



TESIS DOCTORAL

**DESCIFRANDO LA HETEROGENEIDAD EN  
CÁNCER DE MAMA HER2-POSITIVO:  
*ANÁLISIS INTEGRATIVO DE DATOS ÓMICOS Y CLÍNICOS***

**ANA GODOY ORTIZ**

Programa de Doctorado en Biomedicina, Investigación Traslacional y  
Nuevas Tecnologías en Salud. Universidad de Málaga

**DIRECTOR**

**Alfonso Sánchez Muñoz**

**TUTOR**

**Emilio Alba Conejo**

Málaga, 2025

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTORA: Ana Godoy Ortiz

 <http://orcid.org/0000-0002-5503-6946>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)



*A mi familia, por su amor  
incondicional y su apoyo constante*

*A mi director y a mi tutor de  
tesis, por su mentoría, confianza  
y valiosos conocimientos*

*A la vida, por las lecciones  
aprendidas y los  
obstáculos superados*

*Y a ti, mi ARR*



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña ANA GODOY ORTIZ

Estudiante del programa de doctorado BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL Y NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: DESCRIFRANDO LA HETEROGENEIDAD EN CÁNCER DE MAMA HER2-POSITIVO: ANÁLISIS INTEGRATIVO DE DATOS ÓMICOS Y CLÍNICOS

Realizada bajo la tutorización de EMILIO ALBA CONEJO, y dirección de ALFONSO SANCHEZ MUÑOZ,

DECLARO QUE: La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Fdo.: ANA GODOY ORTIZ Doctorando/a	Fdo.: EMILIO ALBA CONEJO Tutor/a
Fdo.: ALFONSO SANCHEZ MUÑOZ Director/es de tesis	

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 14 de mayo de 2025



Por la presente,

**Dr. Emilio Alba Conejo**

Catedrático de Facultad de Medicina de Málaga

Director del Centro de investigaciones Médico-Sanitarias (CIMES) de la Universidad de Málaga

**Dr. Alfonso Sánchez Muñoz**

Profesor Titular del Departamento de Medicina y Dermatología de la Facultad de Medicina de Málaga,

AUTORIZAN a Dña. Ana Godoy Ortiz a la lectura y defensa de esta memoria de Tesis Doctoral titulada: “DESCIFRANDO LA HETEROGENEIDAD EN CANCER DE MAMA HER2 POSITIVO: ANÁLISIS INTEGRATIVO DE DATOS ÓMICOS Y CLÍNICOS”.

Asimismo, CERTIFICAN que la doctoranda ha obtenido y estudiado personalmente bajo su dirección y supervisión, los datos necesarios y resultados obtenidos durante la realización de esta Tesis Doctoral, que consideramos tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al superior juicio de la Comisión que nombre la Universidad de Málaga para optar a grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente documento en Málaga a 14 de mayo de 2025

Fdo.: Emilio Alba Tutor/a	Fdo.: ALFONSO SANCHEZ MUÑOZ Director/es de tesis
------------------------------	---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutor y codirector de tesis, Emilio Alba, la gran oportunidad que me brindó al confiar en mí para llevar a cabo este bonito proyecto de investigación.

El camino vivido durante la creación y culminación de una tesis es un compendio de muchos factores, decisiones, personas y experiencias. La primera y fundamental, pedir, escuchar y aceptar consejos (gracias a Alfonso Sánchez y Emilio Alba), de agradecer la oportunidad de aprender y crecer en conocimientos sobre la complicada biología molecular (Alicia Garrido, en especial, y Martina Álvarez, gracias) y muy importante, de tener cerca personas que no ayuden a evitar la retirada y estar en esos momentos en los que una “necesita soltar” (Rocío Lavado). No quisiera olvidarme de todas aquellas personas que han ido formando parte de mi crecimiento como Oncóloga Médica durante el periodo MIR y posteriores años, ya sea para bien o para mal, de todas las situaciones vividas he podido aprender, extraer la mejor parte, y al final, ser quien soy ahora y tener las inquietudes que me han permitido iniciar entre otros, este proyecto.

Esta tesis doctoral no hubiese sido posible sin el equipo de investigación del Centro de Investigaciones Médico Sanitarias (CIMES) de Málaga, al que agradezco profundamente todo el trabajo realizado y amabilidad con el que resolvieron todas mis dudas y otras múltiples consultas, con especial atención a Martina Álvarez, Alicia Garrido, Rocío Lavado, Iñaki Comino y Esperanza López. Agradecer del mismo modo a la Sociedad Andaluza de Oncología Médica (SAOM) por su soporte económico gracias a una beca de investigación.

Y para terminar queda mencionar a dos partes fundamentales: mi familia por su apoyo incondicional, y a todas las pacientes y familiares que han colaborado desinteresadamente y dado su consentimiento para formar parte del proyecto de investigación.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

---

# RESUMEN

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama (CM) constituye la neoplasia más prevalente y causa principal de mortalidad cáncer-específica en la mujer a nivel mundial. En el CM encontramos un grupo de enfermedades ampliamente heterogéneas a nivel clínico, molecular y de respuesta terapéutica. Los análisis transcriptómicos realizados en las últimas décadas han permitido la identificación de subtipos intrínsecos moleculares con claras diferencias en sus programas de expresión génica: Luminal A, Luminal B, *HER2-enriched* (HER2E) y *Basal-Like*. El CM-HER2 positivo es uno de los fenotipos de CM con mayor heterogeneidad. Hasta la fecha la información pronóstica y predictiva de beneficio a terapias anti-HER2 en la práctica clínica continúa siendo dada por el estatus histopatológico de HER2, independientemente de otras variables clínico-patológicas pronósticas para el CM. En contraposición, disponemos ya de suficiente evidencia acerca de que en el CM-HER2 positivo están presentes todos y cada uno de los distintos subtipos intrínsecos moleculares, con todo lo que ello supone en el carácter evolutivo y de respuesta terapéutica de estos tumores. Es más, considerando el subtipo intrínseco de forma aislada, desaparece cualquier valor pronóstico atribuible a variables clínicas y patológicas clásicas, incluyendo el estatus clínico de HER2. Este trabajo pretende analizar y describir las bases de la heterogeneidad intrínseca del CM-HER2 positivo siguiendo un enfoque multiómico, para investigar diferencias claves entre aquellos tumores HER2 con subtipo intrínseco HER2E y CM-HER2 con subtipo no HER2E.

## METODOLOGÍA Y OBJETIVOS

Se ha realizado un trabajo de revisión bibliográfica sobre el estado actual del CM-HER2 positivo a nivel de práctica clínica y biología molecular, habiéndose publicado un artículo de revisión sobre el cual se basa la introducción de esta tesis doctoral (**Anexo Documento 1**). Tras dicha revisión, llegamos a dos importantes conclusiones. La primera, que la amplificación de *ERBB2* y/o sobreexpresión de

---

HER2 continúa siendo el único biomarcador que guía la toma de decisiones sobre el empleo de terapias anti-HER2, y que esto como un biomarcador por sí solo continúa siendo insuficiente para poder explicar los resultados terapéuticos heterogéneos que encontramos en la práctica clínica. La segunda, la amplificación del gen *ERBB2* en CM es un evento pan-cáncer que puede encontrarse presente en todos los subtipos intrínsecos, especialmente en el subtipo HER2E, subtipo intrínseco cuyo paisaje transcripcional es independiente a la amplificación de *ERBB2*, lo sitúa como un biomarcador previsiblemente más preciso y eficiente en el diseño de nuevas terapias dirigidas. La heterogeneidad molecular de un tumor se define por análisis de expresión, y análisis de mutaciones y/o de alteraciones en el número de copias. Así, se genera la hipótesis de este trabajo, con la intención de desgranar mediante un análisis multiómico (expresión y mutaciones) el subtipo intrínseco HER2E y con el **objetivo primario** de definir las bases moleculares de la heterogeneidad de los CM-HER2 positivos mediante el análisis de diferencias clave entre los subtipos intrínsecos HER2E y no HER2E.

Siguiendo un diseño ambispectivo observacional, fueron seleccionadas 90 casos/pacientes con diagnóstico de CM localizado y positividad para HER2 determinada por inmunohistoquímica (IHQ) y/o hibridación *in situ* (ISH) en la biopsia del tumor primario, tratadas entre 2011 y 2023 en la Unidad Intercentros de Oncología Médica de Málaga. Llegaron a completar el análisis global de expresión génica y mutacional un total de 79 pacientes, con una mediana de seguimiento de 70 meses. Para el análisis de expresión génica se empleó la tecnología nCounter® Analysis System (NanoString Technologies) y el panel comercial *Breast Cancer 360*<sup>TM</sup>. Este panel mide la expresión de un total de 776 implicados en la biología del CM (incluyendo 18 genes *house-keeping*) y 48 firmas biológicas, incluyendo la firma PAM50, firmas relacionadas con el microambiente tumoral y la respuesta inmune. Los datos de expresión crudos fueron normalizados siguiendo el método de normalización de NanoString y el análisis de expresión diferencial se realizó a partir de los datos del panel mencionado y llevado a cabo mediante el paquete `limma` de R. En todos los casos, un gen o firma se consideraron diferencialmente expresados entre grupos cuando se cumplían las condiciones de *p*-valor ajustado

---

(FDR)  $< 0,05$  y  $|\log_2FC| > 1,5$ . Para el análisis de datos genómicos, se empleó la tecnología Ion GeneStudio S5™ System y el panel de secuenciación *OncoPrint™ Comprehensive Assay v3C* que cubre 161 genes asociados al cáncer. En primer lugar, realizamos un análisis descriptivo general por grupo mediante el paquete *maftools* de R. Para los distintos grupos y comparaciones bajo estudio se determinó la existencia de diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de presentar mutaciones en cada uno de los genes recogidos en el panel mediante el test de Fisher (bilateral y unilateral). Se consideraron diferencias significativas si se cumplía p-valor ajustado  $< 0,05$ .

En un primer lugar realizamos un análisis de expresión diferencial y un análisis de diferencias a nivel de alteraciones genómicas entre los casos HER2E y el resto de subtipos intrínsecos. Finalmente se planificó un análisis de supervivencia para analizar el impacto en la supervivencia de las pacientes de los resultados obtenidos tras las comparativas realizadas con la información clínico-patológica, expresión génica y análisis de datos genómicos. Usando el lenguaje de programación R con el paquete *Survival*, analizamos supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia global (SG) basado en a) aproximación de Kaplan-Meier y Log Rank Test y b) *Cox Proportional Hazards Models* corrigiendo el efecto de las covariables “Tratamiento” (Adyuvante o Neoadyuvante) y “Estado del receptor” (Positivo o Negativo).

## RESULTADOS

El 55,7% de los casos (n=44) presentan positividad para el receptor hormonal (RH), definida ésta por una expresión medida por IHQ de  $\geq 1\%$  para el receptor de estrógeno (RE) y/o receptor de progesterona (RP) siendo el resto de los tumores (n=35) RH negativos. La mayoría (71%, n=56) presentan grado histológico 3, en torno al 20% de los casos afectación axilar clínica y/o patológica, y en un 35% de las pacientes habían recibido tratamiento neoadyuvante (TNA). La subtipificación molecular se realizó por PAM50, firma incluida en el panel *Breast Cancer 360™*. Del total de casos CM-HER2 positivo analizados, se clasificó en el subtipo HER2E al 58,2% (n=46), en Luminal A al 20,8% (n=16), en Luminal B el

---

16,8% (n=13) y solo un 5,2% (n=4) en el subtipo Basal-*like*. En la población con RH positivos (n=44), un 41% de los casos cayeron en el subtipo HER2E, seguido por el 30% y 29% de los casos en Luminal B y Luminal A respectivamente, con ningún caso Basal-*like*. En la cohorte de RH negativos, un 80% se corresponden al subtipo HER2E, 11% subtipo Basal-*like* y 9% Luminal A. En la cohorte de pacientes con TNA se alcanzó una respuesta patológica completa (rPC) del 53% siendo el 87% de los casos tumores con subtipo HER2E.

### 1) Análisis de expresión diferencial según variables clínicas

Se realizó un análisis de expresión diferencial según estatus menopáusico, estado de RH y tipo de respuesta patológica tras TNA. En este apartado, destacan los resultados obtenidos según el estatus del RH, donde las firmas *Antigen processing and presentation machinery (APM)*, *BC p53*, *CDK6*, firmas inmunes (*células citotóxicas*, *citotoxicidad*, *Macrófagos*, *PD-L1*, *PD-L2*, *TIGIT*, *IFN-Gamma*, *TIS*), así como *Homologous-Recombination Deficiency (HRD)*, *Hipoxia* e *IDO1*, están infraexpresadas en las pacientes con RH positivos con respecto a las pacientes con RH negativos (grupo de referencia para el análisis). Las firmas de *Apoptosis*, *Diferenciación*, *Señalización de ER*, *ESR1*, *Progesterona (PGR)* y *FOXA1* sí presentan una expresión diferencial al alza en las pacientes con RH positivos. El otro hallazgo de interés viene del análisis de expresión diferencial en función de tipo de respuesta a TNA, donde encontramos que sólo 1 gen y ninguna firma, se expresa diferencialmente entre aquellas pacientes que obtienen rPC y las que no, siendo el gen *INHBB* el único sobreexpresado en las pacientes que alcanzan una rPC.

### 2) Análisis de expresión diferencial por subtipo intrínseco

Se realiza un análisis de expresión diferencial entre los casos HER2E (46 casos) y el resto de los subtipos intrínsecos no HER2E (33 casos). A nivel de gen, tras un análisis exploratorio inicial por análisis de componentes principales (PCA) se obtuvo que la mayoría de los casos con subtipo HER2E se solapaban con los no HER2E, pero tras el *Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)* o análisis de enriquecimiento de genes, del total de los 758 genes analizados, 29 se expresan diferencialmente diferencial entre grupos: 11 genes regulados al alza (*ERBB2*, *GRB7*,

---

*TMEM45B, FUT3, KRT7, B3GNT3, FGFR4, CXCL9, TMPRSS4, S100A7 y CEACAM6*) y 18 genes infraexpresados (*IGFR1, BLC2, ESR1, SLC39A6, FGFR2, SCUBE2, AGTR1, TBC1D9, IRX1, PGR, NAT1, BMPR1B, MAPT, ELOVL2, DNAJC12, CBLC, KRT14 y SOX10*) en la condición HER2E. Tras el análisis funcional de rutas metabólicas KEGG encontramos que los genes diferencialmente expresados se enriquecieron significativamente en la **vía MAPK y PI3K-Akt**, vías de señalización *downstream* de HER2. También podemos ver enriquecimiento, aunque en menor medida en las *vías de resistencia a inhibidor tirosin-quinasa, de resistencia endocrina, vía de señalización de estrógeno, vías de señalización que regulan la pluripotencialidad de las células madre, endocitosis y vía de señalización del calcio*. A nivel de firma, se obtuvo que, del total de las 42 firmas analizadas, **sólo 4 se expresaron diferencialmente entre los grupos** en la condición HER2E: ERBB2, ROR (sobreeexpresadas), ESR1 y PGR (infraexpresada).

Tras este primer análisis de expresión diferencial, aislamos un grupo de casos (N=16) con subtipo HER2E y expresión de genes divergente. A este grupo lo denominamos “*HER2E no agrupado*”. Dentro de un análisis con intención exploratoria, se llevaron a cabo varias comparativas con este subgrupo: A) *HER2E agrupado versus no agrupado*, B) *HER2E no agrupado versus subtipo no HER2E* y C) *HER2E agrupado versus subtipo no HER2E*.

- A) *HER2E agrupado versus no agrupado*: A nivel de gen, encontramos una expresión diferencial entre grupos de 17 genes: 7 genes sobreexpresados (*KRT7, FUT3, SLPI, TMEM45B, B3GNT3, DKK1 y CALML5*) y 10 genes infraexpresados (*ESR1, NAT1, GATA3, PGR, CA12, ARNT2, ELOVL2, LRP2, BMPR1B, ANXA9*) en la condición *HER2E agrupado*. El análisis funcional de rutas metabólicas KEGG puso en evidencia que los genes diferencialmente expresados se enriquecieron significativamente en la **vía de señalización de estrógenos**. A nivel de firma, sólo 2 firmas se expresan diferencialmente diferencial entre grupos, ambas infraexpresadas en la condición *HER2E agrupado*. Estas son ESR1 y PGR.

- 
- B)** *HER2E no agrupado versus subtipo no HER2E*: A nivel de gen, encontramos una expresión diferencial entre grupos de 1 único gen, el gen *ERBB2* sobreexpresado en la condición *HER2E no agrupado*. A nivel de firma, sólo 2 firmas se expresan diferencialmente diferencial, ambas sobreexpresadas en el grupo *HER2E no agrupado*: ROR y ERBB2.
- C)** *HER2E agrupado versus subtipo no HER2E*: en esta última comparativa, a nivel de gen encontramos expresión diferencial entre grupos para un total de 50 genes, con 7 genes adicionales a la comparativa inicial del total de casos HER2E frente a los no HER2E: *EGLN3, LAD1, DKK1, SLPI, CALML5, PROM1* y *PIP*. Con el análisis funcional orientado a rutas metabólicas KEGG encontramos que los genes diferencialmente expresados en esta comparativa se enriquecieron significativamente en **vías de señalización de PI3K-Akt** siendo la que presenta la mayor ratio de genes asociados, siguiéndole **las vías de señalización MAPK y la del calcio**. A nivel de firma se expresan diferencialmente las 4 firmas del análisis primario: ERBB2 y ROR sobreexpresadas en la condición *HER2E agrupado*, e infraexpresadas las firmas ESR1 y PGR.

### 3) Análisis de datos genómicos

Comenzamos con el análisis de diferencias a nivel de alteraciones genómicas (SNVs-*indels* y CNVs) entre los casos HER2E (N=46) y el resto de los subtipos (N=33). En cuanto a alteraciones tipo SNV-*indels*, los 10 genes más frecuente mutados y por orden de frecuencia fueron *RB1, CDK12, SETD2, RNF43, FANCI, ATR, ATRX, CHEK1, NF2, CREBBP* para HER2E, y para el resto de subtipos no HER2E los genes *RB1, CDK12, ATR, ATRX, RNF43, FANCI, CHEK1, NF1, SETD2, CREBBP*. Empleando el test de Fisher (bilateral y unilateral) considerando diferencias significativas si el p-valor ajustado (FDR) <0,05, encontramos que **ningún gen** incluido en el panel *Oncomine™ Comprehensive Assay v3C* **presenta diferente frecuencia de SNVs-*indels* entre los grupos**. Analizando el grupo clínico de mayor interés, el subgrupo con rPC tras TNA, tampoco se encontraron diferencias. En el análisis de CNVs, respecto a las características clínico-patológicas las CNVs para *ERBB2*

---

en términos absolutos, fueron mayores en los tumores con subtipo intrínseco HER2E y HER2 3+ por IHQ. En el análisis de CNVs partir de los resultados para todos los genes alterados incluidos en el panel solo se encontraron diferencias para el análisis de *Copy Number* (CN) (media) entre los grupos HER2E y subtipos no HER2E a nivel de ***ERBB2***, **siendo el único gen con diferente CN (media) entre grupos** (*Wilcox-Test two-tailed, Wilcox-Test one-tailed -greater-*). No se encontraron diferencias entre aquellas pacientes con rPC y enfermedad residual tras TNA.

Al igual que en el caso del análisis de expresión, se estudiaron las diferencias a nivel de alteraciones genómicas entre los casos A) *HER2E agrupado y no agrupado*, B) *HER2E no agrupado y no HER2E* y C) *HER2E agrupado y no HER2E*.

- A) *HER2E agrupado versus no agrupado*: En el análisis de alteraciones tipo SNV-*indels*, los 10 genes más frecuente mutados para *HER2E agrupado* en orden de frecuencia fueron *RB1, CDK12, ATR, RNF43, FANCI, ATRX, CHEK1, ATR, ATM y NF1*, y para *HER2E no agrupado* *RB1, CDK12, ATR, RNF43, CREEBP, NF2, FANCI, ATRX, NOTCH2 y ARID1A*. **Ningún gen presentó diferente frecuencia de SNVs-*indels* entre los grupos**. En el análisis de CNVs, encontramos diferencias para el análisis de CN entre los grupos para los genes ***FGFR1, FGFR2 y RAD51, con una CN media mayor en el grupo HER2E no agrupado***.
- B) *HER2E no agrupado versus subtipo no HER2E*: En el análisis de SNV-*indels*, se encontraron los mismos 10 genes e idéntico orden de frecuencia en la comparativa inicial *HER2E versus no HER2E*. De nuevo, **ningún gen presentó diferente frecuencia de SNVs-*indels* entre grupos**. En el análisis de CNVs, no se encontraron diferencias a nivel de ningún gen para el análisis de CN (media), análisis de frecuencia de CNVs (ganancias y pérdidas), análisis de frecuencia de CNVs (ganancias) ni para el análisis de frecuencia CNVs (pérdidas) entre grupos, ni siquiera en el gen *ERBB2*.
- C) *HER2E agrupado versus subtipo no HER2E*: En el análisis de SNV-*indels*, **ningún gen presentó diferente frecuencia de SNVs-*indels* entre**

---

**grupos.** El análisis de CNVs detectó diferencias en el análisis de CN entre los grupos sólo para el gen *ERBB2*.

#### 4) Análisis de supervivencia

No se detectaron diferencias en supervivencia libre de enfermedad (SLE) ni en supervivencia global (SG) en ninguno de los grupos analizados: *HER2E versus subtipo no HER2E* (SLE p =0.87; SG p =0.52); *HER2E agrupado versus HER2E no agrupado* (SLE p =0.072; SG p =0.18); *HER2E no agrupado versus no HER2E* (SLE p =0.14; SG p =0.55), y *HER2E agrupado versus subtipo no HER2E* (SLE p =0.59; SG p =0.25). Tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas probablemente debido al pequeño tamaño muestral (n=28) entre aquellas pacientes con rPC *versus* el resto tras TNA (SLE p =0.82; SG p =0.96).

## DISCUSIÓN

La amplificación de *ERBB2* y/o sobreexpresión de HER2 continúa siendo el único biomarcador que subclasifica los tumores HER2-positivo dentro del CM y con el que se establecen los algoritmos terapéuticos de las terapias anti-HER2. Aún no disponemos de un conocimiento suficiente acerca de qué mecanismos biológicos subyacen a los resultados terapéuticos heterogéneos que encontramos en la práctica clínica y a la heterogeneidad biológica de este tipo de CM. Además, la amplificación de *ERBB2* parece ser un evento oncogénico que puede estar presente en todos los subtipos de CM, en lugar de un biomarcador en sí mismo de un subtipo intrínseco. Su asociación con el subtipo transcripcional HER2E es errónea, ambos conceptos no son sinónimos, son sustancialmente distintos.

Para homogeneizar nuestra población de estudio nos centramos en tumores de mama HER2-positivo definidos por sobreexpresión de HER2 (IHC) y/o amplificación (ISH) en la biopsia del tumor primario y con una representación más o menos uniforme de tumores con RH positivos y negativos, de forma que tras el subtipificado molecular por PAM50 pudiéramos obtener dos grupos más o menos balanceados de tumores con subtipo HER2E y subtipo no HER2E. Así, un 58% del global

---

correspondieron al subtipo HER2E, siendo el subtipo intrínseco en un 80% de los tumores con RH negativos, y un 41% de los tumores RH positivos. Respecto a las características clínico-patológicas, hay que destacar que se trata de una población con factores de mal pronóstico por presentar en más de un 70% de los casos grado histológico 3 y afectación axilar en el 20%. Un poco más de un tercio de las pacientes (35%) fueron tratadas con TNA alcanzando una tasa de rPC del 53%, similar a la reportada en la literatura para los tumores HER2-positivos y correspondiendo el 87% de los casos a tumores con subtipo HER2E.

Tras el análisis de expresión diferencial en un primer paso investigamos si existía una expresión diferencial de firmas recogidas en el panel *Breast Cancer 360*<sup>TM</sup> en función de variables clínicas, entre estas el estatus de los RH y el tipo de respuesta a TNA (rPC *versus* no-rPC). En el primera comparativa encontramos que múltiples firmas se expresaban diferencialmente según el estatus del RH, destacando firmas inmunes (*células citotóxicas, citotoxicidad, macrófagos, PD-L1, PD-L2, TIGIT, IFN-Gamma, TIS*) con subexpresión en los tumores con RH positivos frente aquellos con RH negativos. Esto podría impactar en el diseño de ensayos clínicos con inmunoterapia y terapia anti-HER2, ya que se debería considerar *a priori* a la población de los tumores RH negativos/HER2 positivo como la más susceptible de beneficio clínico. Respecto a la cohorte de pacientes en tratamiento con TNA encontramos que en aquellas pacientes con rPC, del total de genes analizados solo 1 gen y ninguna firma presentó expresión diferencial entre grupos: 1 gen regulado al alza, el gen de la subunidad  $\beta$ B de la inhibina o *INHBB*. Todas las pacientes (n:11) con una sobreexpresión del gen (Z-score de  $\geq 1$ ) presentan subtipo HER2E y HER2 clínico 3+ por IHQ, un 72% son RH negativos y 54% premenopáusicas. Además, en esta cohorte pacientes se incluyen 2 de las 11 recaídas detectadas durante el seguimiento de nuestro estudio, ambas a nivel de sistema nervioso central (SNC).

El gen *INHBB* se localiza en el cromosoma 2 y codifica una proteína, la inhibina inhibina  $\beta$ B, subunidad de los complejos proteicos diméricos activina e inhibina, dos glicoproteínas estrechamente relacionadas que actúan como citocinas funcionales y con efectos biológicos opuestos. Ambas forman parte de la superfamilia de ligandos del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (*TGF- $\beta$* ) y varios estudios en

---

los últimos años le han otorgado funciones emergentes en cáncer<sup>1</sup>. La inhibina es una hormona de origen exclusivamente gonadal, formada por dos subunidades únicas covalentemente: una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$  de la que existen 2 isoformas, la A y la B ( $\beta A$  y  $\beta B$ ). Mientras que INHBA ( $\beta A$ ) e INHBB ( $\beta B$ ) se expresan en el tejido mamario normal, sólo INHBB está regulada por los estrógenos. La activina A esta compuesta por un homodímero de subunidad  $\beta A$  unido por disulfuro. La activina A puede encontrarse altamente expresada en CM y se ha asociado a peor pronóstico. De forma similar a lo que ocurre con el *TGF- $\beta$* , la señalización canónica de la activina A se produce a través de la activación de la vía de señalización SMAD. También parece participar en las vías no clásicas de transducción por *TGF- $\beta$*  al enviar señales a través de las vías *p38/MAPK*, *PIK3CA/AKT* y *WNT/ $\beta$ -catenina*. No existen hasta la fecha publicaciones que estudien ni relacionen la expresión génica de *INHBB* con el CM-HER2 positivo ni tampoco con respuesta a TNA. En un trabajo reciente, tras el análisis de la actividad proliferativa de 9 líneas celulares de CM-HER2 positivo en tejido cerebral no tumoral, se reportó una sobreexpresión diferencial del gen *INHBB* en aquellas células de las líneas UACC-893 y MDA-MB-453, aquellas que proliferaron rápidamente en el parénquima cerebral. Tras un análisis *de microarrays* se encontró que ambas líneas celulares compartían hasta 138 patrones de expresión génica y que entre los genes sobreexpresados se encontraba *INHBB*. En el análisis de supervivencia empleando el conjunto de datos METABRIC para analizar el impacto de la expresión de los genes diferencialmente expresados, el gen *INHBB* entre otros, no fueron incluidos en el análisis al no disponer de datos clínico-patológicos para estos genes en la base de datos referida<sup>2</sup>.

Como parte del objetivo primario del estudio, *análisis de diferencias significativas entre los subtipos intrínsecos HER2E y no HER2E*, de los resultados de esta primera comparativa tras análisis de expresión diferencial y de datos genómicos debemos hacer varias apreciaciones. La primera, **no existen diferencias a nivel de alteraciones genómicas SNV, indels y CNVs entre los subtipos HER2E y los subtipos no HER2E dentro del CM-HER2 positivo más allá de un mayo ratio de CN en el gen *ERBB2* para los casos HER2E**. En ambos casos dentro de los 10 genes más

---

frecuentemente alterados, *RB1* y *CDK12* encabezaron la lista. Los genes alterados y sus variantes presentaron entre grupos un similar enriquecimiento en las rutas de señalización oncogénica del ciclo celular, *TP53* y *PIK3CA*. La segunda apreciación viene del análisis de expresión diferencial, donde **sólo 4** de las 42 firmas analizadas **parecen separar a los casos HER2E del resto de subtipos: ERBB2, ROR, ESR1 y PGR**. Tras el análisis funcional de rutas metabólicas KEGG encontramos que **los genes expresados diferencialmente se enriquecieron significativamente en la vía MAPK y PI3K-Akt**, vías de señalización *downstream* de HER2 vinculadas con la proliferación tumoral, inhibición de muerte celular y resistencia terapéutica, a la terapia endocrina mediada por *EGFR*, y a las terapias dirigidas frente a HER2.

La tercera apreciación y más relevante fue el **aislamiento de un subgrupo de casos con subtipo HER2E con una expresión de genes divergente** (*HER2 no agrupados*) tras el primer análisis jerarquizado constituyendo un subgrupo que comparamos con el resto de casos HER2E, y con los subtipos no HER2E. La mayoría de los casos HER2E con expresión de genes divergente se correspondían con tumores RH positivos (69%) y HER2 clínico 3+ por IHQ (87,5%). En comparación a al resto de casos HER2E, las diferencias significativas de datos genómicos se dieron por una **mayor ratio de CN en el subgrupo HER2E no agrupado para los genes FGFR1, FGFR2 y RAD51**. Respecto al análisis de expresión diferencial a nivel de gen, *ERBB2* desaparece como gen diferencialmente expresado entre grupos y se observa un **mayor enriquecimiento de los genes diferencialmente expresados en la ruta de señalización de estrógenos**. Lo más llamativo viene dado en el análisis de expresión diferencial por firma, donde los **HER2E con expresión divergente de genes parecen no agrupar dentro del conjunto global de tumores HER2E por el peso a nivel de expresión diferencial al alza que tienen las firmas ESR1 y PGR en estos casos**. En comparación con los no HER2E, en el análisis de datos genómicos no se aislaron diferencias significativas a nivel de alteraciones genómicas ni siquiera a nivel de CN para *ERBB2*, y en el análisis de expresión diferencial solo el gen *ERBB2* y las firmas ROR y *ERBB2* se expresan diferencialmente al alza en los *HER2E no agrupados*.

---

Excluyendo los casos HER2E con expresión de genes divergente, a nivel genómico y de expresión encontramos resultados similares a la comparativa inicial tanto para los datos genómicos como para los datos de expresión diferencial. **No se detectaron diferencias a nivel de alteraciones genómicas más allá de un mayor ratio de CN en el gen *ERBB2* para los casos HER2E agrupados y de nuevo 4 firmas ya descritas que separan ambos los grupos** (*ERBB2* y *ROR* -sobreeexpresadas en HER2E; *ESR1* y *PGR* -infraexpresadas-). A nivel de gen, sí encontramos 7 genes adicionales a los diferencialmente expresados en la comparativa HER2E *versus* no HER2E: *EGLN3*, *LAD1*, *DKK1*, *SLPI*, *CALML5*, *PROM1* y *PIP*. Realizamos una búsqueda y revisión exhaustiva de estos genes, con la intención de conocer lo publicado al respecto de su implicación en el CM-HER2 positivo y heterogeneidad biológica en CM. De los 7 genes referidos, hemos de destacar *EGLN3*, *LAD1* y *CALML5*.

Respecto a *EGLN3* se ha reportado asociación a mayores niveles de ARNm en tumores con RE negativos y HER2 positivos<sup>3</sup>, comportamiento más agresivo y peores resultados en supervivencia, sin haberse relacionado con subtipo intrínseco, si bien en estos tumores se concentran la mayoría de los subtipos HER2E.

*LAD1* codifica para la proteína ladinin-1, proteína aun no completamente caracterizada, que actúa como filamento de anclaje componente de las membranas basales y que parece contribuir a la estabilidad de la asociación de las capas epiteliales con la capa de mesénquima subyacente. De este gen, hay que destacar su papel en la vía EGF-ERK, como mediador regulado a su vez por la fosforilación de esta vía, favoreciendo la proliferación y migración de células mamarias a través del control de la polimerización y entrecruzamiento de las fibras de actina. En el trabajo más importante publicado al respecto, a *LAD1* se le confiere un peor pronóstico y una expresión significativa en subtipos agresivos de CM, en dicho trabajo caracterizados dentro de los *InsClust* 5 y 10, donde a su vez se concentran la mayoría de los CMTN y tumores HER2 positivos<sup>4</sup>.

El gen *CALML5* codifica para una proteína, la *calmodulina-like 5*, que comparte similitud funcional con la calmodulina (proteína de unión al calcio) expresada en la epidermis y uno de los genes con mayor sobreexpresión en CMTN. Se ha reportado que forma parte de las proteínas que interactúan con el receptor de motilidad

---

mediado por hialuronano o Rhamm (*CD168*). Los cambios oncogénicos clave en el microambiente tumoral incluyen síntesis, procesamiento y señalización aberrante del ácido hialurónico. Las interacciones entre las células tumorales y su microambiente son de máxima relevancia para favorecer la invasión tumoral y las metástasis. La expresión de Rhamm dentro del parénquima tumoral no es uniforme, sino que se detecta dentro de regiones en el margen invasivo del tumor (áreas de remodelación activa de la matriz extracelular). Se regula dinámicamente en el contexto de estrés celular, de forma que permite que las células tumorales detecten y respondan a la remodelación de la matriz celular, estando vinculado así con la adhesión celular y la transición epitelial-mesenquimal (EMT). En un estudio se detectó una mayor expresión en tumores con RE positivos de alto grado, CMTN y tumores HER2 positivo, y asociación a peor pronóstico<sup>5</sup>. En otro trabajo en líneas celulares de CM, se vio que la proteína Rhamm de la superficie celular y el CD44 actúan juntos en un mecanismo autocrino dependiente del ácido hialurónico para coordinar la señalización sostenida a través de ERK1,2, lo que conduce a una alta motilidad basal de las células de CM invasivo<sup>6</sup>. Además, se ha descrito la sobreexpresión de mucina 4 y de CD44 asociada a enmascaramiento del sitio de unión a trastuzumab, y por tanto un posible mecanismo de resistencia a dicha terapia anti-HER2 por pérdida de dominio extracelular<sup>7</sup>. Dado que el gen que codifica para la proteína Rhamm, no se incluye en el panel que hemos empleado, solo podemos llegar a la hipótesis de que, si la *calmodulina-like 5* interacciona con Rhamm y éste participa en los procesos de remodelación de la matriz celular, adhesión celular, EMT, y junto a CD44, en el mantenimiento de la señalización a través de ERK1,2 componente de la vía MAPK, la sobreexpresión del gen CALML5 en el subtipo HER2E podría implicar un comportamiento agresivo, con mayor probabilidad de metástasis y de evolución clínica más propia de un fenotipo basal.

## CONCLUSIONES

En nuestra cohorte de pacientes con CM localizado HER2 positivo por amplificación del gen *ERBB2* y/o sobreexpresión de la proteína HER2 encontramos diferencias relevantes a nivel clínico y molecular.

