de tratamiento en combinación con trastuzumab mostrando: una tasa de respuesta de 25.8%; enfermedad estable 12.9%; beneficio clínico en el 38.7% y una mediana de tiempo a la progresión de 3 meses (con un rango de 1 a más de 22 meses). Un total de 8 pacientes (14.3%) recibieron una tercera línea con esquemas que contenían trastuzumab: la tasa de respuesta fue de 12.5%; enfermedad estable en el 12.5%; beneficio clínico en el 25% y una mediana de tiempo a la progresión de 2 meses (rango de 1 mes a más de 12 meses). Cuatro pacientes (7.1%) recibieron una cuarta línea con cero tasas de respuestas y un 25% de enfermedad estable. Los factores predictivos de respuesta encontrados fueron metástasis a nivel de tejido blando y hueso ( $p= 0.03$ , odds ratio 3.25; IC 95%, 1.08-9.8) y metástasis en menos de dos localizaciones ( $p= 0.03$ ; odds ratio 6.2; IC 95%, 1.25-30.9). Se observó una mejor respuesta en la segunda línea tras haber obtenido respuesta en primera línea ( $p= 0.03$ , odd ratio 13.2; IC 95%, 1.36-126). Por tanto podría haber un beneficio hasta en cuarta línea de tratamiento con esquemas que contengan trastuzumab, sin embargo este estudio no nos permite determinar la contribución independiente de trastuzumab. Sería necesario más estudio prospectivos aleatorizados para evaluar el beneficio clínico de continuar con trastuzumab tras progresión (Garcia-Saenz JA, *et al.* 2005).

## 6.2 *Switching* tratamiento anti-HER2

Los tumores resistentes a trastuzumab pueden seguir siendo dependientes de la actividad tirosina quinasa de HER2. Por lo que otra de las estrategias para las pacientes resistentes a trastuzumab es proseguir bloqueando HER2 con otros fármacos antidiana con diferente mecanismo de acción. Como el uso de lapatinib en combinación con xeloda o T-DM1, ya descritos anteriormente.

## 6.3 Combinación de tratamiento anti-HER2

En 2010 se publicó en *Journal of Clinical Oncology* un estudio fase III aleatorizado cuyo objetivo principal era PFS y demostró el beneficio de la combinación de lapatinib con trastuzumab frente a lapatinib en monoterapia en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo que han progresado a trastuzumab, lo que ofrece un esquema de tratamiento sin quimioterapia. Las pacientes habían recibido una mediana de tres tratamientos previos con trastuzumab, la combinación fue superior en la supervivencia libre de progresión (12 vs 8.1 semanas, HR 0.73; IC 95%, 0.57 a 0.93;  $p=0.008$ ) y beneficio clínico (24.7% vs 12.4%,  $p=0.01$ ) (Blackwell KL, *et al.* 2010). La mediana de supervivencia global fue de 14 meses para la rama de la combinación frente a 9.5 meses para lapatinib en monoterapia (HR: 0.74,  $p=0.026$ ) (Blackwell K, *et al.* 2012). Estos datos muestran que lapatinib tiene un mecanismo de acción diferente a trastuzumab sin resistencia cruzada.

En el Congreso de la Sociedad Europea de Oncología (ESMO-14, celebrado en Madrid el 28 de Septiembre de 2014), se presentó los datos finales de supervivencia global del ensayo clínico CLEOPATRA. Con una mediana de seguimiento de 50 meses (un rango entre 0 y 70 meses), se ha mostrado una mejora estadísticamente significativa en la OS a favor de la rama experimental (pertuzumab, trastuzumab más docetaxel) con una HR: 0.68,  $p=0.0002$ . La mediana de OS fue de 40.8 meses en la rama de placebo frente a 56.5 meses en la rama de pertuzumab, con una diferencia de 15.7 meses. Estos resultados han hecho cambiar la práctica clínica, convirtiendo la rama experimental en un tratamiento standard (Swain S, *et al.* 2014).

Actualmente hay ensayos clínicos en marcha que evalúan la eficacia de la combinación de T-DM1 con pertuzumab y otras combinaciones posibles de tratamientos anti-HER2.

## **6.4 Futuras estrategias**

### **6.4.1 Neratinib:**

Neratinib es un inhibidor irreversible pan-HER (HER1, HER2 y HER4). Podría revertir la resistencias a trastuzumab derivado de la activación de HER2 con la heterodimerización con otros receptores de la familia HER. Ha mostrado actividad en ensayos clínicos tanto en pacientes pretratadas y no tratadas con trastuzumab. Con una tolerabilidad aceptable, siendo el principal efecto secundario la diarrea (Burstein HJ, *et al.* 2010).

En el ensayo clínico ExteNET se evalúa la eficacia de Neratinib durante 12 meses después de un tratamiento adyuvante de quimioterapia y trastuzumab en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo en estadios iniciales comparado frente a placebo. Con una mediana de seguimiento de 24 meses, el ratio de DFS fue de 93.9% en la rama de Neratinib frente a 91.6% en el grupo de placebo (HR: 0.67,  $p= 0.009$ ) (Chan A, *et al.* 2016).

### **6.4.2 Inhibidores de la vía PI3K/AKT/mTOR:**

Actualmente hay en desarrollo ensayos clínicos con inhibidores de la vía PI3K en cáncer de mama. Se tratan de inhibidores de PIK3CA, AKT o mTOR.

Los inhibidores selectivos de PI3K y AKT inhiben el crecimiento celular, sin embargo, en cáncer de mama HER2 sólo los inhibidores de PI3K causan una rápida inducción de la apoptosis. Marie Will *et al.*, mostró que mientras los inhibidores de AKT inhiben AKT-mTOR y activan la señalización de ERK, los inhibidores de PI3K inhiben ambos. Esto sugiere que PI3K está por encima de RAS y de AKT-mTOR, por lo que la inhibición de PI3K podría ser significativamente mayor que con

inhibidores de AKT. Los inhibidores de PI3K no sólo causan inhibición duradera de la señalización AKT, sino también la inhibición transitoria de RAS y ERK, ambos requeridos para la inducción de la apoptosis (Will M, *et al.* 2014). Según estos hallazgos, la combinación de tratamiento anti-HER2 con inhibidores de PI3K podría ser necesaria para una eficacia óptima.

Los ensayos clínicos fase III de BOLERO-1 y -3 han mostrado que la asociación de everolimus, trastuzumab más quimioterapia se ha asociado a beneficio en términos de PFS en pacientes con cáncer de mama HER2+ con mutaciones en *PIK3CA*, pérdida de *PTEN* o hiperactivación de la vía PI3K (André F, *et al.* 2016).

En los análisis por separado, en el ensayo BOLERO-1 (combinación de everolimus, trastuzumab y paclitaxel) en primera línea, no mejoró significativamente la PFS. Sin embargo, en BOLERO-3 donde se evaluaba la combinación de everolimus, trastuzumab más vinorelbina si hubo un beneficio significativo.

En un análisis de 549 pacientes (n=302 de BOLERO-1 y n=247 de BOLERO-3) se observó en términos de PFS:

- Según *PIK3CA* status:

- BOLERO-1: 12.0 vs 7.6 meses (HR= 0.70, p= 0.25) en pacientes con *PIK3CA* mutado. En pacientes WT: 18.5 vs 17.1 meses (HR= 1.13, p= 0.59).
- BOLERO-3: 6.9 vs 5.7 meses (HR= 0.65, p= 0.11) en pacientes con *PIK3CA* mutado. En pacientes WT: 6.8 vs 6.6 meses (HR= 1.08, p= 0.68).

- Según *PTEN* status:

- BOLERO-1: 23.5 vs 16.8 meses (HR= 0.56, p= 0.14) en pacientes con pérdida de *PTEN*. En pacientes WT: 16.1 vs 13.8 meses (HR= 1.02, p= 0.93).
- BOLERO-3: 9.5 vs 5.5 meses (HR= 0.52, p= 0.13) en pacientes con pérdida de *PTEN*. En pacientes WT: 6.8 vs 6.7 meses (HR= 1.00, p= 0.98).

- Según activación de la vía PI3K:

- BOLERO-1: 13.9 vs 10.9 meses (HR= 0.72, p= 0.18) en pacientes con hiperactivación de la vía. En pacientes sin hiperactivación: 18.2 vs 17.1 meses (HR= 1.18, p= 0.51).
- BOLERO-3: 8.1 vs 5.6 meses (HR= 0.62, p= 0.04) en pacientes con hiperactivación de la vía. En pacientes sin hiperactivación: 6.8 vs 7.0 meses (HR= 1.19, p= 0.40).

En el meta-análisis de ambos ensayos, se objetivó el beneficio estadísticamente significativo a favor de everolimus frente a placebo.

- *PIK3CA* mutado: HR= 0.67, p= 0.05.
- Pérdida de *PTEN*: HR= 0.54, p= 0.04.
- Hiperactivación vía PI3K: HR= 0.67, p= 0.02.

Este beneficio no se mantuvo en pacientes sin alteraciones:

- *PIK3CA* WT: HR= 1.10, p= 0.5.
- *PTEN* conservado: HR= 1.00, p= 0.97.
- Vía PI3K sin hiperactivación: HR= 1.19, p= 0.28

### 6.4.3 Inhibidores IGFR1

Los estudios *in vitro* han demostrado que el uso de trastuzumab con un inhibidor de la señalización IGF1R tiene un efecto sinérgico en la inhibición del crecimiento de las células de ca. mama HER2 (Camirand A, *et al.* 2002). Actualmente se están desarrollando anticuerpos monoclonales e inhibidores selectivos TK anti-IGF1R.

### 6.4.4 Proteínas de Choque Térmico 90 (HSP90)

HSP90 es una proteína chaperona frecuentemente sobreexpresada en las células cancerosas, cuya función es estabilizar otras proteínas tales como AKT, HER2, EGFR y PDGFR. Sin su presencia estas proteínas son degradadas, por lo que la inhibición de HSP90 tiene el potencial de interrumpir múltiples vías claves de supervivencia

dentro de las células cancerosas. Por ejemplo, la inhibición de HSP90 conduce a una rápida degradación de HER2 en el proteosoma con disminución de pAKT y una significativa actividad antitumoral, por lo que este mecanismo se ha convertido en un objetivo para vencer las resistencias a trastuzumab.

**Tanespimycin** es un inhibidor de la HSP90 que disminuye la expresión de HER2 e inhibe el crecimiento del cáncer de mama en ensayos preclínicos con líneas celulares y animales. En 2006 se inició un fase I con tanespimycin más trastuzumab en 25 pacientes con tumores sólidos avanzados de los cuales 15 eran cáncer de mama HER2. Los datos mostraron que fue bien tolerado, siendo el primer ensayo que mostró actividad antitumoral en pacientes con cáncer de mama HER2 que habían progresado durante tratamiento con trastuzumab (Modi S, *et al.* 2007).

En un fase II con 31 pacientes con cáncer de mama avanzado HER2 que habían progresado previamente a trastuzumab fueron tratadas con la combinación. El objetivo principal fue la tasa de respuesta siendo un 22% y la tasa de beneficio clínico de 59%. La mediana de PFS fue de 6 meses (IC del 95%: 4-9) y la mediana de OS de 17 meses (IC del 95%: 16-28). Por lo que tanespimycin más trastuzumab mostró actividad anticancerígena significativa en pacientes con cáncer de mama avanzado HER2-positivo metastásico previamente tratados con trastuzumab (Modi S, *et al.* 2011).

Se están estudiando otros inhibidores de HSP90 de segunda generación más potentes como **alvespimycin** en combinación con trastuzumab en fases tempranas que muestran que la combinación es segura, tolerable y con actividad antitumoral (Jhaveri K, *et al.* 2012).

#### 6.4.5 Inhibidores VEGFR

La sobreexpresión de HER2 se ha asociado a una *up-regulación* de VEGFR en células cancerosas tanto *in vitro* como *in vivo*. Tanto los datos preclínicos y

clínicos muestran una correlación entre la expresión de HER2 y VEGF, además las pacientes con aumento de expresión de ambos tienen peor pronóstico, pudiendo ser parcialmente atribuido al aumento de la angiogénesis. Un posible enfoque para revertir resistencias a trastuzumab podría ser con fármacos cuyo objetivo es alterar la vasculatura tumoral, por lo que se ha postulado la terapia combinada dirigida a HER2 y VEGFR como un objetivo lógico para la investigación (Jones KL, *et al.* 2009).

Falchook *et al.*, realizaron un fase I-II con un tratamiento de combinación con trastuzumab, lapatinib y **bevacizumab**. Se analizó el subgrupo de 27 pacientes con cáncer de mama metastásico con una mediana de 7 tratamientos sistémicos previos. Todas habían recibido trastuzumab, 23 lapatinib y una bevacizumab. La tasa global de enfermedad estable (EE)  $\geq 6$  meses, respuesta parcial (RP) o completa (RC) fue del 50% (5 pacientes con EE, 7 RP y una RC) (Falchook GS, *et al.* 2013).

Existe un fase II que evalúa la eficacia y viabilidad de la combinación de bevacizumab con trastuzumab y docetaxel en pacientes con cáncer de mama metastásico HER2 positivo que han recibido máximo un régimen de quimioterapia previa para la enfermedad avanzada. Estaba previsto 6 ciclos de tratamiento con posterior mantenimiento con bevacizumab más trastuzumab. El 50% de las pacientes (13/26) reclutadas completaron los 6 ciclos y posterior mantenimiento (una mediana de 11 ciclos). El objetivo principal fue PFS con una mediana de 14.3 meses (IC del 95%: 9.3 a 35 meses), la tasa de respuesta objetiva fue 46% (12/26), la tasa de beneficio clínico fue del 69% (18/26) (IC 95%: 48-86%). La combinación fue bien tolerada y clínicamente activa (Zhao M, *et al.* 2014).

A pesar de estos datos, en 2013 se publicó un fase III (AVEREL) que fue negativo de primera línea con docetaxel, trastuzumab más bevacizumab o placebo para enfermedad avanzada cuyo objetivo principal era PFS. Se randomizaron a 424 pacientes, la mayoría presentaban metástasis viscerales y el 43% tenían un ILE de menos de 12 meses. Con una mediana de seguimiento de 26 meses, la PFS fue de

13.7 meses en la rama con placebo vs 16.5 meses en la rama con bevacizumab con una HR 0.82 (IC del 95%: 0,65 a 1.02;  $p= 0.0775$ ) y la tasa de respuesta fue de 70% vs 74% respectivamente ( $p= 0.3492$ ). Por lo que la combinación no alcanzó el objetivo principal.

Los niveles basales altos del factor de crecimiento endotelio vascular A (VEGF-A) en plasma se asociaron con un mayor beneficio de bevacizumab (no estadísticamente significativo). El valor predictivo de respuesta de VEGF-A es consistente con otros estudios sobre HER2 negativo, por lo que identificar un biomarcador predictivo nos permitiría una mejor selección de pacientes (Gianni L, *et al.* 2013).