Respecto a las variables clínicas,

- 
- Expresión génica diferencial al alza de firmas inmunes en aquellos tumores con RH negativos y mayoritariamente subtipo HER2E, lo que podría impactar en el diseño de ensayos clínicos con inmunoterapia y terapia anti-HER2, ya que se debería considerar *a priori* a la población de los tumores RH negativos dentro de los CM-HER2 positivo como la más susceptible de beneficio clínico.
  - En la población que siguió TNA y tuvo respuesta patológica completa, expresión génica diferencial de un único gen, el gen *INHBB* y ninguna firma. Más del 70% de estas pacientes tienen subtipo HER2E y se incluyen 2 de las 11 recaídas detectadas en el seguimiento del estudio, ambas a nivel de SNC. Para este gen, solo hemos encontrado un trabajo que lo relaciona a una mayor actividad proliferativa y agresividad en CM, en un estudio con líneas celulares de CM-HER2 positivo sobre tejido cerebral sano, detectándose una expresión diferencial de *INHBB* en las dos líneas celulares que proliferaron rápidamente en el parénquima cerebral.

En el análisis de diferencias entre tumores con subtipos HER2E y no HER2E:

- A nivel de expresión génica, 29 genes expresados diferencialmente entre grupos, enriquecidos significativamente en las vías **MAPK y PI3K-Akt**, vías de señalización *downstream* de HER2. A nivel de firma, solo 4 firmas con expresión diferencial: *ERBB2* y *ROR* sobreexpresada en HER2E, y las firmas *ESR1* y *PGR* en los subtipos no enriquecidos.
- En el análisis genómico, ningún gen incluido en el panel presentó diferente frecuencia de SNVs/indels entre tumores HER2E y no HER2E encabezando los genes *RB1* y *CDK12* la mayor tasa de alteraciones genómicas en ambos grupos y siendo la única diferencia a nivel genómico una mayor ratio de CN (ganancia) del gen *ERBB2* en los HER2E.

Por lo tanto, parece que las diferencias dentro del CM-HER2 positivo si tenemos en cuenta la subtipificación molecular, radican en la expresión génica, sin alteraciones genómicas relevantes más allá de la amplificación génica de *ERBB2*.

---

Detectamos un conjunto de casos dentro del global de los tumores HER2E con una expresión de genes divergentes, “*HER2E no agrupado*”, que en un análisis exploratorio detectamos diferencias a nivel de expresión y genómico respecto a su contraparte con expresión común de genes, y respecto a los subtipos no HER2E.

- Los genes diferencialmente expresados respecto a los HER2E con expresión común de genes se enriquecieron significativamente en la **vía de señalización de estrógenos**. A nivel de firma, sólo 2 firmas se expresan diferencialmente entre grupos, ESR1 y PGR, ambas sobreexpresadas en la condición *HER2E no agrupado*. En el análisis genómico las únicas diferencias se dieron por una mayor ratio de CN en el grupo *HER2E no agrupado* para los genes *FGFR1*, *FGFR2* y *RAD51*, genes cuya amplificación en concreto de los dos primeros es más características de tumores con subtipo intrínseco luminal, especialmente LumB.
- En comparación con los subtipos no HER2E, las diferencias radicaron en la expresión diferencial del gen *ERBB2*, de las firmas ROR y *ERBB2* en los *HER2E no agrupados*, y ninguna diferencia significativa en los resultados del análisis genómico, ni siquiera en la ratio CN de *ERBB2*.

En nuestra cohorte, el conjunto de casos *HER2E no agrupado* parece corresponder a casos por subtipificado molecular HER2E con una expresión génica diferencial de genes de la vía de señalización estrogénica y una expresión diferencial al alza de las firmas ESR1 y PGR respecto al resto de casos HER2E, pero de las firmas ROR y *ERBB2* respecto a los tumores no HER2E. Este hallazgo a falta de ser valorado en una serie de pacientes más amplia supondría un añadido a la heterogeneidad del CM-HER2 positivo, más en concreto dentro del subtipo HER2E, con una expresión génica más cercana a tumores no HER2E, esencialmente luminales, frente a los que ni siquiera la ratio de CN de *ERBB2* presenta diferencias significativas. Este grupo, podría explicar parte de los resultados heterogéneos en cuanto a respuesta y evolución clínica que se dan en práctica clínica en tumores de mama HER2 positivo con subtipo HER2E.

---

No se dieron diferencias a nivel de SG ni en SLE. Estos resultados, así como los previamente descritos pudieran estar condicionados por el pequeño tamaño muestral de nuestra serie de pacientes y el análisis de genes con una relación ya establecida con CM, que podría excluir nuevos genes aún no identificados.

# LISTA DE ABREVIATURAS

CM	Cáncer de Mama
HER2E	HER2-enriquecido
IHQ	Inmunohistoquímica
ISH	<i>In situ Hybridization</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
Log2FC	<i>Log2 Fold Change.</i>
RH	Receptor Hormonal
RE	Receptor de Estrógeno
RP	Receptor de Progesterona
TNA	Tratamiento NeoAdyuvante
rPC	Respuesta completa patológica
APM	<i>Antigen processing and presentation machinery</i>
HRD	<i>Homologous recombination deficiency</i>
ER	<i>Estrogen receptor</i>
ESR1	<i>Estrogen Receptor Alpha/1</i>
PGR	<i>Progesterone receptor</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
CN	<i>Copy Number</i>
SLE	Supervivencia Libre de Enfermedad
SG	Supervivencia Global
INHBB	Gen de la subunidad $\beta$ B de la inhibina
SNC	Sistema nervioso central
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ErbB	<i>Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene</i>

RTK	Receptor tirosina cinasa
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
Mr	Masa molecular Relativa
ADNc	ADN complementario
aa	Aminoácido
LumA	Luminal A
LumB	Luminal B
BAL	Basal- <i>like</i>
ARNm	ARN mensajero
AJCC/UICC	<i>American Joint Committee on Cancer/International Union Against Cancer</i>
TNM	Sistema de estadificación del AJCC ( <i>T tumor, N ganglio y M metástasis</i> )
OMS	Organización Mundial de la Salud
CDI	Carcinoma Ductal Infiltrante
CDI-NOS	Carcinoma Ductal Infiltrante de tipo no especial
CLI	Carcinoma Lobulillar Infiltrante
RE+	Receptor de Estrógeno positivo
RP-	Receptor de Progesterona negativo
RE-	Receptor de Estrógeno negativo
RP+	Receptor de progesterona negativo
CMTN	Cáncer de Mama Triple Negativo
RA	Receptor de Andrógenos
CK	Citoqueratina
CNV	Del inglés, <i>Copy Number Variation</i>
qRT-PCR	<i>Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR</i>
FFPE	Del inglés, <i>Formalin-Fixed Paraffin-Embedded</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
SNP	Del inglés, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>

SNV	Del inglés, <i>Single Nucleotide Variation</i>
CNA	Del inglés, <i>Copy Number Aberration</i>
ASCO/CAP	<i>American Society of Clinical Oncology y el College of American Pathologist</i>
TMA	<i>Tissue-Microarrays</i>
GPA	Tricolor HER2 gene-protein assay
WGS	<i>Whole-genome sequencing</i>
BFB	, <i>Breakage-Fusion-Bridge cycle</i>
RCB	<i>Residual Cancer Burden</i>
TILs	<i>Tumor Infiltrating Lymphocytes</i>
sTILs	<i>Stromal tumor-infiltrating lymphocytes</i>
iTILs	<i>Intratumoural infiltrating lymphocytes</i>
ROR	<i>Risk of recurrence</i>
AED	Análisis de Expresión Diferencial
BAM	<i>Binary Alignment Map</i>
GO	Del inglés, <i>Gene Ontology</i>
KEGG	Del inglés, <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
VAF	Variant Allele Frequency
DGIdb	<i>Drug Gene Interaction Database</i>
FSH	Hormona estimuladora del folículo
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
NF- $\kappa$ B	Vía del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B)
EMT	<i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i>



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# TABLA DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 PRESENTACIÓN GENERAL</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2 HISTORIA DEL DESCUBRIMIENTO DE P185, NEU, C-ERBB-2 Ó HER-2/NEU</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3 CLASIFICACIÓN ACTUAL DEL CÁNCER DE MAMA</b> .....	<b>6</b>
1.3.1 <i>Subtipos histopatológicos: Heterogeneidad morfológica</i> .....	7
1.3.2 <i>Heterogeneidad en la expresión proteica del RE, RP y HER2: Subtipos                   inmunohistoquímicos</i> .....	8
1.3.3 <i>Clasificación molecular y genómica del CM</i> .....	11
<b>1.4 CÁNCER DE MAMA HER2-POSITIVO Y SUBTIPO HER2-ENRICHED</b> .....	<b>18</b>
1.4.1 <i>Inmunohistoquímica: pasado, presente y futuro</i> .....	19
1.4.2 <i>Retratos moleculares</i> .....	24
1.4.3 <i>Implicaciones clínicas</i> .....	33
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>
<b>2.1 HIPÓTESIS</b> .....	<b>47</b>
<b>2.2 OBJETIVOS</b> .....	<b>47</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
<b>3.1 DISEÑO Y POBLACIÓN DE ESTUDIO</b> .....	<b>51</b>
<b>3.2 VARIABLES</b> .....	<b>51</b>
<b>3.3 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS</b> .....	<b>52</b>
3.3.1 <i>Muestras tumorales</i> .....	52
<b>3.4 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA</b> .....	<b>53</b>
3.4.1 <i>Aislamiento del ARN</i> .....	53
3.4.2 <i>Expresión génica con la tecnología nCounter® Dx Analysis System (NanoString                   Technologies)</i> .....	53
3.4.3 <i>Análisis bioinformático de los datos de expresión</i> .....	57
<b>3.5 ANÁLISIS MUTACIONAL</b> .....	<b>58</b>
3.5.1 <i>Aislamiento del ADN y ARN</i> .....	58
3.5.2 <i>Genes y secuenciación en Ion GeneStudio S5™ System</i> .....	59
3.5.3 <i>Análisis bioinformático de las variantes encontradas a nivel de ADN</i> .....	60
<b>3.6 ANÁLISIS DE DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS A NIVEL DE EXPRESIÓN Y MUTACIONAL ENTRE HER2E Y RESTO DE SUBTIPOS</b> .....	<b>63</b>
<b>3.7 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA</b> .....	<b>64</b>
<b>3.8 LIMITACIONES DEL ESTUDIO</b> .....	<b>64</b>

<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>67</b>
<b>4.1</b>	<b>PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y PATOLÓGICAS</b> .....	<b>69</b>
<b>4.2</b>	<b>SUBTIPADO MOLECULAR POR PAM50</b> .....	<b>71</b>
<b>4.3</b>	<b>ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL</b> .....	<b>74</b>
4.3.1	<i>ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL SEGÚN VARIABLES CLÍNICAS</i> .....	76
4.3.2	<i>ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL POR SUBTIPO INTRÍNSECO: Her2-Enriched versus No Her2-Enriched</i> .....	78
4.3.3	<i>ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL Her2-Enriched agrupado versus Her2-Enriched no agrupado</i> .....	85
4.3.4	<i>ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL Her2-Enriched no agrupado versus no Her2 Enriched</i> .....	89
4.3.5	<i>ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL Her2-Enriched agrupado versus no Her2-Enriched</i> .....	91
4.3.6	<i>ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN SUBGRUPOS CLÍNICOS DE INTERÉS</i> .....	96
<b>4.4</b>	<b>ANÁLISIS DE DATOS GENÓMICOS</b> .....	<b>97</b>
4.4.1	<i>ALTERACIONES GENÓMICAS SEGÚN SUBTIPO INTRÍNSECO: HER2E versus no HER2</i> ..	99
4.4.2	<i>ALTERACIONES GENÓMICAS POR SUBTIPO INTRÍNSECO: HER2E agrupado versus no agrupado</i> .....	104
4.4.3	<i>ALTERACIONES GENÓMICAS POR SUBTIPO INTRÍNSECO: HER2E no agrupado versus no HER2E</i> .....	109
4.4.4	<i>ALTERACIONES GENÓMICAS SEGÚN SUBTIPO INTRÍNSECO: HER2E agrupado versus no HER2</i> .....	111
4.4.5	<i>ALTERACIONES GENÓMICAS SEGÚN RESPUESTA PATOLÓGICA A NEOADYUVANCIA</i>	114
<b>4.5</b>	<b>ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA</b> .....	<b>116</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>117</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>131</b>
<b>7.</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>137</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>159</b>

# LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> A) Tinción de hematoxilina-eosina para determinar el tipo histológico, junto a la inmunotinción para RE, RP y HER2 (izquierda). B) Inmunotinción de HER2 según criterios guía ASCO/CAP 2018.....	9
<b>Figura 2.</b> Resumen subtipos histológicos más frecuentes en CM, subtipos intrínsecos de Perou y Sorlie basados en la firma de expresión PAM50, y subtipos intrínsecos subrogados .....	13
<b>Figura 3.</b> Principales alteraciones en las vías más representativas en BC, según el perfil intrínseco, analizado en el proyecto TCGA.....	15
<b>Figura 4.</b> Distribución de los subtipos intrínsecos de PAM50 dentro de cada subtipo de CM analizado en el proyecto TCGA.....	16
<b>Figura 5.</b> Empleo de del ensayo GPA de HER2 en tejidos de CM fijados en parafina.....	23
<b>Figura 6.</b> Resultados de la técnica GPA en tejidos de CM FFPE que muestran heterogeneidad de poblaciones de células tumorales positivas para HER2 o poblaciones de células tumorales positivas aisladas. ....	23
<b>Figura 7.</b> Distribución de subtipos intrínsecos en tumores HER2 positivos (3390 tumores RH+/HER2+ y 2567 tumores RH-/HER2+).....	25
<b>Figura 8.</b> Representación y características genómicas del modelo evolutivo jerárquico de células madre stem y mamarias epiteliales en el CM-HER2 positivo.....	28
<b>Figura 9.</b> Naturaleza biológica y papel del HER2 amplificado en otros cánceres no mama.....	31
<b>Figura 10.</b> Mutaciones de ERBB2 en un análisis pan-cáncer. ....	32
<b>Figura 11.</b> Evolución de HER2 como biomarcador y diana de tratamiento del CM. ....	34
<b>Figura 12.</b> Principales mecanismos de resistencia antiHER2.....	41
<b>Figura 13.</b> Principales vías de señalización asociadas a HER2.....	42
<b>Figura 14.</b> Flujo de trabajo del sistema nCounter®.....	54
<b>Figura 15.</b> Genes incluidos en la firma PAM50.....	57
<b>Figura 16.</b> Lista de genes incluidos en el panel Oncomine Comprehensive Assay v3C.....	59
<b>Figura 17.</b> Secuenciación por Ion Torrent, método de secuenciación de ADN basado en la tecnología Ion AmpliSeq.....	60
<b>Figura 18.</b> Tipo de respuesta patológica según clasificación “Residual Cancer Burden” (RCB) a tratamiento neoadyuvante (n=28 pacientes). Tasas de respuesta por tipo RCB (izquierda) y número de casos en cada grupo en función de subtipo intrínseco y estatus RH (derecha). ....	70
<b>Figura 19.</b> Distribución de subtipo intrínseco y estado de RH en la población con respuesta patológica completa (rCP) tras neoadyuvancia. ....	71
<b>Figura 20.</b> Gráfico de frecuencias de los subtipos intrínsecos en la población total del estudio y según estado del RH.....	72
<b>Figura 21.</b> Análisis exploratorio inicial de los datos de expresión de genes normalizados. Heatmap y clustering jerárquico no supervisado. ....	74

<b>Figura 22.</b> Análisis exploratorio inicial de los datos de expresión de firmas normalizadas. Heatmap y clustering jerárquico no supervisado. ....	75
<b>Figura 23.</b> Diagramas de cajas para análisis de expresión diferencial según estado menopáusico. ....	76
<b>Figura 24.</b> Diagramas de cajas para análisis de expresión diferencial según receptor hormonal. ....	77
<b>Figura 25.</b> Se representan todas las firmas según p-valor ajustado ( $p < 0.05$ ) obtenido en el análisis de expresión diferencial D (eje de ordenadas) y el valor Log2FC (eje de abscisas), mostrando la diferencia de expresión cada firma entre la categoría “estado RH positivo versus negativo (baseline) en el eje x, con la importancia (valor p) a lo largo del eje y. ....	78
<b>Figura 26.</b> Análisis exploratorio inicial de los datos de expresión de genes normalizados mediante PCA (HER2E y no HER2E). ....	79
<b>Figura 27.</b> PCA de casos y genes expresados diferencialmente entre grupos (HER2E y no HER2E). ....	80
<b>Figura 28.</b> Volcano plot para todos los genes expresados diferencialmente entre los grupos (HER2E y no HER2E). ....	80
<b>Figura 29.</b> Heatmap y clustering jerárquico no supervisado de casos y genes expresados diferencialmente entre grupos (HER2E y no HER2E). ....	81
<b>Figura 30.</b> Análisis funcional de los genes diferencialmente expresados entre grupos (HER2E y no HER2E) con términos GO (izquierda) y KEGG (derecha). ....	82
<b>Figura 31.</b> Análisis exploratorio inicial de los datos de expresión de firmas normalizados mediante PCA (HER2E y no HER2E). ....	83
<b>Figura 32.</b> PCA de casos y firmas expresadas diferencialmente entre grupos (HER2E y no HER2E). ....	83
<b>Figura 33.</b> Volcano plot para todas las firmas expresadas diferencialmente entre grupos (HER2E y no HER2E). ....	84
<b>Figura 34.</b> Heatmap de casos y firmas expresadas diferencialmente entre grupos (HER2E y no HER2E). ....	84
<b>Figura 35.</b> Análisis exploratorio inicial de los datos de expresión de genes normalizados mediante PCA (HER2E agrupado y no agrupado). ....	85
<b>Figura 36.</b> PCA de casos y genes expresados diferencialmente entre grupos (HER2E agrupado y no agrupado). ....	86
<b>Figura 37.</b> Volcano plot para los genes diferencialmente expresados entre grupos (HER2E agrupado y no agrupado). ....	86
<b>Figura 38.</b> Heatmap de casos y genes expresados diferencialmente entre grupos (HER2E agrupado y no agrupado). ....	87
<b>Figura 39.</b> Análisis funcional de los genes diferencialmente expresados entre grupos (HER2E agrupado y HER2E no agrupado) con términos GO (izquierda) y KEGG (derecha). ....	87
<b>Figura 40.</b> Análisis exploratorio inicial de los datos de expresión de firmas normalizados mediante PCA (HER2E agrupado y no agrupado). ....	88
<b>Figura 41.</b> Volcano plot (izquierda) y Heatmap (derecha) de casos y firmas diferencialmente expresadas entre grupos (HER2E agrupado y no agrupado). ....	88

<b>Figura 42.</b> Análisis exploratorio inicial de los datos de expresión de genes normalizados mediante PCA (HER2E no agrupado y no HER2E).....	89
<b>Figura 43.</b> Volcano plot (izquierda) y Heatmap (derecha) de casos y genes diferencialmente expresados entre grupos (HER2E no agrupado y no HER2E).....	90
<b>Figura 44.</b> Análisis exploratorio inicial de los datos de expresión de firmas normalizados mediante PCA (HER2E no agrupado y no HER2E).....	90
<b>Figura 45.</b> Volcano plot (izquierda) y Heatmap (derecha) de casos y firmas expresados diferencialmente entre grupos (HER2E no agrupado y no HER2E).....	91
<b>Figura 46.</b> Análisis exploratorio inicial de los datos de expresión de genes normalizados mediante PCA (HER2E agrupado y no HER2E).....	91
<b>Figura 47.</b> PCA de casos y genes expresados diferencialmente entre grupos (HER2E agrupado y no HER2E).....	92
<b>Figura 48.</b> Volcano plot para los genes diferencialmente expresados entre grupos (HER2 agrupado y no HER2E).....	92
<b>Figura 49.</b> Heatmap de casos y genes expresados diferencialmente entre grupos (HER2 agrupado y no HER2E).....	93
<b>Figura 50.</b> Análisis funcional de genes diferencialmente expresados entre grupos (HER2E no agrupado y no HER2E) con términos GO (izquierda) y KEGG (derecha).....	94
<b>Figura 51.</b> Análisis exploratorio inicial de los datos de expresión de firmas normalizados mediante PCA (HER2E agrupado y no HER2E).....	94
<b>Figura 52.</b> PCA de casos y firmas expresadas diferencialmente entre grupos (HER2E agrupado y no HER2E).....	95
<b>Figura 53.</b> Volcano plot para las firmas diferencialmente expresadas entre grupos (HER2 agrupado y no HER2E).....	95
<b>Figura 54.</b> Heatmap de casos y firmas expresados diferencialmente entre grupos (HER2 agrupado y no HER2E).....	96
<b>Figura 55.</b> Heatmap de casos y genes expresados diferencialmente entre grupos (Neo pCR y Neo No-pCR).....	97
<b>Figura 56.</b> Resumen de las alteraciones genómicas SNVs e indels pre (A) y post (B) filtrado.....	98
<b>Figura 57.</b> Número de variantes por muestra, los tipos de variantes y los 10 genes más frecuentemente mutados en los casos HER2E.....	99
<b>Figura 58.</b> Número de variantes por muestra, los tipos de variantes y los 10 genes más frecuentemente mutados en los casos no HER2E.....	100
<b>Figura 59.</b> Oncoplot de genes mutados por muestra y tipo de mutación (izquierda, HER2E; derecha no HER2E).....	101
<b>Figura 60.</b> Frecuencia alélica de las variantes para los genes más frecuentemente mutados (izquierda, HER2E; derecha no HER2E).....	101
<b>Figura 61.</b> Análisis de interacciones somáticas con descripción de pares de genes co-mutados o mutuamente excluyentes (izquierda, HER2E; derecha no HER2E).....	101

<b>Figura 62.</b> Análisis de interacciones fármaco-gen según la DGIdb ((izquierda, HER2E; derecha no HER2E).....	102
<b>Figura 63.</b> Resumen del enriquecimiento en rutas de señalización oncogénica en base a la información reco-gida en TCGA (izquierda, HER2E; derecha no HER2E).....	102
<b>Figura 64.</b> CNVs de ERBB2 según subtipo intrínseco (izquierda) y según estatus clínico-diagnóstico de HER2 (derecha). ....	103
<b>Figura 65.</b> Número de variantes por muestra, los tipos de variantes y los 10 genes más frecuentemente mutados en los casos HER2E agrupados. ....	104
<b>Figura 66.</b> Número de variantes por muestra, los tipos de variantes y los 10 genes más frecuentemente mutados en los casos HER2E no agrupados. ....	105
<b>Figura 67.</b> Oncoplot de genes mutados por muestra/tipo de mutación (izquierda, HER2E agrupados; derecha HER2E no agrupados). ....	106
<b>Figura 68.</b> Frecuencia alélica de las variantes para los genes más frecuentemente mutados (izquierda, HER2E agrupados; derecha HER2E no agrupados). ....	106
<b>Figura 69.</b> Análisis de interacciones somáticas con descripción de pares de genes co-mutados o mutuamente excluyentes (izquierda, HER2E agrupados; derecha HER2E no agrupados). ....	107
<b>Figura 70.</b> Análisis de interacciones fármaco-gen según la DGIdb (izquierda, HER2E agrupados; derecha HER2E no agrupados). ....	107
<b>Figura 71.</b> Resumen del enriquecimiento en rutas de señalización oncogénica en base a la información recogida en el TCGA (izquierda, HER2E agrupados; derecha HER2E no agrupados). ....	107
<b>Figura 72.</b> Oncoplot de genes mutados por muestra y tipo de mutación (izquierda, HER2E no agrupado; derecha no HER2E).....	109
<b>Figura 73.</b> Frecuencia alélica de las variantes para los genes más frecuentemente mutados (izquierda, HER2E no agrupado; derecha no HER2E).....	110
<b>Figura 74.</b> Resumen del enriquecimiento en rutas de señalización oncogénica en base a la información recogida en TCGA (izquierda, HER2E no agrupado; derecha no HER2E).....	110
<b>Figura 75.</b> Oncoplot de genes mutados por muestra y tipo de mutación (izquierda, HER2E agrupados; derecha no HER2E). ....	112
<b>Figura 76.</b> Frecuencia alélica de las variantes para los genes más frecuentemente mutados (izquierda, HER2E agrupados; derecha no HER2E). ....	112
<b>Figura 77.</b> Resumen del enriquecimiento en rutas de señalización oncogénica en base a la información recogida en el TCGA. ....	113
<b>Figura 78.</b> Oncoplot de genes mutados por muestra y tipo de mutación (izquierda, Neo pCR; derecha Neo No-pCR). ....	114
<b>Figura 79.</b> Frecuencia alélica de las variantes para los genes más frecuentemente mutados. (izquierda, Neo pCR.; derecha Neo No-pCR). ....	115

# LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Principales datos sobre expresión ARNm, número de copias, mutaciones ADN y expresión de proteínas en muestras de tejido de CM dentro del proyecto TCGA. ....	15
<b>Tabla 2.</b> Principales características de los clusters integradores de 2.000 muestras de tumores de mama (IntClus). ....	17
<b>Tabla 3.</b> Resumen de las recomendaciones de la guía ASCO/CAP de 2018 (originales y centradas en las recomendaciones actualizadas). ....	20
<b>Tabla 4.</b> Resumen de los diferentes escenarios según resultados de la prueba de ISH y recomendaciones finales para determinar el estatus de HER2 según la ASCO/CAP 2018. ....	21
<b>Tabla 5.</b> Firmas incluidas en el panel Breast Cancer 360 <sup>TM</sup> . ....	55
<b>Tabla 6.</b> Lista de genes incluidos panel Breast Cancer 360 <sup>TM</sup> . ....	56
<b>Tabla 7.</b> Principales características clínicas de las pacientes y tumores incluidos en el estudio (izquierda); edad (media) y distribución de la variable en la población (derecha). ....	70
<b>Tabla 8.</b> Distribución de los subtipos intrínsecos por análisis de expresión mediante la firma PAM50 en el total de la población del estudio (izquierda); distribución de los subtipos intrínsecos según el estado del RH (derecha). ....	72
<b>Tabla 9.</b> Resultados por subtipo intrínseco según PAM50 y ROR score. ....	73
<b>Tabla 10.</b> Principales características clínico-patológicas en el grupo tratado con terapia neoadyuvancia, respuesta patológica completa y sobreexpresión de INHBB. ....	121
<b>Tabla 11.</b> Principales características clínico-patológicas, CNV ERBB2 del grupo HER2E no agrupado. ....	124



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# ANEXOS

## Lista de documentos anexo

<i>Documento 1. Revisión bibliográfica sobre las implicaciones clínicas y biológicas de la heterogeneidad tumoral en el CM HER2 positivo.....</i>	<i>163</i>
<i>Documento 2. Documento que acredita la aprobación del estudio por parte del Comité Coordinador de Ética de la Investigación Biomédica de Andalucía .....</i>	<i>167</i>
<i>Documento 3. Consentimiento específico de proyecto.....</i>	<i>171</i>

## Lista de figuras anexo

<i>Figura Anexo 2. PI3K-AKT SIGNALING PATHWAY (KEGG) .....</i>	<i>181</i>
<i>Figura Anexo 3. EGFR TYROSINE KINASE RESISTANCE (KEGG) .....</i>	<i>182</i>
<i>Figura Anexo 4. ENDOCRINE RESISTANCE (KEGG).....</i>	<i>183</i>
<i>Figura Anexo 5. ESTROGEN SIGNALING PATHWAY (KEGG) .....</i>	<i>184</i>
<i>Figura Anexo 6. SIGNALING PATHWAYS REGULATING PLURIPOTENCY OF STEM CELLS (KEGG) .....</i>	<i>185</i>
<i>Figura Anexo 7. ENDOCYTOSIS PATHWAY (KEGG).....</i>	<i>186</i>
<i>Figura Anexo 8. CALCIUM SIGNALING PATHWAY (KEGG).....</i>	<i>187</i>
<i>Figura Anexo 9. FOCAL ADHESION (KEGG).....</i>	<i>188</i>
<i>Figura Anexo 10. RAPI SIGNALING PATHWAY (KEGG).....</i>	<i>189</i>
<i>Figura Anexo 11. RAS SIGNALING PATHWAY (KEGG) .....</i>	<i>190</i>

## Lista de tablas anexo

<i>Tabla Anexo 1. Firmas que presentan expresión diferencial entre grupos (RH negativos y positivos)..</i>	<i>194</i>
<i>Tabla Anexo 2. Genes que presentan expresión diferencial entre grupos (HER2E y no HER2E).....</i>	<i>195</i>
<i>Tabla Anexo 3. Figuras que presentan expresión diferencial entre grupos (HER2E y no HER2E) .....</i>	<i>195</i>
<i>Tabla Anexo 4. Genes que presentan expresión diferencial entre grupos (HER2E agrupados y no agrupados) .....</i>	<i>196</i>
<i>Tabla Anexo 5. Firmas con expresión diferencial entre grupos (HER2E agrupado y no agrupado) .....</i>	<i>196</i>
<i>Tabla Anexo 6. Resultados del análisis de expresión diferencial a nivel de firma para las firmas incluidas en el panel Breast Cancer 360<sup>TM</sup> (HER2E no agrupados y no HER2E) .....</i>	<i>197</i>
<i>Tabla Anexo 7. Genes con expresión diferencial entre grupos (HER2E agrupado y no HER2E) .....</i>	<i>198</i>
<i>Tabla Anexo 8. Firmas con expresión diferencial HER2E agrupado versus no HER2E.....</i>	<i>198</i>
<i>Tabla Anexo 9. Análisis de diferencia de frecuencias de SNVs-indels (HER2E vs no HER2E) .....</i>	<i>199</i>



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# 1. INTRODUCCIÓN

---

*“Me enseñaron que el camino del progreso no era rápido ni fácil”*

**Marie Curie**

(1867-1934)



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## **1.1 PRESENTACIÓN GENERAL**

El cáncer de mama (CM) es la neoplasia más frecuente y una de las principales causas de mortalidad por cáncer en la mujer, a pesar de las importantes mejoras diagnósticas y terapéuticas obtenidas en las últimas décadas. Por el contrario, el CM masculino es una enfermedad rara con una incidencia <1% y siendo en su mayoría clasificada por inmunohistoquímica (IHQ) como una enfermedad luminal<sup>8</sup>. El CM está modelado por un grupo de enfermedades heterogéneas, con una gran variabilidad dentro de un mismo tumor, lo que conocemos como heterogeneidad intra-tumoral, así como entre tumores de un mismo fenotipo en distintos pacientes, esto es, heterogeneidad inter-tumoral. Por tanto, todos los tipos de CM comparten una heterogeneidad morfológica, molecular y genómica sustancial, lo que afecta al comportamiento clínico, respuesta al tratamiento y supervivencia.

En la era actual, la de medicina de precisión, es un objetivo crucial en el tratamiento de cualquier tumor la toma de decisiones clínicas a través de un conocimiento exhaustivo del perfil molecular del tumor en cuestión para así predecir el resultado clínico de forma individualizada. La alta variabilidad inter-paciente de componentes microambientales del tumor como las células estromales o la matriz extracelular, junto con la variabilidad en otras células de los pacientes que pueden participar en la diseminación metastásica de la enfermedad (por ejemplo, células del sistema inmune), añaden un nivel adicional de complejidad a la heterogeneidad del CM [3].

De este modo, la heterogeneidad es una de las áreas más relevantes de investigación en CM, fundamental para mejorar el diagnóstico, identificar biomarcadores pronósticos y predictivos, y diseñar estrategias terapéuticas eficaces. Gracias al desarrollo de tecnologías moleculares de alto rendimiento, actualmente ya podemos analizar cambios en el contexto genómico, epigenético y proteómico, lo que permite mejorar la comprensión de la complejidad biológica del CM.

## 1.2 HISTORIA DEL DESCUBRIMIENTO DE p185, neu, c-erbB-2 ó HER-2/neu

Uno de los biomarcadores con mayor heterogeneidad en CM es el *Receptor 2 del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano* (HER2), un componente de la familia de los receptores de crecimiento epidérmico (receptores *ErbB*), receptores con actividad tirosina cinasa (RTK). Se trata de la familia de receptores de factores de crecimiento mejor caracterizados en las neoplasias epiteliales. En mamíferos está compuesta por *EGFR* ó *ERbB1/HER1*, *ERbB2/HER2*, *ERbB3/HER3* y *ERbB4/HER4*, y son activados por más de 40 ligandos de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF) conocidos actualmente. Esta familia de receptores y sus ligandos juegan un papel crucial en la oncogénesis y en la progresión tumoral del CM<sup>9,10</sup>. La proteína HER2 es producto de un protooncogén específico conocido como *ErbB2/ERBB2* localizado en el brazo largo del cromosoma 17, en el locus *17q21.1*. En condiciones normales, la proteína HER2 desempeña un papel importante en el crecimiento de las células epiteliales del revestimiento externo e interno del organismo, así como del tejido glandular. Las células epiteliales de las unidades ductolobulillares de la glándula mamaria son un ejemplo básico de células epiteliales. La proteína HER2 se puede encontrar dispersa en la membrana celular. Su actividad tirosina cinasa corresponde al dominio intracitosólico y transmite señales hasta el núcleo de la célula, dirigiendo así el crecimiento celular.

El descubrimiento del protooncogén *HER2/neu* se remonta a principios de la década de los 80<sup>11</sup>, identificado inicialmente como un nuevo gen transformador, resultado de estudios de transfección a líneas celulares sanas, de ADN de líneas celulares de rata con neuroblastoma, glioma y carcinoma inducidos. En aquel momento se le llamó *neu* y se demostró que este gen era homólogo al protooncogén *ErbB* que codifica para *EGFR/ErbB1/HER1*<sup>12</sup>, y que la proteína que codificaba, p185 (antígeno tumoral de masa molecular relativa (Mr) de 185.000 daltons) que hoy día conocemos como HER2, se relacionaba serológicamente con *EGFR*, coexistiendo ambas proteínas en células de rata no transformadas, lo que apoyaba que se trataba de dos proteínas distintas. Un equipo de investigadores del *Massachusetts Institute of Technology* <sup>13</sup>,

empleando un clon de ADN complementario (ADNc) a *neu*, aislado a su vez de una línea celular transformada por dicho oncogen, determinaron que la secuencia de nucleótidos de este ADNc predecía una proteína transmembrana de 1260 aminoácidos (aa) muy similar en estructura al *EGFR*, con una concordancia del 50% de los aminoácidos predichos de *neu* con los de *EGFR* y de más del 80% de los aa en el dominio tirosina cinasa. En dos trabajos posteriores<sup>10,14</sup>, mediante el uso de sondas del oncogén retroviral *v-erb-B* y del *EGFR/erb-B* humano se seleccionaron bibliotecas de ADN genómico y ADNc humano, y los autores aislaron de forma independiente genes relacionados con *EGFR/erb-B* humano que llamaron *HER2*<sup>14</sup> y *c-erbB2*<sup>10</sup>. Finalmente, gracias a estudios de mapeo cromosómico, se reveló que los tres genes que se habían denominado *neu*, *c-erbB-2* y *HER2* eran el mismo gen<sup>15</sup>. Un cuarto grupo, que también utilizó *v-erbB* como sonda, identificó el mismo gen con una amplificación de 5 a 10 veces en una línea celular de CM llamada MAC-117, siendo esta la primera descripción de la amplificación de *HER2* en CM<sup>16</sup>. Este hallazgo fue finalmente confirmado en la clínica por *Slamon et al*, donde tras el análisis de 189 muestras de CM se encontró que *HER2/neu* estaba amplificado de 2 a 20 veces en el 30% de los casos estudiados y que esta amplificación génica era un biomarcador pronóstico negativo tanto de supervivencia global (SG) como de tiempo hasta la recaída, con un valor pronóstico más elevado que otros factores pronósticos clásicos como son el receptor hormonal (RH) o la afectación ganglionar axilar<sup>17</sup>. La sobreexpresión de la proteína *HER2* definió así el CM-*HER2* positivo, tradicionalmente asociado a un peor pronóstico y a peores tasas de supervivencia. Afortunadamente, importantes avances terapéuticos de las últimas décadas han mejorado el tratamiento clínico de la enfermedad *HER2* en CM y, por tanto, su pronóstico.

Varias décadas más tarde, llegaría el descubrimiento de los subtipos intrínsecos mediante análisis de expresión génica y estudios de transcriptómica<sup>18</sup>. Disponemos ya de suficiente evidencia clínica y molecular para considerar al CM-*HER2* positivo como una entidad dentro del CM caracterizada por una heterogeneidad compleja e intrínseca a múltiples niveles<sup>19</sup>, incluyendo a nivel *célula-a-célula*. En la práctica clínica, existe una controversia clásica para la determinación del estatus clínico de *HER2*, con numerosas guías internacionales y actualizaciones que persiguen

unificar criterios y llegar a un consenso homogéneo universal. Para el diagnóstico clínico, los CM-HER2 positivo se clasifican por IHQ y/o por estudios de hibridación *in situ* (ISH)<sup>20</sup>.

Los análisis de expresión génica han tenido un impacto a gran escala en el estudio de la heterogeneidad biológica del CM y de este fenotipo tumoral<sup>21</sup>. No obstante, en este ámbito existe aún una variabilidad considerable que complica el categorizar las bases del diagnóstico histopatológico, y, por ende, el abordaje terapéutico. Los subtipos intrínsecos moleculares del CM se han caracterizado ampliamente, y dentro del CM-HER2 positivo el subtipo más representativo es el HER2-enriquecido o *HER2-enriched* (HER2E), si bien podemos encontrar tumores de mama HER2 positivos con subtipo intrínseco *luminal A (LumA)*, *luminal B (LumB)* o incluso, *basal-like (BAL)*<sup>22</sup>. En una aproximación simple, el subtipo intrínseco HER2E se define por una mayor expresión de HER2 a nivel de ARNm y de proteína que otros subtipos, una mayor activación de la vía *HER2/EGFR*, un estroma inmuno-activado con aumento de la infiltración tumoral de linfocitos y además una mayor expresión de los genes relacionados con la proliferación tumoral<sup>22,23</sup>. Estudios recientes confirman que este subtipo obtiene los mejores resultados clínicos y terapéuticos con el uso de fármacos anti-HER2, con o sin quimioterapia, tanto en escenario adyuvante como neoadyuvante, e independientemente del estatus clínico de HER2<sup>19</sup>. No obstante, no más del 50% de los tumores clínicamente HER2 positivos son HER2E, y lo que es más significativo, podemos encontrar este subtipo molecular en el CM-HER2 negativo, tumores que no llegan a recibir terapias anti-HER2 al no estar aprobadas para el tratamiento de tumores de mama con estatus clínico negativo para HER2.

### 1.3 CLASIFICACIÓN ACTUAL DEL CÁNCER DE MAMA

La heterogeneidad inter-tumoral del CM se ilustra ya desde la estadificación clínica de la enfermedad. El sistema de estadificación TNM según la *American Joint Committee on Cancer* y *Union for International Control del Cáncer (AJCC/UICC)* agrega información sobre el tamaño del tumor (T), grado de afectación de los ganglios linfáticos regionales (N) o la presencia de metástasis a distancia (M)<sup>24</sup>. Con la 8ª edición de la

clasificación *AJCC/TNM* publicada en 2018 se esboza una nueva clasificación pronóstica que además de criterios anatómicos incluye factores biológicos (expresión de RH, HER2 y grado histológico)<sup>24,25</sup>. En práctica clínica, tras la estadificación clínica, el siguiente paso es la valoración de criterios histológicos sobre el tumor primario (obtenido mediante cirugía y/o biopsia) englobando un análisis morfológico e inmunohistoquímico para testar el perfil de biomarcadores. Esto se corresponde con una clasificación clásica y no molecular del CM, y es el estándar en la práctica clínica habitual para determinar el tipo tumoral de CM. Los criterios patológicos clásicos, como son el tipo histológico, tamaño del tumor, grado y el estado de los ganglios linfáticos axilares, son esenciales en la evaluación pronóstica inicial<sup>26</sup>. La expresión de los RH, entre los que se incluyen el receptor de estrógeno (RE) y de progesterona (RP), determinada mediante IHQ y el estatus de HER2 medido por sobreexpresión proteica (IHQ) y/o amplificación génica (ISH), otorgan valor pronóstico adicional y predictivo, siendo elemental para definir los algoritmos de tratamiento<sup>26,27</sup>, como se discutirá en los siguientes apartados.

### 1.3.1 Subtipos histopatológicos: Heterogeneidad morfológica

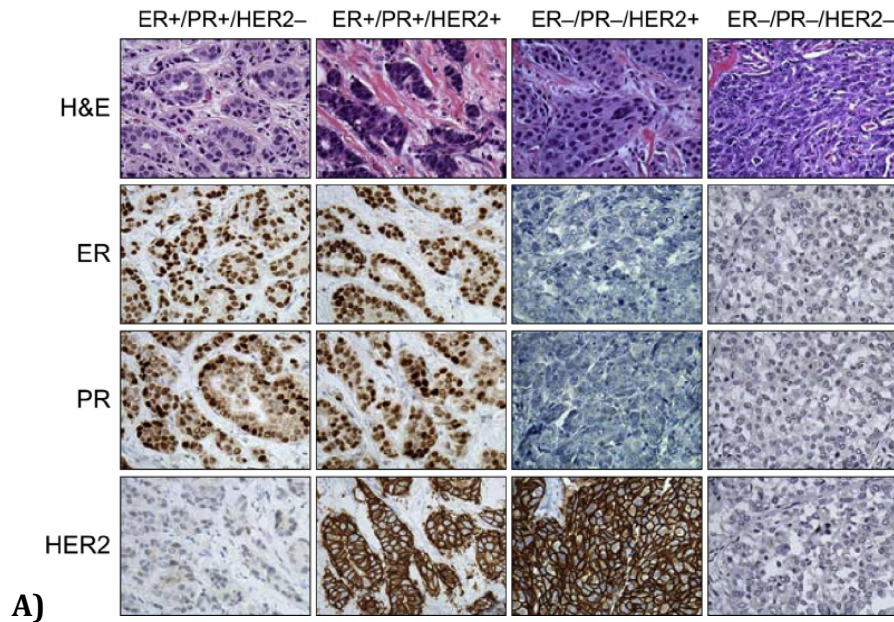
La clasificación histopatológica del CM se establece por la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2012<sup>28</sup>, y posterior actualización en 2019<sup>29</sup>. Esta clasificación incluye el grado y el tipo histológico. El grado histológico evalúa en una escala del 1 al 3 qué tan similar es un tumor al epitelio normal: un tumor de bajo grado se parece más al epitelio normal que un tumor de alto grado<sup>26</sup>. El grado tumoral es otra característica intrínseca de la heterogeneidad tumoral del CM<sup>30</sup>.

Según su patrón morfológico y citológico, los CM se pueden clasificar en alrededor de 18 tipos histológicos. La mayoría de los tumores primarios de mama se clasifican como *carcinoma invasivo de tipo no especial*, tratándose de neoplasias que aparecen en los ductos mamarios, llamados carcinoma ductal infiltrante (CDI) no especificado (CDI-NOS) y que constituyen más del 70% de los casos, o en los lobulillos y conductos terminales de la mama siendo estos conocidos como carcinoma lobulillar invasivo (CLI) con una incidencia inferior al CDI, situada en torno al 10 %. Existen otros

subtipos histológicos especiales como son los carcinomas medulares, papilares, metaplásicos, cribiformes, apocrinos, secretorios, mucinosos, y tubulares, entre otros<sup>28,29</sup>, en su mayoría considerados subtipos raros, de menor incidencia y prevalencia, y que difieren de forma significativa entre ellos y respecto a los tipos histológicos principales, tanto a nivel pronóstico como de respuesta a los tratamientos<sup>31</sup>.

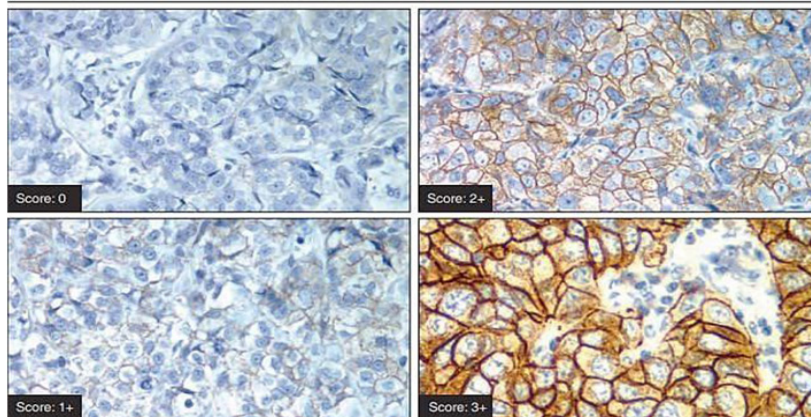
### **1.3.2 Heterogeneidad en la expresión proteica del RE, RP y HER2: Subtipos inmunohistoquímicos**

A través de la caracterización del estado de los RH (RE y RP) y de HER2, podemos clasificar el CM en tres fenotipos o entidades clínicas. Los CM con RH positivos y HER2-negativo, se definen como positivos por la expresión medida por IHQ del RE y/o RP en  $\geq 1\%$  de las células tumorales invasivas<sup>32,33</sup> y HER2 negativo. Constituyen el fenotipo clínico conocido como *CM luminal* y suponen el 65-70% de todos los CM. Con el estudio por IHQ del RE se determina la positividad como el grado de expresión en tanto por ciento, que a su vez se correlaciona a nivel molecular con la expresión génica del RE (una *fosfoproteína* que actúa como factor de transcripción) y principalmente de su isoforma-*alfa* codificada por el gen *ESR1*. Los RE y RP se expresan en alrededor del 80% y el 65% de los CM respectivamente<sup>33</sup>. Aunque los tumores con RE-positivos (RE+) co-expresan el RP en la mayoría de los CM, algunos casos son RE+ con RP-negativo (RP-) y, otros, con una prevalencia que no supera el 1%, son tumores con RE negativo (RE-) y RP-positivo (RP+)<sup>34,35</sup>. Las tasas de respuesta a la terapia hormonal clásica, así como las tasas de SG parecen ser mayores en los CM con positividad para RE y RP, con tasas más bajas en los RE+/RP-, y dispares en tumores RE-/RP+<sup>35,36</sup>. Aproximadamente el 20% de los CM presentan sobreexpresión de HER2 y/o amplificación de *ERBB2*, y más del 50 % de estos CM co-expresan RH<sup>27,37</sup>. Estos tumores se clasifican en la práctica clínica como CM-HER2 positivos. Los restantes, con negatividad para RH (RE y/o RP) y para HER2, se conocen como CM triple negativo (CMTN) (Figura 1).



A)

Score to Report	HER2 Protein Overexpression Assessment	Staining Pattern
0	Negative	No staining is observed, or membrane staining is observed in <10% of the tumor cells.
1+	Negative	A faint/barely perceptible membrane staining is detected in >10% of tumor cells. The cells exhibit incomplete membrane staining.
2+	Weakly Positive*	A weak to moderate complete membrane staining is observed in >10% of tumor cells.
3+	Positive	A strong complete membrane staining is observed in >10% of tumor cells.



B)

**Figura 1.** A) Tinción de hematoxilina-eosina para determinar el tipo histológico, junto a la inmunotinción para RE, RP y HER2 (izquierda). B) Inmunotinción de HER2 según criterios guía ASCO/CAP 2018.

Los tumores catalogados como *HER2-low*, son aquellos definidos por una puntuación IHQ de HER2 de 1+ o 2+ con ISH negativo<sup>20</sup>, independientemente del estado de los RH (Figura 1), y representan la mayoría de los CM negativos para HER2. Los resultados de un análisis integral retrospectivo con muestras de más de 3500 pacientes revelaron que los subtipos intrínsecos luminales abarcan la mayoría de los tumores *HER2-low* con RH positivos, siendo el subtipo HER2E infrecuente (<5%), y a su vez con una

distribución similar entre los tumores HER2 0 y *HER2-low*. Esta distribución de subtipo fue consistente con un patrón de expresión diferencial del gen *ERBB2* entre tumores con HER2 0 y *HER2-low*, especialmente en el grupo con RH positivos, no observándose diferencias significativas en la distribución entre los CMTN según una subdivisión por niveles de IHQ de HER2<sup>38</sup>. Además, el estado *HER2-low* no tuvo ningún impacto pronóstico. Por ello, no hay evidencia actual que respalde que el subgrupo de tumores *HER2-low* sea una entidad nosológica independiente<sup>39</sup>, si bien podría representar un subconjunto de tumores con cierta activación de la vía HER2, con una asociación baja o nula con el subtipo intrínseco y que merece especial atención debido a sus posibles implicaciones terapéuticas<sup>40</sup>.

Un cuarto marcador proteico emergente, el receptor de andrógenos (RA), se innoexpresa en más del 70% de los tumores primarios de mama<sup>41</sup> y por lo general, su expresión se correlaciona con la del RE y RP. La prevalencia de este marcador, es mayor en los tumores de mama con RH positivos que en los CMTN (75% frente a 31,8%)<sup>42</sup> o CM-HER2 positivo, aportando información únicamente de tipo pronóstico al existir datos publicados que lo asocian a mejores datos de SG y libre de recidiva para tumores luminales y habiéndose descartado de forma reciente su valor pronóstico en el CMTN<sup>43</sup>. Dado que en la práctica clínica aún no existe un tratamiento dirigido para este marcador, su determinación rutinaria no está justificada. Otros biomarcadores con expresión heterogénea en el CM incluyen *EGFR*, TP53, *c-Myc*, y marcadores de proliferación celular clásicos como el Ki-67<sup>44,45</sup>. El Ki-67 es una proteína nuclear, expresada en todas las fases del ciclo celular excepto en la fase G0, y constituye un marcador celular de proliferación con valor pronóstico y predictivo en numerosas neoplasias entre las que se incluyen el CM<sup>44,46</sup>.

Aun así, esta clasificación clásica de los tumores de mama presenta una serie de limitaciones importantes. La principal es la inquietante variabilidad en la respuesta terapéutica y evolución clínica incluso para tumores con características clínicas y patológicas idénticas. En segundo lugar, esta clasificación proporciona un conocimiento limitado de la biología y las múltiples vías moleculares que dividen al CM en distintos subtipos y que suelen estar implicadas en la heterogeneidad de tumor, tanto

en estadios precoces como en la progresión metastásica, lo que la aleja en última instancia del paradigma del tratamiento personalizado.

### **1.3.3 Clasificación molecular y genómica del CM**

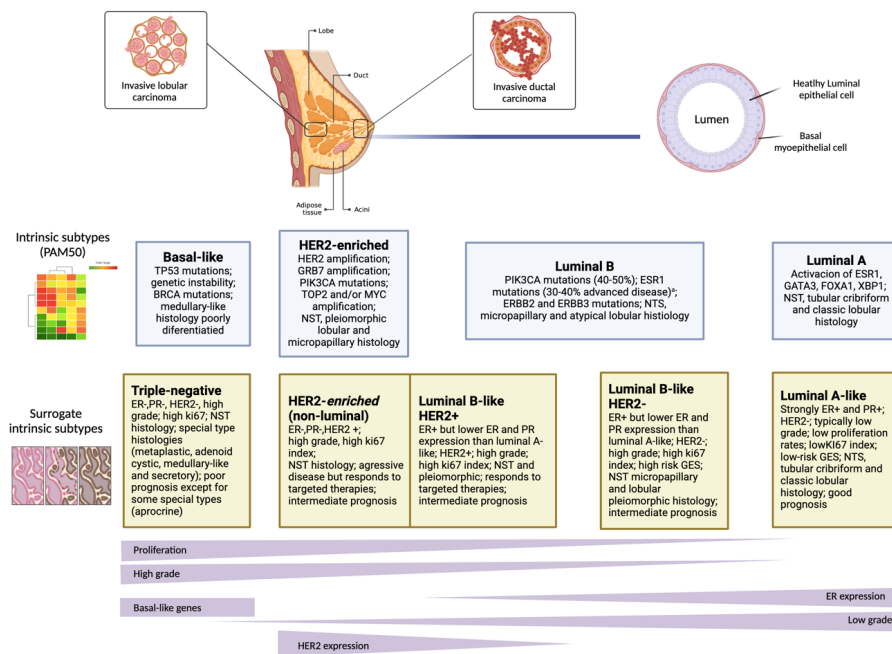
Los estudios de expresión génica han tenido un gran impacto para el conocimiento de la biología del CM, habiendo hecho posible explorar el perfil molecular completo de esta neoplasia. Las diferencias en los patrones de expresión génica muestran alteraciones básicas en la biología de las células tumorales y una variación significativa en términos de comportamiento clínico, supervivencia<sup>18,47-49</sup> y de respuesta terapéutica<sup>49-64</sup>, tanto en el escenario de enfermedad localizada como en el de enfermedad avanzada. La identificación de varios subtipos moleculares supuso la primera aproximación a la heterogeneidad molecular del CM<sup>65</sup>. Fue en el año 2000, cuando el profesor *Charles M. Perou* y colaboradores, describieron los subtipos intrínsecos moleculares basados en patrones de expresión génica empleando micromatrices de ADN que representaban más de 8000 genes en 65 muestras quirúrgicas y de 17 de líneas celulares de CM. En este trabajo, se identificaron cuatro subtipos moleculares principales que se denominaron *luminal A*, *luminal B*, *HER2-enriquecido* y *Basal-like*, con otro subtipo intrínseco menos caracterizado conocido como *Normal-like*. Estas entidades componen los subtipos intrínsecos moleculares del CM, entidades pronósticas y con implicaciones terapéuticas que se extienden a las 3 entidades clínicas de CM conocidas, y que han expuesto diferencias cruciales a nivel clínico y terapéutico (Figura 2).

La heterogeneidad tumoral dentro de los CM con RH positivos está abarcada principalmente por los subtipos LumA y LumB, con mejores resultados de supervivencia con respecto a los subtipos intrínsecos no luminales<sup>64</sup>. Ambos subtipos luminales, tienen patrones de expresión que recuerdan al componente epitelial de la mama, incluida la expresión de citoqueratinas (CK) 8 y 18, RE y genes asociados con la activación del RE como el gen *CCND1*<sup>21</sup>. A nivel molecular el subtipo LumB parece ser radicalmente distinto al LumA tanto a nivel de expresión génica, variaciones en número de copias (del inglés, *copy number variation* o CNV) o mutaciones, así como de comportamiento clínico y terapéutico. La principal distinción molecular entre ambos subtipos luminales es que, en general, el LumB tiene una expresión más baja de

genes relacionados con el RE, una expresión baja o negativa del RP y mayor expresión de genes relacionados con la proliferación celular (por ej. *MKI67* y *AURKA*) incluyendo HER2<sup>66</sup>. Todas estas características le confieren un pronóstico más desfavorable respecto al otro subtipo intrínseco luminal y peores tasas de respuesta a la hormonoterapia clásica<sup>21</sup>.

El subtipo BAL es el subtipo intrínseco dominante en el espectro del CMTN, si bien también podemos encontrarlo en algunos CM con RH positivos y en CM-HER2 positivo. Se caracteriza por una alta expresión de genes relacionados con la proliferación celular y con el ciclo celular (*CK5/6*, *CK14* y *CK17* y *EGFR*), una expresión intermedia de genes relacionados con HER2 y una expresión baja de genes relacionados con el RE y RP. A nivel de ADN, este subtipo intrínseco es el que presenta la mayor ratio de mutaciones del CM, siendo *TP53* el gen que acumula la mayor parte de éstas (80%) mientras que no se detectan variantes en la mayoría de los genes mutados en los subtipos luminales, a excepción del gen *PIK3CA* (9%).

El subtipo *Normal-like* muestra características de expresión génica generalmente expresadas en el tejido adiposo de la mama y agrupadas con entidades como el fibroadenoma e incluso del tejido mamario normal<sup>65</sup>. La relevancia clínica de este subtipo no ha sido determinada y en numerosos trabajos y grupos ha sido considerado un mero artefacto, probablemente atribuible a la contaminación de la muestra por tejido normal no tumoral<sup>18,21,48,49</sup>. Respecto a las características moleculares del subtipo HER2E, se expondrán más ampliamente en el apartado 4.2.



**Figura 2.** Resumen subtipos histológicos más frecuentes en CM, subtipos intrínsecos de Perou y Sorlie basados en la firma de expresión PAM50, y subtipos intrínsecos subrogados. Los subtipos intrínsecos subrogados se usan típicamente en la clínica y se basan en la expresión histológica medida por IHQ de proteínas clave: RE, RP, HER2 y Ki67. **LEYENDA:** La ubicación relativa de los cuadros se alinea con las características (por ejemplo, proliferación y grado) en verde. Abreviaturas: -, negativo; +, positivo. GES, firma de expresión genética <sup>a</sup>Mutaciones de ESR1 inducidas por la terapia dirigida con inhibidores de la aromatas. <sup>b</sup>Artefacto; expresión de componentes normales de la mama debido a la baja celularidad tumoral. Created with BioRender.com y adaptado de "Harbeck N, et al. Breast cancer. Nature Reviews, 2019".

A pesar de todo, la implementación de dichos subtipos intrínsecos en la práctica clínica se vio inicialmente paralizada por varios aspectos. El primero era que la mayoría de las tecnologías a aplicar requerían tejido fresco congelado y todo el proceso desde la muestra hasta el resultado requería de un laboratorio centralizado, acreditado y controlado. La segunda, la tecnología de micromatrices implicaba recursos de alto impacto económico y tiempo. Con el objetivo de desarrollar una herramienta que fuera aplicable al entorno clínico, en 2009 Parker, Perou et al <sup>67</sup> desarrollaron y validaron una prueba basada en expresión génica empleando qRT-PCR, llamada PAM50, que logra identificar los subtipos moleculares intrínsecos en cuatro subtipos transcripcionales mediante el análisis de expresión de 50 genes en tejidos tumorales fijados en formalina e incluidos en parafina (FFPE): LumA, LumB, HER2E, y BAL <sup>54,57,67</sup>. Además derivaron una puntuación pronóstica llamada "puntuación de riesgo de recaída o ROR

*score*” que integra y pondera las correlaciones de los subtipos intrínsecos con un subconjunto de genes de proliferación y el tamaño tumoral<sup>68</sup>.

Varios estudios han evaluado y comparado la clasificación de los CM basada en la expresión génica mediante el empleo de PAM50 con la clasificación basada en criterios patológicos (expresión de RE, RP y HER2 por IHQ/ISH), encontrando una tasa de discordancia significativa en la mayoría de estos estudios<sup>57,60,61,69-73</sup>. *Prat et al*<sup>73</sup> llevaron a cabo un análisis combinado de datos procedentes de varios de estos estudios, empleando datos publicados sobre IHQ y PAM50 de un total de 5994 muestras de tumores independientes. La mayoría de estos estudios realizaron una evaluación central de biomarcadores (RE, RP, HER2). La tasa de discordancia entre ambas clasificaciones fue del 30,72% en el total de pacientes (1 de cada 3), llegando hasta un 44% si eran excluidos los CMTN. Los autores establecieron de forma simultánea 4 grupos en función de los estudios por IHQ: *IHQ-Luminal A*, *IHQ-Luminal B*, *IHQ-Luminal B/HER2+*, *IHQ-RH negativo/HER2+* e *IHQ-triple negativo*, con las mayores tasas de discordancia en los *IHQ-Luminal B* (45%) y los *IHQ-Luminal B/HER2+* (53,8%), seguido del *IHQ-RH negativos/HER2+* (39%) y con un 14% para los *IHC-triple negativo*. Por tanto, no debemos emplear los biomarcadores de IHQ como subrogados de los subtipos intrínsecos moleculares, ya que los estaríamos empleando erróneamente como un método intercambiable para la identificación de la heterogénea biología del CM.

Sin embargo, el paisaje genómico del CM no se captura por completo a través del análisis histopatológico o transcriptómico. Los cambios en los patrones de expresión génica están influenciados por la estructura genómica subyacente, y disponemos de evidencias acerca de que características distintivas de los subtipos intrínsecos también pueden definirse mediante perfiles basados en análisis del número de copias<sup>21,47,55,74</sup>. El desarrollo de tecnologías de secuenciación de nueva generación ha permitido la caracterización del panorama mutacional y la importancia de integrar la información del subtipo intrínseco con el análisis genómico se destaca en uno de los estudios de caracterización molecular más completos e importantes que se han realizado en CM. En este estudio dirigido por *The Cancer Genome Atlas (TCGA)*, se perfilaron más de 600 muestras de tumores primarios de mama a nivel de ADN (metilación, alteraciones en el número de copias, mutaciones somáticas y de línea germinal), de

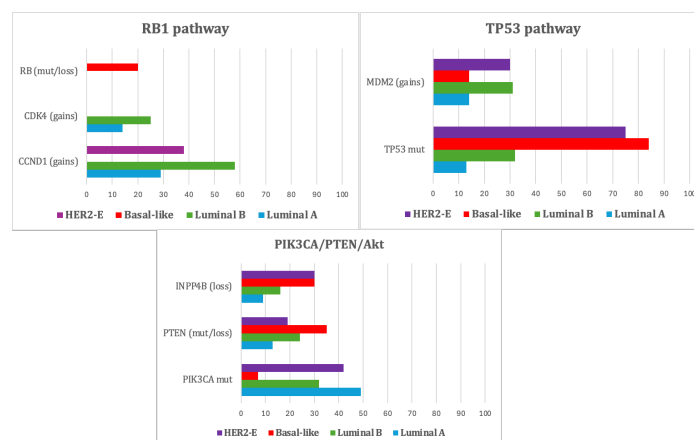
ARN (secuenciación de micro-ARN y expresión de ARNm) y proteico (mediante micromatrices de lisados de proteínas de fase inversa o *RPPA*) (Tabla 1; Figura 3). Tras el análisis de más de 300 tumores primarios, se combinaron cinco tipos de datos en un conjunto de 10 grupos o *clusters*. El análisis de clasificación no supervisado identificó cuatro grupos principales de CM, muy bien resumidos por los cuatro subtipos intrínsecos moleculares, definidos solo por expresión de ARNm (Figura 4).

Subtype/ cluster	Luminal A	Luminal B	Basal-like	HER2-E
mRNA expression	High ER cluster; low proliferation signature	Lower ER cluster; high proliferation signature	Basal-signature; high proliferation	HER2 amplicon signature; high proliferation
Copy number	Most diploid; many with quiet genomes; 1q, 8q, 8q11 gain; 8p, 16q loss, 11q13.3 amp (24%)	Most aneuploidy; many with focal amp; 1q, 8q, 8p11 gain; 8p, 16q loss, 11q13.3 amp (51%); 8p11.23 amp (28%)	Most aneuploidy; high genomic instability; 1q, 10p gain; 8p, 5q loss; MYC focal gain (40%)	Most aneuploidy; high genomic instability; 1q, 8q gain; 8p, 5q loss; MYC focal gain (71%)
DNA mutations	PIK3CA (49%); TP53 (12%); GATA3 (14%); MAP3K1 (14%)	TP53 (32%); PIK3CA (32%); MAP3K1 (5%)	TP53 (84%); PIK3CA (7%)	TP53 (75%); PIK3CA (42%); PIK3R1 (8%)
Protein expression	High estrogen signaling; high MYB; RPPA reactive subtypes	Less estrogen signaling; high FOXM1 and MYC; RPPA reactive subtypes	High expression of DNA repair proteins, PTEN and INPP4B loss signature (pAKT)	High protein and phosphoprotein expression of EGFR and HER2

Amp, amplification; mut, mutation. Percentages are based on 466 tumor samples (463 patients).

**Tabla 1.** Principales datos sobre expresión ARNm, número de copias, mutaciones ADN y expresión de proteínas en muestras de tejido de CM dentro del proyecto TCGA.

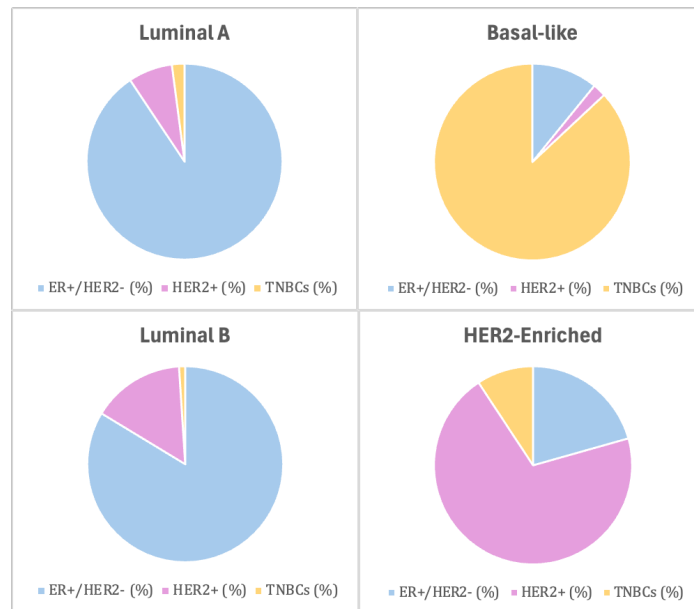
Adaptado de: et al. *Front. Oncol.* 9:1124 (2019)



**Figura 3.** Principales alteraciones en las vías más representativas en BC, según el perfil intrínseco, analizado en el proyecto TCGA.

Adaptado de: Godoy-Ortiz et al. *Front. Oncol.* 9:1124 (2019)

Los porcentajes se basan en 466 muestras de tumores (463 pacientes). A) Principales alteraciones vía PIK3CA/PTEN. (B) Principales alteraciones vía TP53. (C) Principales alteraciones vía RB1. Dentro del subtipo intrínseco basal, las principales alteraciones encontradas fueron mutación/pérdida de RB1 (20%) y amplificación de Ciclina E1 (9%). El grado de expresión de CDKN2C y RB1 fue bajo y alto, respectivamente, en el subtipo luminal A, a diferencia de lo informado en tumores con subtipo basal.



**Figura 4.** Distribución de los subtipos intrínsecos de PAM50 dentro de cada subtipo de CM analizado en el proyecto TCGA.

Los porcentajes se basan en 466 muestras de tumores (463 pacientes). *Adaptado de: Godoy-Ortiz et al. Front. Oncol. 9:1124 (2019)*

Todos los CM muestran una diversidad genética significativa. Las variantes heredadas, representadas por los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) y las CNV pueden tener un impacto en el panorama genético de la línea germinal del individuo e inducir el desarrollo del cáncer. Las variantes de un solo nucleótido (SNV) y las aberraciones del número de copias (CNA) son cambios genómicos a nivel somático, por lo tanto, variaciones adquiridas que contribuyen al desarrollo, crecimiento y diseminación de CM esporádico<sup>75</sup>. En un estudio publicado en el 2013 por el grupo del *Prof. Caldas*<sup>76</sup>, se integraron análisis de datos genómicos y transcriptómicos de 2000 muestras primarias de CM primario, provenientes de la base de datos pública del *Consortio Internacional de Taxonomía Molecular del CM (METABRIC)*<sup>62,77</sup>. Este trabajo, propuso una clasificación molecular del CM alternativa (Tabla 2).

IntClust	Frequency (n)	Expression (n, %)	Molecular features	PAM50 subtype (n, %)	Prognosis (HR 5, 10 year DSS)
1	139	ER+: 123 (88.5%) PR+: 60 (43%) HER2+: 20 (14.4%)	17q23 amplification High genomic instability	Basal: 9 (6.5%) HER2-E: 21 (15 %) LumA: 11 (7.9%) LumB: 90 (64.8%) Normal: 8 (5.8%)	Intermediate 0.80, 0.69
2	72	ER+: 69 (95.8%) PR+: 51 (70.8%) HER2+: 3 (4.2%)	11q13/14 amplification High genomic instability	Basal: 2 (2.8%) HER2-E: 6 (8.3 %) LumA: 25 (34.7%) LumB: 36 (50%) Normal: 3 (4.2%)	Poor 0.78,0.51
3	290	ER+: 278 (95.9%) PR+: 211 (72.8%) HER2+: 1 (0.3%)	Paucity of copy number changes Low genomic instability	Basal: 4 (1.4%) HER2-E: 9 (3.1 %) LumA: 195 (67.9%) LumB: 43 (15%) Normal: 36 (12.5%)	Good 0.93, 0.88
4	343	ER+: 238 (69.4%) PR+: 155 (45.2%) HER2+: 20 (5.8%)	CNA devoid Low genomic instability	Basal: 64 (18.7%) HER2-E: 34 (10 %) LumA: 106 (31%) LumB: 29 (8.5%) Normal: 109 (31.9%)	Good 0.89, 0.76
5	190	ER+: 79 (41.6%) PR+: 40 (21.1%) HER2+: 181 (14.4%)	ERBB2 amplification Intermediate genomic instability	Basal: 21 (11%) HER2-E: 108 (56.8 %) LumA: 18 (9.5%) LumB: 33 (17.4%) Normal: 10 (5.3%)	Poor 0.62, 0.45
6	85	ER+: 123 (88.5%) PR+: 60 (43%) HER2+: 20 (14.4%)	8p12 amplification High genomic instability	Basal: 3 (3.5%) HER2-E: 10 (11.8%) LumA: 23 (27.1%) LumB: 43 (50.6%) Normal: 6 (7.1%)	Intermediate 0.83, 0.59
7	190	ER+: 187 (98.4%) PR+: 150 (79%) HER2+: 2 (1.1%)	16p gain, 16q loss, 8q amplification Intermediate genomic instability	Basal: 3 (1.6%) HER2-E: 9 (4.8 %) LumA: 123 (65.1%) LumB: 41 (21.7%) Normal: 13 (6.9%)	Good 0.94, 0.81
8	299	ER+: 297 (99%) PR+: 236 (78.9%) HER2+: 1 (0.3%)	1q gain, 16q loss Intermediate genomic instability	Basal: 1 (0.3%) HER2-E: 9 (3%) LumA: 192 (64.2%) LumB: 89 (29.8%) Normal: 8 (2.7%)	Good 0.88, 0.78
9	146	ER+: 125 (85.6%) PR+: 79 (54.1%) HER2+: 10 (6.9%)	8q gain, 20q amplification High genomic instability	Basal: 20 (13.8%) HER2-E: 26 (18%) LumA: 24 (16.6%) LumB: 70 (48.3%) Normal: 5 (3.5%)	Intermediate 0.78, 0.62
10	226	ER+: 25 (11.1%) PR+: 19 (8.4%) HER2+: 6 (2.7%)	5q loss, 8q gain, 10p gain, 12 p gain Intermediate genomic instability	Basal: 202 (89.4%) HER2-E: 8 (3.5%) LumA: 1 (0.4%) LumB: 14 (6.2%) Normal: 1 (0.4%)	Poor 0.71, 0.68

IntClust, integrative cluster; DSS, disease-specific survival; ER+, estrogen receptor; PR+, progesterone receptor.

**Tabla 2.** Principales características de los clusters integradores de 2.000 muestras de tumores de mama (IntClus).

Adaptado de: Godoy-Ortiz et al. *Front. Oncol.* 9:1124 (2019).

Los autores encontraron que las variantes de la línea germinal y las alteraciones somáticas estaban relacionadas con cambios en la expresión génica, y las CNA explicaban la mayor variabilidad. Se demostró que las CNA modifican la expresión de genes ubicados tanto en *cis* (regiones de ADN no codificante dentro de un genoma que regulan la transcripción de genes cercanos) como en *trans* (regiones de ADN codificante para factores de transcripción que regulan la expresión de genes distantes), dominando los efectos de los CNA que afectan en *cis*. El análisis de agrupamiento, conjunto del número de copias y de datos de expresión génica de los genes asociados a *cis*, permitió establecer 10 nuevos subgrupos moleculares o *clusters* integradores (IntClust

1-10) con la capacidad de dividir los subtipos intrínsecos moleculares en grupos independientes. Cada grupo integrador se caracteriza por distintos CNA, cambios en la expresión génica, inestabilidad genómica y SNVs, así como a características clínicas<sup>76,78</sup> y resultados de supervivencia diferentes<sup>62,76</sup>. Esta amplia heterogeneidad, como resultado de diferentes células de origen y variaciones moleculares, hace que la respuesta de los pacientes a los tratamientos sea muy variable y difícil de predecir.