En paralelo al desarrollo de bevacizumab, existen inhibidores tirosina quinasa que actúan contra VEGFR. Por ejemplo, **pazopanib** es un inhibidor multiquinasa que actúa sobre VEGFR, PDGFR y c-KIT. El primer fase II randomizado de lapatinib frente a lapatinib con pazopanib en primera línea en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo mostró una tasa de respuesta mayores en la combinación, pero no hubo un beneficio en PFS en comparación con lapatinib en monoterapia. Además la combinación fue más tóxica (Cristofanili M, *et al.* 2013).

**Sunitinib** es otro inhibidor multiquinasa que inhibe VEGFR, PDGFR, KIT, RET, FLT3, y CSF-1R. Al igual que pazopanib, sunitinib inhibe el *cross-talk* entre HER2 y VEGFR. Se ha publicado un fase II que estudia la combinación de sunitinib con trastuzumab en pacientes con cáncer de mama metastásico HER2 se permitía tratamiento previo con trastuzumab y/o lapatinib. La mayoría de los pacientes (58%) no habían recibido quimioterapia previa para la enfermedad avanzada. El objetivo principal era la tasa de respuesta, siendo del 37%, el beneficio clínico fue de 56%. En el subgrupo de pacientes con tratamiento-*naïve* o tratamiento sólo en la adyuvancia se obtuvo una respuesta mayor (44%) y una tasa de beneficio clínico de 59%. La OS a un año fue de 91%. Por lo que la combinación de sunitinib más trastuzumab

mostró actividad antitumoral sobre todo en pacientes sin tratamiento previo o sólo adyuvante con una seguridad y tolerabilidad aceptable (Bachelot T, *et al.* 2014). Un estudio exploratorio evaluó la combinación de sunitib con docetaxel y trastuzumab en primera línea, mostrando un perfil de toxicidad aceptable y actividad antitumoral (Cardoso F, *et al.* 2012). Sin embargo, se necesitan más estudios para comprender mejor el potencial de estas combinaciones.





---

---

**HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---

---



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### Hipótesis:

La transición epitelio-mesénquima es un fenómeno responsable de la resistencia a fármacos en cáncer. Proponemos AXL, un receptor transmembrana tirosina-quinasa implicado en la transición epitelio-mesénquima, como potencial mecanismo de resistencia a trastuzumab en cáncer de mama HER2 positivo. Y por tanto, potencial diana terapéutica para revertir la resistencia.

### Objetivo Principal:

- Explorar AXL y otros receptores implicados en la transición epitelio-mesénquima como MET como posibles mecanismos de resistencia primaria y secundaria a trastuzumab explorando su expresión en las líneas celulares de cáncer de mama HER2+: AU565-S, AU565-R y HCC1954.

### Objetivos Secundarios:

- Estudiar *in vitro* el papel de AXL como posible diana terapéutica para revertir la resistencia a trastuzumab en cáncer de mama HER2+.
- Analizar *in silico* la relación de la expresión de AXL con genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima en una cohorte pública de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. MATERIALES

#### 1.1 Líneas celulares. Descripción.

Se utilizaron 3 líneas celulares derivadas de carcinoma de mama HER2 positivas:

- **AU565:** células de adenocarcinoma de mama metastásico derivadas de derrame pleural de una paciente caucásica de 43 años. Crecen de forma adherente con morfología epitelial. Esta línea celular sobreexpresa HER2 y la expresión de receptores hormonales es negativa. Es una línea sensible a tratamiento con trastuzumab.
  
- **HCC1954:** células de carcinoma de mama primario. Derivadas de una paciente India de 61 años diagnosticada de carcinoma ductal infiltrante, grado histológico 3, estadio IIA. Crecen de forma adherente con morfología epitelial. Presentan sobreexpresión de HER2 y negatividad para receptores hormonales. Y además, mutaciones a nivel de *PIK3CA* (H1047R). Esta línea presenta resistencia primaria a trastuzumab.
  
- **BT-474:** células de adenocarcinoma de mama de primario. Derivadas de una paciente caucásica de 60 años. Son células epiteliales adherentes que forman colonias que raramente confluyen. Sobreexpresan HER2 y son sensibles a trastuzumab.

#### 1.2. Tratamientos utilizados:

- **Trastuzumab:** Herceptin, Genentech, USA.
  
- **TP-0903:** un potente y selectivo inhibidor del receptor tirosina quinasa de AXL (Selleckchem).
  
- **BKM120:** inhibidor selectivo de clase I de PI3K (p110 $\alpha$ / $\beta$ / $\delta$ / $\gamma$ ) (Selleckchem).

- **Everolimus:** inhibidor de mTORC1 (Selleckchem).
- **GDC-0980:** inhibidor dual de clase I de PI3K (p110 $\alpha$ / $\beta$ / $\delta$ / $\gamma$ ) y mTOR (mTORC1/2) (Selleckchem).

### 1.3 Generación de la línea celular resistente (AU565-R)

Las líneas celulares (AU565 y HCC1954) se obtuvieron de *American Type Culture Collection*. En colaboración con el grupo del Dr. Fedrico Rojo obtuvimos la línea celular con resistencia adquirida a trastuzumab (AU565-R) a partir de la línea parenteral de AU565-S (Zazo S, *et al.* 2016).

Se utilizó trastuzumab a 15  $\mu$ g/mL que se añadió al medio celular de las AU565 por un mínimo de 7 meses. Las células crecieron a una concentración de 10  $\mu$ g/mL de trastuzumab durante 30 días y posteriormente la dosis fue aumentada hasta una concentración final de 15  $\mu$ g/mL. Paralelamente la línea parenteral fue cultivada sin tratamiento para ser usada como control de sensibilidad al fármaco. La resistencia adquirida de AU565-R se evaluó por ensayos de proliferación celular y una vez obtenida se mantuvo la línea celular con una concentración de mantenimiento de 15  $\mu$ g/mL de trastuzumab.

Para su confirmación se sembraron 3-5x10<sup>6</sup> células en Flask de T75 por cada condición (sensible y resistente), ambas cultivadas en ausencia y en presencia de trastuzumab durante 7 días. Una vez la resistencia fue confirmada se mantuvo ambas líneas sin tratamiento durante 30 días y se volvió a reconfirmar con el mismo protocolo. Además la resistencia se comprobó tras periodos de congelación y descongelación de las células. El medio de las células se cambiaba cada 3 días.

Para los ensayos de proliferación se sembraron 10<sup>4</sup> células por pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron *overnight*. Las células se trataron con 0.01-500  $\mu$ g/mL de trastuzumab. Tras 72 horas de incubación, la viabilidad celular fue determinada con

ensayos de MTT, la absorbancia fue media a 490 con espectrofotómetro. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Para caracterizar molecularmente las líneas celulares se utilizaron los mismos métodos y criterios utilizados para el diagnóstico clínico de las pacientes. Se analizó receptores hormonales (estrógeno y progesterona) por IHQ y la sobreexpresión HER2 por IHQ y FISH. Para ello, se recogieron bloques de parafina a partir de pellets celulares de  $0.5-1.10^7$  de células. Se objetivó que la línea AU565-R conservaba la amplificación de HER2 y la negatividad a los receptores hormonales (*Figura 7*).

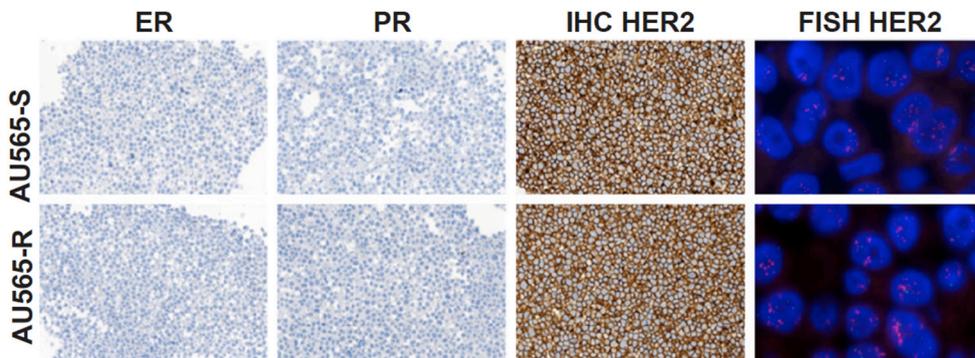


Figura 7. Evaluación molecular de la línea celular parental sensible a trastuzumab (AU565-S) y la línea con resistencia adquirida (AU565-R).

#### 1.4. Aparataje Utilizado.

- **Centrífugas:** para tubos de microcentrífuga se utilizó una centrífuga de la marca Eppendorf, modelo 5415R. Para la centrifugación tanto de placas como de tubos se utilizaron las centrífugas Eppendorf modelo 5804.
- **Autoclave:** marca SELECTA, model Austester-G.
- **Campana de flujo laminar:** Haraeus Gemini. Faster modelo Bio60.
- **Estufas termostatazadas de cultivo:** Haraeus BB6060. Jouan IG 150.
- **Homogeneizador:** Heidolph modelo ReaxTop.
- **Baño:** Selecta modelo Precistern.

- **Congelador a -80°C:** Heraeus modelo HeraFreeze. Thermo Scientific Forma 900 Series.
- **Microscopio:** Microscopio óptico invertido Carl Zeiss hasta 100X.
- **Plataforma oscilante:** Marca VWR modelo Rocking Platform.
- **Balanzas:** Balanza Scaltec con una precisión de 0.1g. Balanza Ae Adam modelo PGW 753i con una precisión de 0.001g.
- **Sistema de purificación de agua:** Marca MILLIPORE, modelos Milli-Q y Milli-RO.
- **Cubetas de electroforesis:** Marca BIORAD, modelo Mini-PROTEAN 3 Cell.
- **Cubetas de electrotransferencia:** Marca BIORAD, modelo Mini Trans-Blot Cell.
- **Fuentes de alimentación para la electroforesis:** Se utilizaron 2 fuentes de alimentación, una de la marca SIGMA, modelo PS 250-2, y otra de la marca BIORAD, modelo 200/2.0 Power Supply.
- **Espectrofotómetro/fluorímetro de placas y cubetas:** Marca Molecular Device, modelo Spectra max 384 plus.
- **Termobloque:** Marca Eppendorf, modelo Thermomixer comfort.

### 1.5 Bases de datos pública

Se ha evaluado una base de datos independiente y pública de cáncer de mama, disponible en el portal *cBioPortal for cancer Genomics* (<http://www.cbioportal.org/>) (Gao, *et al.* 2012). Incluye múltiples datos moleculares a nivel de expresión de mRNA, cambios en el número de copias de DNA, expresión de proteínas, mutaciones, etc. Todos los datos clínicos y genómicos están disponibles públicamente.

## **2. MÉTODOS**

### **2.1 CULTIVOS CELULARES**

#### **2.1.1 Medios de cultivo**

Para las líneas celulares AU565 y HCC1954 se utilizó el medio RPMI sin HEPES. El medio fue suplementado con 10% SBF, 1% glutamina y 1% antibióticos (penicilina/estreptomicina). El medio, el suero y los antibióticos fueron adquiridos de la compañía SIGMA-ALDRICH.

#### **2.1.2 Mantenimiento de células.**

Todas las líneas celulares se mantuvieron en sus medios correspondientes con sus suplementos en una estufa con atmósfera húmeda a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>. La manipulación de los cultivos y la preparación de las soluciones se llevaron a cabo en campanas de flujo laminar en condiciones de esterilidad. Las células crecieron en Flask de T75. Los experimentos se realizaron cuando la confluencia celular era de un 70%.

#### **2.1.3 Inactivación del SBF (Suero Bovino Fetal).**

El suero que se utiliza para suplementar el medio de cultivo fue previamente inactivado (se ha desnaturalizado las proteínas que contiene para evitar que interfieran en el metabolismo celular). Para inactivarlo, hemos incubado el suero a 56°C durante 30 minutos. Una vez inactivado se ha mantenido congelado a -20°C en stock.

#### **2.1.4 Tratamiento con Tripsina-EDTA.**

Ambas líneas celulares utilizadas crecen en monocapa adheridas al frasco de cultivo. Por tanto para trabajar con ellas y hacer los pases celulares se requiere tripsina-EDTA (*Ethylene-Dinitrilo Tetraacetic Acid*). La tripsina es una enzima proteolítica que interfiere en la adhesión célula-célula mediada por cadherinas. Como en presencia de calcio estas moléculas son resistentes a la tripsina, se le añade EDTA, que es un quelante del calcio. De esta forma las cadherinas pasan a ser susceptibles a la tripsina y las células se separan. El protocolo consiste en lavar

las células con PBS y cubrir las con una capa de tripsina-EDTA entre 3 y 5 minutos a 37°C. Posteriormente se neutraliza la tripsina añadiendo medio de cultivo (6 mL) y se centrifuga para recoger el pellet celular.

### **2.1.5 Congelación**

La congelación debe ser un proceso lento. Primero se prepara el medio de congelación. En nuestro caso, el medio de congelación utilizado para todas las líneas celulares está compuesto por un 90% de SBF y 10% de DMSO como criopreservante (evita que se formen cristales de hielo durante el proceso de congelación). Una vez preparado el medio de congelación, se elimina el medio de cultivo de la placa y se lava con 2-3 mL de PBS. Se retira el PBS y se tripsiniza, se deja a 37°C hasta que se despeguen las células (2-5 minutos). Una vez despegadas, se recogen con 6-7 mL de medio de cultivo y se pasan a un tubo de 15 mL que se centrifuga durante 5 minutos, a 1500 rpm a temperatura ambiente. Una vez llevado a cabo este paso, se elimina el sobrenadante, que contiene los restos de medio y tripsina y se resuspende el sedimento en 1 mL de medio de congelación. Los criotubos se guardan a -80°C durante 2 días en una caja especial de crioconservación que contiene isopropanol, un alcohol que debido a sus características químicas se mantiene en estado líquido a -80°C y evita que la congelación se produzca de forma brusca. Una vez transcurridos los 2 días, se guarda definitivamente la muestra en nitrógeno líquido, cuya temperatura máxima es -195,8°C, ya que a una temperatura mayor el nitrógeno pasa a vapor.

### **2.1.6 Descongelación**

La descongelación debe ser un proceso rápido para evitar la formación de cristales de hielo que pueden dañar las estructuras celulares e incluso matar a la célula. Se atemperan los medios que se van a utilizar a 37°C, se extraen los criotubos del tanque de nitrógeno y se rocían con etanol para que la descongelación se produzca más rápidamente. Los criotubos rociados se dejan en la estufa a 37°C hasta su completa descongelación. Una vez descongelados, se resuspenden las células en 6 o 7 mL de medio de cultivo, ya que el DMSO posee cierta toxicidad para las

células y así minimizamos el daño diluyéndolo. Se mezcla suavemente un tubo de 15 mL y se centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, las células quedan en el sedimento, por lo que se elimina el sobrenadante y se resuspenden el pellet en 1 mL de medio de cultivo. Se toma una alícuota para contar las células y se siembran en los frascos que se dejan crecer en la estufa a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>.

## **2.2. MÉTODO MTT PARA DETERMINAR VIABILIDAD CELULAR.**

### **2.2.1 Fundamento**

Utilizamos el método MTT para determinar la viabilidad y proliferación celular, en nuestro caso utilizamos el *Cell Growth Determination Kit* (#GDC1; Sigma). El compuesto MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) es un tetrazol que emite en amarillo, el cual es metabolizado por enzimas reductoras que lo transforman en formazán que emite en azul. Mediante este viraje de color, se cuantifica la cantidad de MTT transformado. Ya que la reducción sólo se puede llevar a cabo cuando las enzimas reductoras están activas y por tanto las células vivas.