## **1.4 CANCER DE MAMA HER2-POSITIVO Y SUBTIPO HER2-ENRICHED**

Un claro ejemplo de la compleja heterogeneidad inter- e intra-tumoral es el CM-HER2 positivo. *ERBB2* es un oncogén que codifica para la proteína HER2, una proteína con actividad tirosina cinasa que forma parte de los RTK transmembrana y que activa vías oncogénicas relacionadas con la proliferación tumoral, angiogénesis e invasividad, resultando en un tipo tumoral más agresivo que otros fenotipos de CM<sup>17,79</sup>. *ERBB2* se localiza en el brazo largo cromosoma 17 (17q21) y se encuentra amplificado en el 15-20% de los CM<sup>27</sup> como parte de una amplia región en el cromosoma 17 (17q12-21). La sobreexpresión de este RTK permite que los pacientes con CM-HER2 positivo se beneficien de tratamientos basados en anticuerpos monoclonales y terapias dirigidas al dominio tirosina cinasa del receptor, ya sea en combinación de estas terapias dirigidas y quimioterapia, o mediante terapia dual anti-HER2 sin quimioterapia<sup>72,80,81</sup>. Este enfoque terapéutico ha cambiado por completo el pronóstico de los CM-HER2 positivo.

Hasta no hace mucho tiempo, se la ha considerado como una enfermedad simple dentro del CM definida por la amplificación de *ERBB2*, y aunque la eficacia de los agentes anti-HER2 lo avalan, cada vez hay más pruebas de que el CM-HER2 positivo es un entidad clínica dentro del CM con una elevada heterogeneidad intrínseca<sup>20,22,82,83</sup>. Existe una amplia diversidad en sus variaciones genómicas, programas de expresión, linaje y plasticidad celular, lo que impacta en su microambiente, pronóstico y resultados terapéuticos. Una muestra de ello es el hecho de que en este tipo de CM se pueden encontrar los 4 subtipos intrínsecos en más de la tercera parte de los CM-HER2

positivos, si bien el subtipo que suele tener una mayor representación es el subtipo HER2E. Biológicamente, el HER2E es un subtipo caracterizado por una alta expresión de genes relacionados con receptores de factor de crecimiento, así como de genes relacionados con el ciclo celular, frente a una baja expresión de genes propios del fenotipo luminal y del fenotipo basal, con una elevada aneuploidía y el mayor número de alteraciones en todo el genoma. También se caracteriza por una mayor expresión de genes inmunes en comparación con tumores luminales, si bien comparte los patrones de expresión de genes relacionados con la proliferación de los subtipos LumB. El subtipo HER2E dentro de los CM HER2-positivos a nivel molecular comparte la mayoría de las alteraciones genómicas con su contraparte dentro de los tumores HER2 negativos, a excepción de la regulación positiva de genes localizados y/o próximos al amplión de HER2 en el cromosoma 17<sup>74</sup>.

### 1.4.1 Inmunohistoquímica: pasado, presente y futuro

La determinación del estatus clínico de HER2 fue establecida por la *American Society of Clinical Oncology* y el *College of American Pathologist (ASCO/CAP)* mediante la publicación en guías internacionales de las pautas y directrices para examinar el nivel de expresión de HER2 según la expresión proteica mediante IHQ y el nivel de amplificación génica mediante ISH, ambos procedimientos en muestras FFPE de CM. La primera guía ASCO/CAP se publicó en 2006<sup>84</sup>, con posteriores actualizaciones en 2013<sup>85,86</sup> y 2018<sup>20</sup> (Tabla 3).

En la última actualización, los expertos perfeccionan algunos criterios controvertidos de las anteriores guías con la intención de sistematizar el algoritmo de prueba para las categorías inusuales de HER2 según resultados por ISH (Tabla 4). Los resultados de aquellas pruebas se califican de forma semi-cuantitativa ya sea como 0 (negativo), 1+ (negativo), 2+ (equivoco) o 3+ (positivo) mediante IHQ, y por grupos cuando empleamos ISH, siendo estos amplificado (positivo, grupo 5), equivoco (grupo 2,3,4) o negativo (grupo 1). Como se recoge en todas las guías, cuando el estatus de HER2 es negativo tanto por IHQ como por ISH, no está indicado un estudio adicional mediante una técnica alternativa. Por el contrario, los casos de HER2 equivoco, ya sea por IHQ o por ISH, deben seguir un segundo análisis mediante una técnica validada, o bien en

diferentes bloques de tejido empleando el mismo método de testeo<sup>20,85</sup>. Además de estas situaciones complejas, con las dos últimas actualizaciones de la guía ASCO/CAP respecto a la de 2007, se generó un problema importante: se diagnostican más casos equívocos de HER2, lo que conlleva un aumento de las pruebas reflejas de HER2<sup>87</sup>. Ambas aproximaciones detectan diferentes dianas biológicas, la expresión de la proteína HER2 y la expresión del gen *ERBB2*, y cada una de ellas tiene sus propias ventajas e inconvenientes.

	2013 ASCO/CAP recommendations	2018 ASCO/CAP recommendations
<b>HER2 IHC CRITERIA</b>		
Specimens to be tested	All newly diagnosed patients with breast cancer must have a HER2 test performed. Patients who then develop metastatic disease must have a HER2 test performed in a metastatic site, if tissue sample is available.	No change
HER2 score 0 (negative)	No staining is observed or membrane staining that is incomplete and is faint/barely perceptible and within $\leq 10\%$ of tumor cells.	No change
HER2 score 1+ (negative)	Incomplete membrane staining that is faint/barely perceptible and within $> 10\%$ of tumor cells.	No change
HER2 score 2+ (equivocal)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Circumferential membrane staining that is incomplete and/or weak/moderate and within <math>&gt; 10\%</math> of tumor cells, or</li> <li>• Complete and circumferential membrane staining that is intense and within <math>\leq 10\%</math> of the invasive tumor cells.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Weak to moderate complete membrane staining observed in <math>&gt; 10\%</math> of tumor cells.</li> <li>• Basolateral staining for HER2 in a rare subtype of breast cancer with micropapillary histology and circumferential staining that is intense but <math>&lt; 10\%</math> of the tumor cells.</li> </ul>
HER2 score 3+ (positive)	Circumferential membrane staining that is complete, intense, and with $> 10\%$ of tumor cells that must show homogeneous, dart circumferential (chicken wire).	No change
<b>HER2 ISH CRITERIA</b>		
Amplificación	Dual-probe Her2/CEP17 ratio $\geq 2.0$ ; with an average Her2 gene copy number $\geq 4.0$ signals/cell (Group 1) Dual-probe Her2/CEP17 ratio $< 2.0$ with an average Her2 gene copy number $\geq 6.0$ signals/cell (Group 3) Dual-probe Her2/CEP17 ratio $\geq 2.0$ with an average Her2 gene copy number $< 4.0$ signals/cell (Group 2)	Dual-probe Her2/CEP17 ratio $\geq 2.0$ ; with an average Her2 gene copy number $\geq 4.0$ signals/cell (Group 1) Dual-probe Her2/CEP17 ratio $< 2.0$ with an average Her2 gene copy number $\geq 6.0$ signals/cell (Group 3) <sup>†</sup> Dual-probe Her2/CEP17 ratio $\geq 2.0$ with an average Her2 gene copy number $< 4.0$ signals/cell (Group 2) <sup>†</sup> If a case has is Group 3 and 2, a definitive diagnosis will be rendered based on additional work-up. If not already assessed by the institution or laboratory performing the ISH test, IHC testing for HER2 should be performed using sections from the same tissue sample used for ISH, and the slides from both ISH and IHC should be reviewed together to guide the selection of areas to score by ISH.
Equivocal	Single-probe average Her2 gene copy $\geq 4.0$ and $\leq 6.0$ signals/cell Dual-probe Her2/CEP17 signal ratio of $< 2.0$ with an average Her2 gene copy number $\geq 4.0$ and $\leq 6.0$ signals/cell (Group 4).	Dual-probe Her2/CEP17 signal ratio of $< 2.0$ with an average Her2 gene copy number $\geq 4.0$ and $\leq 6.0$ signals/cell (Group 4) If a case has an Her2 gene copy $\geq 4.0$ and $< 6.0$ signals/cell ((Group 4) <sup>†</sup> , formerly diagnosed as ISH positive for HER2, a definitive diagnosis will be rendered based on additional work-up. If not already assessed by the institution or laboratory performing the ISH test, IHC testing for HER2 should be performed using sections from the same tissue sample used for ISH, and the slides from both ISH and IHC should be reviewed together to guide the selection of areas to score by ISH.
Non-amplification	Single-probe average Her2 gene copy $< 4.0$ signals/cell Dual-probe Her2/CEP17 signal ratio of $< 2.0$ with an average Her2 gene copy number of $< 4$ signals/cell (Group 5)	No change
<b>Acceptable (IHC and ISH) tests</b>	Should preferentially use an FDA-approved IHC, brightfield ISH, or FISH assay	No change

CAP, College of American Pathologists; CEP17, chromosome enumeration probe 17; ER, estrogen receptor; FDA, US Food and Drug Administration; FISH, fluorescent in situ hybridization; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; IHC, immunohistochemistry; ISH, in situ hybridization.  
<sup>†</sup>In the 2013 Guideline Update, the work-up of cases in the less common dual-probe ISH categories (groups 2 to 4) include only ISH as additional work-up on diagnosis.

**Tabla 3.** Resumen de las recomendaciones de la guía ASCO/CAP de 2018 (originales y centradas en las recomendaciones actualizadas).

Adaptado de: Godoy-Ortiz et al. *Front. Oncol.* 9:1124 (2019).

Group	Biology	HER2/CEP17 ratio	HER2 copy number	2018 ASCO/CAP recommendation
1	Classic HER2 amplified cancer <sup>‡</sup>	≥2.0	≥4.0	Positive
2	Monosomy 17 <sup>†</sup>	≥2.0	<4.0	Negative, unless concurrent IHC 3+
3	Co-amplification, previously polysomy 17 <sup>†</sup>	<2.0	≥6.0	Negative, unless concurrent IHC 2+ or 3+
4	Borderline/equivocal <sup>†</sup>	<2.0	≥4.0 and <6.0	Negative, unless concurrent IHC 3+
5	Classic HER2 non-amplified cancer <sup>‡</sup>	<2.0	<4.0	Negative

<sup>‡</sup>Around 95% of breast tumors tested for HER2 by dual-probe ISH correspond to group 1 (HER2 positive) and group 5 (HER2 negative).

<sup>†</sup>The overall prevalence of subgroups 2, 3, and 4 among all breast cancers undergoing HER2 testing is estimated to be about 5%, but within and individual laboratory, the frequency ISH results can be increased.

**Tabla 4.** Resumen de los diferentes escenarios según resultados de la prueba de ISH y recomendaciones finales para determinar el estatus de HER2 según la ASCO/CAP 2018.

Adaptado de: Godoy-Ortiz et al. *Front. Oncol.* 9:1124 (2019)

Los estudios de IHQ/ISH para determinar el estatus HER2 se emplean en el escenario clínico con el objetivo de seleccionar aquellas pacientes que puedan beneficiarse de tratamiento anti-HER2. La concordancia entre el estatus del gen *ERBB2* y la expresión proteica de HER2 es generalmente elevada, aunque la discordancia entre los ensayos de IHQ y de ISH no es infrecuente. El principal mecanismo biológico subyacente a los resultados discordantes parece ser la heterogeneidad intra-tumoral<sup>88-92</sup>, concentrada ésta principalmente en los casos de HER2 equívoco<sup>20,86,89</sup>, y la cual constituye un factor crítico para una evaluación precisa del estatus clínico de HER2.

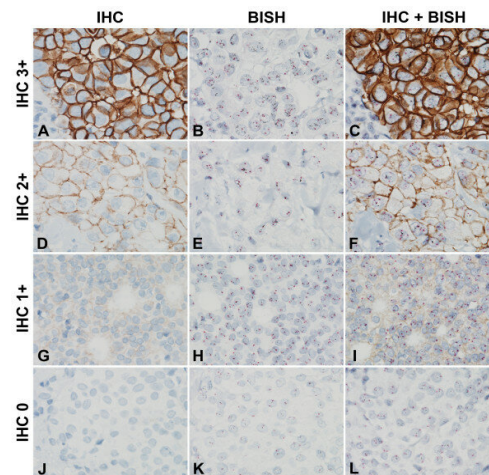
La heterogeneidad intra-tumoral supone que dentro de un mismo tumor se pueden detectar varias poblaciones con alteraciones moleculares diferentes que no tienen por qué presentar el mismo comportamiento ante determinados tratamientos. La guía ASCO/CAP 2013 define la heterogeneidad como hallazgos de entre el 5 y 50% del total de las células con una relación HER2/CEN17 >2.0 o > 6 señales de HER2/célula, y la ASCO/CAP 2018 como la presencia de cualquier población agregada de células amplificadas que comprenda >10% de las células tumorales. Según esto, en los casos de bajo grado de amplificación (definido como ratio HER2/CEN17 entre 2.0 y 4.0) se detecta con más frecuencia y de forma significativa una heterogeneidad genética de HER2 respecto a los CM con amplificación de HER2 de alto grado (definida

como ratio  $HER2/CEN17 \geq 4.0$ ) y sobreexpresión de la proteína HER2 3+ por IHQ<sup>76,93</sup>. Así, la evaluación de HER2 mediante inmunotinción y amplificación génica puede ser marcadamente heterogénea, lo que afectaría a la selección de pacientes, respuesta terapéutica y por ende, a los resultados en supervivencia de las pacientes<sup>89,94</sup>. Con una incidencia entre los estudios de un 5-40% de heterogeneidad intra-tumoral, este hecho biológico no se puede ignorar.

Con el objetivo de optimizar la evaluación de la heterogeneidad intra-tumoral de HER2 en muestras de CM, *Nitta* y colaboradores<sup>95</sup>, elaboraron y validaron un protocolo en secciones de FFPE de tumores derivados de xenoinjertos de pacientes con CM y en *microarray* de tejido o micromatriz tisular (TMA) de muestras FFPE, que permitía la detección simultánea con microscopía de campo claro de la expresión de la proteína y del gen (Figura 5). Este protocolo recibió el nombre de *tricolor HER2 gene-protein assay* (GPA)<sup>95</sup>. Esta prueba expuso la heterogeneidad de la expresión de la proteína HER2 en diferentes poblaciones de células de CM (Figura 6). En un estudio más reciente, se demostraron implicaciones clínicas relevantes de la heterogeneidad intra-tumoral<sup>96</sup>. Mediante la evaluación combinada de amplificación génica y expresión de proteína siguiendo el protocolo GPA, se establecieron cinco patrones. Tres de ellos (tipo 3 a 5) se definieron como estado heterogéneo de HER2, de forma que si la muestra del tumor presentaba alguno de estos tipos se relacionaba con heterogeneidad intra-tumoral. El tipo 1 (amplificación de gen y sobreexpresión proteica en toda el área tumoral) y tipo 2 (amplificación de gen homogénea en las células tumorales, pero sin sobreexpresión proteica) fueron definidos como HER2 homogéneo. Previamente, el patrón tipo 2 había sido reportado como “micro-heterogeneidad”<sup>72,97,98</sup>, la cual solo puede ser detectada mediante GPA. En el análisis final del estudio, la heterogeneidad intra-tumoral de HER2 fue un factor independiente asociado a una respuesta patológica desfavorable a quimioterapia y terapia anti-HER2 neoadyuvantes en una cohorte de 64 pacientes<sup>96</sup>.

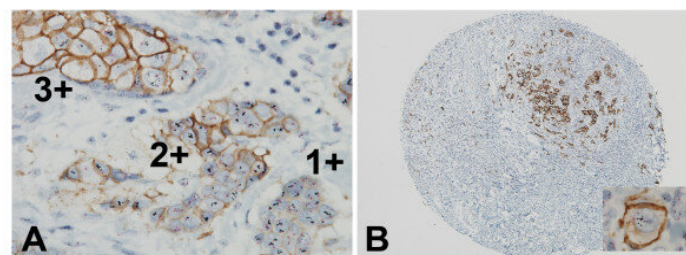
Así, respecto al estudio histopatológico de las muestras, el empleo de una prueba como GPA, que permite reconocer de forma simultánea la discordancia entre la amplificación del gen *ERBB2* y la expresión de la proteína, podría mejorar la

selección clínica de pacientes para terapias dirigidas al determinar con una mayor precisión la heterogeneidad intra-tumoral de HER2 en el CM-HER2 positivo.



**Figura 5.** Empleo de del ensayo GPA de HER2 en tejidos de CM fijados en parafina.

Los tejidos con puntuaciones de HER2 IHQ de 3+ (A – C), 2+ (D – F), 1+ (G – I) y 0 (J – L) se sometieron a un ensayo de HER2 IHQ (A, D, G, J), ensayo BISH de HER2 y CEN17 (B, E, H, K) o el ensayo GPA de HER2 (C, F, I, L) utilizando portaobjetos de microarrays de tejido. El ensayo IHQ de HER2 produjo la tinción esperada de la proteína (A, D, G, J) y el ensayo BISH de HER2 y CEN17 por separado produjo la tinción esperada del gen HER2 (puntos negros) y CEN17 (puntos rojos) (B, E, H, K). El ensayo combinado produjo tanto la tinción apropiada de la proteína HER2 como la tinción apropiada del gen HER2 y CEN17 (C, F, I, L). [Imágenes 60×.]



**Figura 6.** Resultados de la técnica GPA en tejidos de CM FFPE que muestran heterogeneidad de poblaciones de células tumorales positivas para HER2 o poblaciones de células tumorales positivas aisladas.

(A) Se observa que las poblaciones de células con puntuaciones IHQ de HER2 de 3+, 2+ y 1+ son vecinas entre sí y todas las poblaciones presentan HER2 amplificado. Sin embargo, la población de células tumorales HER2 IHQ 3+ contiene copias dispersas del gen HER2, mientras que la población HER2 IHC 2+ y 1+ contiene copias agrupadas del gen HER2 [40×]. (B) El empleo del ensayo GPA HER2 visualizó claramente pequeños grupos de células de CM con HER2 IHQ 3+ [4×]. En la esquina inferior derecha se muestra una célula tumoral individual aislada HER2 con IHQ positiva y amplificación del gen HER2 (x100).

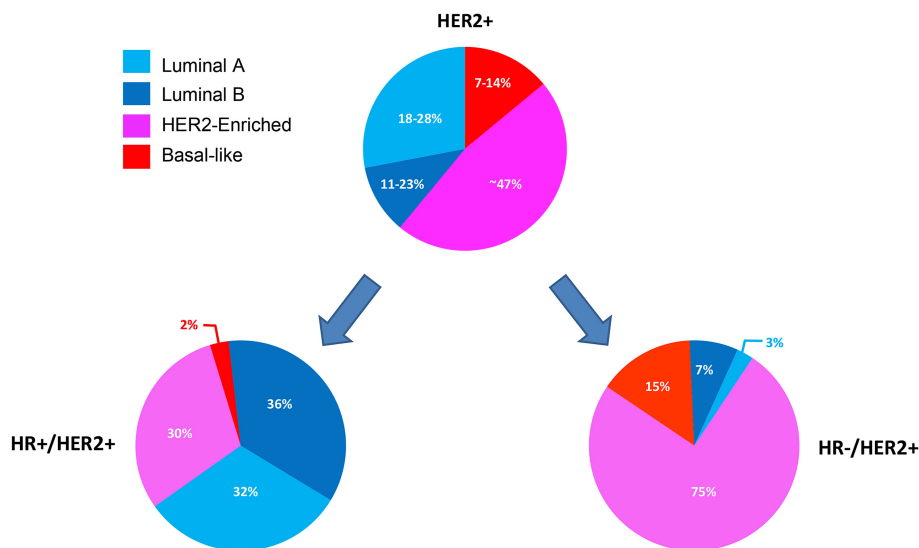
Ambas figuras adaptadas de Nitta et al. *Diagn Pathol.* 2012; 7:60

### 1.4.2 Retratos moleculares

Aunque la definición molecular y celular de origen de los CM-HER2 positivo es importante para comprender la oncogénesis del CM, el principal interés de la comunidad científica y médica en la actualidad radica en la identificación de subgrupos homogéneos dentro de este fenotipo de CM y en mejorar la comprensión de los mecanismos genéticos subyacentes. Si bien el CM-HER2 positivo se ha clasificado históricamente en dos entidades según la expresión de RH, con la incorporación de los análisis de expresión génica se ha demostrado que este tipo de CM está constituido por todos los subtipos intrínsecos moleculares, independientemente del estado de los RH. En el CM-HER2 positivo con positividad para RH se aíslan de forma predominante dos subtipos intrínsecos: LumB y HER2E<sup>23,73</sup>, seguidos del LumA y raramente BAL. En los tumores con RH negativos, el subtipo HER2E supone entre el 50 hasta el 88% de los casos, seguido de otros subtipos de mal pronóstico (LumB y BAL)<sup>71</sup>(Figura 7).

El subtipo HER2E como se ha comentado previamente, es un subtipo caracterizado por una alta expresión de genes relacionados con receptores de factor de crecimiento y de proliferación (ej., *ERBB2*, *EGFR* y *GRB7*), así como de genes relacionados con el ciclo celular, con una baja expresión de genes propios del fenotipo luminal (ej., *ESR1*, *FGFR4*, *FOXA1* y *PGR*) y una baja o ausente de genes relacionados con el fenotipo basal (ej., *CK5* y *CK6*, *OFXC19*, *FOXC1*). Presenta una elevada aneuploidía y es el subtipo con el mayor número de mutaciones en todo el genoma. De forma global, entre el 70-75% y 40% de los tumores HER2E son *TP53* y *PIK3CA* mutados respectivamente, y respecto a CNA, muestran amplificación frecuente de *FGFR*, *EGFR*, *CDK4* y *CCND1*<sup>21</sup>. Las firmas mutacionales dentro de APOBEC, una familia compuesta por enzimas editoras de ARN tipo desaminasas que sustituyen citosina por uracilo, y que constituyen una de las fuentes endógenas más común en el ser humano de mutaciones en cáncer, están enriquecidas en el CM-HER2 positivo<sup>99</sup>. En el caso del HER2E, la APOBEC3B es la que se encuentra más frecuentemente mutada<sup>100</sup>. También se caracteriza por una mayor expresión de genes inmunes en comparación con tumores luminales, aunque comparte patrones de expresión de genes relacionados con la proliferación del subtipo LumB.

Tenemos entonces que cualquier CM-HER2 positivo puede incluirse en los subtipos moleculares HER2E, BAL, LumA o LumB, lo que va a afectar significativamente al comportamiento biológico y terapéutico del tumor. Además, el subtipo HER2E parece capturar algunos, pero no todos los tumores clínicamente HER2 positivos, y es más, este subtipo puede identificarse dentro de los CM-HER2 negativos, independientemente del estado del RH<sup>21,22,63,74</sup>.



**Figura 7.** Distribución de subtipos intrínsecos en tumores HER2 positivos (3390 tumores RH+/HER2+ y 2567 tumores RH-/HER2+)

Muestras procedentes de ensayos clínicos CALGB 40601<sup>97</sup>, PAMELA<sup>101</sup>, NOAH<sup>72</sup>, CherLOB<sup>98</sup> y NSABP B-41<sup>102</sup>. Leyenda. RH: receptores hormonales; +: positivo; -: negativo.

Adaptado de Schettini F and Prat A. *Breast* vol. 59 (2021): 339-350.

El concepto de los subtipos intrínsecos ha proporcionado grandes conocimientos sobre la heterogeneidad del CM-HER2 positivo. De los trabajos más relevantes y extensos al respecto tenemos el llevado a cabo por Prat y colaboradores<sup>74</sup>, donde se realiza un análisis con datos de los estudios TCGA<sup>21</sup> y de la base de datos pública METABRIC<sup>62</sup> con el objetivo de evaluar cómo se superponen los subtipos moleculares y el estatus clínico de HER2 (definido en el estudio por las directrices de la guía ASCO/CAP de 2007 y/o CNAs de *ERBB2* a nivel de ADN). Se encontró que el CM-HER2 positivo tuvo una mayor frecuencia de subtipo HER2E (47% versus 7,1 % en tumores HER2

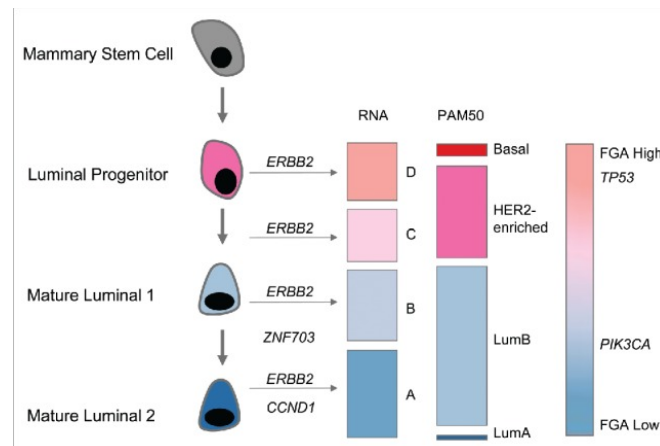
negativos), con una menor frecuencia de subtipos LumA (10.7% *versus* 39%) y de BAL (14.1% *versus* 23,4 %). Por el contrario, la proporción de tumores HER2 positivo fue del 64,6 % para el subtipo HER2E, frente al 20%, 14,4% y 7,3 % en los subtipos LumB, BAL y LumA, respectivamente. Entre los tumores de mama HER2 positivo y negativo, se encontró que solo el 0,3%, 1,2%, 1,2% y 3,9% de todos los genes evaluados (más de 25.000 genes evaluados), se expresaban diferencialmente en el subtipo LumA, LumB, BAL y HER2E respectivamente. Para cada subtipo, el conjunto de los 100 genes significativamente regulados al alza en tumores HER2 positivos, estaban enriquecidos por genes localizados en el amplicones 17q12 y 17q21, siendo la expresión del gen *ERBB2* y de otros genes del amplicón 17q12 significativamente mayor en los tumores HER2 positivo con subtipo intrínseco HER2E y BAL. La expresión de gen y proteína fue mayor de forma estadísticamente significativa en los subtipos HER2E y BAL respecto a cualquiera de los subtipos luminales. Finalmente, mediante un análisis de agrupamiento de datos de la base METABRIC de los genes más variables en los cuatro subtipos, se reveló que a pesar de una mayor expresión de genes ubicados en la región 17q en los CM-HER2 positivos frente a los HER2 negativos, el perfil molecular global de los subtipos intrínsecos se mantiene en gran medida independiente al estatus clínico de HER2, excepto para el subtipo HER2E donde los autores encontraron que los tumores HER2E/HER2 positivos son más parecidos a tumores BAL que los HER2E/HER2 negativos, si bien aquellos HER2E/HER2 positivos están lejos de ser un tumor de tipo basal. Ni el estatus clínico de HER2 ni el sistema de clasificación basado en el número de copias de 10 subtipos (*IntClust*) agregaron valor pronóstico independiente al subtipo intrínseco<sup>74</sup>. Así, parece que, en términos de expresión génica, el CM-HER2 positivo de un subtipo intrínseco determinado es prácticamente indistinguible de un tumor HER2 negativo con el mismo subtipo, excepto por una mayor expresión de genes en o cerca del amplicón 17q de *ERBB2* en los CM-HER2-positivo. El estudio llega a la conclusión que el valor clínico positivo para HER2, si se tienen en consideración los subtipos intrínsecos, no excluye ni traduce cambios relevantes en la expresión de las vías de señalización *downstream* de HER2, ni parece afectar a la supervivencia del paciente en ausencia de tratamiento anti-HER2<sup>74</sup>.

El estudio del TCGA permitió examinar características adicionales al subtipo intrínseco según el valor clínico de HER2<sup>21</sup>. Mediante el análisis de expresión de proteínas, de mi-ARN, metilación del ADN y de expresión génica, se detectaron ligeras diferencias moleculares entre los tumores HER2 positivos y negativos dentro de cada subtipo intrínseco. Aun así, de nuevo la gran mayoría de las proteínas reguladas positivamente en los CM-HER2 positivo derivaron de genes ubicados en el amplicón 17q.

Cuatro años después de la publicación del anterior estudio, se publica el último trabajo que sigue un enfoque similar y uno de los más singulares, al explicar la compleja heterogeneidad molecular del CM-HER2 positivo por primera vez mediante datos de secuenciación de genoma completo (del inglés *Whole Genome Sequencing* - WGS-) y de transcriptoma de muestras FFPE de tumores de mama HER2 positivo<sup>22</sup>. En el marco del *Consortio Internacional del Genoma del Cáncer*, los autores seleccionaron un total de 289 tumores/muestras que formaban parte de los programas franceses PHARE/SIGNAL<sup>103,104</sup>, cumpliendo finalmente los criterios de calidad recogidos en la publicación un total de 99 carcinomas invasivos primarios, de los cuales 64 muestras de tejido tumoral y ADN emparejado de sangre de donante sano se sometieron a WGS. Mediante un análisis de expresión génica basada matrices y análisis jerárquico de conglomerados o *clusters*, se definieron cuatro grupos con alteraciones genómicas y genéticas específicas (mutaciones, CNV y alteraciones estructurales). Los grupos A y B abarcaron la mayoría de los tumores HER2 positivos con RH positivos, y los grupos C y D contenían en su mayoría aquellos con RH negativos. Utilizando el clasificador PAM50, los tumores fueron predominantemente LumB (grupos A y B) y HER2E (en los grupos C y D), con una presencia marginal de tumores LumA y BAL<sup>22</sup>. Estos cuatro grupos presentaban alteraciones genómicas específicas respecto a mutaciones, CNVs y reordenamientos. A nivel mutacional, todas las muestras del grupo D y ninguna del grupo A mostraron mutaciones en TP53, mientras que solo una muestra del grupo D albergaba una mutación en PIK3CA, con una distribución similar de mutaciones en este gen en los otros grupos. También se observó un gradiente similar en términos de firmas génicas y transcriptómicas de células de origen<sup>105</sup>. El grupo D era el que presentaba una mayor inestabilidad genómica y una firma progenitora

luminal, frente al grupo A que fue el de mayor estabilidad genómica y con una firma luminal madura típica (Figura 8).

Sabemos que los subtipos LumA y LumB parecen derivar de la transformación neoplásica del progenitor luminal maduro, mientras que el BAL presenta una gran similitud con el progenitor luminal, al haberse revelado perfiles superpuestos de expresión génica y marcadores de superficie que se solapan con los de células progenitoras luminales<sup>106,107</sup>. Estas observaciones concuerdan con el modelo evolutivo jerárquico de células madre cancerosas<sup>105,108-110</sup>, en el que la heterogeneidad intra-tumoral parece reflejar la etapa evolutiva de desarrollo de las células mamarias epiteliales. Por lo tanto, pueden surgir múltiples fenotipos de una célula de origen dependiendo del evento genético iniciador<sup>110</sup>.



**Figura 8.** Representación y características genómicas del modelo evolutivo jerárquico de células madre stem y mamarias epiteliales en el CM-HER2 positivo.

De izquierda a derecha: etapa de desarrollo de las células mamarias epiteliales normales; eventos de amplificación: tirosina cinasa 2 del receptor erb-b2 (ERBB2), ciclina D1 (CCND1) y proteína de dedos de zinc 703 (ZNF703); grupos de expresión de ARN (A, B, C y D, Ferrari et al<sup>22</sup>); subtipos intrínsecos de PAM50 (LumA, LumB, BL, HER2E); características genómicas: fracción del genoma alterado (FGA); mutaciones en la proteína tumoral p53 (TP53) y la subunidad catalítica  $\alpha$  de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinasa (PIK3CA).

Adaptado de: Ferrari A, et al. *Mol Cell Oncol.* 2016;3(6): e1232186.

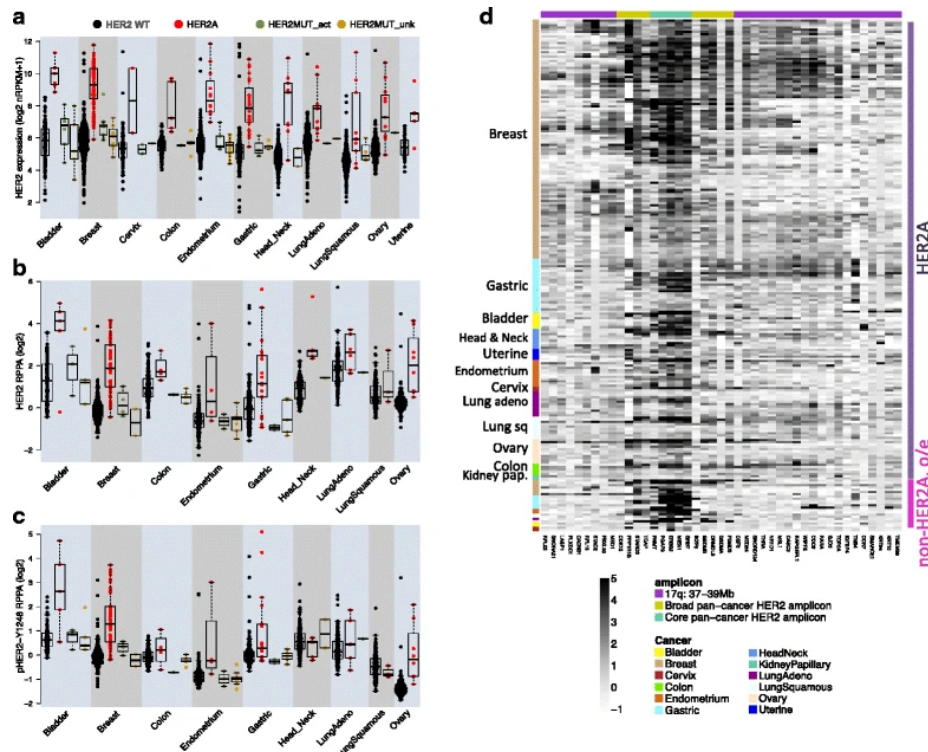
Los autores también obtuvieron información sobre el proceso de amplificación de *ERBB2* en sí, sobre cómo y cuándo se puede producir. El proceso fue consistente con un mecanismo de inestabilidad genómica conocido como ciclo de puente ruptura-

fusión, del inglés, *Breakage-fusion brigde* (BFB), que no suele darse en más del 3% de los tumores<sup>105,111</sup>. Este ciclo se inicia con la rotura de un cromosoma con pérdida telomérica. Sin los telómeros para evitar la fusión cromosómica, las dos cromátidas hermanas se unirían para formar un único cromosoma dicéntrico. Durante el anafase los dos centrómeros del cromosoma dicéntrico son atraídos hacia polos opuestos del huso formando una estructura en forma de puente hasta que los centrómeros se alejan tanto uno del otro que se produce una rotura cromosómica aleatoria, que si no ocurre en el lugar exacto donde los dos cromosomas se fusionaron originalmente, se producirían reordenamientos estructurales. Debido a que el ciclo BFB produce dos *neocromosomas* que carecen de telómeros en sus extremos rotos, cada cromosoma roto resultante proporciona un punto de partida para un ciclo BFB posterior, lo que puede continuar produciendo más duplicaciones, deleciones, inversiones y traslocaciones de material cromosómico a lo largo de múltiples generaciones celulares. En los tumores, los patrones de reordenamiento que se esperarían fruto de ciclos de BFB suelen aparecer en los genomas tumorales junto a otras alteraciones cromosómicas como la cromotripsis, un fenómeno donde se producen reordenamientos genómicos extensos que afectan solo a uno o a pocos cromosomas en un único evento catastrófico. La cromotripsis, a diferencia del ciclo BFB, ocurre entre el 20-65% en determinadas neoplasias<sup>112</sup>. En el estudio de *Ferrari et al*<sup>22</sup> el mecanismo BFB como productor de la amplificación de *ERBB2* en el CM-HER2 positivo se respaldaba por la secuencia de los CNVs y la orientación de las lecturas recortadas<sup>113</sup>. Sin embargo, la presencia añadida de reordenamientos de larga distancia e inter-cromosómicos determina que la amplificación de *ERBB2* es un fenómeno de extrema complejidad, que no solo comprende el mecanismo BFB, sino varios entrelazados entre los que se incluyen el de cromotripsis, estando implicados otros amplicones en el mismo o diferentes cromosomas. Todo esto finalmente nos lleva a la hipótesis final de que amplificación de *ERBB2*, aunque esté fuertemente seleccionada en el CM-HER2 positivo, probablemente se trata de un evento integrado que se superpone al curso temporal estándar de la carcinogénesis del CM.

En un estudio posterior, de nuevo con análisis genómico y transcriptómico, se concluye en una teoría similar: la amplificación de *ERBB2* podría definirse como un

fenómeno *pan-cáncer* integrado en el curso temporal de la carcinogénesis del CM<sup>114</sup>, un evento conductor observado en todos los subtipos intrínsecos y con una mayor presencia en los tumores con subtipo HER2E. Los autores exploraron datos genómicos publicados de expresión génica y CNV en tres cohortes de pacientes, con muestras procedentes del TCGA<sup>21</sup>, consorcio METABRIC<sup>62</sup> y de un ensayo clínico fase III USO1062<sup>115</sup>, con un total de 3155 tumores de mama y 5391 de tumores no-mama analizados, estos últimos tomados los datos de la *NCI's Genomic Data Commons* (<https://gdc.cancer.gov>). La firma PAM50 se empleó para la clasificación de los subtipos intrínsecos en tumores de mama. Para los tumores no-mama se emplearon subtipos moleculares derivados del TCGA (tumores de vejiga, ovario, cabeza y cuello) o de un panel diverso de datos moleculares (tumores gástricos). Se encontró que la amplificación y/o sobreexpresión de *ERBB2* también se produjo con relativa frecuencia en numerosas neoplasias<sup>114</sup>(Figura 9). Respecto a los tumores de mama, los resultados de este trabajo fueron similares a los revisados anteriormente. La concordancia entre amplificación de *ERBB2* y subtipo HER2E fue pobre con sólo el 47% de los tumores con amplificación de *ERBB2* correspondiendo al subtipo HER2E, con un 46% de los tumores HER2E que se correspondían con CM sin amplificación de *ERBB2*. En un análisis de mutaciones y CNA en 43 genes frecuentemente alterados en CM según la publicación del TCGA (*AFF2, AKT1, ALK, BRAF, CFBF, CCND1, CCNE1, CDH1, CDK4, CDK6, CDKN1B, CTCF, DDR1, ERBB4, ERBB3, FGFR2, FGFR4, FOXA1, GATA3, JAK1, JAK2, JAK3, MAP2K4, MAP3K1, MET, MLL3, NCOR1, NF1, PDGFRB, PIK3CA, PIK3R1, PIK3R3, PTEN, PTPN2, PTPRD, RB1, ROS1, RUNX1, SF3B1, TBX3, TP53, TYK2*), solo 3 genes presentaron alteraciones genómicas asociadas de forma significativa a amplificación de *ERBB2* y subtipo intrínseco: mutaciones de *PIK3CA* en tumores HER2 positivos fueron más frecuentes en el subtipo BAL en comparación a tumores HER2 negativos, mutaciones en *GATA3* en tumores con subtipo HER2E sin amplificación de *ERBB2*, y deleciones de *BRCA1* en tumores con subtipo HER2E y amplificación de *ERBB2*. Los autores concluyen que 1) la amplificación de *ERBB2* es un evento discreto que se suma a un estado mutacional y transcripcional luminal o basal; 2) el subtipo HER2E tiene un panorama transcripcional distintivo independiente de la amplificación de *ERBB2*, en el caso de los tumores con RH positivos impulsada la carcinogénesis por el RE y por el RA en los tumores con RH negativos; y 3) amplificación de *ERBB2*

es un evento *driver* oncogénico presente en todos los subtipos moleculares del CM en lugar de un marcador de un subtipo intrínseco<sup>114</sup>.



**Figura 9.** Naturaleza biológica y papel del HER2 amplificado en otros cánceres no mama.

**a-c** Los tumores se agrupan según la amplificación de HER2 y el estado mutacional. Los tumores sin amplificación o sin mutación de HER2 (*HER2 WT*) en negro, los tumores HER2 amplificados en rojo (*HER2A*), los tumores no amplificados con una mutación activadora de HER2 (*HER2MUT act*) en verde y los tumores no amplificados con una mutación de HER2 no probada o funcionalmente inactiva (*HER2MUT unk*) en dorado; **a.** La expresión de HER2 es consistentemente mayor en los tumores HER2A que en los tumores sin alteración de HER2. Los tumores no HER2A con una mutación HER2 activadora o no funcional presentan niveles de expresión de HER2 similares a los *HER2 WT*; **b.** Los niveles de proteína HER2 son más altos en HER2A en comparación con los tumores *HER2 WT*. Los niveles de proteína HER2 en tumores con *HER2MUT act* o *HER2MUT unk* son similares a los de tumores *HER2 WT*. **c.** Los niveles de fosfo-HER2 (Tyr1248) son significativamente más altos en tumores con HER2A de vejiga ( $p = 8e-12$ ), mama ( $p = 3e-53$ ), gástrico ( $p = 1e-10$ ), ovario ( $p = 8e-20$ ) y endometriales ( $p = 1e-8$ ) en comparación con *HER2 WT*. Los niveles de fosfo-HER2 en tumores con *HER2MUT act* o *HER2MUT unk* son similares a los de tumores *HER2 WT*; **d.** Expresión de genes en un panel de tumores HER2A (arriba) y tumores no HER2A (o/e) (abajo).

Adaptado de: Daemen A et al. *Breast Cancer Res* 2018

Otra cuestión relevante, es que disponemos de pruebas adicionales de discordancias entre el genoma y el proteoma en el sentido de que la sobreexpresión de HER2 no deriva exclusivamente de la amplificación de *ERBB2*, sino que también se puede producir en ausencia de amplificación génica<sup>116</sup>. La proteína HER2 sobreexpresada en sentido descendente podría interpretarse por dos mecanismos: la amplificación génica de *ERBB2* y la traducción mejorada<sup>117</sup>. Las mutaciones de *ERBB2* han emergido como un mecanismo alternativo para activar la señalización de la vía<sup>118</sup>, habiéndose demostrado en un análisis funcional que varias mutaciones recurrentes en diferentes cánceres además del CM-HER2 positivo, son probablemente alteraciones impulsoras (Figura 10) e independientes de la amplificación de *ERBB2*<sup>119-121</sup>.

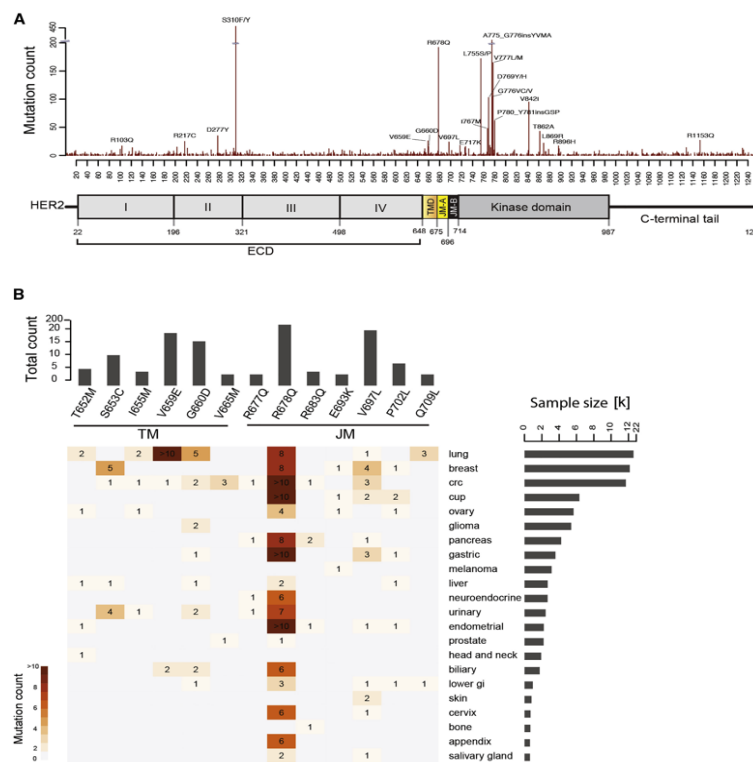


Figura 10. Mutaciones de *ERBB2* en un análisis pan-cáncer.

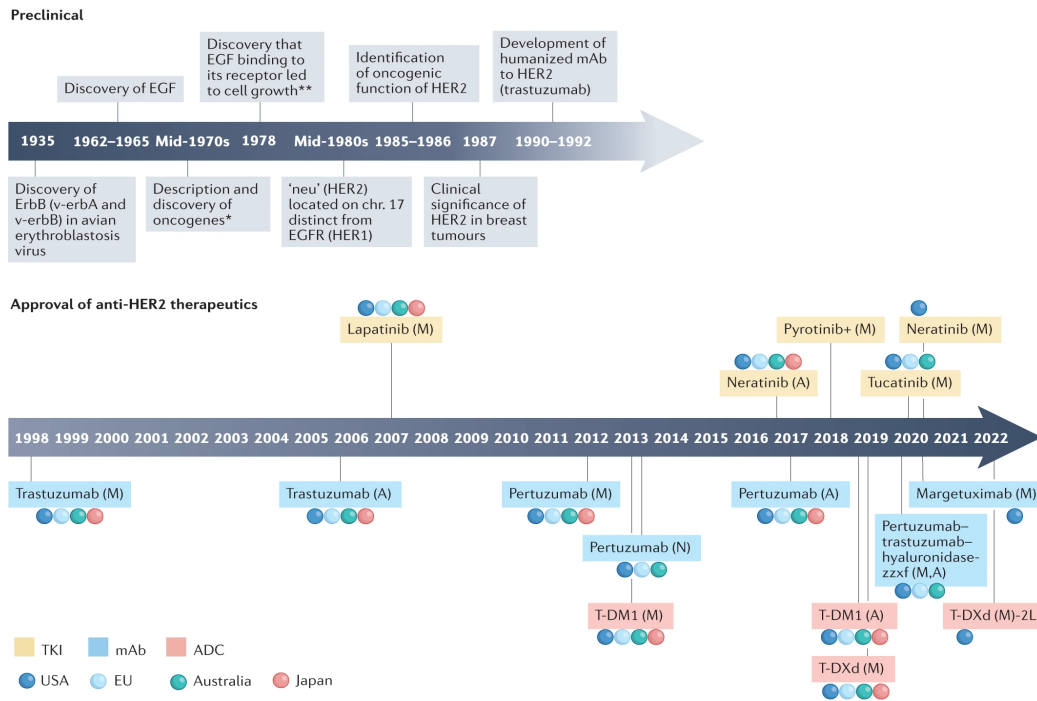
Análisis de datos específicos del exoma de 111.176 tumores (400 tipos de cáncer). Se detectaron mutaciones de HER2 en 3.851 tumores (3,5%). El dominio extracelular y del dominio quinasa representaron la mayoría de estas mutaciones (~40% cada uno), el dominio transmembrana y el dominio yuxtamembrana aproximadamente el 2,8% y 7,7% de las mutaciones respectivamente. **(A)**. Mutaciones observadas en *ERBB2* mostradas en un diagrama de la proteína HER2; **(B)**. Puntos críticos de mutación observados en las regiones TMD/JMD de *ERBB2* en diferentes cánceres.

Adaptado de: Pahuja KB et al. *Cancer Cell*. 12 de noviembre de 2018;34(5):792-806.e5

### **1.4.3 Implicaciones clínicas**

El primer fármaco aprobado para CM-HER2 positivo fue trastuzumab, un anticuerpo monoclonal, hace más de dos décadas, siendo la primera indicación en el tratamiento del CM metastásico a raíz de los resultados del primer ensayo clínico aleatorizado que empleó terapia anti-HER2 en CM<sup>122</sup>. Años más tarde en el escenario adyuvante, el empleo de trastuzumab tras quimioterapia en CM precoz con sobreexpresión de HER2, testado en cinco ensayos clínicos aleatorizados, consiguió una mejora significativa en supervivencia libre de enfermedad (SLE)<sup>123</sup>, beneficio que se extendía, en un análisis combinado de cinco estudios, a una disminución estadísticamente significativa de la mortalidad específica por CM y de la tasa de metástasis a distancia<sup>124</sup>. Posteriores actualizaciones con datos de largo seguimiento confirman un beneficio mantenido con impacto significativo en SG con el empleo de terapia anti-HER2 en CM con sobreexpresión de HER2 en estadios localizados y enfermedad metastásica. Tras esto, se han ido incorporando nuevos fármacos dirigidos, de modo que en la práctica clínica habitual ya disponemos de más de 10 terapias anti-HER2 las cuales se pueden emplear en las distintas fases de tratamiento (neo/adyuvante o paliativo) del CM-HER2 positivo<sup>7</sup> (Figura 11).

Por el momento, factores clínicos clásicos como el tamaño tumoral o la afectación axilar, factores histopatológicos y los biomarcadores clásicos (expresión de RH y valor de HER2 por IHQ/ISH), continúan definiendo el algoritmo terapéutico del CM-HER2 positivo en la práctica clínica. Sin embargo, como se ha detallado previamente, si tomamos en consideración el subtipo intrínseco molecular del tumor en cuestión, el impacto de estos factores clínico-patológicos clásicos respecto a una aproximación precisa al éxito o fracaso del tratamiento disminuye considerablemente. Aunque las pacientes con CM-HER2 positivo son el grupo que obtiene el mayor beneficio del tratamiento anti-HER2, la respuesta es heterogénea y una proporción sustancial de pacientes presenta resistencia primaria y secundaria al tratamiento.



**Figura 11.** Evolución de HER2 como biomarcador y diana de tratamiento del CM.

Cronología de los hitos del descubrimiento preclínico para la biología de HER2 y la aprobación regulatoria para terapias anti-HER2. **Leyenda:** A, configuración adyuvante; M, entorno metastásico; N, configuración neoadyuvante; +, aprobado únicamente en China; \* M. Bishop y H. Varmus recibieron el Premio Nobel en 1989 por este descubrimiento; \*\* S. Cohen y R. Levi-Montalcini recibieron el Premio Nobel en 1986 por el descubrimiento de los factores de crecimiento y sus receptores. Adaptado de "Swain SM et al. Nat Rev Drug Discov. 2023;22(2):101-126.

La relación entre el grado de amplificación génica de *ERBB2* o sobreexpresión de la proteína HER2, y la medida de beneficio de los diferentes fármacos anti-HER2 se ha evaluado en estudios de CM precoz y metastásico. La evidencia disponible respalda una mayor probabilidad de éxito para estas terapias en tumores con una mayor expresión de la proteína y/o incremento de los niveles de ARNm de *ERBB2*, si bien una menor expresión de HER2 o inferiores niveles de ARNm también se ha asociado en varias publicaciones a beneficio clínico<sup>125-131</sup>. Varios estudios en el contexto neoadyuvante demostraron una asociación entre las tasas de respuesta patológica completa (rPC) y niveles más elevados de ARNm de *ERBB2* o sobreexpresión de la proteína<sup>129-131</sup>. En el contexto adyuvante, esta asociación no tuvo impacto en SLE ni en SG. En un análisis exploratorio y centralizado con muestras procedentes del estudio NSABP B-31<sup>132</sup> se encontró una asociación no significativa ( $p=0.60$ ) entre CNA de *ERBB2* y

beneficio a tratamiento adyuvante con trastuzumab, incluso pacientes con copias normales del gen parecían obtener beneficio. Entre los 1787 pacientes con datos de seguimiento, 174 (9,7%) correspondían a tumores HER2 negativos tras el análisis centralizado de HER2 por IHQ/ISH, y estos también parecían mantener beneficio del tratamiento adyuvante con trastuzumab (RR para SLE 0,34; 95% CI, 0,14-0,80,  $p=0,014$ ). Similares resultados se obtuvieron en otro análisis exploratorio del estudio N9831, donde tras un primer análisis la relación entre los niveles de ARNm de *ERBB2* y beneficio con trastuzumab fue no significativa ( $p=0.057$ ), siendo la concordancia entre los 3 métodos de valoración centralizada de HER2 empleados (IHQ, ISH y RT-PCR) elevada<sup>133</sup>.

Con respecto a la expresión de los RH, en el ámbito neoadyuvante diferentes ensayos han mostrado tasas de respuesta heterogéneas tras TNA basado en quimioterapia y terapia anti-HER2 entre tumores con RH positivos y negativos. El conseguir una rPC es un factor pronóstico significativo para SLE y SG en pacientes con CMTN y CM-HER2 positivo, de forma que aquellas pacientes que obtienen una rPC tienen mejores resultados en supervivencia que las que no. En el caso de los tumores HER2 positivos, si bien las tasas de rPC tras TNA basada en quimioterapia y fármacos anti-HER2 son numéricamente superiores en los tumores con RH negativos, no se ha podido demostrar que esta superioridad según estatus del RH trascienda en términos de supervivencia<sup>134</sup>, obteniendo ambos grupos resultados similares. En el escenario adyuvante, tras la publicación de un meta-análisis de datos individuales con más de 13.000 pacientes procedentes de 7 estudios aleatorizados, los resultados fueron similares sin impacto de beneficio de trastuzumab adyuvante añadido a quimioterapia en tasas de recurrencia y de mortalidad por CM según estatus del RH<sup>135</sup>.

Otro ejemplo que detalla el impacto en la clínica de la heterogeneidad de HER2 proviene de un estudio fase II basado en TNA con doble terapia anti-HER2 (trastuzumab-emtansina y Pertuzumab), llevado a cabo por el *Dana-Farber Cancer Institute*. En este ensayo se evaluó la heterogeneidad intra-tumoral en muestras pretratamiento obtenidas mediante biopsia guiada por ecografía de dos áreas distintas de cada tumor. La heterogeneidad intra-tumoral se definió por 1) un área con

amplificación de *ERBB2* mediante ISH en más de 5% pero <50% de las células tumorales ó 2) un área tumoral con resultado negativo para HER2. Entre los 164 pacientes incluidos, se detectó heterogeneidad intra-tumoral de HER2 en un 10% de los casos. Estos casos fueron clasificados como heterogéneos, grupo en el que no se obtuvo ninguna rPC (0% versus 55%,  $p < 0.0001$ , ajustada por RH), siendo la tasa de respuesta patológica más frecuente según el sistema de gradación de Symmans<sup>136</sup> de carga residual tumoral<sup>137</sup> la RCB III (del inglés, *Residual Cancer Burden*). Estos hallazgos, así como los descritos previamente por Nitta et al<sup>96</sup> (83), confirman que la heterogeneidad intra-tumoral es una entidad distinta, más diversa de lo que podríamos esperar con la evaluación patológica clásica y que parece constituir un mecanismo potencial de resistencia a terapia anti-HER2.

#### **1.4.3.1 Sensibilidad a la quimioterapia y terapia anti-HER2**

El impacto de los subtipos intrínsecos se ha evaluado retrospectivamente en ensayos clínicos de quimioterapia y terapia anti-HER2 tanto en escenario neoadyuvante (NeoALTTO<sup>138</sup>, CALGB-40601<sup>97</sup>, NOAH<sup>72</sup>, CHER-LOB<sup>98</sup>, BERENICE<sup>139</sup>, NSABP-B41<sup>140</sup>) como adyuvante (por ej. NSABP-B31<sup>141</sup> y N9831<sup>142</sup>). Nuevamente, en todos estos análisis el impacto del estado del RH, la amplificación de *ERBB2* o la expresión de HER2 a nivel de proteína o ARNm, caen a un segundo o tercer nivel como biomarcadores predictivos con respecto al subtipo intrínseco. En los estudios de TNA cuando los tumores se clasificaron por PAM50, el subtipo HER2E fue asociado con las mayores tasas de rPC excediendo el 50% en todos los ensayos clínicos, así como con la mejor SLE en comparación con los subtipos no enriquecidos.

#### **1.4.3.2 Sensibilidad a tratamiento anti-HER2**

Una de las áreas de mayor interés para la comunidad científica hoy en día en el tratamiento del CM-HER2 positivo es la desescalada terapéutica, un compendio de estrategias entre la que se encuentra el manejo con bloqueo dual de HER2 sin quimioterapia. Se han presentado varios análisis retrospectivos de ensayos de TNA con esquemas de tratamiento libres de quimioterapia, siendo el más reciente un análisis combinado de los estudios PAMELA<sup>101</sup>, TBCR006<sup>81</sup> y TBCR023<sup>143</sup>, en el que el beneficio

medido por tasas de rPC fue mayor para los tumores HER2E (35,1 % frente al 9,9 % en no enriquecidos;  $p < 0,001$ ) y en aquellos con niveles de expresión del ARNm de *ERBB2* elevados (36,1 % versus 8,2 % en ARNm *ERBB2* bajos;  $p < 0,001$ )<sup>144</sup>. En particular aquellos tumores con HER2E y ARNm de *ERBB2* altos, mostraron las mayores tasas de rPC (OR 6 ajustado,  $p < 0,001$ ). Este valor predictivo de los niveles de ARNm de *ERBB2* más allá del subtipo intrínseco no se ha demostrado en los estudios con quimioterapia y terapia antiHER2.

La explicación más probable tanto en ensayos con y sin quimioterapia se puede encontrar en el hecho de que el subtipo HER2E es más indicativo de la activación de la vía de señalización *HER2/EGFR* que la expresión proteica de HER2 o los niveles de ARNm de *ERBB2*. Los tumores de mama con subtipo HER2E son impulsados por la vía de señalización *HER2/EGFR*, como se demostró en el proyecto del genoma del CM del TCGA<sup>21</sup>, siendo este el subtipo intrínseco el que presenta una mayor expresión de *EGFR* y desde una perspectiva de expresión proteica, una mayor expresión de HER2 y HER2-fosforilado en comparación con otros subgrupos. Por lo tanto, este subtipo intrínseco dentro del CM-HER2 positivo debería beneficiarse al máximo del bloqueo dual anti-HER2, lo que explicaría los casos de tumores CM HER2 negativos y subtipo HER2E que obtienen beneficio terapéutico, por el hecho de que biológicamente estos tumores tienen la mayor expresión de *HER2/EGFR* con independencia del grado de expresión de los RH<sup>23</sup> y de la amplificación génica de *ERBB2*. Sin embargo, debido al diseño de la mayoría de los ensayos clínicos en los que se basa el tratamiento neo/ad-yuvante del CM-HER2 positivo, aún no hemos podido distinguir dentro del subtipo HER2E que una mayor tasa de eficacia se corresponda a una sensibilidad mejorada a los fármacos anti-HER2 o bien a la terapia citotóxica. El subtipo HER2E podría ser un predictor en sí mismo y de una precisión molecular exclusiva, del beneficio de la terapia dirigida, teoría aún pendiente de ser validada en ensayos clínicos. Si esto se llegara a validar, este subtipo intrínseco permitiría perfeccionar la selección de aquellas pacientes que podrían obtener el mayor beneficio de los fármacos anti-HER2 sin empleo de quimioterapia cuando hablamos de etapas iniciales del CM, o para pacientes con enfermedad avanzada, las cuales van a precisar de un tratamiento prolongado,

igualmente recibir tratamiento de desescalada con combinaciones de fármacos anti-HER2 y omitir la quimioterapia.

### 1.4.3.3 Infiltración inmune

Varios estudios publicados han encontrado que firmas de expresión genética relacionadas con el sistema inmunitario ofrecen un valor pronóstico y también predictivo respecto a probabilidad de rCP en el contexto del CM-HER2 positivo en estadio temprano<sup>145</sup>. En un análisis conjunto de los ensayos CALGB 40601 y PAMELA, las firmas génicas inmunológicas, en concreto firmas de expresión génica de células B, demostraron información adicional y superior a la ofrecida por otros biomarcadores inmunes, en la predicción de la rCP y SLE<sup>146</sup>. El subtipo HER2E, muestra una mayor infiltración inmunológica, por lo que estas firmas génicas inmunológicas podrían ser especialmente útiles en este subtipo intrínseco para identificar aquellas pacientes con mayor probabilidad de responder a terapias dirigidas.

Los linfocitos infiltrantes de tumor (*TILs*, por sus siglas en inglés) son una mezcla de poblaciones de glóbulos blancos que migran e infiltran el tejido tumoral. Comprenden la mayoría de los infiltrados inmunes mononucleares que se identifican en el tumor, y parecen ser el reflejo biológico de la respuesta inmune innata y adaptativa antitumoral. Así podemos encontrar estudios que hablan de tumores “calientes” o “inflamados” si presentan un infiltrado inmunológico abundante, de tumores “inmuno-excluidos” si solo hay células inmunes en el estroma peritumoral, o finalmente de tumores “fríos” o “inmuno-desiertos” si la presencia de linfocitos es nula o escasa<sup>147</sup>. Los *TILs* se pueden localizar en el estroma tumoral (*sTILs*) y en el compartimento intraepitelial (esto es, célula a célula en contacto con las células tumorales, *iTILs*). Se pueden clasificar según su fenotipo y función biológica en células T CD8+ citotóxicas, CD8+ de memoria residentes en tejidos, células T *helper* CD4+ 1/2/17 (linfocitos Th1, Th2, Th17), células T CD4+ reguladoras (Treg FOXP3+), y células B infiltrantes de tumores. El Grupo de Trabajo Internacional de *TILs* desarrolló una metodología estandarizada para la valoración de los *TILs* en muestras de cáncer en 2014<sup>148</sup>, estableciendo que deben valorarse en secciones tumorales teñidas con hematoxilina y eosina

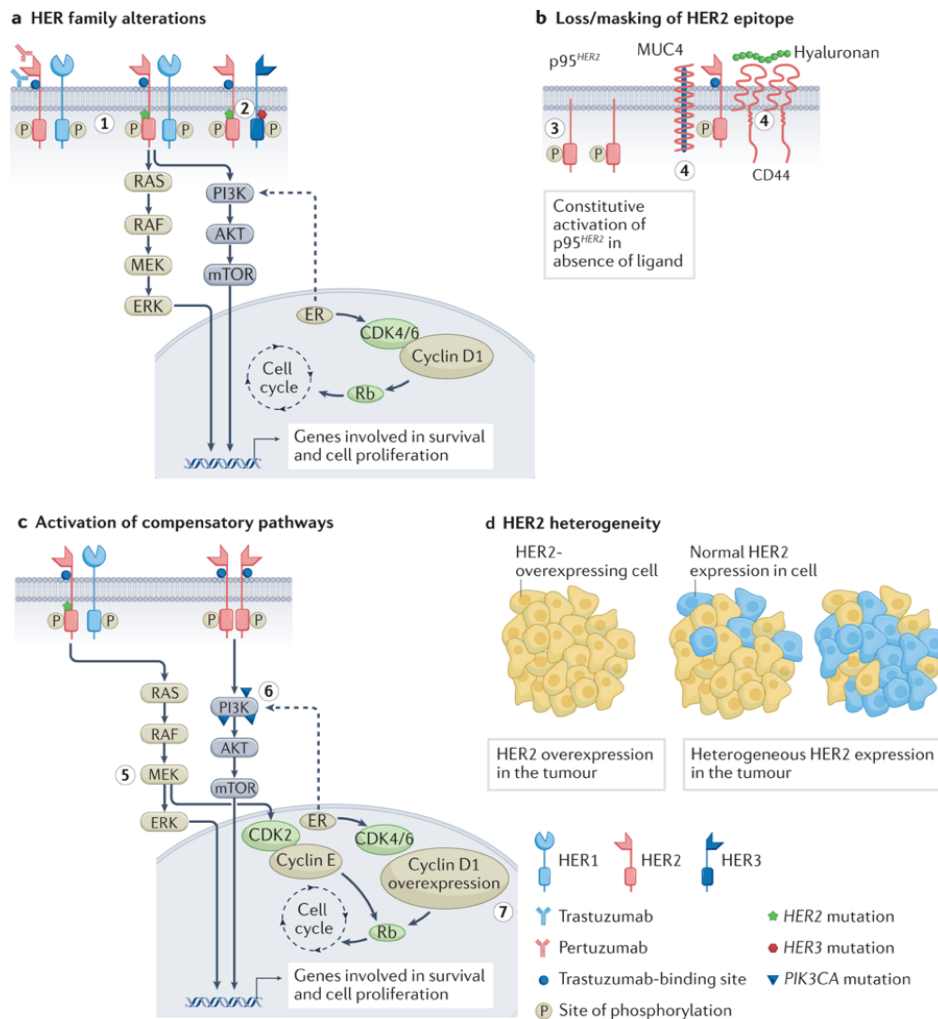
y cuantificarse como una relación entre el área estromal ocupada por linfocitos y células plasmáticas y el área estromal intra-tumoral total. Aún no se ha establecido un umbral de TILs con la suficiente relevancia clínica, si bien el término de CM rico en TILs se suele referir a aquellos tumores con >50% de infiltración. Una característica importante de estas células es que sus funciones cambian dinámicamente a lo largo de la progresión tumoral y en respuesta a los tratamientos pudiendo adquirir funciones dramáticamente opuestas. Los TILs representan inmunidad anti-tumoral preexistente, con relevancia pronóstica y valor predictivo en el CM-HER2 positivo y el CMTN<sup>149</sup>, si bien el CM no ha sido considerado clásicamente una neoplasia inmunogénica. A diferencia de la mayoría de los tejidos mucosos, el tejido mamario normal contiene agregados limitados de células inmunes<sup>150</sup>.

En pacientes con CM-HER2 positivo, los TILs están relacionados con un pronóstico y resultados de supervivencia favorables a largo plazo, tanto en la enfermedad temprana<sup>148,151-154</sup> como metastásica<sup>155</sup>. En la mayoría de los estudios de enfermedad precoz, se ha reportado una correlación positiva entre TILs elevados y respuesta a TNA, de forma similar a los estudios en CMTN<sup>151</sup>. En un análisis secundario del estudio NeoALTTO, se reportó que la presencia basal de TILs constituye un factor pronóstico independiente para rPC y SLE, y lo que es más significativo, que aquellos pacientes con unos TILs elevados presentaban una SLE favorable independientemente del tipo de respuesta patológica<sup>156</sup>. Dentro de los CM-HER2 positivo, los subtipos no luminales son los que presentan los niveles más elevados de sTILs, y en especial el subtipo HER2E<sup>23,157</sup>. Esto se ha asociado con tasas más altas de rPC y mejores resultados de supervivencia tras quimioterapia y/o doble terapia anti-HER2, así como con datos de eficacia positivos con el empleo de inmunoterapia, como sugieren los resultados del ensayo de fase IB/II PANACEA<sup>158</sup>. Sin embargo, en modelos multivariados ajustados por los subtipos PAM50, los TILs parecen perder potencia en su asociación con mejores resultados, debido a que el subtipo intrínseco molecular también parece abarcar la información proporcionada por los TILs<sup>23</sup>. Así, si la inmunoterapia aspira a obtener relevancia en el tratamiento del CM, los futuros ensayos clínicos deberían tener en cuenta a los subtipos intrínsecos en su diseño, especialmente en el CM-HER2 positivo.

#### 1.4.3.4 Resistencia terapéutica

La resistencia intrínseca y adquirida a terapias anti-HER2 es un problema actual y de máxima relevancia en la práctica clínica. Se han descrito diferentes mecanismos de resistencia que favorecen en su mayoría la reactivación de la vía HER2 o su señalización posterior (Figura 12)<sup>159</sup>. La mayoría de los fracasos terapéuticos en el tratamiento del CM-HER2 positivo se deben a resistencia adquirida por sub-clones de células altamente seleccionadas por la presión terapéutica. La prevalencia y el impacto clínico real de estos mecanismos siguen sin estar completamente estudiado. La mayoría de ellos implican aberraciones genéticas o epigenéticas, principalmente descritas en relación con el bloqueo único anti-HER2. Entre los principales mecanismos descritos tenemos:

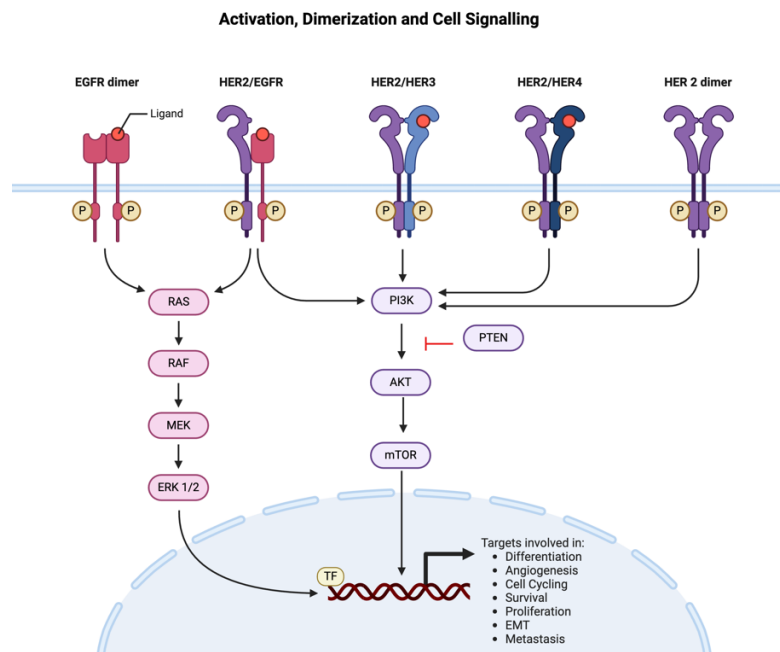
1. Bloqueo incompleto del receptor HER2 con activación de mecanismos compensatorios por parte de la familia de receptores HER.
2. Generación de p95HER2, una forma truncada de HER2 que carece del dominio extracelular reconocido por los anticuerpos anti-HER2, y la  $\Delta 16$ HER2, una variante de *splicing* con pérdida del exón 20 que codifica para una región del dominio extracelular, y que conduce a la estabilización de los homo-dímeros y por tanto, a la activación constitutiva de señalización intracelular mediada<sup>7</sup>.
3. Activación de RTKs alternativos u otros receptores de membrana fuera de la familia HER, como el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (*IGF-1R*), *AXL* o *MET*<sup>160</sup>.
4. Heterogeneidad intra-tumoral.
5. Alteraciones en las vías de señalización intracelular, esencialmente en el eje *PI3K/AKT/mTOR* (Figura 13).



**Figura 12.** Principales mecanismos de resistencia antiHER2.

**a.** Mutaciones y/o alteraciones en la familia de receptores HER que conducen a la activación de vías de señalización posteriores. Mutaciones en HER2 que conducen a la activación de las vías PI3K-AKT y RAS-MAPK. Mutaciones concurrentes en HER2 y HER3 que conducen a la activación de la vía PI3K-AKT; **b.** Pérdida del dominio extracelular de HER2. (3) sobreexpresión de p95<sup>HER2</sup>. (4) Enmascaramiento del sitio de unión de trastuzumab a HER2 debido a la sobreexpresión de mucina 4 (MUC4) y complejo hialuronano polimérico CD44; **c.** Activación de vías compensatorias. (5) Mutaciones en HER2 que promueven señalización MEK-ERK, que activa la quinasa CDK2. (6) Las mutaciones de PIK3CA y activación de la vía P13K-AKT. (7) Sobreexpresión del gen *CCND1* que conduce a resistencia a las terapias anti-HER2; **d.** La expresión heterogénea del receptor HER2 en tumores conduce a una menor sensibilidad a las terapias dirigidas que dependen de la sobreexpresión de HER2.