### **2.2.2 Protocolo**

Se sembraron 8000 células por pocillo con un volumen de 200 µL de medio en una placa de 96 pocillos. Se utilizaron las líneas celulares: AU565-S, AU565-R y HCC1954 tratadas con 15 µg/mL de trastuzumab durante 7 días. El día uno se sembraron las células, el día dos se trataron con trastuzumab y el día 4 se añadió +/-TP-0903 (con una IC<sub>50</sub> calculada para cada línea celular), finalmente el día 7 se realizó la MTT tras 72 horas de tratamiento con el inhibidor de AXL. La concentración IC<sub>50</sub> de TP-0903 fue de 100 nM para HCC1954, 150 nM para AU565-S y 600 nM para AU565-R. Para el estudio de los inhibidores de la vía PI3K sobre la línea celular HCC1954 se utilizó el mismo protocolo. Las IC<sub>50</sub> fueron: 1000 nM para BKM120, 1000 nM para GDC-0980 y 25 nM para everolimus.

Se añadió 50µL de MTT SOLUTION a cada pocillo en condiciones de esterilidad y se incubó 4 horas a 37°C. Después de la incubación se retiró el medio de cultivo (con cuidado para no levantar las células adheridas a la superficie) y se añadió el mismo volumen de MTT SOLVENT (disolución 1:1). Se realizó una agitación suave para mejorar la disolución de los cristales de MTT formazán. Las placas se leyeron una hora después de añadir la MTT SOLVENT. La absorbancia se midió a 570 nm con un background de 690 nm.

La sensibilidad o resistencia a trastuzumab fue evaluada usando la siguiente ecuación:  $\text{Log}(N_t) = (\text{Log}2/\text{DT}) T + \text{Log}(N_0)$  y el *fold change* del ratio de crecimiento =  $\text{DT con tratamiento} / \text{DT sin tratamiento}$ . Donde: DT = tiempo de duplicación,  $N_t$  = número de células después del tratamiento, T = tiempo de tratamiento y  $N_0$  = número de células antes del tratamiento. Las líneas celulares con más de un 20% de disminución en el número de células en respuesta a trastuzumab fueron consideradas sensibles.

## **2.3 MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DE mRNA: q-PCR**

### **2.3.1 Extracción de RNA**

Los pellets celulares para la extracción del RNA total fueron obtenidos de los Flask de T75 con una confluencia al 70%, se utilizó el kit *PureLink<sup>TM</sup> RNA Mini Kit de Thermo Fisher Scientific*, siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del RNA fueron medidos con NanoDrop ND-2000 (*NanoDrop Technologies*) y su integridad mediante la determinación del ratio A260/280 y A260/230.

### **2.3.2 RT-PCR en Tiempo real**

El RNA fue retro-transcrito a cDNA utilizando el *Real-Time RT-PCR high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems)* a 25°C 10 minutos, seguido de 2h a 37°C. El cDNA obtenido fue amplificado por qPCR utilizando *TaqMan Universal Master MIX (Applied Biosystems)*. Todas las reacciones fueron

hechas por triplicado. Las PCR cuantitativas se llevaron a cabo en 9700HT *Fast Real-Time PCR System*. Se utilizaron primers pre-diseñados *TaqMan* de *Applied Biosystems*.

Nombre del Gen	TaqMan Probe
<i>AXL</i>	hs01064444_m1
<i>MET</i>	hs01565584_m1
<i>GAPDH</i> (Housekeeping gene)	hs03929097_g1

La cantidad estimada de transcrito se normalizó con la expresión del mRNA de *GAPDH* cuantificado en la misma reacción.

## 2.4 MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DE PROTEINAS: Western-Blot

### 2.4.1 Extracción de Proteína.

Las proteínas se extrajeron a partir de pellets celulares con una confluencia de 70% en Flask de T75. Las muestras se homogenizaron con 1 mL de RIPA buffer (1.8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1% SDS, 1.0% TritonX 100, 0.1 M NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 1mM PMFS). Suplementado con 2 µL/mL de cocktail de inhibidores de proteasas y 5 µL/mL de cocktail de fosfatasa. Después de la homogenización las muestras fueron sonicadas seguido de una centrifugación a 4°C, a una velocidad de 14000g durante 30 minutos. El sobrenadante contiene el total de las proteínas extraídas, se recogió y se normalizó su concentración.

### 2.4.2 Método para determinar la concentración de proteína (*BCA protein assay*)

Es un ensayo colorimétrico para medición de concentración proteica basado en la absorbancia que se realizó con el *Kit Pierce, BCA protein assay (Thermo Fisher Scientific)*. El componente más importante del reactivo es el colorante de Coomassie. Este colorante es de color rojo, pero al unirse a las proteínas vira a color azul y así forma el máximo del espectro de absorción que pasa de 465nm (forma no unida a la proteína) a 595nm (forma unida a la proteína) siendo proporcional el incremento de la absorbancia a la cantidad o concentración de proteína presente en la muestra de interés.

Se realiza una recta patrón con diferentes concentraciones crecientes de BSA que van desde 0 ug/uL a 25 ug/uL, con lo que obtenemos una recta con concentraciones conocidas. Tras esto, se añaden 5 uL de muestra y 200 uL de reactivo a cada pocillo. La absorbancia se midió con Spectra Max Plus 384 (*Molecular Devices, software softmax Pro 6.2.2*) a 595 nm. Con estas mediciones interpolamos la absorbancia de nuestras muestras para conocer su concentración. Las medidas se hicieron por duplicado, tanto para la curva patrón como para las muestras de interés.

### 2.4.3 Western Blotting

Se desnaturalizaron las mismas cantidades de proteína (40 µg) con tampón Laemli 5x (0.3M Tris/HCl pH 6.8, 50% glicerol, 10% SDS, 0.05% azul de bromofenol, 25% β-mercaptoetanol) a 95°C durante 5 min y se cargó en geles de SDS-PAGE para electroforesis (*Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). La concentración de bis-tris Acrilamida fue de 8% dependiendo del peso molecular de las proteínas a cuantificar. Mediante la electroforesis separamos las proteínas desnaturalizadas según su peso molecular debido al campo eléctrico. Se añade a las muestras el detergente SDS y el agente reductor β-mercaptoetanol. El SDS es un detergente aniónico capaz de eliminar las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas y además confiere una carga negativa a cada proteína en proporción a su masa, mientras que el β-mercaptoetanol se utiliza para la desnaturalización de los enlaces disulfuro. Al añadir estos dos compuestos químicos asumimos que la distancia de migración de las proteínas en el gel está directamente vinculada sólo al tamaño de la proteína desplegada (longitud de su cadena, número de aminoácidos).

Se aplicó un campo eléctrico de 80 voltios al *Stacking* gel, aumentando hasta 120 voltios para el *Resolving* gel durante el tiempo necesario para la correcta separación de las proteínas. El tampón electroforesis fue Tris-Glicina (25 mM Tris, 200 mM Glicina, 0.1%, SDS, pH 8.3). Una vez finalizado, el gel se transfiere a una membrana de 0.45 µm de Nitrocelulosa (Bio-rad), mediante electrotransferencia en condiciones húmedas durante 90 minutos a 4°C a una intensidad constante de 120 V o 400 mA en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, Metanol 20%, pH 8.3).

Las membranas con las proteínas transferidas se bloquearon durante una hora con BSA al 5% en TBS-T (0.25 M TrisHCl pH 7.5, 0.15M NaCl, 0.1 Tween 20). Este paso permite evitar uniones inespecíficas del anticuerpo. A continuación se realizaron 3 lavados de 5 minutos en una plataforma oscilante con TBS-T. Posteriormente se añadió el anticuerpo primario en tampón de bloqueo. Para todos los anticuerpos primarios las membranas se incubaron durante la noche a 4° C con agitación. Al día siguiente se hicieron otros tres lavados con TBS-T de 5 minutos y posteriormente se incubó el anticuerpo secundario durante 60 minutos a temperatura ambiente (*anti-rabbit IgG 7074 Cell Signaling*, a una concentración 1:2000). Transcurrido la hora, se lavó nuevamente tres veces la membrana con TBS-T. La detección de las bandas se llevó a cabo utilizando quimioluminiscencia, durante un minutos se incubaba con la solución reveladora (*Amersham ECL Western Blotting detection reagent, GE Healthcare*). Para el revelado de los films se utilizó *Luminescent Image Avancer, ImagenQuant Las 4000 (GE Healthcare)*. La densitometría de las bandas fue analizada usando *Image J*, de *Java image processing program* de dominio público, que permite una valoración semicuantitativa de las bandas. La carga se normalizó con  $\beta$ -actina y GAPDH, además se hizo tinción de *Ponceau*. Los anticuerpos utilizados se especifican en la siguiente tabla.

Proteína	Origen	Dilución	Casa Comercial
AXL	Rabbit	1:1000	ab37861 Abcam
MET	Rabbit	1:1000	ab51067 Abcam
HER2	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
$\beta$ -actina	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
GAPDH	Rabbit	1:40000	Abcam

## 2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Para el análisis se ha utilizado el programa de SPSS y para los gráficos el programa *GraphPad Prism7*. Se ha utilizado la prueba de *t* de *Student* de dos colas para la comparación de dos grupos. El p-valor < 0.05 se consideró estadísticamente

significativo. Se realizaron estudios independientes con un mínimo de tres replicados biológicos por condición para permitir la comparación estadística. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  desviación estándar.





## **RESULTADOS**



## RESULTADOS

### 1. Evaluación de la sensibilidad a trastuzumab y descripción morfológica de las líneas celulares

Para los estudios *in vitro* preclínicos utilizamos las siguientes líneas celulares: las BT-474 como control positivo de sensibilidad a trastuzumab, las líneas celulares HCC1954 como modelo celular establecido de resistencia primaria y AU565-R como modelo de resistencia adquirida a trastuzumab generado a partir de su parental sensible AU565-S.

Para establecer la dosis de trabajo se evaluó el efecto de trastuzumab sobre la viabilidad celular en la línea sensible BT-474 al fármaco durante 72 horas. Se mostró un efecto antiproliferativo desde concentraciones de 0.5  $\mu\text{g/ml}$  con una IC<sub>50</sub> que fue estable a partir de concentraciones superiores a 10  $\mu\text{g/ml}$  (**Figura 8A**). A partir de estos datos se decidió trabajar con concentraciones de 15  $\mu\text{g/ml}$  de trastuzumab por ser una dosis que proporcionaba la máxima capacidad inhibitoria de la droga.

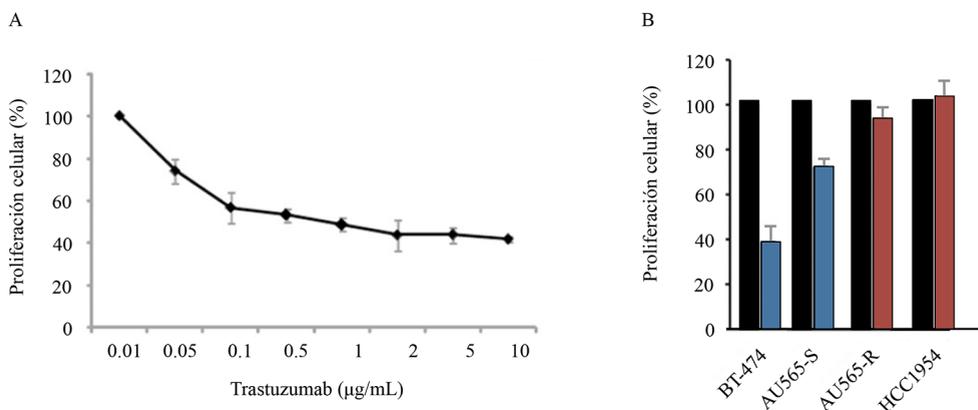


Figura 8. Efecto de trastuzumab en la viabilidad de la línea celular BT-474 en dosis crecientes de 0.01 a 10  $\mu\text{g/mL}$  (A). Evaluación de resistencia a trastuzumab en las líneas BT-474, AU565-S, AU565-R y HCC1954 a dosis de 15  $\mu\text{g/mL}$  de trastuzumab. Cada condición está comparada consigo misma con y sin tratamiento (B).

Una vez establecida la dosis se evaluó la sensibilidad de trastuzumab en las tres líneas celulares: AU565-S, AU565-R y HCC1954. Se realizaron experimentos en presencia y ausencia de 15  $\mu\text{g/ml}$  de trastuzumab durante 7 días. La respuesta al tratamiento fue calculada mediante el *fold change* del ratio de crecimiento entre las células tratadas y las no tratadas. Un incremento del crecimiento  $\geq 1.2$  veces fue considerado como resistencia a trastuzumab (**Figura 8B**). Así las líneas HCC1954 y AU565-R fueron consideradas como resistentes y AU565-S como sensible (**Tabla 2**).

Trastuzumab (15 $\mu\text{g/mL}$ )				
Línea Celular	Viabilidad Celular (%)	SD	Fold Change (Ratio crecimiento)	Tipo de Respuesta
BT-474	38.70	0.07	3.52	S
AU565-S	72.15	0.04	1.26	S
AU565-R	93.96	0.06	0.91	R
HCC1954	101.14	0.02	0.94	R

Tabla 2. Panel de las cuatro líneas celulares tratadas con trastuzumab. Se clasificaron como sensibles (S) o resistentes (R) evaluando la proliferación en presencia y ausencia de trastuzumab 15  $\mu\text{g/mL}$  durante 7 días. La respuesta a trastuzumab se calculó con el fold change del ratio de crecimiento de las células tratadas con las células no tratadas. Si el fold change de descenso del crecimiento es  $\geq 1.2$  veces se consideraron sensibles y si  $\leq 1.2$  veces se consideraron resistentes.

En cuanto a la evaluación de la morfología celular, no hubo cambios morfológicos entre AU565-R con resistencia adquirida y su parental (AU565-S). Ambas tenían características propias de las células epiteliales, crecían formando *clusters* y de forma uniforme (**Figura 9**).

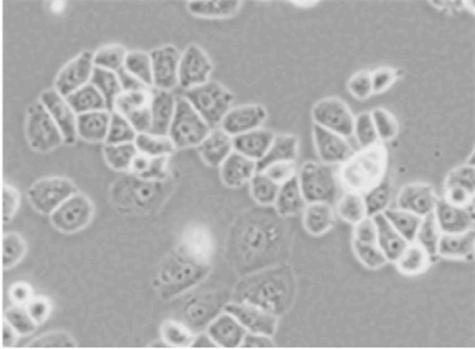
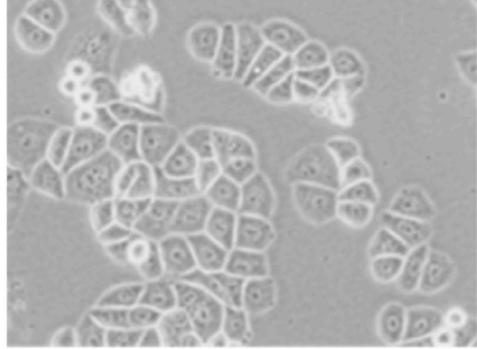
**AU565-S****AU565-R**

Figura 9. Imagen de la línea AU565-R con su parental AU565-S cultivadas en monocapa (Zazo, *et al.* 2016).

Al análisis morfológico la línea celular HCC1954 (con resistencia primaria a trastuzumab), también presentaba una morfología epitelial. Se caracteriza por células epiteliales grandes con vacuolas ocasionales (**Figura 10**).

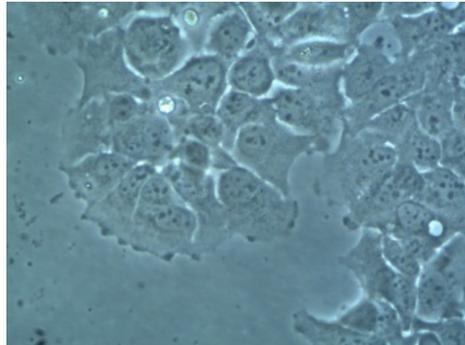
**HCC1954**

Figura 10. Imagen de la línea celular con resistencia primaria, HCC1954

Para comprobar que la sobreexpresión de HER2 se mantenía en las tres líneas celulares (AU565-S, AU565-R y HCC1954), evaluamos su expresión a nivel de proteína por la técnica de WB. Confirmamos que tanto las líneas resistentes como sensibles mantenían la sobreexpresión de HER2 (**Figura 11**).

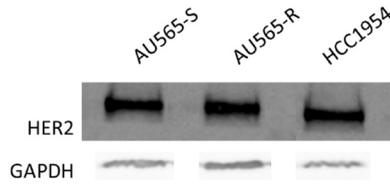


Figura 11. WB de la proteína HER2 en las líneas AU565-S, AU565-R y HCC1954.

## 2. Aumento de expresión de los genes *AXL* y *MET* en las líneas celulares resistentes a trastuzumab

Planteamos la hipótesis de la transición epitelio-mesénquima como un fenómeno responsable de la resistencia a trastuzumab en cáncer de mama HER2 positivo. Por lo que decidimos estudiar *AXL* y *MET*, dos receptores transmembrana tirosina quinasa cuya función está relacionada con este fenotipo. Ambos receptores podrían jugar un papel tanto en la resistencia primaria como secundaria. El primer paso fue analizar a nivel de mRNA la expresión de estos dos genes.

Por tanto, se evaluó la expresión de *AXL* a nivel de mRNA sobre las tres líneas celulares (AU565-S, AU565-R y HCC1954) mediante RT-qPCR. Encontramos un importante y significativo incremento de *AXL* en las líneas celulares resistentes a trastuzumab con respecto a la sensible. El incremento en la línea celular de resistencia adquirida (AU565-R) fue de media 599 veces (SD: 143.87,  $p= 3.08E^{-6}$ ), mientras que el incremento fue mucho mayor en la línea celular con resistencia primaria (HCC1954) con un incremento de 1061 (SD: 495.54,  $p= 7.4E^{-4}$ ) (**Figura 12A**).

También se analizó la expresión diferencial de *MET* entre las diferentes condiciones. La línea celular AU565-R presentó un incremento de 1.89 veces con respecto a AU565-S (SD: 0.49,  $p= 0.009849$ ), siendo el incremento mucho mayor en la línea celular con resistencia primaria (5.02 veces, SD: 1.75,  $p= 0.003635$ ) (**Figura 12B**).

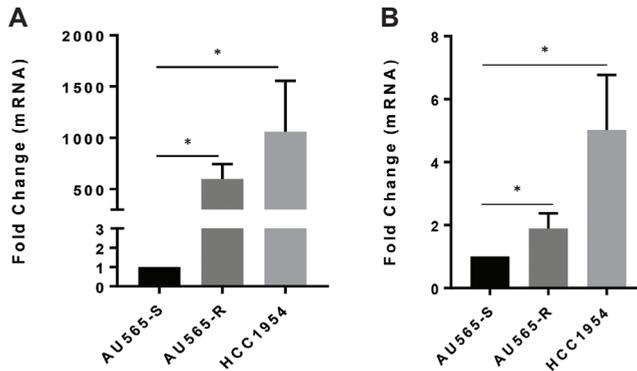


Figura 12. Expresión mRNA mediante RT-qPCR sobre las líneas celulares AU565-S, AU565-R y HC1954: *AXL* (A), *MET* (B).

### 3. Aumento de las proteínas AXL y MET en las líneas celulares con resistencia a trastuzumab

Con el objetivo de estudiar si este importante incremento observado a nivel de mRNA de los receptores AXL y MET en las líneas celulares con resistencia adquirida (AU565-R) y resistencia primaria (HCC1954) era estable y se correlacionaba con una mayor síntesis de proteína, decidimos analizar por WB las diferencias de expresión a nivel proteico. Y así poder confirmar que en las líneas celulares HER2+ con resistencia a trastuzumab hay un aumento de la transcripción y traducción de los genes *AXL* y *MET*.

Analizamos la expresión de la proteína AXL por la técnica de WB en las tres líneas celulares, utilizando la línea AU565-S de forma basal para la comparación. Objetivamos un aumento de expresión en ambas líneas resistentes a trastuzumab. En el caso de la resistencia adquirida se observó un incremento de 1.62 veces (SD= 0.43,  $p= 0.11$ ). En el caso de la resistencia primaria la diferencia fue mayor con un incremento de 3.60 veces con respecto a AU565-S (SD=1.47,  $p=0.07$ ) (**Figura 13**).

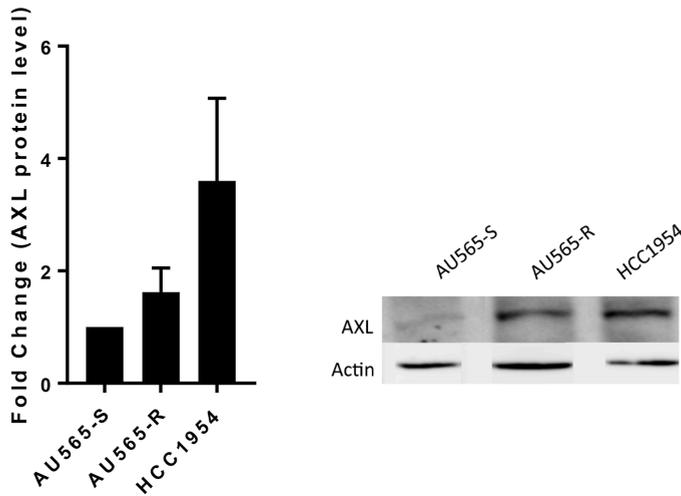


Figura 13. Expresión de la proteína AXL en las líneas celulares AU565-S, AU565-R y HCC1954.

Cuando analizamos MET también se observó un incremento de la expresión de la proteína en ambas líneas resistentes. En AU565-R el incremento fue de 4.14 veces (SD= 0.89,  $p= 0.01$ ), este incremento también fue mayor en la línea con resistencia primaria, siendo de 14.49 veces con respecto a AU565-S (SD=1.69,  $p=0.0004$ ) (Figura 14).

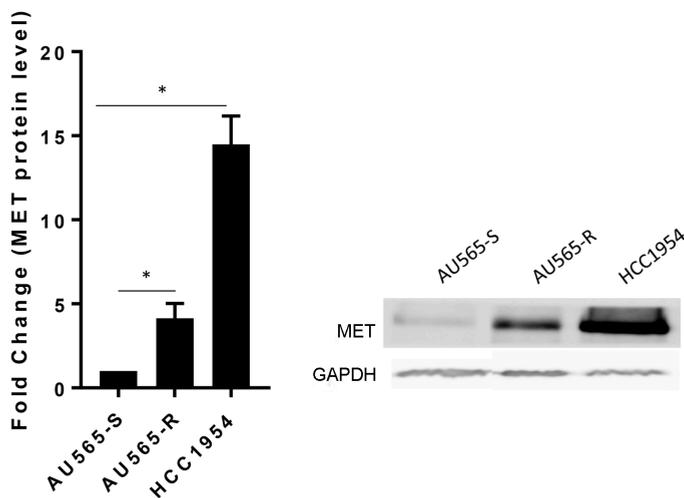


Figura 14. Expresión de la proteína MET en las líneas celulares AU565-S, AU565-R y HCC1954.

#### 4. La inhibición de AXL revierte resistencia adquirida a trastuzumab

Ante el aumento de expresión de ambos receptores tanto a nivel de mRNA como de proteína en las líneas con resistencia primaria y secundaria, decidimos focalizarnos en el estudio de AXL. Debido a que es la primera vez en la literatura que se describe como mecanismo de resistencia a trastuzumab.

Evaluamos el potencial de AXL como posible diana terapéutica para vencer la resistencia a trastuzumab. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de MTT sobre las tres líneas celulares con el fin de determinar el efecto del inhibidor de AXL (TP-093) en la proliferación *in vitro* y testar la hipótesis de si la resistencia a trastuzumab mediada por la sobreexpresión de AXL podría ser revertida con la inhibición farmacológica de dicho receptor.

Las células fueron tratadas en tres condiciones diferentes: con trastuzumab en monoterapia, TP-093 en monoterapia y la combinación de ambos. Como era de esperar, las líneas celulares AU565-R y HCC1954 fueron resistentes al tratamiento con trastuzumab. La línea AU565-S mostró sensibilidad a trastuzumab y en menor medida a TP-0903, con una viabilidad celular de 58.05% y 62.28%, respectivamente. Sin embargo, la asociación de ambos fármacos no obtuvo ningún beneficio añadido (*Tabla 3*).

Viabilidad (%)	No tratamiento	Trastuzumab	TP-0903	TP-0903 + Trastuzumab
AU565-S	100	58.05	62.28	54.45
AU565-R	100	92.07	35.53	22.28
HCC1954	100	100.6	60.75	70.59

Tabla 3. Viabilidad celular de las tres líneas celulares tratadas con trastuzumab, TP-0903 y la combinación.

La viabilidad celular de AU565-R con trastuzumab fue de 92.07% (una disminución sólo del 7.93%). Al tratarlas con TP-0903 se indujo una importante disminución de la proliferación quedando una viabilidad celular de 35.53%. Además, la combinación de los tratamientos mostró una disminución significativa de la viabilidad hasta 22.28% ( $p= 0.022$ ). Lo que supuso una resensibilización a trastuzumab con una disminución del 37.29%, al comparar la asociación de fármacos con respecto al inhibidor de AXL en monoterapia (*Figura 15*).

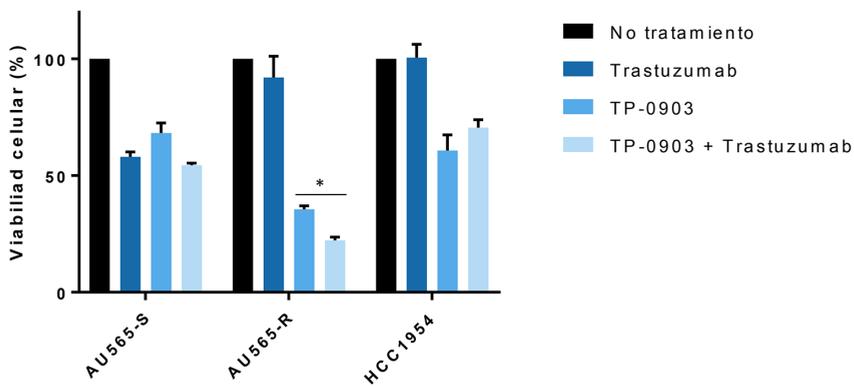


Figura 15. MTT de trastuzumab y TP-093 en las líneas celulares AU565-S, AU565-R y HCC1954.

Estos datos sugieren que el tratamiento combinado con inhibidores de AXL y trastuzumab tiene efecto sinérgico y revierte la resistencia secundaria a trastuzumab. Sin embargo dicho efecto no fue observado en la línea celular con resistencia primaria. En las HCC1954 observamos una disminución de la viabilidad significativa con TP-0903 en monoterapia (60.75%), pero la combinación de ambos fármacos no indujo una resensibilización a trastuzumab (70.59%).

## 5. La inhibición de la vía PI3K mejora la sensibilidad a trastuzumab en la línea HCC1954

El tratamiento combinado con TP-0903 no restauró la sensibilidad a trastuzumab en la línea HCC1954 con resistencia primaria, pese a los altos niveles de expresión de AXL. Lo que nos llevó a plantearnos la hipótesis de que probablemente AXL no era el mecanismo principal de resistencia a trastuzumab en este modelo y que habría otra alteración molecular driver responsable.

Las HCC1954 presentan una mutación activadora en *PIK3CA*, por lo que la activación constitutiva de esta vía de forma independiente a la activación de los receptores tirosina quinasa podría ser la causa de la resistencia a trastuzumab. Hicimos un estudio mediante MTT de inhibidores de la ruta PI3K/mTOR, con el objetivo de estudiar el efecto de esta inhibición en la resistencia primaria a trastuzumab en este modelo. Seleccionamos tres fármacos: un inhibidor puro de PI3K (BKM120), un inhibidor de mTORC1 (everolimus) y un inhibidor dual de PI3K y mTORC1/2 (GDC-0980) (*Figura 16A*).

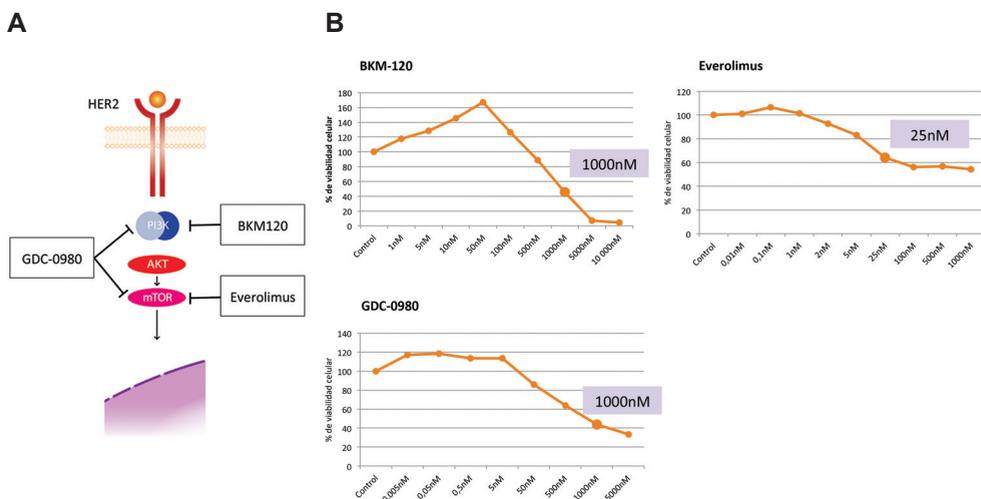


Figura 16. Inhibidores de la vía PI3K/mTOR (A). IC50 de BKM120, Everolimus y GDC-0890 en HCC1954 (B).

Calculamos las IC50 de cada fármaco para HCC1954, las concentraciones fueron de: 1000 nM para BKM120, 25 nM para everolimus y 1000 nM para GDC-0980 (*Figura 16B*).