Adaptado de "Swain SM et al. *Nat Rev Drug Discov.* 2023;22(2):101-126.



**Figura 13.** Principales vías de señalización asociadas a HER2.

La unión del ligando a un heterodímero EGFR/HER2 provoca la activación de vías de señalización mediante la fosforilación del dominio tirosin-quinasa de la molécula intracelular de HER2. El homodímero HER2 está constitutivamente activo. Se activan las vías *RAS/MAPK* y *PI3K/Akt/mTOR*, lo que culmina en la activación de importantes efectores y factores de transcripción. En última instancia, esta señalización puede alterar la transcripción y modular la expresión genética, lo que repercute en muchas funciones celulares importantes. Leyenda: EMT: transición epitelio-mesénquima; *PTEN*: inhibidor importante de la vía *PI3K/Akt*. Las flechas indican señalización.

Created with BioRender.com y adaptado de: Hart V., et al. *Oncotarget*. 2020; 11: 4338-43

La hiperactivación de la vía *PI3K/AKT/mTOR* es la mejor caracterizada y la alteración más importante en el inicio y mantenimiento de la resistencia a las terapias anti-HER2 en tumores HER2 positivo y de forma independiente al grado de expresión del RH<sup>159</sup>. Mutaciones activadoras en *PIK3CA* o niveles reducidos de genes supresores de tumores por mutaciones o pérdida de *PTEN* y pérdida de *INPP4-B*, entre otras, son las principales alteraciones moleculares que mantienen esta hiperactivación. El impacto de bloquear esta vía se ha evaluado en numerosos ensayos clínicos, entre los que destacan el BOLERO-1 y BOLERO-3, ensayos que evalúan el papel de everolimus, un inhibidor de *mTOR*, en combinación con trastuzumab más paclitaxel como tratamiento de primera línea (BOLERO-1)<sup>161</sup> o en combinación con trastuzumab y vinorelbina en CM-HER2 positivo resistente a trastuzumab (BOLERO 3)<sup>162</sup>. Los resultados en eficacia de

ambos estudios fueron pobres frente a un aumento de la toxicidad muy significativo. No obstante, los datos más relevantes de ambos estudios provienen de análisis combinado de biomarcadores que mostraron beneficio en supervivencia en pacientes con mutaciones *PIK3CA* y/o pérdida de *PTEN*, y que fueron tratados con everolimus<sup>163</sup>. La mayoría de los estudios actuales se han diseñado para evaluar la actividad en combinación de la terapia anti-HER2 junto a inhibidores pan-*PI3K* y de la isoforma alfa de *PI3K*. Hasta ahora los inhibidores de *PI3K*-alfa específicos son los fármacos con resultados terapéuticos más prometedores y con menor incidencia de toxicidad grado 3 o superior respecto a los pan-inhibidores de *PI3K*<sup>164</sup>.

Otro posible mecanismo de resistencia, es la existencia de una comunicación bidireccional entre las vías HER2 y del RE. Varios estudios preclínicos sugieren que la vía de señalización del RE constituye una vía de escape, y por tanto de promoción de la resistencia a las terapias anti-HER2<sup>165</sup>. El eje *ciclina D1-CDK4/6* también desempeña un papel en la resistencia a las terapias anti-HER2<sup>159,166</sup>, habiéndose correlacionado la sobre-expresión de *CCND1* con tasas más bajas de rPC en pacientes tratadas con TNA basada en quimioterapia y terapia anti-HER2<sup>166</sup>. Estudios preclínicos en líneas celulares han demostrado la sinergia terapéutica de la combinación de terapia anti-HER2 e inhibidores de *CDK4/6*, y ya disponemos de resultados positivos en pacientes que apoyan la inhibición dual de *CDK4/6* y HER2, procedentes de los en los ensayos monarchER<sup>167</sup> y PATRICIA<sup>168</sup>, ambos en un escenario de CM-HER2 positivo avanzado y politratado. Por tanto, existe suficiencia evidencia de resistencia mediada por la ciclina D1 a terapias dirigidas frente a HER2, y el empleo de inhibidores de *CDK4/6* podría ayudar a superar dicha resistencia<sup>169</sup>. Una prueba de concepto que lo confirmaría la tenemos en un ensayo clínico de combinación libre de quimioterapia, con trastuzumab, pertuzumab, palbociclib y fulvestrant como TNA en CM con RE y HER2 positivos, que reportó una actividad prometedora en términos de reducción del Ki67 a las 2 semanas de tratamiento, y de tasa de rPC del 27% en mama y axila<sup>170</sup>.

Así, hipotéticamente, la gran mayoría de los mecanismos de resistencia descritos podrían ser atacados por terapias que ya están disponibles, como la terapia endocrina, los inhibidores de *CDK4/6*, o los inhibidores de mTOR. Sin embargo, la posible ventaja terapéutica de combinar estos fármacos con la terapia anti-HER2 estándar debe

sopesarse frente al riesgo potencial de toxicidades severas. Además, como resultado de la heterogeneidad intra e intertumoral, pueden coexistir diferentes mecanismos en un mismo paciente. El subtipo HER2E es el segundo subtipo intrínseco, después del LumA, con mayor porcentaje de aberraciones en el eje *PI3K/AKT/mTOR* (por mutaciones de *PI3KCA* y/o pérdida de *PTEN*) y de alteraciones en la vía del *RB1* (por amplificación de *CCND1* y/o de *CDK4*). Así, si ambos ejes están implicados en la resistencia del tratamiento anti-HER2, este subtipo intrínseco podría ser el más apropiado para diseñar futuros ensayos clínicos que prueben el papel de atacar todas las vías simultáneamente y evitar el desarrollo de resistencias adquiridas, independientemente del estatus clínico de HER2 que, por otro lado, no parece medir adecuadamente la heterogeneidad intra-tumoral, entidad ya establecida como otro potencial mecanismo de resistencia.

# 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

*“El científico debe tomarse la libertad de plantear cualquier cuestión, de dudar de cualquier afirmación, de corregir errores”*

**Oppenheimer** (1904-1967)



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## 2.1 HIPÓTESIS

El CM se compone de un grupo de entidades clínicas de elevada heterogeneidad a nivel clínico, molecular y de respuesta terapéutica. Los análisis transcriptómicos permitieron la identificación de los subtipos intrínsecos moleculares. El CM-HER2 positivo es uno de los fenotipos con mayor heterogeneidad y en él podemos encontrar representados cada uno de los 4 subtipos intrínsecos, si bien con una representación predominante del subtipo HER2E. Hasta la fecha la información pronóstica de este tipo de CM en la práctica clínica y predictiva de beneficio a terapias dirigidas continúa siendo dada según el estatus histopatológico de HER2 (definido por IHC y/o SISH), independientemente de otras variables clínico-patológicas. En contraposición a esta definición clásica alejada del paradigma de la medicina personalizada, sabemos ya que la definición de CM-HER2 positivo por IHC y/o ISH es heterogénea, y que la heterogeneidad molecular de un tumor se define por análisis de expresión y/o de mutaciones y alteraciones en el número de copias. La amplificación de *ERBB2* en CM es un evento pan-cáncer que puede encontrarse presente en todos los subtipos intrínsecos, especialmente en el subtipo HER2E. El subtipo intrínseco HER2E presenta un paisaje transcripcional único e independiente de la amplificación de *ERBB2*, lo que lo sitúa como el biomarcador ideal, más preciso y previsiblemente de mayor eficiencia para el diseño de ensayos clínicos con terapias anti-HER2.

## 2.2 OBJETIVOS

**Objetivo 1:** Identificar las bases moleculares de la heterogeneidad de los tumores de mama HER2 positivos mediante el análisis de diferencias significativas entre el subtipo HER2E y subtipos no HER2E.

**Objetivo 2:** Determinar la presencia de variantes genómicas (mutaciones, CNA) y de expresión en los genes más relevantes que integran las principales vías asociadas a la carcinogénesis y a la respuesta inmunitaria en el CM-HER2 positivo, y en función de subtipos intrínsecos HER2E y subtipos no HER2E.

**Objetivo 3:** Identificar perfiles de expresión génica asociados al microambiente tumoral y pasaje inmunológico del CM-HER2 positivo.

**Objetivo 4:** Correlación entre variables clínico-patológicas y de respuesta terapéutica con los datos moleculares derivados de los estudios de expresión y secuenciación.

# 3. MATERIAL Y MÉTODOS

---

*“La ciencia y la vida cotidiana no pueden y no deben ser separadas”*

**Rosalind Franklin** (1920-1958)



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

### **3.1 DISEÑO Y POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Siguiendo un diseño ambispectivo y observacional, se seleccionaron pacientes con diagnóstico de CM estadios I, II y III con sobreexpresión de HER2 determinada por IHC y/o ISH en la biopsia del tumor primario, tratadas entre 2011 y 2023 en la Unidad Intercentros de Oncología Médica de Málaga, compuesta por los hospitales Regional Universitario y Virgen de la Victoria. Se incluyeron pacientes de  $\geq 18$  años, tratadas según los estándares oncológicos para el CM-HER2 positivo: estrategia adyuvante (esto es, quimioterapia basada en taxanos con antraciclinas y/o carboplatino, junto a terapia anti-HER2) tras cirugía primaria, o bien TNA con administración de tratamiento sistémico previo a la cirugía. Aquellas pacientes con expresión de RH positiva han recibido terapia hormonal según estatus menopáusico durante al menos 5 años como terapia adyuvante complementaria al tratamiento dirigido. Se excluyeron pacientes con otra neoplasia en los 5 años previos al diagnóstico de CM y/o otra neoplasia sincrónica (incluyendo CM multifocal y/o bilateral con subtipo clínico no HER2), pacientes con estadio IV al diagnóstico o aquellos casos en los que no hubiera disponibilidad de biopsia diagnóstica y/o quirúrgica. Todos los pacientes fueron informados del propósito del estudio para el que fueron reclutados y dieron su consentimiento informado por escrito para participar. Los protocolos del estudio y consentimiento informado específico de proyecto fueron aprobados por el comité ético de investigación clínica correspondiente (*Comité Coordinador de Ética de la Investigación Biomédica de Andalucía*). En el **Anexo Documento.2** se adjunta el documento que acredita la aprobación del estudio por parte del comité de ética. En el **Anexo Documento.3** se adjunta el modelo de consentimiento informado específico de proyecto.

### **3.2 VARIABLES**

Se diseñaron dos bases de datos. En una de ellas se recogieron las principales características clínico-patológicas (*edad al diagnóstico, estatus menopáusico, fecha al diagnóstico, subtipo histológico, grado expresión de RH, grado histológico, Ki67, estatus HER2*), tipo y duración de tratamiento sistémico, grado de respuesta patológica en

caso de tratamiento neoadyuvante siguiendo el sistema RCB, tipo y tiempo a la recaída de haberse producido ésta, así como fecha y estado de último seguimiento. En la otra base de datos se recogieron los datos referentes a los resultados de secuenciación y expresión de cada una de las muestras analizadas.

### **3.3 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

#### **3.3.1 Muestras tumorales**

El nodo del Biobanco Andaluz en Málaga que gestiona las muestras del hospital-IBIMA proporcionó la mayoría de los bloques de tejido tumoral analizados en este proyecto. Las muestras se recuperaron del material excedente de biopsias sólida, obtenidas para el diagnóstico o durante la cirugía e incluidas en bloques de parafina (FFPE) para mantener la morfología celular y preservar el tejido a lo largo del tiempo. Para determinar el área tumoral de cada muestra, realizamos una tinción con hematoxilina y eosina de una sección tumoral montada en portaobjetos, que fue revisada por un patólogo para determinar el contenido y área tumoral. Realizamos tinción inmunohistoquímica de secciones de 10 µm en una inmunotinción automática (Autostainer Plus, Dako) utilizando el sistema EnVision FLEX (Dako). Como cromógeno utilizamos diaminobencidina contrateñida con hematoxilina. Utilizamos un suero no-inmune para reemplazar el anticuerpo primario como control negativo y controles positivos específicos para cada anticuerpo. Los anticuerpos utilizados fueron: anticuerpo monoclonal de conejo, clon SP1, Máster Diagnostica para el RE; anticuerpo monoclonal de conejo, clon Y85, Master Diagnostica para el RP; anticuerpo monoclonal de conejo, clon SP6, Master Diagnostica para Ki67, y finalmente el Kit Herceptest de Dako Corp. y el Kit VENTANA® HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail de Roche para HER2.

Las tinciones fueron evaluadas y calificadas por un patólogo experto en CM. Se cuantificó el porcentaje de celularidad tumoral de cada una de las muestras, siendo seleccionadas para el estudio muestras con un mínimo de 30% de celularidad tumoral en el área marcada. La positividad y valor del RE, RP y HER2 se definió siguiendo las

guías ASCO/CAP<sup>20,33</sup>. Se determinó el índice Ki67 cuantificando el porcentaje de células neoplásicas nucleares positivas. En las biopsias obtenidas durante cirugía tras tratamiento neoadyuvante, se determinó el grado de respuesta patológica siguiendo el sistema RCB<sup>171</sup>.

## **3.4 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA**

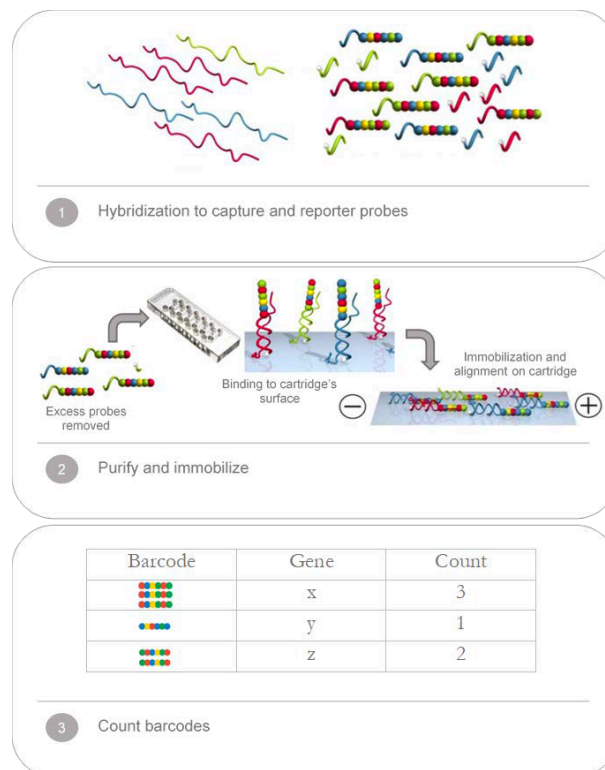
### **3.4.1 Aislamiento del ARN**

Para la extracción de ARN se realizó utilizando el kit de aislamiento *High Pure FFPE RNA isolation kit* (Roche, Indianápolis, IN, EE.UU.) siguiendo el protocolo del fabricante y por recomendación de Nanostring para el uso de su tecnología nCounter®. Para cada muestra de tumor se emplearon varias secciones de FFPE de 10 µm de espesor, según la celularidad del tumor y el área tumoral realizando una macro-diseción manual del área tumoral previamente delimitada por el patólogo para enriquecer la muestra en tejido tumoral. Para determinar la pureza y la concentración del ARN aislado se usó el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). La ratio entre 260 nm/280nm (A260/280), que determina la pureza de los ácidos nucleicos con respecto a las proteínas, se han dado por válidos valores entre 1,7 y 2,3.

### **3.4.2 Expresión génica con la tecnología nCounter® Dx Analysis System (NanoString Technologies)**

Para el estudio de expresión génica empleamos el sistema nCounter® de Nano-String basado en el conteo digital automatizado de moléculas de ARN. Es una metodología basada en hibridación sin amplificación previa, donde cada molécula diana se va a identificar por un código o combinación de fluorocromos. Este sistema mide la expresión génica de los genes a estudiar de forma directa en base al código de color que poseen las sondas a las que se unen cada uno de ellos. Estas sondas son contadas individualmente dando una alta precisión y sensibilidad y evitando así los posibles sesgos de los métodos basados en la amplificación, como el caso de la cuantificación de la expresión génica por qPCR o Microarray (Figura 14). La expresión génica de 758

genes se evaluó empleando el panel *Breast Cancer 360*<sup>TM</sup> de la plataforma NanoString nCounter (Nanostring Technologies, Seattle, WA) que abarca subtipos intrínsecos y 46 firmas biológicas claves<sup>172</sup> (Tabla 5 y 6). Las firmas biológicas están enriquecidas con genes potencialmente predictivos e implicados en la proliferación celular, endotelio, angiogénesis, citotoxicidad, estroma tumoral, quimioquinas inflamatorias y la apoptosis. Se analizaron 150 nanogramos de ARN y se procesaron en un sistema de análisis NanoString nCounter<sup>TM</sup> FLEX de acuerdo con las instrucciones del fabricante.



**Figura 14.** Flujo de trabajo del sistema nCounter®.

1) Cada RNA mensajero hibrida con una sonda *reporter* (que lleva la señal) y con una sonda de captura inmovilizada en el cartucho. 2) Las muestras son cargadas en la estación de preparación o PrepStation, donde el exceso de sondas se retira y el complejo ARN mensajero-sonda reporter-sonda de captura es inmovilizada y alineada en la superficie del cartucho. 3) Con el *Digital Analyzer*, se recogen los datos de nuestras; los códigos de color de la superficie del cartucho son contadas y asignadas a cada diana. La imagen ha sido tomada de la web <https://www.nanostring.com/scientific-content/technology-overview/ncounter-technology>.

PATHWAYS	FIRMAS	RESUMEN
<b>Breast Cancer Receptors</b>	<i>AR expression</i>	Gen que codifica el RA
	<i>ER expression</i>	Gen que codifica el RE
	<i>HER2 expression</i>	Gen que codifica HER2 ( <i>ERBB2</i> )
	<i>PR expression</i>	Gen que codifica el RP
<b>Breast Cancer Signaling Pathways</b>	<i>CDK4 expression</i>	Gen que codifica la quinasa dependiente de ciclina 4
	<i>CDK6 expression</i>	Gen que codifica la quinasa dependiente de ciclina 6
	<i>ER Signaling</i>	Mide la señalización mediada por el RE
	<i>PTEN expression</i>	Gen que codifica para PTEN
<b>Breast Cancer Subtyping</b>	<i>Basal-Like Correlation</i>	Coefficiente de correlación para el subtipo basal
	<i>HER2-Enriched Correlation</i>	Coefficiente de correlación para el subtipo HER2-enriquecido
	<i>Luminal A Correlation</i>	Coefficiente de correlación para el subtipo Luminal A
	<i>Luminal B Correlation</i>	Coefficiente de correlación para el subtipo Luminal B
	<i>Claudin-low Correlation</i>	Subtipo molecular caracterizado por un bajo nivel de marcadores luminales y una EMT elevada.
	<i>PAM50 Subtypes</i>	Firma de 50 genes que clasifica el cáncer de mama en cuatro subtipos distintos
<b>Breast Cancer Prognosis</b>	<i>Genomic Risk of Recurrence</i>	Utiliza la correlación de subtipos y la puntuación de proliferación PAM50 para estimar el riesgo genómico de recurrencia a distancia
<b>Immune Cell Population Abundance</b>	<i>CD8 T-cells</i>	Mide la abundancia de células T CD8+
	<i>Cytotoxic Cells</i>	Mide la abundancia de células citotóxicas en el microambiente tumoral
	<i>Macrophage Abundance</i>	Mide la abundancia de macrófagos
	<i>Mast Cells</i>	Mide la abundancia de mastocitos
	<i>Treg abundance</i>	Mide la abundancia de Treg midiendo la expresión de FOXP3
<b>Inhibitory Metabolism</b>	<i>Hypoxia</i>	Mide los genes asociados con la oxigenación reducida en el tumor
<b>Inhibitory Tumour Mechanisms</b>	<i>B7-H3</i>	Gen que codifica B7-H3
	<i>IDO1 expression</i>	Gen que codifica Indolamina 2,3 dioxigenasa 1
	<i>PD-L1</i>	Gen que codifica Ligando-1 de muerte celular programada
	<i>TGF-Beta expression</i>	Gen que codifica TGF-Beta
<b>Inhibitory Tumour Signaling</b>	<i>Inflammatory Chemokines</i>	Mide las quimiocinas que reclutan poblaciones mieloides y linfoides al tumor
	<i>PD-1</i>	Gen que codifica PD-1
	<i>PD-L2</i>	Gen que codifica Ligando-2 de muerte celular programada
	<i>TIGIT expression</i>	Gen que codifica el inmunorreceptor de células T y los dominios Ig e ITIMS
<b>Stromal Factors</b>	<i>Endothelial cells</i>	Mide los genes asociados con el tejido vascular y la angiogénesis
	<i>Stroma</i>	Mide los componentes del estroma en el microambiente tumoral
<b>Tumour Immunogenicity</b>	<i>APM</i>	Mide la abundancia de genes en la vía de presentación de antígenos de MHC de clase I
<b>Anti-Tumour Immune Activity</b>	<i>Cytotoxicity</i>	Mide las moléculas utilizadas por las células T CD8+ y las células <i>natural killer</i>
	<i>Interferon gamma signalling</i>	Sigue la respuesta canónica al IFN gamma
	<i>MHC class II antigen presentation</i>	Mide los principales antígenos leucocitarios humanos implicados en la presentación de antígenos de MHC de clase II
	<i>TIS</i>	Mide la abundancia de una respuesta inmunitaria adaptativa suprimida periféricamente
<b>Tumour Mutational Response</b>	<i>P53 mutational score</i>	Es un subrogado del estado de TP53: las puntuaciones más altas se refieren a un estado similar a un mutante y las puntuaciones más bajas a un estado de tipo salvaje
	<i>BRCAness</i>	Informa sobre defectos en los genes de reparación de daños del ADN BRCA1 y 2
	<i>HRD</i>	Evalúa funcionalmente el estado de reparación de recombinación homóloga. Una puntuación más alta se refiere a una mayor deficiencia de reparación de daños
<b>Tumour Regulation</b>	<i>Apoptosis</i>	Captura genes asociados con procesos apoptóticos, genes proapoptóticos y antiapoptóticos
	<i>Proliferation</i>	Mide genes implicados en la proliferación tumoral
	<i>Cell Adhesion</i>	Puntuación de la muestra para la regulación negativa de genes que codifican para proteínas de las uniones estrechas
	<i>Differentiation Score</i>	Asigna una puntuación de diferenciación a la muestra
	<i>FOXA1 expression</i>	Gen que codifica el factor de transcripción FOXA1
	<i>Mammary Stemness</i>	Mide un cluster o grupo de genes EMT sobreexpresados en <i>stem-cell-like tumours</i>
	<i>Rb1 Expression</i>	Gen que codifica el gen del retinoblastoma
<i>SOX2 Expression</i>	Gen que codifica el gen SRY-box2	

Tabla 5. Firmas incluidas en el panel Breast Cancer 360™.

Adaptado de: Bergamino MA, et al. EBioMedicine. 2022;83:104205.

Lista de genes incluidos en el panel BC360																
HK=housekeeping gene	Target gene															
ABCF1	ABCA8	BLM	CD19	CKB	DTX1	FGF10	GPR160	HOXA7	KCNB1	MELK	NSD1	POLD1	ROCK1	SP1	TPSAB1/B2	
ACTB	ACTR3B	BLVRA	CD1E	CKMT1A	DTX3	FGF12	GPX3	HOXA9	KDR	MEOX2	NTRK2	POLQ	ROCK2	SPC25	TRIP13	
G6PD	ACVR1B	BMP2	CD24	CKS1B	DTX4	FGF13	GRB2	HOXB13	KIAA0040	MET	NUDT1	POPDC3	RORA	SPDEF	TSPAN1	
GUSB	ACVR1C	BMP4	CD27	CLDN1	DUSP4	FGF18	GRB7	HOXB3	KIAA1462	MFNG	NUMBL	PPARG	RORR	SPN	TSPAN7	
MRPL19	ACVRL1	BMP5	CD274	CLDN3	DUSP6	FGF2	GREM1	HSPA2	KIF11	MIA	NUPR1	PPARGC1A	RPS6KA5	SPP1	TTK	
NRDE2	ADAM12	BMP6	CD276	CLDN4	E2F1	FGF7	GRIA3	IBSP	KIF14	MIS18A	OAS3	PPP2CB	RPS6KB1	SPRY1	TTYH1	
OAZ1	ADCY9	BMP7	CD29	CLDN7	E2F5	FGF9	GRIN1	ICAM1	KIF23	MKI67	OCLN	PPP2R1A	RPS6KB2	SPRY2	TUBA4A	
POLR2A	ADD1	BMP8A	CD34	CLEC14A	ECM2	FGFR2	GRIN2A	ID1	KIF2C	MLH1	OGN	PPP2R2C	RRM2	SPRY4	TWIST1	
PSMC4	ADM	BMPR1A	CD36	CLEC5A	EDN1	FGFR3	GSK3B	ID2	KIFC1	MLLT3	OLFM2L2B	PRC1	RUNX3	SRPX	TWIST2	
PUM1	AGR2	BMPR1B	CD44	CMKLR1	EDNRB	FGFR4	GTF2H2	ID4	KIT	MLPH	ORC6L	PREP	S100A14	ST6GALNAC2	TYK2	
RPLP0	AGT	BMPR2	CD49f	CNTFR	EFNA3	FGL2	GZMA	IDO1	KLRK1	MMP11	PALB2	PRF1	S100A7	STAT1	TYMP	
SDHA	AGTR1	BNC2	CD68	COL11A1	EFNA5	FHL1	GZMB	IFT140	KNTC2	MMP14	PALMD	PRKAA2	S1PR1	STC1	TYMS	
SF3A1	AKT3	BNIP3	CD84	COL27A1	EGF	FIGF	GZMH	IGF1	KRT14	MMP3	PARP1	PRKACA	SCARA5	SUV39H2	UBE2C	
STK11IP	ALDH1A1	BRCA1	CD8A	COL2A1	EGFR	FL11	GZMM	IGF1R	KRT17	MMP7	PARP2	PRKACB	SCUBE2	SYTL4	UBE2T	
TBC1D10B	ALDOA	BRCA2	CD8B	COL4A6	EGLN2	FLNC	HAPLN1	IKZF3	KRT5	MMP9	PARP4	PRKCA	SELE	TAP1	VCAN	
TBP	ANGPT1	BTG2	CD14A	COL6A3	EGLN3	FLRT3	HAS1	IL10RA	KRT6B	MMRN2	PAX5	PRKCB	SERPBP1	TAP2	VEGFA	
TFR3	ANLN	C10orf32	CD14B	COL7A1	EIF2AK3	FLT3	HBB	IL11RA	KRT7	MRE11	PAX8	PRKDC	SERPINH5	TAPBP	VIM	
UBB	ANXA9	C13orf3	CD20	COL9A3	EIF3B	FNBP1	HDAC1	IL12RB2	LAD1	MS4A2	PBX3	PRKX	SERPINH1	TBC1D9	VIT	
APH1B	C2orf82	CD25A	COLEC12	EIF4E2	FOS	HDAC10	IL13RA1	LAG3	MSR1	PCK1	PRLR	SFN	TBX1	WDR77		
APOD	C5orf38	CD25B	COMP	EIF4EBP1	FOSL1	HDAC11	IL1B	LAMA3	MT1G	PCNA	PROM1	SFRP1	TCEAL1	WEE1		
APOE	CA12	CD25C	CPA3	ELF3	FOXA1	HDAC2	IL1R2	LAMB3	MTOR	PDCD1LG2	PSAT1	SFRP2	TCF4	WHSC1L1		
AR	CACNA1D	CD6C	CREBBP	ELK3	FOXC1	HDAC5	IL1RN	LAMC2	MUC1	PDE9A	PSMB7	SFRP4	TCF7L1	WIF1		
AREG	CACNA1H	CD7	CRYAB	ELOVL2	FOXC2	HDAC6	IL20RA	LEF1	MUS81	PDGFR	PSMB7	SHC2	TEK	WNT10A		
ARID1A	CACNA2D1	CDCA1	CSF3R	EMCN	FOXO1	HEG1	IL20RB	LEFTY2	MYBL2	PDGFRA	PSMB9	SHC4	TFDP1	WNT11		
ARNT2	CACNA2D3	CDCA5	CTSW	ENO1	FOXO3	HEG1	IL22RA2	LEMD1	MYC	PDGFRB	PTCH1	SHE	TFP1	WNT2		
ASPM	CACNG1	CDCA7L	CXADR	ENPP2	FREM2	HELLS	IL24	LEP	MYCN	PDK4	PTEN	SHMT2	TFP3	WNT4		
ASP	CACNG4	CDCA8	CXCL10	EP300	FST	HEMK1	IL2RA	LEPR	MYCT1	PECAM1	PTGDS	SIDT1	TGFB1	WNT5A		
ATAD2	CACNG6	CDH1	CXCL12	EPAS1	FSTL1	HES1	IL2RB	LFNG	NASP	PFDN2	PTGER3	SIGIRR	TGFB2	WNT5B		
ATM	CALML5	CDH2	CXCL13	ERBB2	FSTL3	HGF	IL3RA	LIF	NAT1	PGK1	PTGS2	SIX1	TGFB3	WNT6		
ATP10B	CAMK2B	CDH3	CXCL5	ERBB4	FUT3	HIF1A	IL4R	LIFR	NCAM1	PGR	PTTG1	SKP1	TGFB2	WNT7B		
AURKA	CAV1	CDH5	CXCL9	EREG	FXYD3	HIST1H1C	IL6	LOC400043	NCAPH2	PHGDH	PYCARD	SKP2	THBS1	WRN		
AURKB	CLIC	CDK1	CXCR6	ERBB2	FZD10	HIST1H2BH	IL6R	LPL	NDP	PIK3CA	RAC2	SLC2A1	THBS2	WT1		
AXIN1	CCL2	CDK6	CXorf36	ERBB4	FZD7	HIST1H3H	IL7R	LRP2	NEIL1	PIK3CD	RAC3	SLC39A6	THBS4	XRCC2		
AXIN2	CCL21	CDKN1A	CXXC5	EREG	FZD8	HIST3H2BB	IL8	LRRC32	NEIL3	PIK3CG	RAD51	SLC44A4	THY1	XRCC3		
B3GNT3	CCL3/L1	CDKN1B	CYBB	ESPL1	FZD9	HK2	INHBA	LTB	NEO1	PIK3R1	RAD51C	SLPI	TIE1	ZBTB16		
BAD	CCL4	CDKN1C	CYP4F3	ESR1	GABRP	HLA.A	INHBB	LTBP1	NETO2	PIK3R2	RAD52	SMAD1	TIGIT	ZEB1		
BAG1	CCL5	CDKN2A	DCN	ETV4	GADD45A	HLA.B	IRF6	MAD2L1	NFATC1	PIK3R3	RAD54L	SMAD3	TIMP4	ZEB2		
BAI1	CCL7	CDKN2B	DDB2	ETV7	GADD45B	HLA.C	IRX1	MAF	NFKBIZ	PIK3R5	RARRS3	SMAD4	TLE3	ZFPM2		
BALAP3	CCL8	CDKN2C	DDR2	EXO1	GADD45G	HLA.DMA	ISG15	MAML2	NGFR	PIM1	RASAL1	SMAD5	TLR4	ZFYVE9		
BAMBI	CCNA1	CDKN2D	DDX39	EYA1	GAS1	HLA.DMB	ITGAV	MAP2K4	NGG7	PIP	RASGRF1	SMC1B	TLX1	ZIC2		
BAX	CCNA2	CDKN3	DEPDC1	EYA2	GATA3	HLA.DOB	ITGB3	MAP3K12	NOD2	PKMTY1	RASGRF2	SMO	TMEM45B	ZNF205		
BBC3	CCNB1	CEACAM5	DHRS2	EYA4	GATA4	HLA.DPA1	ITGB6	MAPK1	NOTCH1	PLA1A	RASGRP1	SMURF2	TMPSR2			
BBOX1	CCND1	CEACAM6	DKK1	F3	GDF15	HLA.DPB1	ITPR1	MAPK10	NOTCH2	PLA2G2A	RB1	SNAI1	TMPSR4			
BCAS1	CCND2	CENPF	DKK2	FAM124B	GDF5	HLA.DQA1	JAG1	MAPK3	NOTCH3	PLA2G3	RBL1	SNAI2	TNF			
BCL11A	CCNE1	CEP55	DLG7	FAM198B	GGH	HLA.DQB1	JAG2	MAPK8IP2	NPEPPS	PLA2G4A	RBL2	SOC1	TNFAIP6			
BCL2	CCNE2	CFD	DLL1	FAM214A	GHR	HLA.DRA	JAK1	MAPT	NPR1	PLA2G4F	RBX1	SOC2	TNFSF10			
BCL2L1	CCR1	CHAD	DLL3	FAM83D	GJB2	HLA.DRB1	JAK2	MARCO	NR4A1	PLAT	RELN	SOC3	TNKS			
BCL2L1	CCR2	CHEK2	DLL4	FANCF	GLI3	HLA.E	JAK3	MCM2	NR4A3	PLCB1	REFC4	SOX10	TNKS2			
BCL6B	CCR5	CHI3L1	DNAJC12	FAP	GNG4	HMGAI1	JAM2	MCM3	NRCAM	PLCB4	RNASE2	SOX17	TNN			
BDNF	CD10	CHIT1	DPT	FBN1	GNLY	HNF1A	JUN	MDM2	NRXN1	PLCE1	RNF103	SOX2	TOP2A			
BIRC5	CD163	CHRNA5	DSC2	FGF1	GPC4	HOXA5	KAT2B	MED1	NRXN3	PLD1	ROB4	SOX9	TP53			

Tabla 6. Lista de genes incluidos panel Breast Cancer 360™.

Información más detallada del panel puede ser consultada en <https://nanosting.com/products/ncounter-assays-panels/oncology/breast-cancer-360/>.

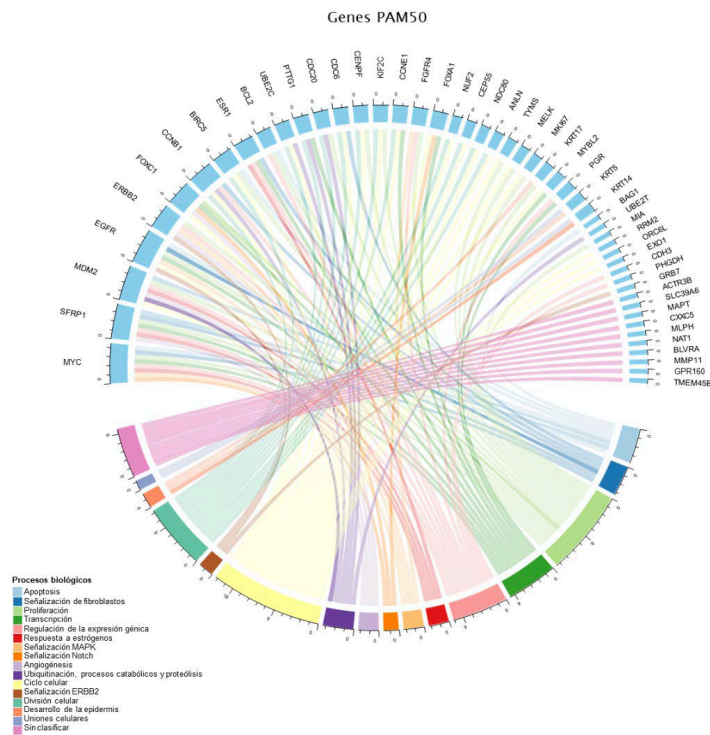


Figura 15. Genes incluidos en la firma PAM50.