La inhibición con BKM120 en monoterapia redujo la viabilidad celular a 48.20%, su asociación a trastuzumab tuvo un impacto significativo con una mayor disminución de viabilidad a 35.72% ( $p < 0.001$ ), lo que supuso una reducción mayor del 25% y una resensibilización a trastuzumab. El tratamiento con everolimus resultó menos efectivo que BKM120 y GDC-0980, redujo la viabilidad hasta un 55.18% ( $p < 0.001$ ). Además, su asociación a trastuzumab no presentó un efecto sinérgico, la combinación redujo la viabilidad a 44.66%. El inhibidor dual de PI3K y mTOR (GDC-0980) fue el más efectivo de los inhibidores. Redujo la viabilidad a 12.10% en monoterapia y a 7.48% en asociación con trastuzumab ( $p < 0.001$ ), lo que supone una reducción del 38% ( $p < 0.01$ ). Por tanto, GDC-0980 mejoró la sensibilidad a trastuzumab (*Figura 17*).

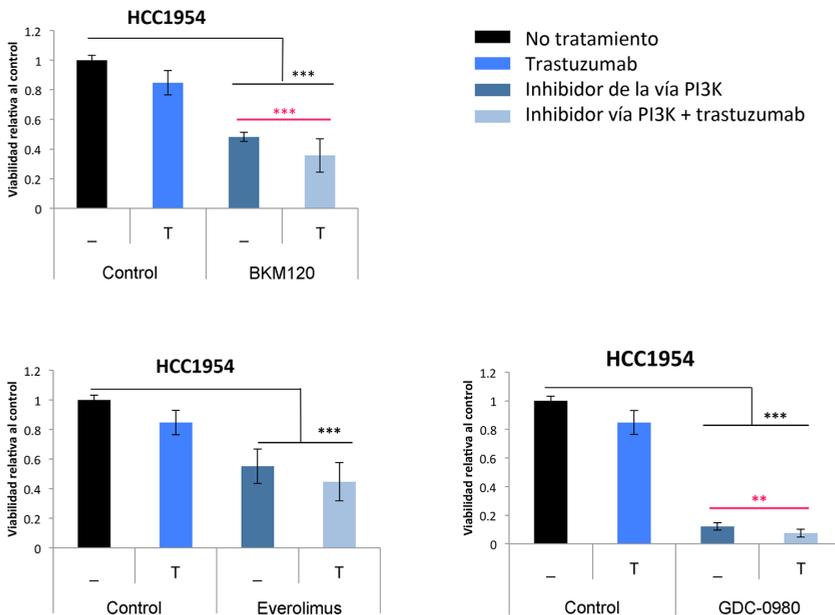


Figura 17. MTT de trastuzumab y los fármacos inhibidores de la vía PI3K/mTOR (BKM120, everolimus y GDC-0980) en la línea celular HCC1954. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ )

Estos datos sugieren que la resistencia primaria a trastuzumab en este modelo celular está relacionado con la mutación activadora de *PIK3CA*, lo que permite una señalización independiente de los RTKs. La inhibición farmacológica de la vía reduce la viabilidad celular, además, en el caso de BKM120 y GDC-0980 cuando se asocia a trastuzumab revierte la resistencia. La inhibición de la vía a varios niveles con GDC-0980 es más efectiva, esto es debido a que podría evitar la supresión de los mecanismos de *feedback* negativos y posibles *cross-talk*.

## 6. Análisis *in silico* en la base de datos pública.

Para evaluar el papel de AXL en la transición epitelio-mesénquima en pacientes con cáncer de mama, analizamos su expresión a nivel de mRNA en una base de datos pública contenida en [www.cbioportal.org](http://www.cbioportal.org): METABRIC, Nature 2012 & Nat. Commun 2016.

Se analizó una cohorte de 2509 pacientes diagnosticadas de tumor primario de cáncer de mama con un rango de edad entre 21.93 a 96.29 años. El 60% (1506/2509) presentaba expresión del receptor de estrógenos (18.9% negativo y 21.1% desconocido), mientras que el 9.8% (247/2509) presentaba amplificación de HER2 (69.1% HER2 negativo y 21.1% desconocido). La distribución por subtipos intrínsecos analizada en 1974 pacientes fue: Luminal A 35.5% (700/1974), Luminal B 24.1% (475/1974), HER2-E 11.3% (224/1974), Basal-like 10.6% (209/1974), Normal 7.5% (148/1974) y Claudin-low 11.0% (218/1974) (**Figura 18**).

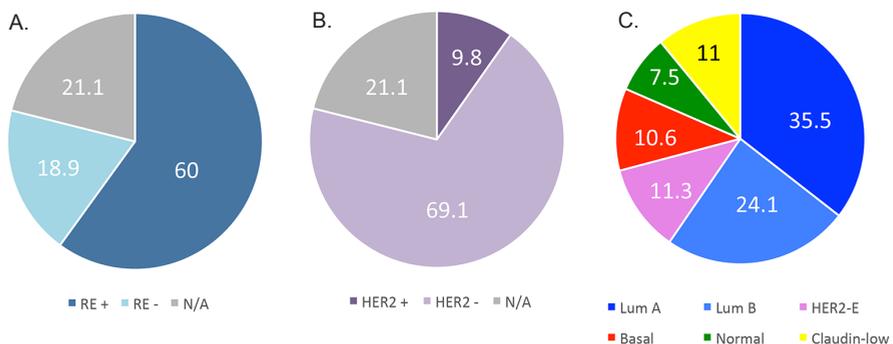


Figura 18. Análisis sobre la cohorte de datos pública: evaluación anatomopatológica de la expresión de receptores de estrógeno (A) y amplificación de HER2 (B). Distribución por subtipos intrínsecos de PAM50 (C).

Al clasificar la cohorte por subtipos intrínsecos, observamos que había una tendencia a una mayor expresión de AXL en el subtipo Claudin-low (**Figura 19A**). En el conjunto de la cohorte encontramos en un 4% (95/2509) alteración de expresión de AXL a nivel de mRNA. En 68 pacientes se encontraba *down-regulado*, mientras que sólo en 27 estaba *up-regulado*. En el grupo de pacientes con *up-regulación* de la expresión de AXL hay un aumento importante del subtipo Claudin-low representando el 48%. Al agrupar los subtipos en no-Luminales (Claudin-low, HER2-E y Basal-like) vs Luminales A+B, evidenciamos como más de la mitad de las pacientes (63%) con *up-regulación* de AXL son no-Luminales (**Figura 19B**). Encontramos la situación inversa al analizar el grupo de pacientes con *down-regulación* de AXL, donde el subtipo Claudin-low sólo representa un 3%, siendo el 60% de las pacientes luminales (**Figura 19C**).

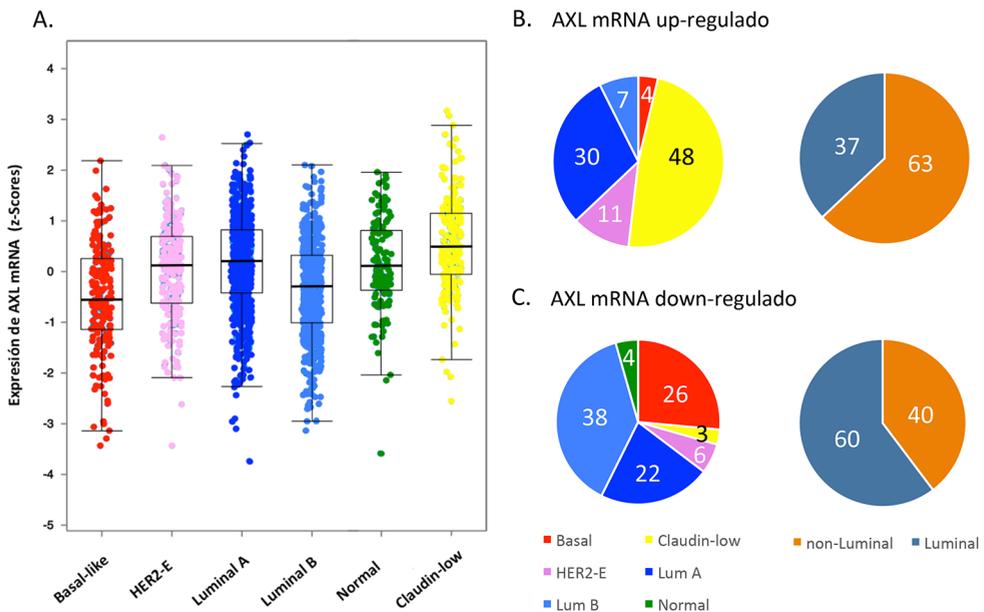


Figura 19. Expresión de *AXL* mRNA en las base de datos estudiada. Expresión del gen a lo largo de toda la cohorte clasificada por subtipos intrínsecos de PAM50 (A). Análisis de los subtipos intrínsecos sobre las muestras donde *AXL* mRNA está *up-regulado* (B) y *down-regulado* (C).

Con el objetivo de identificar genes y vías relacionadas con la expresión de *AXL*, analizamos en la misma base de datos la correlación entre la expresión a nivel de mRNA de *AXL* y la expresión de otros genes cuyos datos se habían obtenido mediante microarrays de expresión. Identificamos 11 genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima (Anastassiou D, *et al.* 2011 y Martinelli E, *et al.* 2015) cuya expresión presentaba una correlación positiva (correlación de Pearson  $> 0.56$ ) con la expresión de *AXL* (**Figura 20**). Y además, 22 genes relacionados con dicho proceso que presentaban una co-expresión significativa con *AXL* (**Tabla 4**).

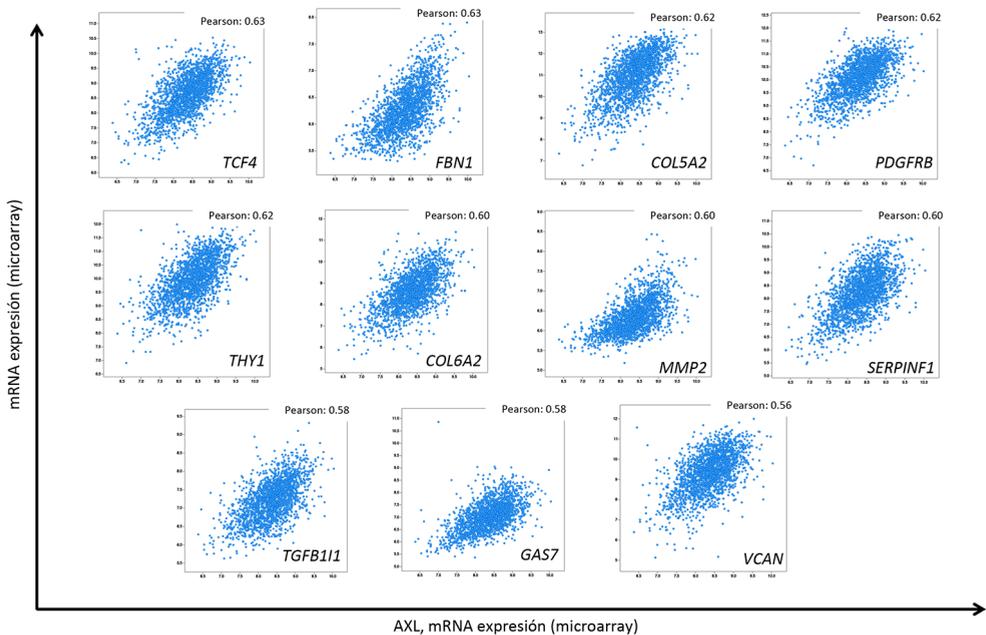


Figura 20. Genes correlacionado positivamente con *AXL* mRNA: *TCF4*, *FBN1*, *COL5A2*, *PDGFRB*, *THY*, *COL6A2*, *MMP2*, *SERPINF1*, *TGFB111*, *GAS7* y *VCAN*.

Gen	p-Valor	Log Odds Ratio
COL5A2	< 0.001	>3
COL3A1	< 0.001	2.924
TCF4	< 0.001	2.830
COL1A2	< 0.001	2.932
VCAN	< 0.001	>3
BMP1	< 0.001	2.254
ITGA5	< 0.001	2.103
IGFBP4	< 0.001	1.841
AHNAK	< 0.001	1.716
MSN	< 0.001	1.587
CALD1	< 0.001	1.788
TGFB1	< 0.001	1.427
VIM	< 0.001	1.699
TIMP1	< 0.001	1.543
ITGAV	< 0.001	1.493
SNAI2	< 0.001	1.478
WNT5B	< 0.001	1.272
MMP2	< 0.001	1.511
MMP9	0.001	1.449
TMEFF1	0.003	1.211
ZEB2	0.014	1.026
FOXC2	0.032	1.007

Tabla 4. Co-expresión de genes con *AXL* implicados en la transición epitelio-mesénquima.





## **DISCUSIÓN**



## DISCUSIÓN

HER2 es uno de los oncogenes más importantes en cáncer de mama. La amplificación de HER2 es un evento temprano en la tumorigénesis, estando presente en casi la mitad de los carcinomas *in situ*. Sin embargo, se encuentra amplificado en aproximadamente 20% de las pacientes con carcinoma invasivo, manteniéndose en las recaídas durante la progresión de la enfermedad. Algunos estudios muestran como la concordancia de la expresión de HER2 entre el tumor primario y la metástasis es muy estable. Un trabajo retrospectivo de GEICAM señala una discordancia sólo del 3% entre la enfermedad primaria y la metástasis a nivel de expresión de la proteína, además en los cinco casos en los que hubo una conversión fue de no amplificado a amplificado (Martínez de Dueñas E, *et al.* 2014). Por lo que el mecanismo fundamental de resistencia al tratamiento con trastuzumab no parece ser debido a una pérdida de expresión de HER2.

La sobreexpresión de HER2 es un factor de mal pronóstico clínico asociado con más recaídas y peor supervivencia. Sin embargo, desde el desarrollo de trastuzumab, el primer fármaco anti-diana contra HER2, la sobreexpresión de dicha proteína se ha convertido también en un factor predictivo de respuesta y ha mejorado la supervivencia en este subgrupo de pacientes. Se trata de un anticuerpo monoclonal que se une al dominio yuxtamembrana de HER2 y que ha mostrado beneficio para las pacientes con cáncer de mama HER2+ tanto en enfermedad temprana como en avanzada.

Existe evidencia clínica de la eficacia de mantener el tratamiento con trastuzumab asociado a otros tratamientos más allá de la progresión en la enfermedad metastásica. Continuar con un tratamiento tras la progresión de la enfermedad supone en oncología una paradoja. Esto es debido a que trastuzumab no sólo tiene un efecto antiproliferativo como la mayoría de fármacos en oncología, sino que además se caracteriza por otros mecanismos de acción. El efecto antiproliferativo

está mediado por la inhibición de la señalización de HER2 que promueve la parada del ciclo celular, la inhibición de la reparación del DNA y de la angiogénesis. Pero además, al tratarse de un anticuerpo monoclonal tiene la capacidad de inducir el sistema inmune mediante la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y este mecanismo podría permanecer intacto a las progresiones, lo que hace viable mantener trastuzumab tras la progresión cambiando el fármaco asociado.

Sin embargo, existe un porcentaje de pacientes que presentan resistencia primaria o secundaria al tratamiento. Lo que pone de manifiesto la necesidad de identificar marcadores predictivos de respuesta/resistencia para identificar que pacientes se van a beneficiar del tratamiento y poder desarrollar nuevas estrategias para superar dichas resistencias.

Las metástasis en cáncer de mama pueden ocurrir años e incluso décadas tras el diagnóstico del tumor primario. Para que las células del tumor primario originen metástasis a distancia deben pasar por el proceso de transición epitelio-mesénquima y posterior mesénquima-epitelio y dotarse de características que les permiten la migración, colonización de órganos a distancia e iniciación tumoral. Hoy sabemos que la enfermedad primaria y metastásica no son exactamente iguales, durante el tiempo que pasa desde el diagnóstico del tumor primario y el desarrollo de la macrometástasis, las células tumorales diseminadas pasan por un periodo de *dormancy* formando micrometástasis que son indetectables por las pruebas diagnósticas habituales. El periodo de *dormancy* es el resultado del equilibrio entre una proliferación celular enlentecida y muerte celular. Durante ese periodo las células sufren cambios moleculares que les permiten adquirir nuevas características para salir de ese estado de *dormancy* y formar las macrometástasis.

Un estudio con muestras pareadas entre el tumor primario y la metástasis basado en la expresión de RNA muestra como hay un enriquecimiento en la metástasis de genes relacionados con proliferación celular y una disminución de genes relacionados

con procesos lumbinales en comparación con el tejido procedente del tumor primario. En el caso de los tumores primarios que pertenecían al subtipo molecular Luminal A, se convirtieron en un 55% de los casos en Lumbinales B o HER2-E. Además, se observó como existía una relación ente el tiempo necesario para desarrollar una macrometástasis y la agresividad tumoral, lo que sugiere que el tumor evoluciona hacia un fenotipo más agresivo a medida que el tiempo pasa entre el diagnóstico del primario y la recaída (Cejalvo JM, *et al.* 2017). Esta plasticidad celular es la que permite a las células adquirir nuevas características y poder desarrollar resistencias adquiridas a fármacos. Esto apoya la idea de biopsiar a las pacientes en la enfermedad metastásica para poder caracterizar la enfermedad y poder ser más efectivos en el tratamiento.

En nuestros modelos preclínicos, de resistencia a trastuzumab tanto primaria como secundaria, no depende de cambios en la expresión del oncogen *HER2*. Al evaluar su expresión por IHC y por WB no encontramos diferencias entre la línea celular con resistencia adquirida (AU565-R) y su parental (AU565-S), manteniendo la amplificación de *HER2* y la negatividad a la expresión de receptores hormonales. Además, la línea HCC1954 con resistencia primaria también mantiene la sobreexpresión de *HER2*. Estos datos confirman el hecho de que las células adquieren nuevos mecanismos moleculares que contribuyen a dicha resistencia independientemente de la presencia de *HER2*

Proponemos el fenómeno de transición epitelio-mesénquima como mecanismo de resistencia primaria y adquirida a trastuzumab en cáncer de mama HER2+. Para ello analizamos la expresión de dos receptores tirosina quinasa (AXL y MET) implicados en este fenómeno. Ambos son receptores con potencial oncogénico que han sido descritos como biomarcadores de resistencia a diferentes fármacos en diferentes tipos de tumores. El estudio de receptores de membrana resulta atractivo como pontenciales dianas terapéuticas en oncología. Esto es debido a que son moléculas fácilmente accionables y son responsables de importantes vías de señalizan oncológica.

En nuestras líneas celulares con resistencia a trastuzumab, observamos una sobreexpresión de AXL y MET con respecto a la línea sensible. Dicha sobreexpresión fue estable y consistente. Hubo una mayor transcripción de los genes con un aumento a nivel de RNA y una mayor traducción con un aumento de la síntesis de proteína. Esto es indicativo de que las células con la sobreexpresión de AXL y MET podrían adquirir propiedades mesenquimal-like que contribuyeran a la resistencia y que por tanto podrían constituir nuevas dianas terapéuticas, convirtiéndose en una estrategia razonable a explorar.

Se ha descrito como MET contribuye a la resistencia a trastuzumab y está relacionado con peor pronóstico en las pacientes, además en estudios preclínicos, su inhibición restaura la sensibilidad. Por otro lado, la expresión de AXL se ha relacionado con la resistencia adquirida a lapatinib y como su inhibición restaura la sensibilidad en modelos *in vitro*, pero hasta la fecha no se ha descrito como mecanismo de resistencia a trastuzumab. Este hecho nos llevó a focalizarnos en el estudio de AXL como posible mecanismo responsable de la resistencia.

*AXL* es un gen que pertenece a la firma Claudin-low del test PAM50. Cuando exploramos su expresión a nivel de RNA en bases de datos públicas, observamos como está *up-regulado* en los subtipos no-Luminales con respecto a los Luminales, siendo predominante en el subtipo Claudin-low. Además presenta una correlación positiva y/o co-expresión de genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima.

En el presente trabajo postulamos el receptor AXL como una nueva posible diana terapéutica en cáncer de mama HER2 positivo resistente a trastuzumab. Para ello utilizamos TP-0903, un inhibidor específico de AXL. Nuestros datos preclínicos muestran su eficacia en monoterapia disminuyendo la viabilidad celular *in vitro* tanto para AU565-R como HCC1954. Y, lo más importante, restaura la sensibilidad a trastuzumab en la línea celular con resistencia adquirida.

Este efecto de resensibilización a trastuzumab, no se observó en la línea con resistencia primaria, a pesar de la sobreexpresión de AXL. Lo que nos llevó a hipotetizar que en este modelo la señalización de AXL no era *driver* en la resistencia a trastuzumab. Las HCC1954 poseen una mutación activadora en *PIK3CA*, la vía PI3K es una de las más relevantes en cáncer de mama con propiedades oncogénicas. Las mutaciones de *PIK3CA* es uno de los mecanismos de hiperactivación de la vía, esta mutación sería responsable de una activación constitutiva e independiente de la señalización upstream de receptores tirosina quinasa como HER2 y AXL.

Por tanto, exploramos la inhibición farmacológica de la vía PI3K como estrategia para revertir la resistencia a trastuzumab en la línea con resistencia primaria y *PIK3CA* mutada. Utilizamos tres fármacos con mecanismos moleculares diferentes: un inhibidor de PI3K (BKM120), inhibidor de mTOR (everolimus) y un inhibidor dual de PI3K y mTOR (GDC-9080). Observamos como los tres fármacos en monoterapia eran eficaces y redujeron la viabilidad celular de HCC1954. El más efectivo de los inhibidores fue GDC-0980, probablemente debido a su inhibición en dos puntos de la vía que podría evitar la supresión de los mecanismos de *feedback* negativo.

Estos datos ponen en relieve lo importante que es caracterizar la enfermedad metastásica e identificar potenciales dianas *driver* como objetivos terapéuticos.

Por un lado, AXL tiene un papel importante en la biología tumoral y como mecanismo de resistencia a tratamientos lo que lo convierte en una atractiva diana terapéutica. Recientes estudios preclínicos muestran efecto antitumoral en la inhibición de AXL en diversos tipos de tumores, por ejemplo glioblastomas, cáncer de pulmón y de ovario. Además a día de hoy, bosutinib, un inhibidor multiquinasa que actúa sobre SRC/ABL y AXL, es un fármaco aprobado para la leucemia mieloide crónica cromosoma Philadelphia positivo con resistencia a imatinib.

Actualmente existen diferentes ensayos clínicos en fases tempranas que evalúan el papel de AXL como diana terapéutica con inhibidores orales de tirosina-quinasa o anticuerpos monoclonales. Uno de estos inhibidores es TP-0903 que actualmente se encuentra en ensayo clínico fase I *first-in-human* en fase de reclutamiento para tumores sólidos avanzados (NCT02729298).

La importancia de este trabajo radica en la implicación traslacional de los hallazgos preclínicos. AXL podría ser un biomarcador predictivo de resistencia secundaria a trastuzumab. De este modo una potencial estrategia a evaluar sería un tratamiento con trastuzumab más inhibidor de AXL en aquellas pacientes con cáncer de mama HER2 positivo con progresión de enfermedad a trastuzumab y en las que el tumor asocia sobreexpresión de AXL (a nivel de proteína o RNA ya que a nivel de DNA las alteraciones son muy poco frecuentes). El tratamiento de combinación permitiría bloquear la inducción de la transición epitelio-mesénquima y la vía HER2.

Además, las firmas génicas podrían ayudar a estratificar a las pacientes según un perfil molecular, se ha descrito una firma de AXL con 30 genes fuertemente correlacionados de forma positiva con su expresión. Por ejemplo, en cáncer de ovario la firma de AXL ha mostrado un valor de mal pronóstico y está relacionado con el subtipo molecular mesenquimal (Antony J, *et al.* 2016).

Por otro lado, ya es una realidad en oncología como la determinación de las mutaciones de la vía PI3K y el desarrollo de inhibidores en ensayos clínicos fase I, II y III nos ayuda a entender su valor predictivo y pronóstico. Por ejemplo, en el estudio CLEOPATRA las pacientes con mutaciones en *PIK3CA* presentaron peor pronóstico, además, el análisis combinado del BOLERO-1 y 3 mostró una correlación positiva entre la hiperactivación de la vía PI3K y el beneficio en términos de PFS. Los resultados de los ensayos clínicos que están en marcha nos ayudarán a comprender mejor el potencial terapéutico de los inhibidores de PI3K.

La línea de investigación proseguirá para profundizar en el papel de AXL como mecanismo de resistencia. A nivel *in vitro*, se llevará a cabo experimentos con el fin de determinar el fenotipo diferencial en las líneas celulares con sobreexpresión de AXL: se analizará la diferencia de expresión de un panel de genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima, el subtipo molecular intrínseco, se definirá molecularmente las posibles vías de señalización y que capacidades adquieren en términos de ventaja proliferativa, tumor-iniciación y migración/invasión. Como hipótesis postulamos que una posible vía de señalización podría ser la vía PI3K ya que la línea celular AU565-R presenta con respecto a la parenteral un aumento de los niveles de fosforilación de AKT (Ser473 y Thr308) y S6RP (Ser235/236), ambos *downstream target* de la vía. También se programarán experimentos *in vivo* para evaluar su capacidad de metastatización y la eficacia farmacológica con inhibidores de AXL y tratamientos de combinación.

Además, trataremos de validar los datos preclínicos con una cohorte de pacientes del Hospital Clínico Universitario de València. Se analizará a nivel de IHC y de RNA la expresión de AXL y su correlación con los datos clínicos, además según los resultados se analizará la firma de AXL y los subtipos intrínsecos de PAM50. Disponemos de una cohorte de 235 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama HER2 positivo tratadas con trastuzumab



**CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

- Los receptores tirosina quinasa de AXL y MET, relacionados con el fenómeno de transición epitelio-mesénquima, se postulan como mecanismos de resistencia a trastuzumab en cáncer de mama HER2 positivo. En nuestros modelos celulares *in vitro* de cáncer de mama HER2 amplificado se encontraron sobreexpresados a nivel de mRNA y de proteína, tanto en resistencia adquirida (AU565-R) como en primaria (HCC1954).
- *AXL* es un gen que pertenece a la firma Claudin-low del test de PAM50. En los análisis *in silico* se mostró como *AXL* estaba *up-regulado* con más frecuencia en los subtipos no-Luminales frente a los Luminales (63% vs 37%). Además, su expresión se correlacionó de forma positiva con la expresión de genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima.
- Al tratar la línea celular AU565-R con resistencia secundaria a trastuzumab con TP-0903, un inhibidor específico de AXL, disminuyó la viabilidad celular. Además, en combinación con trastuzumab se restauró su sensibilidad con una disminución significativa. Lo que sugiere que AXL juega un papel importante en la resistencia secundaria.
- En la línea con resistencia primaria, HCC1954, TP-0903 redujo la viabilidad celular. Sin embargo, no se observó una resensibilización a trastuzumab en el tratamiento combinado. Este modelo alberga una mutación activadora en *PIK3CA*, el tratamiento con inhibidores de la vía (BKM120, everolimus y GDC-0980) afectó a la viabilidad celular. La inhibición a dos niveles con GDC-0980 (inhibidor dual de PI3K y mTOR) fue más efectiva que BKM120 y everolimus. Además, BKM120 y GDC-0980 demostraron un efecto sinérgico con trastuzumab, restaurando la sensibilidad.

- Estos datos sugieren que AXL podría tener un papel más decisivo, *driver*, en la resistencia secundaria que en la primaria. La inhibición farmacológica de AXL se postula como una posible diana terapéutica en las pacientes con cáncer de mama HER2 positivo con resistencia secundaria a trastuzumab. Sin embargo, en el modelo de resistencia primaria la mutación en *PIK3CA* podría tener un papel más relevante en la resistencia, produciendo una activación constitutiva de la vía e independiente de la señalización de RTKs como HER2 o AXL.





**ANEXO 1: Publicaciones derivadas**

- Cejalvo JM, Tormo E, Adam A, Rojo F, Pineda B, *et al.* AXL as a potential primary and secondary trastuzumab resistance mechanism in breast cancer cells with HER2 overexpression. September 2017. *Annals of Oncology* 28 (suppl\_5). Póster presentación en el congreso de la Sociedad Europea de Oncología Médica. ESMO-17.
- Cejalvo JM, Tormo E, Adam A, Rojo F, Zazo S, *et al.* Papel de la transición epitelio-mesénquima en la resistencia primaria y secundaria a trastuzumab en cáncer de mama HER2 amplificado. Comunicación oral en el congreso de la Sociedad Española de Oncología Médica. SEOM-17.
- Cejalvo JM, Pérez-Fidalgo JA, Huerta M, Bermejo B, Burgues O, *et al.* Carcinoma de mama HER2 positivo: resistencias primarias, secundarias y largas respondedoras a tratamientos anti-HER2. Póster en el congreso del Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama. GEICAM-15.
- Pérez-Fidalgo JA, Espín E, Tormo E, Pineda B, Cejalvo JM, *et al.* AKT and/or mTOR inhibition as a potencial target in trastuzumab resistant breast cancer cell with MUC4 overexpression. Póster presentación en el congreso de la Sociedad Europea de Oncología Médica. ESMO-15.
- Espín E, Pérez-Fidalgo JA, Tormo E, Pineda B, Cejalvo JM, *et al.* Study of the involvement of PI3K pathway in resistance to trastuzumab in HER2+ breast cancer patients. Póster presentación en el congreso de la Sociedad Americana de Oncología Clínica. ASCO-15.