En la parte superior del *circus plot* se muestran los genes que se incluyen en la firma PAM50. En la parte inferior se muestran los procesos biológicos a los que pertenecen dichos genes.

### 3.4.3 Análisis bioinformático de los datos de expresión

Continuando con la tecnología nCounter™ DX Analysis System, se evaluaron los cambios encontrados entre los diferentes tiempos según los objetivos descritos en el capítulo 2. Los datos de expresión crudos fueron normalizados siguiendo el método de normalización de NanoString con respecto a los controles internos y expresión de los 18 genes *house-keeping* incluidos en el panel (usados como control positivo interno dada su expresión constitutiva bajo cualquier condición a un nivel relativamente bajo en todas las células). Dentro de las firmas, se incluye la firma PAM50 que subtipifica el CM en los 4 subtipos intrínsecos en base a un algoritmo según la expresión de 50 genes (Figura 15). Para cada una de las muestras, se utilizaron datos normalizados para determinar las puntuaciones de correlación para las cuatro firmas de subtipo intrínseco incluidas, asignar así el subtipo intrínseco y calcular el riesgo de recurrencia (*ROR*). El análisis de expresión diferencial (AED) se realizó a partir de los datos de

expresión de las 79 muestras analizadas según el panel BC360™ para 758 genes (excluidos los 18 genes *housekeeping*-) y 42 firmas biológicas (*AR, ESR1, ERBB2, PGRC, CDK6\_Expression, CDK4\_Expression, ER\_Signaling, PTEN, ROR, CD8\_T-Cells, Cytotoxic\_Cells, Macrophages, Mast\_Cells, Treg, Hypoxia, IDO1, B7-H3, PD-L1, TGF-Beta, Inflammatory\_Chemokines, PD-1, PD-L2, TIGIT, Stroma, Endothelial\_Cells, APM, Cytotoxicity, IFN\_Gamma, MHC-2, TIS, BC\_p53, HRD, BRCAness, Apoptosis, BC\_Proliferation, Cell\_Adhesion, Differentiation\_Score, FOXA1, Rb1, SOX2, Mammary\_Stemness*). Se empleó el paquete `limma` de R, una herramienta validada y ampliamente utilizada en el análisis diferencial de los datos de RNA-seq. En todos los casos, un gen o firma se consideró diferencialmente expresados entre grupos cuando se cumplen las condiciones de p-valor ajustado  $< 0,05$  y  $|\log_2FC| > 1,5$ .

## 3.5 ANÁLISIS MUTACIONAL

### 3.5.1 Aislamiento del ADN y ARN

Para la extracción de ácidos nucleicos totales de las muestras FFPE, se llevó a cabo una macro-disección del tejido previamente delimitada el área tumoral por el patólogo. Se empleó el kit de aislamiento de ácidos nucleicos totales *Recover All™* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) siguiendo el protocolo del fabricante, siendo un procedimiento de aislamiento basado en métodos de columnas con membranas de sílice que permiten la unión del ADN o ARN. Estos protocolos comienzan con la desparafinación del tejido con xileno seguida de lavados con etanol, digestión del tejido con proteasas, unión del ADN o ARN a la membrana, una serie de lavados con alcoholes y por último la elución del ácido nucleico purificado. Se determinó la concentración y pureza del ADN y ARN mediante el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) dando por válidos valores de la ratio 260nm/280nm próximos a 1,8 para el ADN y entorno a 2 para el ARN. A continuación, los ácidos nucleicos se cuantificaron de forma más específica y precisa con un método fluorométrico mediante el Qubit™ 4.0 (Invitrogen) con el kit de ensayo *Qubit DNA dsDNA BR* para el

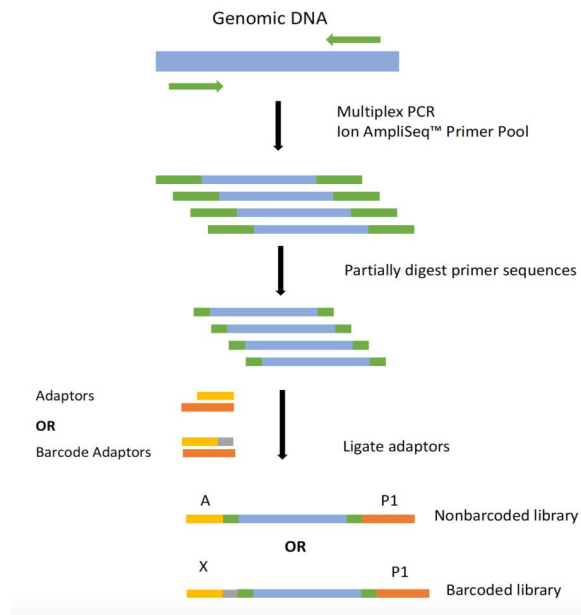
ADN y el kit de ensayo *Qubit RNA BR* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) para el ARN.

### 3.5.2 Genes y secuenciación en Ion GeneStudio S5™ System

Se han secuenciado un total de 161 genes implicados en la biología del cáncer, englobando aquellos involucrados en la carcinogénesis del CM. Estos genes se incluyen en el panel *Oncomine™ Comprehensive Assay v3C* (Figura 16). Este panel está validado por la FDA y su uso ya se ha extendido en la práctica clínica habitual para respaldar la toma de decisiones clínicas respecto a terapias dirigidas en un amplio abanico de neoplasias, incluyendo CM. Se prepararon librerías de forma automatizada con el sistema Ion Chef (Thermo Fisher Scientific) partiendo de 20 nanogramos de ADN y ARN. Se preparó un máximo de 8 muestras (8 muestras de ADN y 8 muestras de ARN) por carrera en un chip Ion 540 (Thermo Fisher Scientific). Los chips se cargaron en el secuenciador Ion Gene Studio S5 Prime (ThermoFisher® Scientific), que lleva a cabo una secuenciación basada en un sistema de semiconductores que miden cambios de pH.

Hotspot genes				Full-length genes			Copy number genes		Gene fusions (inter- and intragenic)		
AKT1	ESR1	KIT	PDGFRB	ARID1A	FBXW7	PTEN	AKT1	FGFR4	AKT2	FGFR2	NUTM1
AKT2	EZH2	KNSTRN	PIK3CB	ATM	MLH1	RAD50	AKT2	FLT3	ALK	FGFR3	PDGFRA
AKT3	FGFR1	KRAS	PIK3CA	ATR	MRE11	RAD51	AKT3	IGF1R	AR	FGR	PDGFRB
ALK	FGFR2	MAGOH	PPP2R1A	ATRX	MSH6	RAD51B	ALK	KIT	AXL	FLT3	PIK3CA
AR	FGFR3	MAP2K1	PTPN11	BAP1	MSH2	RAD51C	AXL	KRAS	BRCA1	JAK2	PRKACA
ARAF	FGFR4	MAP2K2	RAC1	BRCA1	NBN	RAD51D	AR	MDM2	BRCA2	KRAS	PRKACB
AXL	FLT3	MAP2K4	RAF1	BRCA2	NF1	RNF43	BRAF	MDM4	BRAF	MDM4	PTEN
BRAF	FOXL2	MAPK1	RET	CDK12	NF2	RB1	CCND1	MET	CDKN2A	MET	PPARG
BTK	GATA2	MAX	RHEB	CDKN1B	NOTCH1	SETD2	CCND2	MYC	EGFR	MYB	RAD51B
CBL	GNA11	MDM4	RHOA	CDKN2A	NOTCH2	SLX4	CCND3	MYCL	ERBB2	MYBL1	RAF1
CCND1	GNAQ	MED12	ROS1	CDKN2B	NOTCH3	SMARCA4	CCNE1	MYCN	ERBB4	NF1	RB1
CDK4	GNAS	MET	SF3B1	CHEK1	PALB2	SMARCB1	CDK2	NTRK1	ERG	NOTCH1	RELA
CDK6	H3F3A	MTOR	SMAD4	CREBBP	PIK3R1	STK11	CDK4	NTRK2	ESR1	NOTCH4	RET
CHEK2	HIST1H3B	MYC	SMO	FANCA	PMS2	TP53	CDK6	NTRK3	ETV1	NRG1	ROS1
CSF1R	HNF1A	MYCN	SPOP	FANCD2	POLE	TSC1	EGFR	PDGFRA	ETV4	NTRK1	RSP02
CTNNB1	HRAS	MYD88	SRC	FANCI	PTCH1	TSC2	ERBB2	PDGFRB	ETV5	NTRK2	RSP03
DDR2	IDH1	NFE2L2	STAT3				ESR1	PIK3CB	FGFR1	NTRK3	TERT
EGFR	IDH2	NRAS	TERT				FGF19	PIK3CA			
ERBB2	JAK1	NTRK1	TOP1				FGF3	PPARG			
ERBB3	JAK2	NTRK2	U2AF1				FGFR1	RICTOR			
ERBB4	JAK3	NTRK3	XPO1				FGFR2	TERT			
ERCC2	KDR	PDGFRA					FGFR3				

Figura 16. Lista de genes incluidos en el panel *Oncomine Comprehensive Assay v3C*.



**Figura 17.** Secuenciación por Ion Torrent, método de secuenciación de ADN basado en la tecnología Ion AmpliSeq.

### 3.5.3 Análisis bioinformático de las variantes encontradas a nivel de ADN

El procesamiento de los datos de secuenciación integró varios pasos. Los archivos crudos FASTQ fueron evaluados usando controles de calidad (software *FastQC v0.11.9*, y *Trim Galore*) para la eliminación de bases, adaptadores, y otras secuencias de baja calidad. Este tipo de archivos está basado en texto, y contienen, además de la secuencia de nucleótidos como texto (formato FASTA). El procesado de estas secuencias en formato FASTQ implica un paso de alineado o mapeo con el genoma de referencia del organismo correspondiente, de manera que pueda añadirse la información de coordenadas genómicas. El siguiente paso, estrictamente técnico, consiste en crear un archivo BAM. Los BAM (*Binary Alignment Map*, \*.bam) son archivos de formato binario para el almacenamiento de datos de secuenciación, y en concreto contienen la información sobre las lecturas de secuencias tras haberse realizado un alineamiento de estas contra un genoma de referencia. Cada FASTQ se preprocesó y alineó frente a la versión GRCh37/hg19<sup>173</sup> del genoma humano de referencia y se generaron así BAM ordenados mediante la Torrent Suite™. En cuanto a la priorización de

variantes, para la selección de aquellas potencialmente somáticas en cada muestra se aplicaron los siguientes filtros específicos y generales.

A) **CNVs**. Se emplearon los siguientes filtros:

- Exclusión de casos con MAPD < 0,4
- Ganancia de número de copias: CN > 4
- Pérdida de número de copias: CN < 2

Para los distintos grupos y comparaciones bajo estudio se determinó:

1. La existencia de diferencias significativas entre los CN detectados para cada gen recogido en el panel mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon (bilateral y unilateral).
2. La existencia de diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de presentar CNVs (ganancias y pérdidas) en cada uno de los genes recogidos en el panel mediante la prueba de Fisher (bilateral y unilateral).
3. La existencia de diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de presentar CNVs (ganancias) en cada uno de los genes recogidos en el panel mediante la prueba de Fisher (bilateral y unilateral).
4. La existencia de diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de presentar CNVs (pérdidas) en cada uno de los genes recogidos en el panel mediante la prueba de Fisher (bilateral y unilateral).

En todos los casos se consideraron diferencias significativas cuando el p-valor ajustado (FDR) < 0.05.

B) **SNVs-indels**. En primer lugar, se realiza la llamada de variante (*Variant Calling*) utilizando el *variant caller* Mutect2 (GATK). Obtenidos los resultados de la llamada de variantes, se añaden etiquetas a cada uno de los resultados para facilitar el filtrado posterior. Finalmente, las variantes resultantes

fueron anotadas con el software ANNOVAR y empleando las siguientes bases de datos:

- *Bases de datos de frecuencia poblacional*
  - dbSNP
  - ExAC
  - gnomAD
  - Kaviar
  - 1000 Genomes
- *Bases de datos de cáncer*
  - COSMIC
  - TCGA
  - GENIE (AACR)
  - ICGC
  - cBioportal (BRCA)
- *Bases de datos clínicas*
  - ClinVar
  - InterVar
  - CIVIC

Los filtros generales empleados se detallan a continuación.

- Mutaciones PASS o *multiallelic* (posiciones en las que se encuentra más de una mutación diferente en una misma muestra), eliminando contaminación, mutaciones normales, posibles mutaciones germinales, ambigüedades, etc.
- Exclusión de mutaciones sinónimas.
- Mutaciones en regiones exónicas o de *splicing*, eliminando mutaciones en regiones intrónicas, *UTR5*, *UTR3*, *upstream*, *downstream* y *ncRNA*.
- Exclusión de mutaciones benignas o probablemente benignas (ClinVar e InterVar).
- Exclusión de variantes presentes en dbSNP.
- Exclusión de variantes con AF > 0.000001 en gnomAD y Kaviar.

- Mutaciones anotadas en las bases de datos: COSMIC, TCGA, GENIE (AACR), cBioportal (BRCA) o ICGC.
- Mutaciones con unacobertura mínima de 250x informada por el software *Ion Reporter*.
- Frecuencia alélica  $\geq 0.05$  (5%).

Se realizó un análisis descriptivo general por grupos mediante el paquete `mafTools` de R. Para los distintos grupos y comparaciones bajo estudio se determinó la existencia de diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de presentar mutaciones en cada uno de los genes recogidos en el panel mediante la prueba de Fisher (bilateral y unilateral). Se consideraron diferencias significativas cuando el p-valor ajustado (FDR)  $< 0.05$ .

### **3.6 ANÁLISIS DE DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS A NIVEL DE EXPRESIÓN Y MUTACIONAL ENTRE HER2E Y RESTO DE SUBTIPOS**

Como parte del **objetivo 1**: *Identificar las bases moleculares de la heterogeneidad de los tumores de mama HER2 positivos mediante el análisis de diferencias significativas entre el subtipo HER2E y no HER2E*, establecimos dos grupos de trabajo, aquellos tumores con subtipo intrínseco HER2E frente al resto de casos tumores HER2 positivos con subtipo no HER2E (estos son, LumA, LumB o BAL).

- A) Se realiza un AED entre los casos HER2E (*Her2-Enriched*) y el resto de los subtipos intrínsecos (*No Her2-Enriched*).
- B) Se estudian las diferencias a nivel de alteraciones genómicas (SNVs-*indels*, CNVs) entre los casos HER2E (*Her2-Enriched*) y el resto de los subtipos intrínsecos (*No Her2-Enriched*).

### 3.7 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

Con la intención de comprobar si alguno de los resultados obtenidos en las comparativas realizadas con la información clínico-patológica, la expresión génica y el análisis de datos genómicos pudiera tener impacto en la supervivencia de las pacientes, se diseñó y llevó a cabo un análisis de supervivencia. Se crearon las variables 1) “SLE” definida como el tiempo en meses desde fin de tratamiento adyuvante hasta recurrencia tumoral, muerte por cualquier causa o fecha de último control, 2) “SG” definida como el tiempo en meses desde el diagnóstico de CM hasta muerte por cualquier causa o fecha de último control.

Usando el lenguaje de programación R con el paquete *Survival*, analizamos SLE y SG basado en a) aproximación de Kaplan-Meier y Log Rank Test y b) Cox Proportional Hazards Models corrigiendo el efecto de las covariables “Tratamiento” (Adyuvante o Neoadyuvante) y “Estado del receptor” (Positivo o Negativo). Se realizó dicho análisis de SLE y SG para detectar diferencias según:

- HER2E *versus* no HER2E
- HER2E *agrupado versus* HER2E *no agrupado*
- HER2E *no agrupado versus* no HER2E
- HER2E *agrupado versus* no HER2E
- En la población tratada con TNA, rPC *versus* no rPC

### 3.8 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

De forma general, la limitación más importante de nuestro estudio es que contempla un concreto de genes tanto en el análisis de expresión génica como en los estudios de secuenciación frente a un amplio número de variables clínico-patológicas y genómicas. Al centrarnos en aquellos genes con una relación ya establecida con CM, dejamos fuera la posible determinación de nuevos genes que pueden no haber sido identificados aún. Tampoco podemos olvidar el hecho de que el tamaño muestral

pequeño ha podido limitar el encontrar diferencias significativas según los resultados obtenidos en aspectos clínicos como son la supervivencia o la asociación con respuesta terapéutica (en el grupo tratado con neoadyuvancia).



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# 4. RESULTADOS

---

*“Lo bueno de la ciencia es que es cierta independientemente  
de si crees o no en ella”*

**Neil de Grasse Tyson** (1958 – presente)



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## **4.1 PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y PATOLÓGICAS**

Se seleccionaron un total de 90 pacientes que cumplieron inicialmente los criterios de inclusión en el estudio descritos en el apartado de metodología. Finalmente llegaron a completar el análisis global de expresión génica y mutacional un total de 79 pacientes/muestras, descartándose el resto de los casos del análisis final por haber agotado material (ARN y/o ADN) y/o no cumplir los criterios de calidad para el análisis.

Las principales características clínico-patológicas de las pacientes se resumen en la Tabla 7. La media de edad de nuestra población fue de 52 años. El 55,7% (n=44) de los casos presentaban positividad para RH (RE y/o RP), siendo el resto tumores RH negativos. La mayoría de los tumores (71%) tenían grado histológico 3, siendo el subtipo histológico ductal infiltrante el predominante, con 1 caso subtipo apocrino y otro subtipo medular. Los casos con afectación axilar clínica y/o patológica suponen el 20,5% de los casos (n=26). El 35,4% (n=28) de las pacientes se trataron con estrategia neoadyuvante, con un 53% de rPC, 36% de respuestas patológicas parciales (32% RCB-II y 4% RCB-I) y un 11% de RCB-III (Figura 18). El subtipo HER2E suponía el 87% de los casos de rPC (Figura 19). Con una mediana de seguimiento de 70 meses, se dieron 12 recurrencias (9,5%), 11 a nivel visceral y/o óseo y 1 recaída locorregional.

Características clínico-patológicas	Población total (N=79)
Edad media (años)	52
<b>Estado menopausico</b>	
Pre	35
Post	44
<b>Estado RH</b>	
Positivo	44
Negativo	35
<b>Estado RE</b>	
Positivo	44
Negativo	35
<b>Estado RP</b>	
Positivo	36
Negativo	43
<b>Estatus HER2</b>	
IHQ 3+	63
IHQ 2+/SISH amp	16
<b>Invasión linfovascular</b>	
Sí	27
No	52
<b>Grado histológico</b>	
G1	3
G2	21
G3	56
<b>ki67 (grupos)</b>	
< 20	21
20-50	28
> 50	30
<b>Tamaño tumoral (mm)</b>	
< 20	33
20-50	31
> 50	15
<b>Afectación axilar</b>	
Sí	26
No	53
<b>Tiempo de tratamiento</b>	
Adyuvante	51
Neoadyuvante	28
RCB 0	15
RCB I	1
RCB II	9
RCB III	3
<b>Recurrencia</b>	
Sí	12
No	67

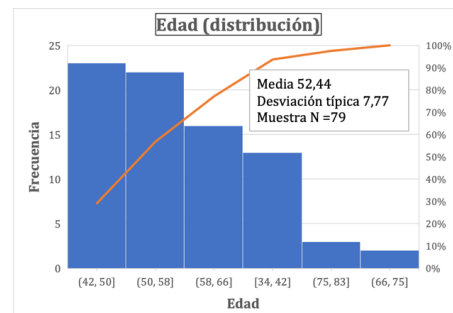


Tabla 7. Principales características clínicas de las pacientes y tumores incluidos en el estudio (izquierda); edad (media) y distribución de la variable en la población (derecha).

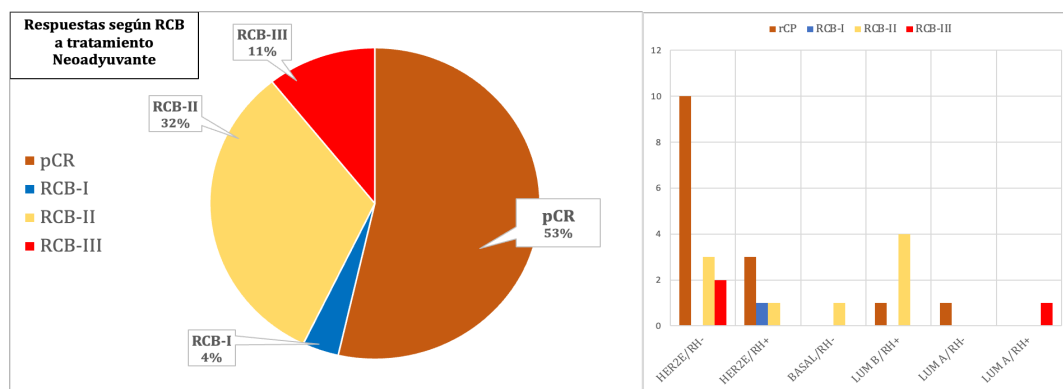
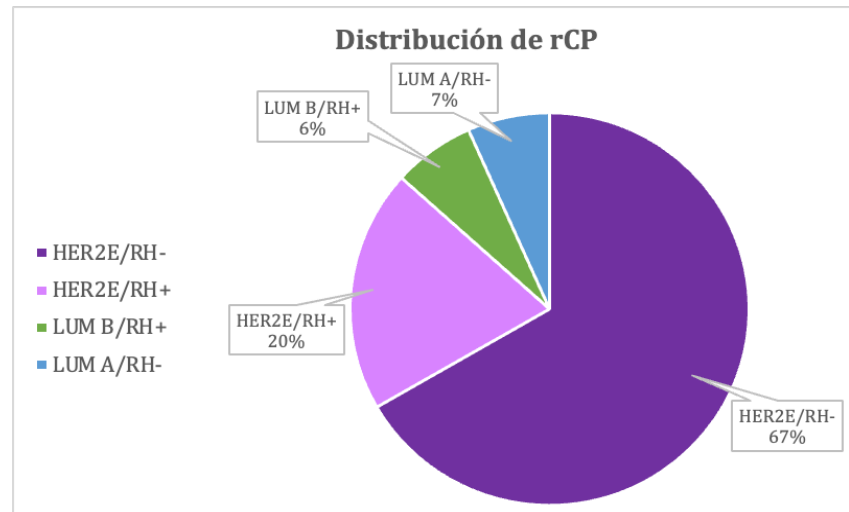


Figura 18. Tipo de respuesta patológica según clasificación “Residual Cancer Burden” (RCB) a tratamiento neoadyuvante (n=28 pacientes). Tasas de respuesta por tipo RCB (izquierda) y número de casos en cada grupo en función de subtipo intrínseco y estatus RH (derecha).



**Figura 19.** Distribución de subtipo intrínseco y estado de RH en la población con respuesta patológica completa (rCP) tras neoadyuvancia.

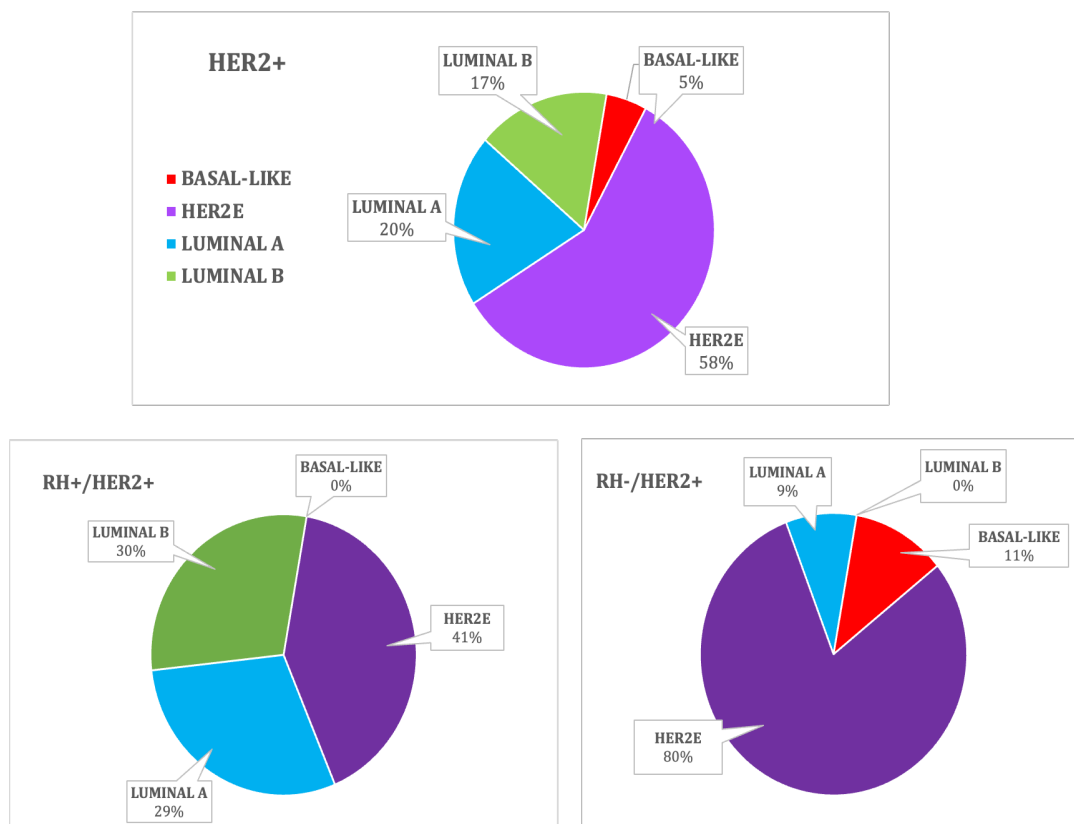
## 4.2 SUBTIPADO MOLECULAR POR PAM50

El análisis de expresión se realizó empleando el panel *Breast Cancer 360™*, el cual incluye la firma PAM50, firma que determina los subtipos intrínsecos y el *ROR score*. Del total de 79 casos de CM-HER2 positivo, 46 casos corresponden al subtipo HER2E (58,2%), 16 casos LumA (20,8%), 13 casos LumB (16,8%) y 4 casos BL (5,2%) (Tabla 8, Figura 20). En la población con RH positivos (n=44), un 41% de los casos son HER2E, seguido por el 30% y 29% de los casos en LumB y LumA respectivamente, con ningún caso subtipo BAL. En la cohorte de RH negativos, un 80% corresponde al subtipo HER2E, con un 11% de casos con subtipo BAL, 9% LumA y ningún caso LumB.

Los resultados respecto al *ROR score*, se resumen en la Tabla 9.

Subtipo intrínseco	Población total (N = 79)	Subtipo intrínseco	RH+ (N=44)	RH- (N=35)
BASAL-LIKE	4	BASAL-LIKE	0	4
HER2E	46	HER2E	18	28
LUMINAL A	16	LUMINAL A	13	3
LUMINAL B	13	LUMINAL B	13	0

**Tabla 8.** Distribución de los subtipos intrínsecos por análisis de expresión mediante la firma PAM50 en el total de la población del estudio (izquierda); distribución de los subtipos intrínsecos según el estado del RH (derecha).



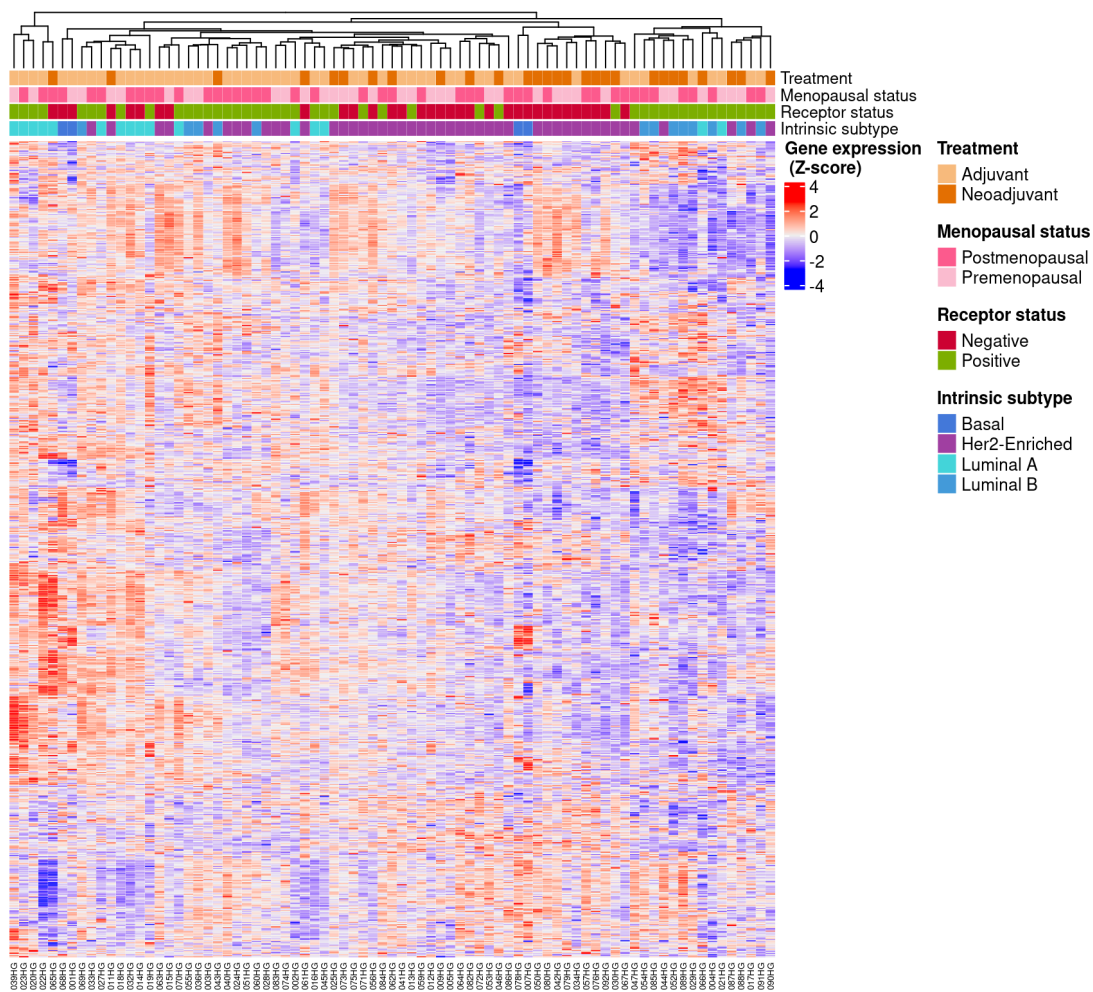
**Figura 20.** Gráfico de frecuencias de los subtipos intrínsecos en la población total del estudio y según estado del RH.

ROR según PAM50					
Sample ID	Subtype	Genomic Risk (ROR)	Sample ID	Subtype	Genomic Risk (ROR)
001HG20	Basal	31	051HG20	HER2-E	80
002HG20	LumA	64	052HG20	LumB	65
003HG20	HER2-E	79	053HG20	HER2-E	85
004HG20	LumB	63	054HG20	LumB	82
005HG20	HER2-E	60	055HG20	LumB	56
007HG20	Basal	54	056HG20	HER2-E	62
009HG20	HER2-E	69	057HG20	HER2-E	91
011HG20	HER2-E	68	059HG20	HER2-E	84
012HG20	HER2-E	65	060HG20	LumB	79
013HG20	HER2-E	68	061HG20	HER2-E	47
014HG20	LumA	33	062HG20	HER2-E	73
015HG20	HER2-E	77	063HG20	HER2-E	81
016HG20	LumA	45	064HG20	HER2-E	72
017HG20	HER2-E	71	065HG20	LumA	18
018HG20	LumA	33	066HG20	LumA	55
019HG20	LumA	47	067HG20	HER2-E	68
020HG20	LumA	53	068HG20	Basal	45
021HG20	LumA	49	069HG20	LumB	59
022HG20	LumA	6	070HG20	LumA	33
023HG20	LumA	42	071HG20	HER2-E	64
024HG20	HER2-E	89	072HG20	HER2-E	83
025HG20	HER2-E	72	073HG20	HER2-E	63
027HG20	LumA	51	074HG20	HER2-E	59
028HG20	HER2-E	79	075HG20	HER2-E	64
029HG20	LumB	65	076HG20	HER2-E	80
030HG20	HER2-E	77	078HG20	Basal	57
032HG20	LumA	27	079HG20	HER2-E	74
033HG20	HER2-E	77	080HG20	HER2-E	81
034HG20	HER2-E	66	082HG20	HER2-E	71
036HG20	LumB	74	083HG20	HER2-E	62
039HG20	LumA	57	084HG20	HER2-E	85
040HG20	HER2-E	89	085HG20	LumB	65
041HG20	HER2-E	77	086HG20	HER2-E	71
042HG20	HER2-E	86	087HG20	HER2-E	75
043HG20	LumB	75	088HG20	LumB	67
044HG20	HER2-E	89	089HG20	LumB	83
045HG20	LumA	51	090HG20	HER2-E	52
046HG20	HER2-E	82	091HG20	LumB	83
047HG20	HER2-E	82	092HG20	HER2-E	79
050HG20	HER2-E	68			

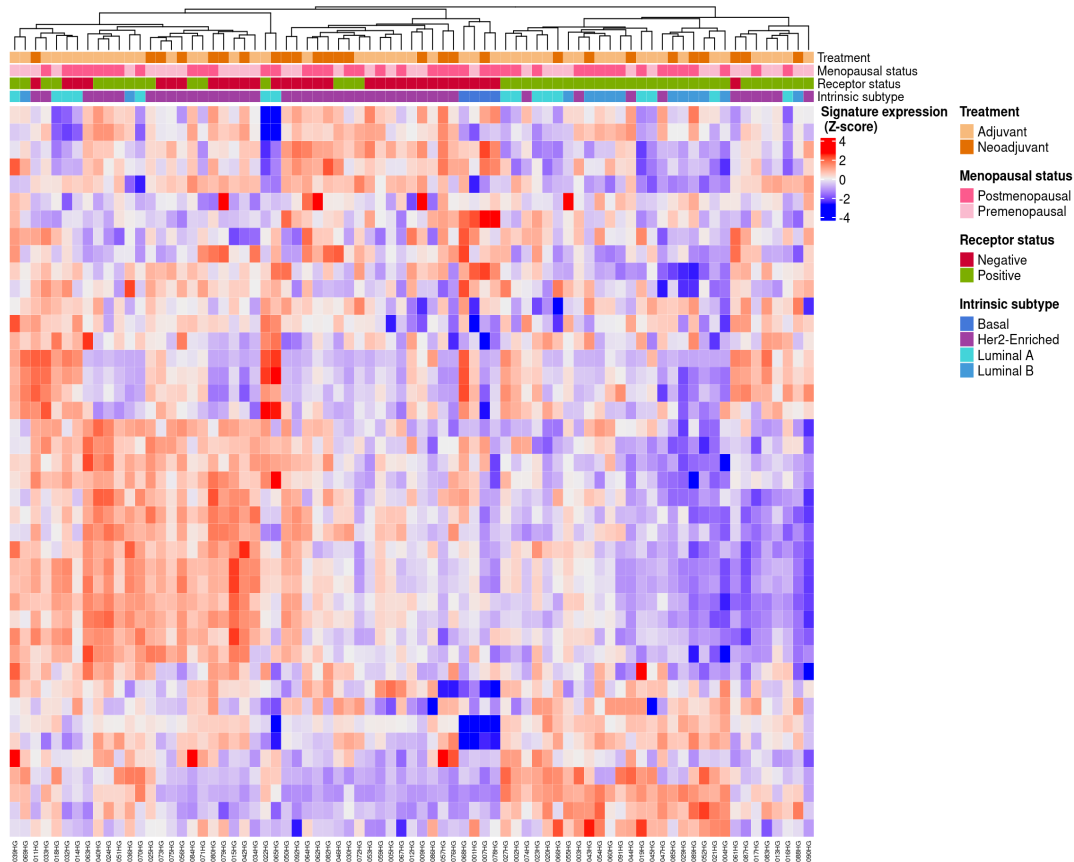
*Tabla 9. Resultados por subtipo intrínseco según PAM50 y ROR score.*

### 4.3 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL

El AED se realizó a partir de los datos de expresión de 758 genes y 42 firmas biológica según el panel BC360™ para 79 pacientes. Los datos de expresión crudos fueron normalizados siguiendo el método de normalización de NanoString. Empleamos el paquete `limma` de R. En todos los casos, un gen o firma se consideran diferencialmente expresados entre grupos cuando se cumplen las condiciones de p-valor ajustado ( $FDR < 0.05$  y  $|\log_2FC| > 1.5$ ).