## ANEXO 2: Descripción clínica de la cohorte de pacientes del Hospital Clínico Universitario de València

Disponemos de una cohorte de 235 pacientes de cáncer de mama HER2 positivo del Hospital Clínico Universitario de València. De ellas, 222 fueron diagnosticadas en estadios iniciales, la mayoría en estadios I-II (72.2%), sólo 14 pacientes presentaban enfermedad avanzada en el momento del diagnóstico. La mediana de edad fue 52 años con un rango entre 25 – 83 años. El 53.4% del conjunto eran postmenopáusicas. En cuanto al tipo de cirugía en el 62.7% fue conservadora, realizándose en un 36% mastectomía radical. El 66.5% presentaba una enfermedad Luminal/HER2+. El 46.2% recibió tratamiento neoadyuvante y el 47.9% adyuvante. El análisis histológico de las muestras mostró un claro predominio en el tipo histológico ductal (sin tipo especial) (94.1%), sólo 7 pacientes presentaron un carcinoma lobulillar infiltrante. El grado histológico mayoritario fue GH-3 (47.0%) y aproximadamente la mitad de las pacientes presentaban afectación ganglionar (51.7%). Más de la mitad (66.5%) expresaban receptores hormonales. El 69.5% de las pacientes se encuentran libres de enfermedad, presentando una tasa de recaídas o progresión del 30.5% (72/236).

Características de la cohorte	
	n (%)
<b>Pacientes estudiadas</b>	236
<b>Tipo histológico</b>	
Carcinoma Ductal Infiltrante	222 (94.0)
Carcinoma Lobulillar Infiltrante	7 (3.0)
Otros	7 (3.0)
<b>Edad</b>	
Mediana	52
Rango	25 – 83
<b>Estadios</b>	
I – II	170 (72.2)
III	52 (21.8)
IV	14 (6.0)
<b>Tamaño tumoral</b>	
T1	107 (45.3)
T2	70 (29.7)
T3	12 (5.1)
T4	13 (5.5)
N/A	34 (14.4)
<b>Ganglios axilares</b>	
N0	113 (47.9)
N1, N2, N3	122 (51.7)
N/A	1 (0.4)
<b>Grado Histológico</b>	
1	13 (5.5)
2	97 (41.1)
3	111 (47.0)
N/A	15 (6.4)
<b>Receptores Hormonales</b>	
Positivo	157 (66.5)
Negativo	77 (32.6)
N/A	2 (0.8)
<b>HER2 +</b>	
IHQ	155 (65.7)
FISH	23 (9.7)
Ambos	58 (24.6)

Cohorte de pacientes Hospital Clínico Universitario de València



## BIBLIOGRAFÍA

Altaha R, Crowell E, Ducatman B, et al: Risk of brain metastases in HER2/neu-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 22:47, 2004 (suppl 14; asbstr 682)

Anastassiou D, Rumjantseva V, Cheng W, et al. Human cancer cells express Slug-based epithelial-mesenchymal transition gene expression signature obtained in vivo. *BMC Cancer* 2011

Anderson WF, Rosenberg PS, Prat A, et al: How Many Etiological Subtypes of Breast Cancer: Two, Three, Four, Or More? *Journal of the National Cancer Institute* 106, 2014

André F, Hurvitz S, Fasolo A, et al. Molecular alterations and everolimus efficacy in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing metastatic breast cancers: Combined exploratory biomarker analysis from BOLERO-1 and BOLERO-3. *J Clin Oncol* 34:2115-2124, 2016

Antony J, Tan TZ, Kelly Z, et al. The GAS6-AXL signaling network is a mesenchymal (Mes) molecular subtype-specific therapeutic target for ovarian cancer. *Sci. Signal* 2016

Arboleda MJ, Lyons JF, Kabbinnar FF, et al. Overexpression of AKT2/Protein Kinase B $\beta$  Leads to Up-Regulation of  $\beta$ 1 Integrins, Increased Invasion, and Metastasis of Human Breast and Ovarian Cancer Cells. *Cancer Res.* 2003 Jan 1;63(1):196-206

Asiedu MK, Beauchamp-Pérez FD, Ingle JN, et al. AXL induces epithelial-to-mesenchymal transition and regulates the function of breast cancer stem cells. *Oncogen* (2013), 1-9

Azuma K, Tsurutani J, Sakai K, et al. Switching addictions between HER2 and FGFR2 in HER2-positive breast tumor cells: FGFR2 as a potential target for salvage after lapatinib failure. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 407 (2011) 219–224

Bachelot T, Garcia-Saenz JA, Verma S, et al. Sunitinib in combination with trastuzumab for the treatment of advanced breast cancer: activity and safety results from a phase II study. *BMC Cancer.* 2014 Mar 7;14:166. doi: 10.1186/1471-2407-14-166

Baselga J. Targeting the Phosphoinositide-3 (PI3) Kinase Pathway in Breast Cancer. *Oncologist.* 2011;16 Suppl 1:12-9

Baselga J, Verma S, Ro J, Huober J, Guardino E, Fang L, et al. Relationship between tumor biomarkers and efficacy in EMILIA, a phase 3 study of trastuzumab emtansine (T-DM1) in HER2-positive metastatic breast cancer [abstract]. In: *Proceedings of the 104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*; 2013 Apr 6–10; Washington, DC. Philadelphia (PA): AACR; 2013. Abstract nr LB-63

Blackwell KL, Burstein HJ, Storniolo AM et al. Randomized study of lapatinib alone or in combination with trastuzumab in women with ErbB2-positive, trastuzumab-refractory metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1124–1130

Blackwell K, Burstein HJ, Storniolo AM, et al. Overall Survival Benefit With Lapatinib in Combination With Trastuzumab for Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Metastatic Breast Cancer: Final Results From the EGF104900 Study. *J Clin Oncol.* 2012 Jul 20;30(21):2585-92

Berns K, Horlings HM, Hennessy BT et al. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell* 2007; 12: 395–402

Bosch A, Eroles P, Zaragoza R, Viña JR, Lluch A. Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat Rev.* 2010 May;36(3):206-15

Brand TM, Iida M, Stein AP, et al. AXL Mediates Resistance to Cetuximab Therapy. *Cancer Res* 2014; 18:5152-5164.

Burris HA, Rugo HS, Vukelja SJ, et al. Phase II study of the antibody drug conjugate trastuzumab-DM1 for the treatment of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positive breast cancer after prior HER2 directed therapy. *J Clin Oncol* 2011; 29: 398-405

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999;96:857–868

Burstein HJ. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *The New England Journal of Medicine*, vol. 353, no. 16, pp. 1652–1654, 2005

Burstein HJ, Sun Y, Dirix LY et al. Neratinib, an irreversible ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced ErbB2-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1301–1307

Camirand A, Lu Y, and Pollak M. Co-targeting HER2/ErbB2 and insulin-like growth factor-1 receptors causes synergistic inhibition of growth in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Med Sci Monit* 2002 Dec;8: BR521–BR526

Cardoso F, Canon JL, Amadori D, et al. An exploratory study of sunitinib in combination with docetaxel and trastuzumab as first-line therapy for HER2-positive metastatic breast cancer. *Breast.* 2012 Dec;21(6):716-23. doi: 10.1016/j.breast.2012.09.002

Cardoso F, Costa A, Senkus E, et al. 3rd ESO-ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 3). *Ann Oncol* 28; 16-33, 2017

Cejalvo JM, Martínez de Dueñas E, Galván P, et al. Intrinsic Subtypes and Gene Expression Profiles in Primary and Metastatic Breast Cancer. *Cancer Res*, 77 (9); 2213-21

Cejalvo JM, Pérez-Fidalgo JA, Ribas G, et al. Clinical implications of routine genomic mutation sequencing in PI3K/AKT1 and KRAS/NRAS/BRAF in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2016 Nov;160 (1)

Chan A, Delaloge S, Holmes FA, et al. Neratinib after trastuzumab-based adjuvant therapy in patients with HER2-positive breast cancer (ExteNET): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2016 Mar;17(3): 367-77

Chan TO, Rodeck U, Chan AM, et al. Small GTPases and tyrosine kinases coregulate a molecular switch in the phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit. *Cancer Cell* 2002;1:181–191

Chapuis N, Tamburini J, Comillet-Lefebvre P, et al. Autocrine IGF-1/IGF-1R signaling is responsible for constitutive PI3K/Akt activation in acute myeloid leukemia: therapeutic value of neutralizing anti-IGF-1R antibody. *Haematologica* 2010;95:415–423

Cheang MC, Chia SK, Voduc D, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009 May 20;101(10):736-50

Chen CT, Kim H, Liska D, et al. MET activation mediates resistance to lapatinib inhibition of HER2-amplified gastric cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2012, 11(3), 660–669

Chin YR, Toker A. Akt isoform-specific signaling in breast cancer: Uncovering an anti-migratory role of palladin. *Cell Adh Migr.* 2011 May-Jun;5(3):211-4

- Cidado J, Park BH. Targeting the PI3K/Akt/mTOR Pathway for Breast Cancer Therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2012 Aug
- Cizkova M, Cizeron-Clairac G, Vacher S, et al. Gene expression profiling reveals new aspects of PIK3CA mutation in ERalpha-positive breast cancer: major implication of the Wnt signaling pathway. *PLoS One*. 2010 Dec 30;5(12):e15647
- Coughlin CM, Johnston DS, Strahs A, et al. Approaches and limitations of phosphatidylinositol-3-kinase pathway activation status as a predictive biomarker in the clinical development of targeted therapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Nov;124(1):1-11. Epub 2010 Aug 28
- Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The PI3K Pathway As Drug Target in Human Cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:1075–1083
- Cristofanili M, Johnston SR, Manikhas A, et al. A randomized phase II study of lapatinib + pazopanib versus lapatinib in patients with HER2+ inflammatory breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2013 Jan; 137 (2): 471-82
- Dave B, Migliaccio I, Gutierrez MC, 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;29:166–73
- Datta SR, Dudek H, Tao X, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997;91:231–241
- De Azambuja E, Holmes AP, Piccart-Gebhart M, 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
- Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 2007; 13(15 Pt.1):4429–34
- Desmedt C, Sperinde J, Piette F et al. Quantitation of HER2 expression or HER2:HER2 dimers and differential survival in a cohort of metastatic breast cancer patients carefully selected for trastuzumab treatment primarily by FISH. *Diagn Mol Pathol* 2009; 18: 22–9
- Dunne PD, McArt DG, Blayney JK, et al. Axl is a key regulator of inherent and chemotherapy-induced invasion and predicts a poor clinical outcome in early-stage colon cancer. *Clinical Cancer Res*. 2014; 20:164-175
- Efeyan A and Sabatini DM. mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Curr Opin Cell Biol* 2009;22:169–176
- Eroles P, Bosch A, Pérez-Fidalgo JA, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev*. 2012 Oct;38(6):698-707
- Esteva FJ, Guo H, Zhang S et al. PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Am J Pathol* 2010;177:1647– 1656
- Falchook GS, Moulder SL, Wheler JJ, Jiang Y, Bastida CC, Kurzrock R. Dual HER2 inhibition in combination with anti-VEGF treatment is active in heavily pretreated HER2-positive breast cancer. *Annals of Oncology* 24: 3004–3011, 2013
- Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 2004;23:3151–3171
- Galceran J, Ameijide A, Carulla M, et al. Cancer incidence in Spain, 2015. *Clin Transl Oncol*. 2017 Jul;19(7):799-825
- Gao et al. *Sci Signal* 2013 & Cerami et al. *Cancer Discovery* 2012

- Gao T, Furnari F, Newton AC. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell*. 2005 Apr 1;18(1):13-24
- Garcia-Saenz JA, Martin M, Puente J et al. Trastuzumab associated with successive cytotoxic therapies beyond disease progression in metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2005; 6: 325–329
- Garrett JT and Arteaga CL. Resistance to HER2-directed antibodies and tyrosine kinase inhibitors. Mechanisms and clinical implications. *Cancer Biology & Therapy* 11:9, 793-800; May 1, 2011
- Gennari R, Menard S, Fagnoni F et al. Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5650-5
- Gewinner C, Wang ZC, Richardson A, et al. Evidence that Inositol Polyphosphate 4-Phosphatase Type II Is a Tumor Suppressor that Inhibits PI3K Signaling. *Cancer cell*. 2009 Aug 4;16(2):115-25
- Geyer CE, Forster J, Lindquist D. Lapatinib plus capecitabine for HER2 positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2006 Dec 28;355 (26): 2733-43
- Gianni L, Pienkowski T, Im YH, et al. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced inflammatory , or early Her2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2012 Jan; 13(1):25-32
- Gianni L, Romieu GH, Lichinitser M et al. AVEREL: A Randomized Phase III Trial Evaluating Bevacizumab in Combination With Docetaxel and Trastuzumab As First-Line Therapy for HER2-Positive Locally Recurrent/ Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2013 May 10;31(14):1719-25
- Gjerdum C, Tiron C, Hoiby T, et al. Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 1124-9
- Guarneri V, Conte P. Metastatic breast cancer: therapeutic options according to molecular subtypes and prior adjuvant therapy. *Oncologist*. 2009 Jul;14(7):645-56
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011 Mar 4;144(5):646-74
- Guillemet-Guibert J, Bjorklof K, Salpekar A, et al. The p110 $\beta$  isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110 $\gamma$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:8292–8297
- Hanker AB, Garret JT, Estrada MV, et al. HER2-Overexpressing Breast Cancers Amplify FGFR Signaling upon Acquisition of Resistance to Dual Therapeutic Blockade of HER2. *Clin Cancer Res*; 23(15); 4323-34. 2017
- Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Stenke-Hale K, et al. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res*. 2009 May 15;69(10):4116-24
- Hernández-Haya LF, Gonzalez-Angulo AM. Targeting the Phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in breast cancer. *The Oncologist* 2011;16:404-414
- Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*. 2007;8(5):R76
- Huang CH, Mandelker D, Schmidt-Kittler O, et al. The structure of a human p110 $\alpha$ /p85 $\alpha$  complex elucidates the effects of oncogenic PI3K $\alpha$  mutations. *Science* 2007; 318: 1744–8
- Irie HY, Pearline RV, Grueneberg D, et al. Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*. 2005 Dec 19;171(6):1023-34

- Izumi Y, Xu L, Di TE, et al. Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature* 2002; 416: 279–80
- Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Adv Cancer Res.* 2009;102:19-65
- Jhaveri K, Miller K, Rosen L, et al. A phase I dose-escalation trial of trastuzumab and alvespimycin hydrochloride (KOS-1022; 17 DMAG) in the treatment of advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2012 Sep 15;18(18):5090-8
- Jones KL and Buzdar AU. Evolving novel anti-HER2 strategies. *Lancet Oncol* 2009; 10: 1179–87
- Kalinsky K, Jacks LM, Heguy A, et al. PIK3CA Mutation Associates with Improved Outcome in Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:5049–5059
- Katoh M, Katoh M. Integrative genomic analyses of CXCR4: transcriptional regulation of CXCR4 based on TGFbeta, Nodal, Activin signaling and POU5F1, FOXA2, FOXC2, FOXH1, SOX17, and GFI1 transcription factors. *Int J Oncol.* 2010 Feb;36(2):415-20
- Kaufman B, Mackey JR, Clemens MR, et al. Trastuzumab plus anastrozole versus anastrozole alone for the treatment of postmenopausal women with human epidermal growth factor receptor 2-positive, hormone receptor-positive metastatic breast cancer: results from the randomized phase III TAnDEM study. *J Clin Oncol* 2009;27:5529–5537
- Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol.* 2010 Jul 10;28(20):3271-7
- Khoury H, Naujokas MA, Zuo D, et al. HGF converts ErbB2/Neu epithelial morphogenesis to cell invasion. *Mol Biol Cell* 2005;16:550–61
- King CR, Kraus MH, Aaronson SA (1985) Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 229(4717): 974–976
- Kostler WJ, Hudelist G, Rabitsch W et al. Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) expression does not predict for resistance to trastuzumab- based treatment in patients with Her-2/neu overexpressing metastatic breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132: 9–18
- Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H, et al. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res* 2007;9(5):R65
- Krop IE, Kim SB, Martin AG, et al. Trastuzumab emtansine versus treatment of physician's choice in patients with previously treated HER2-positive metastatic breast cancer (TH3RESA): final overall survival results from a randomised open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2017
- Krop I and Winer EP. Trastuzumab Emtansine: A Novel Antibody–Drug Conjugate for HER2-Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2014 Jan 1;20(1):15-20. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0541
- Kyriakis JM. Thinking Outside the Box about Ras. *J Biol Chem* 2009;284:10993–10994
- Lee JS, Kim HS, Kim YB et al. Reduced PTEN expression is associated with poor outcome and angiogenesis in invasive ductal carcinoma of the breast. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004;12:205–210
- Li Y, Ye X, Tan C, et al. Axl as a potential therapeutic target in cancer: role of Axl in tumor growth, metastasis and angiogenesis. *Oncogene* (2009) 28, 3442-3455
- Liu J, Stevens PD, and Gao T. mTOR-Dependent Regulation of PHLPP Expression Controls the Rapamycin Sensitivity in Cancer Cells. *J Biol Chem.* 2011 Feb 25; 286(8): 6510–6520

Liu Li, Greger J, Shi H, et al. Breast Tumor Cells: Activation of AXL Novel Mechanism of Lapatinib Resistance in HER2-Positive. *Cancer Res.* 2009 Sep 1;69(17):6871-8

Liu L, Shi H, Liu Y, et al. Synergistic Effects of Foretinib with HER-Targeted Agents in MET and HER1- or HER2-Coactivated Tumor Cells. *Mol Cancer Ther*; 10(3) March 2011

Livasy CA, Karaca G, Nanda R, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 2006;19(2):264–71

Lopez-Knowles E, O'Toole SA, McNeil CM et al. PI3K pathway activation in breast cancer is associated with the basal-like phenotype and cancer-specific mortality. *Int J Cancer* 2010;126:1121–1131

Loibl S, von Minckwitz G, Schneeweiss, et al. A PIK3CA Mutations Are Associated With Lower Rates of Pathologic Complete Response to Anti-Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) Therapy in Primary HER2-Overexpressing Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2014 Sep 8

Lu Y, Zi X, Zhao Y, Mascarenhas D, Pollak M. Insulin-like growth factor-1 receptor signaling and resistance to trastuzumab (herceptin). *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:1852-7

Lu Y, Zi X, Pollak M. Molecular mechanisms underlying IGF-I-induced attenuation of the growth-inhibitory activity of trastuzumab (Herceptin) on SKBR3 breast cancer cells. *Int J Cancer* 2004; 108: 334–41

Martínez de Dueñas E, Hernández AL, Zotano AG, Carrión RM, López-Muñiz JI, Nova SA, et al. Prospective evaluation of the conversion rate in the receptor status between primary breast cancer and metastasis: results from the GEICAM 2009–03 ConvertHER study. *Breast Cancer Res Treat* 2014;143:507–15

Martinelli E, Martini G, Cardone C, et al. AXL is an oncotarget in human colorectal cancer. *Oncotarget* 2015 Sep 15;6(27):232281-96

Maroun CR, Rowlands T. The Met receptor tyrosine kinase: A key player in oncogenesis and drug resistance. *Pharmacology & Therapeutics* 142 (2014) 316–338

Mendoza MC and Blenis J. PHLPPing It off: Phosphatases Get in the AKT. *Molecular Cell* 25, March 23, 2007

Miller TW, Rexer BN, Garrett JT, et al. Mutations in the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role in tumor progression and therapeutic implications in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2011;13(6):224. Epub 2011 Nov 1

Millikan R, Newman B, Tse C-K, et al: Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 109:123-139, 2008

Miled N, Yan Y, Hon WC et al. Mechanism of two classes of cancer mutations in the phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit. *Science* 2007; 317: 239–42

Minuti G, Cappuzzo F, Duchnowska R, et al. Increased MET and HGF gene copy numbers are associated with trastuzumab failure in HER2-positive metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 2012. 107(5), 793–799

Mittendorf EA, Wu Y, Scaltriti M, et al. Loss of HER2 Amplification Following Trastuzumab-Based Neoadjuvant Systemic Therapy and Survival Outcomes. *Clin Cancer Res* 2009;15(23) December 1, 2009

Modi S, Stopeck AT, Gordon MS, et al. Combination of trastuzumab and tanespimycin (17-AAG, KOS-953) is safe and active in trastuzumab-refractory HER-2 overexpressing breast cancer: a phase I dose-escalation study. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5410–07

Modi S, Stopeck A, Linden H, et al. HSP90 inhibition is effective in breast cancer: a phase II trial of tanespimycin (17-AAG) plus trastuzumab in patients with HER2-positive metastatic breast cancer progressing on trastuzumab. *Clin Cancer Res.* 2011 Aug 1;17(15):5132-9

- Mohd Sharial MS, Crown J and Hennessy BT. Overcoming resistance and restoring sensitivity to HER2-targeted therapies in breast cancer. *Annals of Oncology* 23: 3007–3016, 2012
- Molina MA, Saez R, Ramsey EE et al. NH(2)-terminal truncated HER-2 protein but not full-length receptor is associated with nodal metastasis in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 347–53
- Motoyama AB, Hynes NE, Lane HA. The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides. *Cancer Res* 2002; 62:3151-8
- Musolino A, Naldi N, Bortesi B et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 1789–96
- Mukohara T. Mechanisms of resistance to anti-human epidermal growth factor receptor 2 agents in breast cancer. *Cancer Sci.* 2011 Jan;102(1):1-8
- Müller A, Homey B, Soto H, et al: Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410: 50-56, 2001
- Nagata Y, Lan KH, Zhou X et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 2004;6:117–127
- Nagy P, Friedlander E, Tanner M, et al. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res* 2005; 65: 473–82
- Nahta R, Yuan LX, Zhang B, et al. Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65:11118-28
- Nielsen TO, Parker JS, Leung S, et al: A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 16:5222-32, 2010
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 2005; 307:1098–101
- Schechter AL, Hung MC, Vaidyanathan L et al. The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science.* 1985;229976- 978
- Semba KKamata NToyoshima KYamamoto T A v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;826497- 6501
- Smid M, Wang Y, Zhang Y, et al. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res* 2008;68(9):3108–14
- Sørliæ T, Perou CM, Tibshirani R, Turid Aas, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 September 11; 98(19): 10869–10874
- Pal SK, Reckamp K, Yu H, et al. Akt inhibitors in clinical development for the treatment of cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* (2010) 19(11)
- Parker JS, Mullins M, Cheang MC, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol.* 2009 Mar 10;27(8):1160-7
- Paulson AK, Linklater ES, Berghuis BD, et al. MET and ERBB2 are co-expressed in ERBB2+ breast cancers and contribute to innate resistance. *Mol. Cancer Res* 2013: 11(9), 1112–1121

- Prat A, Baselga J. Bioterapia: aplicaciones actuales y futuras en oncología. *Med Clin (Barc)*. 2007;129:184-93. - vol.129 núm 05
- Prat A, Bianchini G, Thomas M, et al: Research-based PAM50 subtype predictor identifies higher responses and improved survival outcomes in HER2-positive breast cancer in the NOAH study. *Clin Cancer Res* 20:511-21, 2014
- Prat A, Carey LA, Adamo B, et al: Molecular Features and Survival Outcomes of the Intrinsic Subtypes Within HER2-Positive Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 106, 2014
- Prat A, Parker JS, Fan C, et al: Concordance among gene expression-based predictors for ER-positive breast cancer treated with adjuvant tamoxifen. *Annals of Oncology* 23:2866-2873, 2012
- Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010 Sep 2;12(5):R68
- Prat A, Pineda E, Adamo B, et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *The breast* 24 (2015) S26-S35
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van de Rijn M, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406:747–752
- Pietras RJ et al. (1994) Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene* 9: 1829–1838
- Press MF, Pike MC, Chazin VR, et al., “Her-2/neu expression in node-negative breast cancer: direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease,” *Cancer Research*, vol. 53, no. 20, pp. 4960–4970, 1993
- Price-Schiavi SA, Jepson S, Li P, et al. (2002) Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance. *Int J Cancer* 99: 783–791
- Reinholz M, Chen B, Dueck A, et al. IGF1R Protein Expression Is Not Associated with Differential Benefit to Concurrent Trastuzumab in Early-Stage HER2<sup>+</sup> Breast Cancer from the North Central Cancer Treatment Group (Alliance) Adjuvant Trastuzumab Trial N9831. *Clin Cancer Res* 2017
- Rena G, Guo S, Cichy SC, et al. Phosphorylation of the Transcription Factor Forkhead Family Member FKHR by Protein Kinase B. *J Biol Chem* 1999;274:17179–17183
- Ritter CA, Perez-Torres M, Rinehart C, et al. Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab in vivo overexpress epidermal growth factor receptor and ErbB ligands and remain dependent on the ErbB receptor network. *Clin Cancer Res* 2007;13:4909–19
- Saéz R, Molina MA, Ramsey EE, et al. p95HER2 predicts worse outcome in patients with HER2 positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006 Jan 15; 12 (2): 424-31
- Scaltriti M, Rojo F, Ocana A et al. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 628–638
- Schwartzberg LS, Franco SX, Florance A, et al. Lapatinib plus letrozole as first- line therapy for HER-2+ hormone receptor positive metastatic breast cancer. *Oncologist*, vol. 15, no. 2, pp. 122–129, 2010
- Seshadri R, Firgaira FA, Horsfall DJ, et al. Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. The South Australian Breast Cancer Study Group. *Journal of Clinical Oncology*, vol. 11, no. 10, pp. 1936–1942, 1993
- Shattuck DL, Miller JK, Carraway KL, et al. Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68(5), 1471–1477

- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235:177- 182)
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shaketal S. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against her2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England Journal of Medicine*, vol. 344, no. 11, pp. 783–792, 2001
- Smith BL, Chin D, Maltzman W, et al. The efficacy of Herceptin therapies is influenced by the expression of other erbB receptors, their ligands and the activation of downstream signalling proteins. *Br J Cancer* 2004; 91: 1190–94
- Sperinde J, Jin X, Banerjee J et al. Quantitation of p95HER2 in paraffin sections by using a p95-specific antibody and correlation with outcome in a cohort of trastuzumab-treated breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 4226–4235
- Stemmler HJ, Schmitt M, Willems A et al. Ratio of trastuzumab levels in serum and cerebrospinal fluid is altered in HER2-positive breast cancer patients with brain metastases and impairment of blood-brain barrier. *Anticancer Drugs* 2007; 18: 23–28
- Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, et al. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res* 2008;68:6084–6091
- Swain S, Kim S, Cortes J, et al. Final overall survival (OS) analysis from the CLEOPATRA study of first-line (1L) pertuzumab (Ptz), trastuzumab (T), and docetaxel (D) in patients (pts) with HER2-positive metastatic breast cancer (MBC). *Annals of Oncology*, Volume 25, Issue suppl\_4, 1 September 2014
- Torka R, Péntzes K, Gusenbauer S, et al. Activation of HER3 Interferes with Antitumor Effects of Axl Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors: Suggestion of Combination Therapy. *Neoplasia*. Apr 2014; 16(4): 301–318
- Toi M, Sperinde J, Huang W et al. Differential survival following trastuzumab treatment based on quantitative HER2 expression and HER2 homodimers in a clinic-based cohort of patients with metastatic breast cancer. *BMC Cancer* 2010; 10: 56
- Usary J, Zhao W, Darr D, et al: Predicting Drug Responsiveness in Human Cancers Using Genetically Engineered Mice. *Clinical Cancer Research* 19:4889-4899, 2013
- Valabrega G, Montemurro F, Sarotto I, et al. TGFalpha expression impairs Trastuzumab-induced HER2 downregulation. *Oncogene*. 2005 Apr 21;24(18):3002-10
- Vasudevan KM, Barbie DA, Davies MA et al. AKT-independent signaling downstream of oncogenic PIK3CA mutations in human cancer. *Cancer Cell* 2009;16:21–32
- Verma S, Miles D, Gianni L, et al. Trastuzumab Emtansine for HER2- positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* 2012 Nov 8;367(19):1783-91
- von Minckwitz G, du Bois A, Schmidt M et al. Trastuzumab beyond progression in human epidermal growth factor receptor 2-positive advanced breast cancer: a german breast group 26/breast international group 03–05 study. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1999–2006
- von Minchwitz G, Protector M, de Azambuja E, et al. Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* 2017; 377:122-131
- Vuoriluoto K, Haugen H, Kiviluoto S, et al. EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene*. 2011; 30:1436-1448
- Wang Q1, Quan H, Zhao J, et al. RON confers lapatinib resistance in HER2-positive breast cancer cells. *Cancer Lett*. 2013 Oct 28;340(1):43-50

Wang L, Zhang Q, Zhang J, et al. PI3K pathway activation results in low efficacy of both trastuzumab and lapatinib. *BMC Cancer* 2011, 11:248

Will M, Qin AC, Toy W, et al. Rapid Induction of Apoptosis by PI3K Inhibitors Is Dependent upon Their Transient Inhibition of RAS –ERK Signaling. *Cancer Discovery* 2014;4:334-347

Wu Y, Sarkissyan M, Vadgama JV. Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast cáncer. *J Clin Med.* 2016 Feb; 5(2): 13

Xia W, Liu LH, Ho P, et al. Truncated ErbB2 receptor (p95ErbB2) is regulated by heregulin through heterodimer formation with ErbB3 yet remains sensitive to the dual EGFR/ErbB2 kinase inhibitor GW572016. *Oncogene* 2004; 23: 646–53

Zazo S, González-Alonso P, Martín-Aparicio E, et al. Generation, characterization, and maintenance of trastuzumab-resistant HER2+ breast cancer cell lines. *Am J Cancer Res* 2016;6(11):2661-2678

Zhao M1, Pan X, Layman R, et al. A Phase II study of bevacizumab in combination with trastuzumab and docetaxel in HER2 positive metastatic breast cancer. *Invest New Drugs.* 2014 Dec;32(6):1285-94

Zhao L, Vogt PK. Helical domain and kinase domain mutations in p110 $\alpha$  of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Feb 19;105(7):2652-7. Epub 2008 Feb 11

Zhang Z, Lee JC, Lin L, et al. Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer. *Nat Genet.* 2012 Jul 1;44(8):852-60

Zhuang G, Brantley-Sieders DM, Vaught D, et al. Elevation of receptor tyrosine kinase EphA2 mediates resistance to trastuzumab therapy. *Cancer Res.* 2010 Jan 1;70(1):299-308.





## EPÍLOGO

*Autonomía, Beneficiencia, no-Maleficiencia y Justicia.*

Los principios básicos de la bioética  
T.L. Beauchamp y J.F. Childress

*So take my hands and come with me, we will change reality.*

Animal Instinct. The Cranberries

HER2

AXL



RTK

PI3K

Aparato de Golgi

Vesicula