**Figura 21.** Análisis exploratorio inicial de los datos de expresión de genes normalizados. Heatmap y clustering jerárquico no supervisado.



**Figura 22.** Análisis exploratorio inicial de los datos de expresión de firmas normalizadas. Heatmap y clustering jerárquico no supervisado.

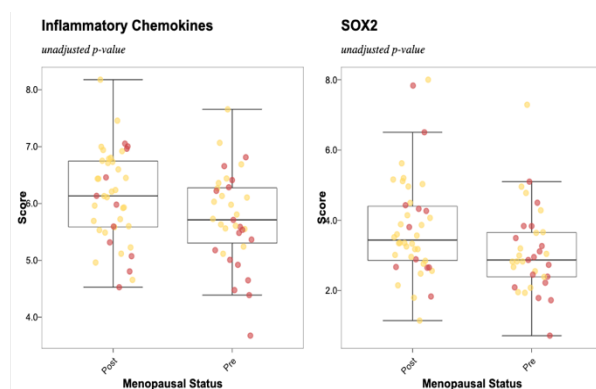
**\*NOTA:** Las pacientes 028HG y 041HG quedan excluidas del análisis a nivel de firma al no contar con el score de Nanostring asociado a cada firma para estos casos.

Los *heatmaps* o mapas de calor muestran valores de expresión génica o puntuaciones de firma en todas las muestras analizadas. Estos valores generalmente están centrados y escalados dentro de cada gen o firma para su representación gráfica. Cada mosaico dentro del *heatmap* muestra un color que indica el valor relativo de la expresión génica o la puntuación de la firma para la muestra correspondiente (*Z-score*). En estos *heatmaps* para genes (Figura 21) y para firmas (Figura 22), las muestras se han clasificado según intención de tratamiento (*neo/adyuvante*) estatus menopáusico (*pre/postmenopáusico*), estado RH (*positivo/negativo*) y según subtipo intrínseco (*HER2E, LumA, LumB, BAL*). Los niveles de relación están organizados mediante agrupamiento jerárquico no supervisado. Para ambos *heatmaps*, los valores de expresión y puntuaciones se escalan por gen y firma para tener una media de cero y una desviación estándar de uno y luego se truncan a  $\pm 3$  desviaciones estándar

para preservar una mayor claridad en el cambio de color dentro de la mayor proporción de datos (el 99% de los datos deben estar dentro de  $\pm 3$  desviaciones estándar de la media). Los genes y firmas se muestran en filas, siendo cada columna una muestra única con una etiqueta de muestra que se muestra debajo del *heatmap*.

### 4.3.1 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL SEGÚN VARIABLES CLÍNICAS

A continuación, se muestran los resultados del AED por firmas según *estatus menopáusico* (Figura 23) y *estado del RH* (Figura 24 y 25). Las quimiocinas inflamatorias y las firmas de SOX2 fueron ligeramente más altas en las pacientes con estatus postmenopáusico frente a las premenopáusicas, pero sin alcanzar la significación estadística.

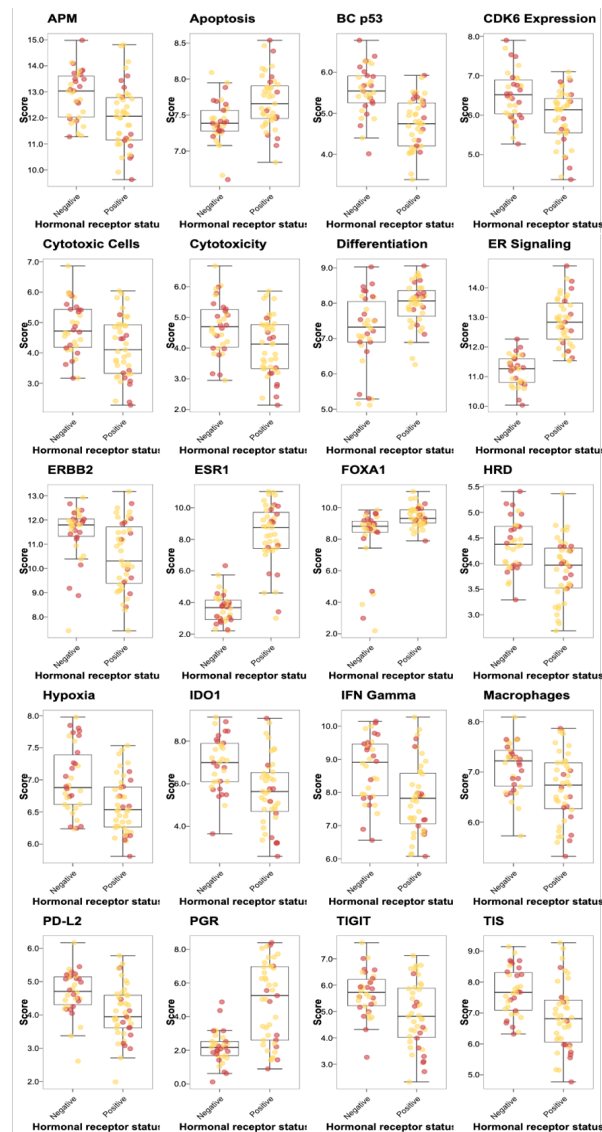


**Figura 23.** Diagramas de cajas para análisis de expresión diferencial según estado menopáusico.

Se representan diagramas de cajas de firma con valores p-no ajustados. Se muestra el número de “counts” normalizados (eje ordenadas) frente a la variable estado postmenopáusico Post o Pre (eje de abscisas).

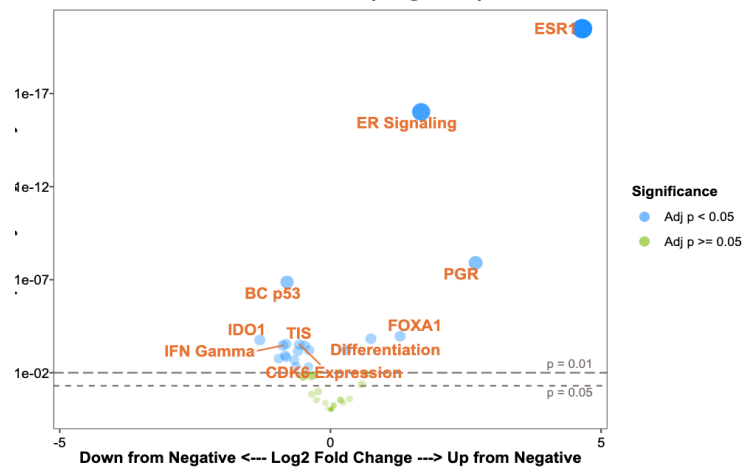
Respecto al estatus del RH, las firmas *APM*, *BC p53*, *CDK6*, *Células citotóxicas*, *Citotoxicidad*, *Macrófagos*, *PD-L1*, *PD-L2*, *TIGIT*, *IFN-Gamma*, *TIS*, *HRD*, *Hipoxia*, *IDO1*, *Apoptosis*, *Diferenciación*, *Señalización de ER*, *ESR1*, *Progesterona (PGR)* y *FOXA1* presentan una expresión diferencial entre grupos (Tabla A1). Las firmas *APM*, *BC p53*, *CDK6*, *células citotóxicas*, *citotoxicidad*, *Macrófagos*, *PD-L1*, *PD-L2*, *TIGIT*, *IFN-Gamma*, *TIS*, *HRD*, *Hipoxia* e *IDO1*, están subexpresadas en las pacientes con RH positivos con respecto a las pacientes con RH negativos (grupo de referencia para el análisis). Las

firmas de *Apoptosis*, *Diferenciación*, *Señalización de ER*, *ESR1*, *PGR* y *FOXA1* presentan una expresión diferencial significativa al alza en las pacientes con RH positivos.



**Figura 24.** Diagramas de cajas para análisis de expresión diferencial según receptor hormonal.

Diagramas de cajas de firma correspondientes a valores p ajustados significativos ( $< 0,05$ ). Se muestra el número de “counts” normalizados (eje ordenadas) frente a la variable estado del RH, Negativo o Positivo (eje de abscisas). Múltiples firmas, presentaron una expresión diferencial significativa en función del RH. *Leyenda: color rojo tratamiento neoadyuvante, color amarillo, tratamiento adyuvante.*



**Figura 25.** Se representan todas las firmas según  $p$ -valor ajustado ( $p < 0.05$ ) obtenido en el análisis de expresión diferencial  $D$  (eje de ordenadas) y el valor  $\text{Log}_2\text{FC}$  (eje de abscisas), mostrando la diferencia de expresión cada firma entre la categoría “estado RH positivo versus negativo (baseline) en el eje  $x$ , con la importancia (valor  $p$ ) a lo largo del eje  $y$ .

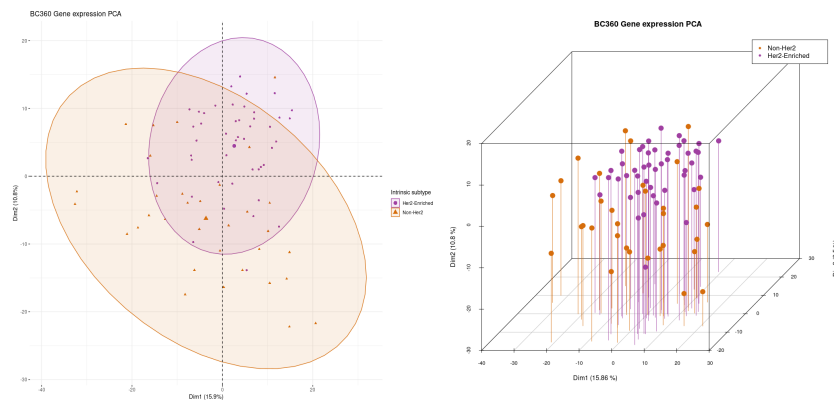
En el gráfico vemos aquellas firmas con una mayor significancia estadística con puntos de mayor grosor y en la parte más superior del gráfico. De la misma forma, aquellas firmas con una mayor expresión diferencial frente al grupo de referencia aparecen más alejadas del centro del gráfico. Aquellas firmas en la zona izquierda desde el valor 0 del eje de abscisas, serán aquellas firmas con menor expresión respecto al grupo de referencia (en este caso las pacientes con RH positivos). En la parte derecha están las firmas que se expresen al alza.

### 4.3.2 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL POR SUBTIPO INTRÍNSECO: *Her2-Enriched* versus *No Her2-Enriched*

#### 4.3.2.1 HER2E versus no HER2E a nivel de gen

Se realiza un AED entre los casos HER2E (46 casos) y el resto de los subtipos no HER2E (33 casos). En primer lugar, llevamos a cabo un análisis exploratorio de los datos de expresión de genes normalizados empleando un análisis de componentes principales (PCA) (Figura 26 y Tabla A2), para comprobar la asociación de las distintas muestras y, si se comportaban de la manera esperada. Este análisis es una técnica utilizada para describir un conjunto de datos en términos de nuevas variables («componentes») no correlacionadas. Los componentes se ordenan por la cantidad de varianza original que describen, por lo que es útil para reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos. Se emplea en análisis exploratorio de datos y en la

construcción de modelos predictivos. Hay que aclarar que, para el actual y siguientes análisis entre grupos, solo se van a mostrar los PCA post-AED en aquellos casos en los que el número de genes o firmas expresados diferencialmente sea igual o mayor a 4.



**Figura 26.** Análisis exploratorio inicial de los datos de expresión de genes normalizados mediante PCA (HER2E y no HER2E).

En el análisis exploratorio inicial por PCA podemos ver que la mayoría de los casos con subtipo HER2E se solapan con los no HER2E. A continuación, mediante un análisis tipo *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA), se obtuvo que, del total de los 758 genes analizados, 29 se expresan diferencialmente entre grupos: 11 genes regulados al alza y 18 genes subexpresados en la condición HER2E (Figura 27 y 28). Un análisis GSEA es un análisis funcional de genes que incorpora los valores de expresión, valores de FC o valores  $p$  de todos los genes para hacer un análisis de significación estadística.

Los 11 genes sobreexpresados en la condición *Her2-Enriched* son: *ERBB2*, *GRB7*, *TMEM45B*, *FUT3*, *KRT7*, *B3GNT3*, *FGFR4*, *CXCL9*, *TMPRSS4*, *S100A7* y *CEACAM6*. Los 18 genes subexpresados son *IGFR1*, *BLC2*, *ESR1*, *SLC39A6*, *FGFR2*, *SCUBE2*, *AGTR1*, *TBC1D9*, *IRX1*, *PGR*, *NAT1*, *BMPR1B*, *MAPT*, *ELOVL2*, *DNAJC12*, *CBLC*, *KRT14* y *SOX10* (Figura 28, Figura 29 y Tabla A3).

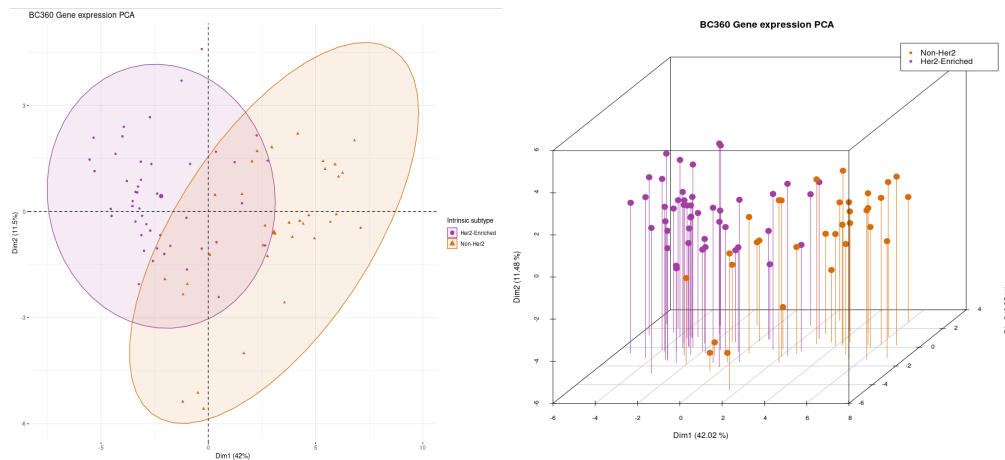


Figura 27. PCA de casos y genes expresados diferencialmente entre grupos (HER2E y no HER2E).

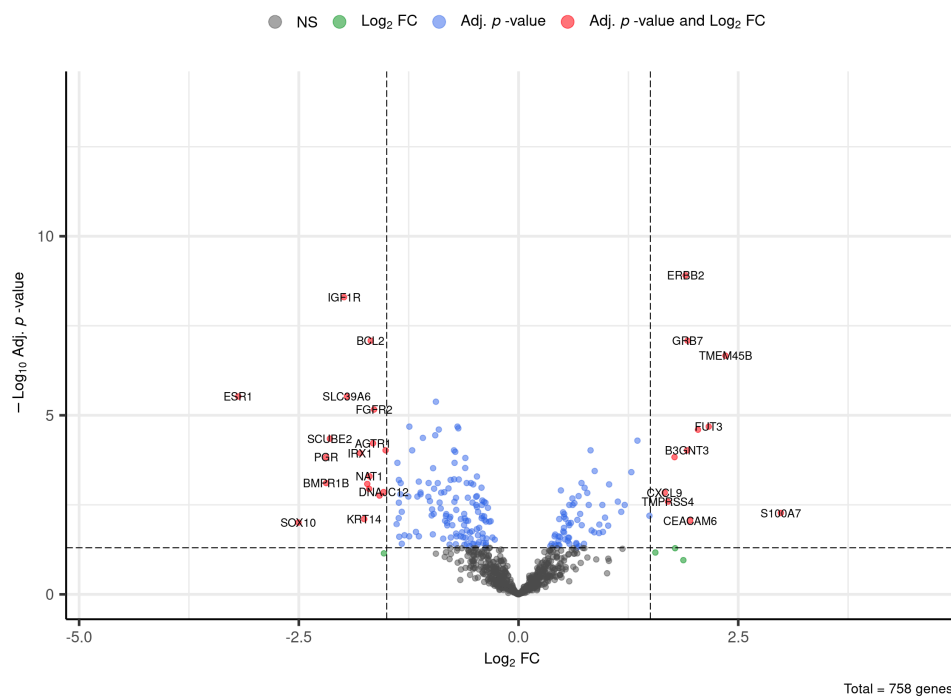
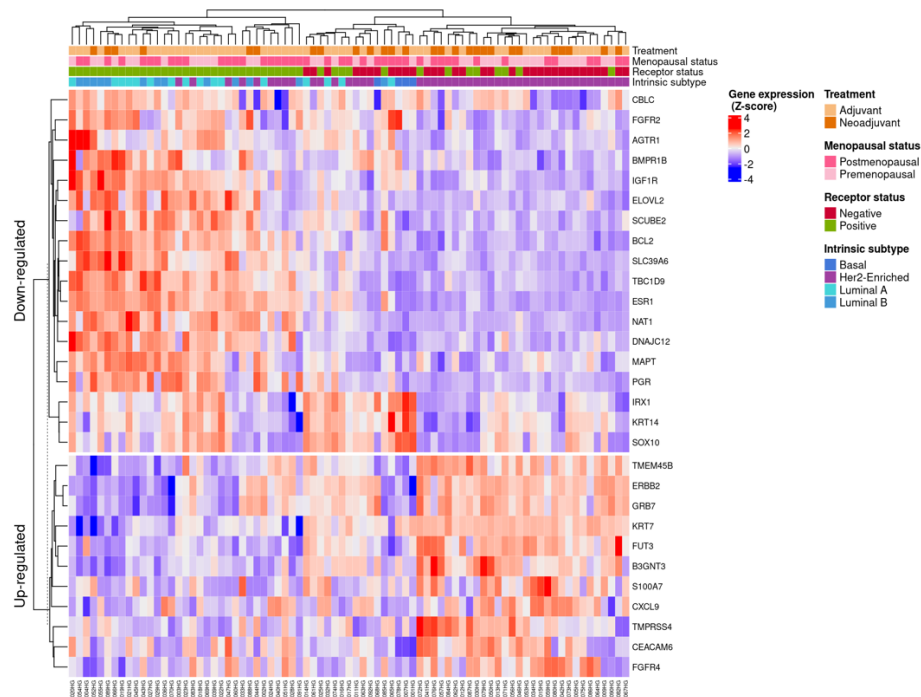


Figura 28. Volcano plot para todos los genes expresados diferencialmente entre los grupos (HER2E y no HER2E).

En el gráfico vemos aquellos genes con una mayor significancia estadística en la parte más superior del gráfico. De la misma forma, aquellos genes con una mayor expresión diferencial aparecen más alejados del centro del gráfico. Podemos ver más a la derecha los genes que indican un aumento en la expresión y los genes más a la izquierda las que indican una disminución de expresión respecto al grupo de referencia (HER2E).

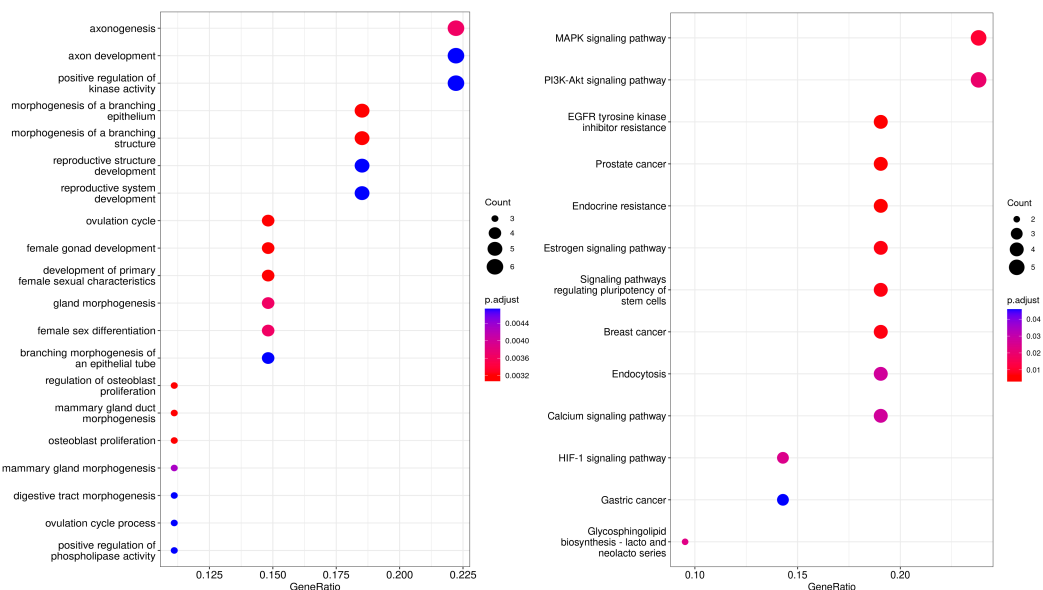


**Figura 29.** Heatmap y clustering jerárquico no supervisado de casos y genes expresados diferencialmente entre grupos (HER2E y no HER2E).

Tras el GSEA, se llevó a cabo análisis funcional para evaluar la interacción de todo el conjunto de genes sobre diversos mecanismos o funciones biológicas, empleando las bases de datos *Gene Ontology* (GO) y *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG), para ver los términos GO y KEGG asociados a genes diferencialmente expresados (Figura 30). En este punto, conviene aclarar que sólo se van a mostrar términos GO y KEGG en los casos en el que número de genes expresados diferencialmente sea igual o mayor a 15. El proyecto GO (<https://geneontology.org>) es una iniciativa bioinformática con el objetivo de estandarizar la representación de los genes y los atributos de sus productos génicos de todas las especies, por lo que provee un vocabulario controlado que describe el gen y los atributos del producto génico en cualquier organismo. Contiene anotaciones de los procesos biológicos, funciones moleculares o componentes células que caracterizan a un grupo de genes. La base de datos KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) proporciona información para el análisis sistemático de las funciones de los genes, relacionando información genómica con información funcional de orden superior (proteínas, rutas

metabólicas, interacciones moleculares). Con el análisis funcional utilizando KEGG, se seleccionan conjuntos de genes que interactúan en la misma ruta biológica.

Finalmente, el análisis funcional por GO y KEGG evidenció que los genes diferencialmente expresados se enriquecieron significativamente en las vías *MAPK* y *PI3K-Akt*, vías de señalización *downstream* de HER2 (Figuras Anexo 1 y 2). También podemos ver enriquecimiento, aunque en menor medida en las vías de resistencia a inhibidor tirosin cinasa de *EGFR* (Fig. Anexo 3), resistencia endocrina (Fig. Anexo 4), vía de señalización de estrógeno (Fig. Anexo 5), vías de señalización que regulan la pluripotencialidad de las células madre (Fig. Anexo 6), endocitosis (Fig. Anexo 7) y vía de señalización del calcio (Fig. Anexo 8).

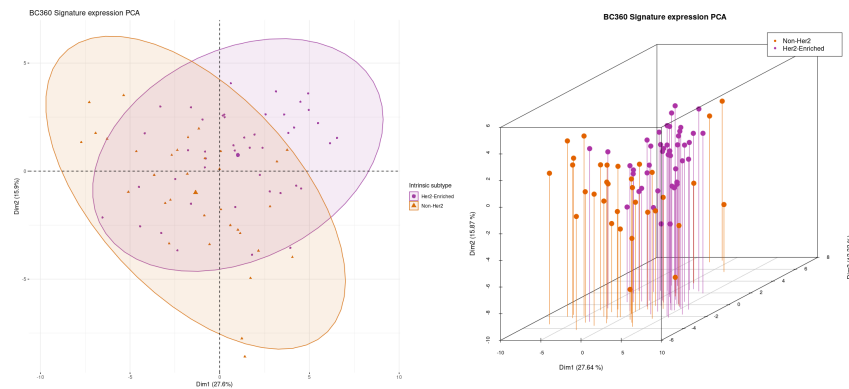


**Figura 30.** Análisis funcional de los genes diferencialmente expresados entre grupos (*HER2E* y no *HER2E*) con términos GO (izquierda) y KEGG (derecha).

El eje y indica el proceso biológico (dotplot GO izquierda) o nombre de la vía (dotplot KEGG, derecha); el eje x indica el factor enriquecido en proceso biológico o vía. Para ambos, el tamaño de la burbuja indica la cantidad de genes asociados al término, y la barra de color indica el valor p corregido, de forma que el azul representa el valor más alto y el rojo el valor más bajo.

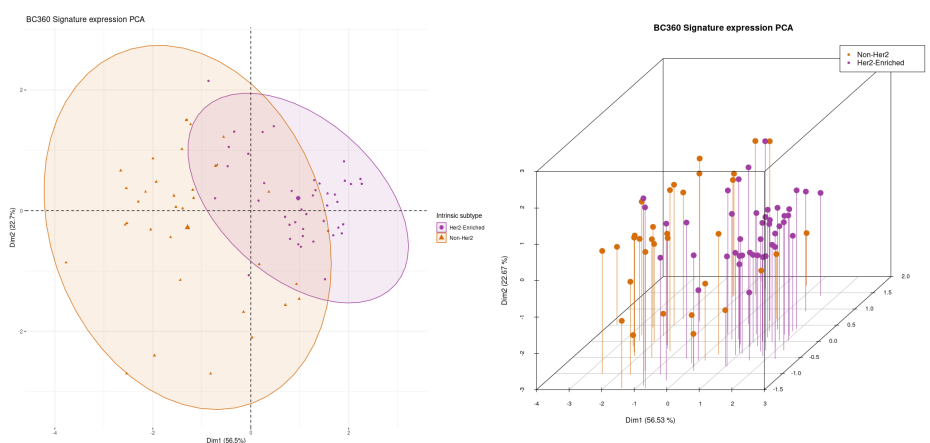
### 4.3.2.2 HER2E versus no HER2E a nivel de FIRMA

Se realiza un AED para firmas entre los casos HER2E y el resto de los subtipos. Al igual que con el AED por gen, comenzamos con un análisis exploratorio inicial de los datos de expresión de firmas normalizados mediante PCA (Figura 31 y Tabla A4).

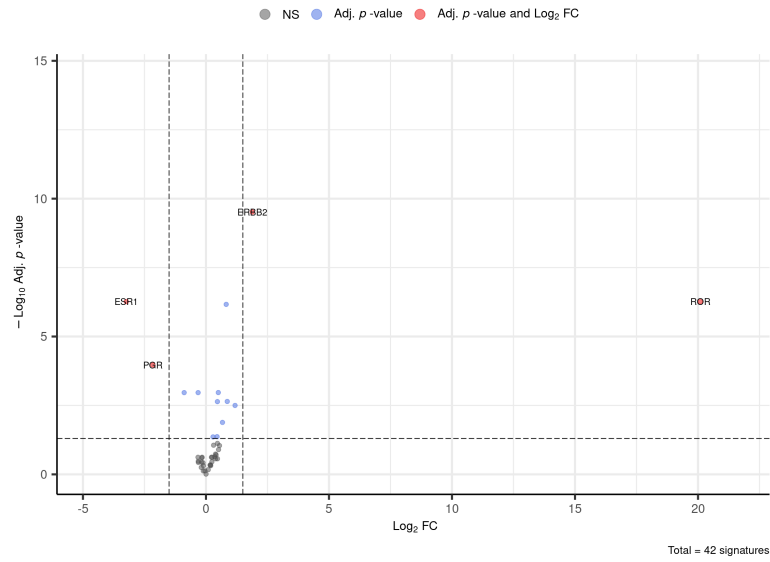


**Figura 31.** Análisis exploratorio inicial de los datos de expresión de firmas normalizados mediante PCA (HER2E y no HER2E)

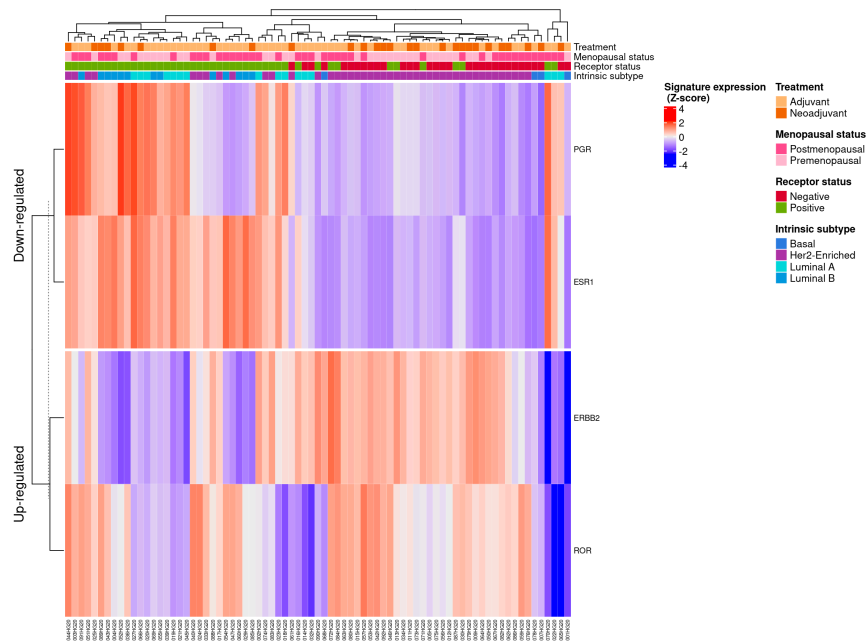
Tras el análisis GSEA, se obtuvo que sólo 4 firmas se expresan diferencialmente entre grupos: 2 firmas sobreexpresadas y 2 firmas subexpresados en la condición HER2E (Figura 32 y 33 y Tabla A5). Solo 2 firmas están sobreexpresadas en la condición HER2E son: ERBB2 y ROR. Las 2 firmas subexpresadas son ESR1 y PGR (Figura 33 y Figura 34).



**Figura 32.** PCA de casos y firmas expresadas diferencialmente entre grupos (HER2E y no HER2E).



**Figura 33.** Volcano plot para todas las firmas expresadas diferencialmente entre grupos (HER2E y no HER2E).



**Figura 34.** Heatmap de casos y firmas expresadas diferencialmente entre grupos (HER2E y no HER2E).

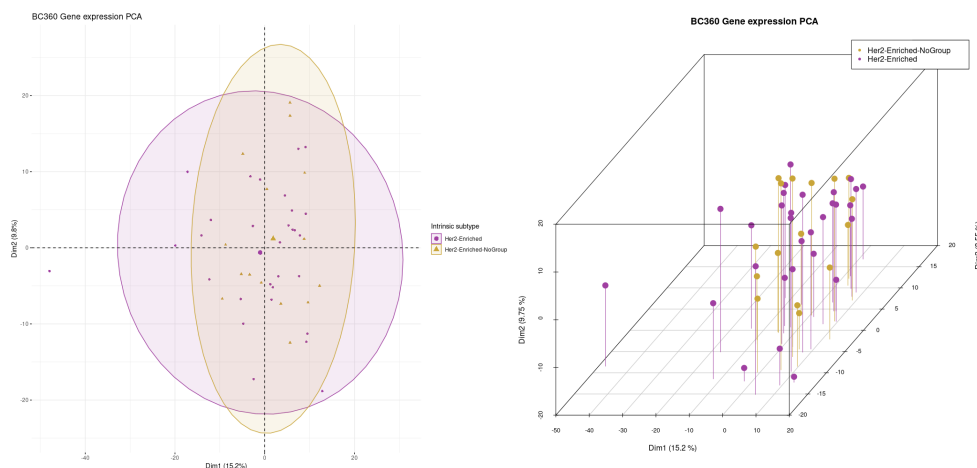
Tras este primer análisis de comparación entre HER2E y resto de subtipos intrínsecos, encontramos un subgrupo de casos dentro de HER2E con una expresión de genes divergente. A este grupo lo hemos llamado “HER2E no agrupado”.

### 4.3.3 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL *Her2-Enriched* agrupado versus *Her2-Enriched* no agrupado

Se realiza un AED entre los casos HER2E con expresión de genes común en el análisis anterior (*HER2E agrupado*, 30 casos) frente a los casos HER2E con expresión de genes divergente a este primer grupo (*HER2E no agrupado*, 16 casos).

#### 4.3.3.1 HER2E agrupado versus no agrupado a nivel de GEN

A continuación, se muestra el análisis exploratorio inicial de los datos de expresión por PCA (Figura 35). Tras el análisis GSEA, 17 genes se expresan diferencialmente entre grupos: 7 genes regulados al alza y 10 genes subexpresados en la condición *HER2E agrupado* (Figura 36 y 37) respecto a los casos HER2E con expresión de genes divergente. Los 7 genes sobreexpresados en la condición *HER2E agrupado* son *KRT7*, *FUT3*, *SLPI*, *TMEM45B*, *B3GNT3*, *DKK1* y *CALML5*. Los 10 genes subexpresados son *ESR1*, *NAT1*, *GATA3*, *PGR*, *CA12*, *ARNT2*, *ELOVL2*, *LRP2*, *BMPR1B*, *ANXA9* (Figura 37, Figura 38 y Tabla A3).



**Figura 35.** Análisis exploratorio inicial de los datos de expresión de genes normalizados mediante PCA (*HER2E agrupado* y *no agrupado*).

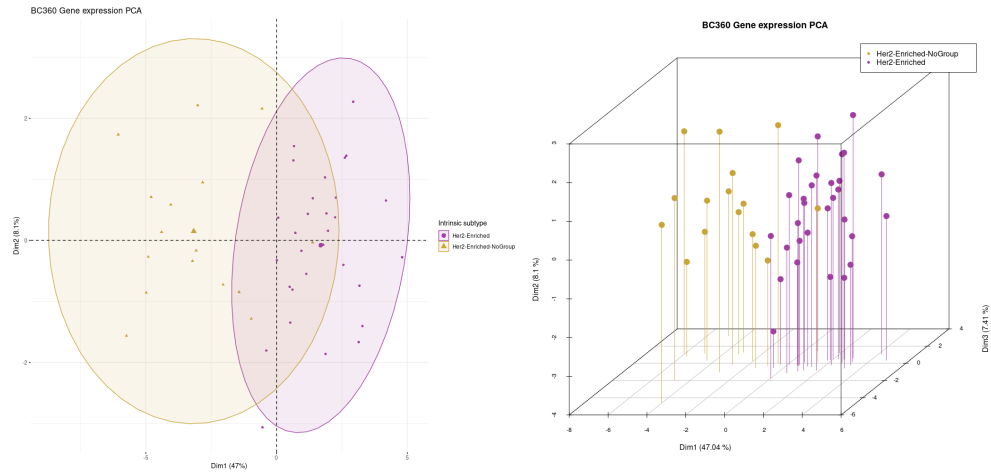


Figura 36. PCA de casos y genes expresados diferencialmente entre grupos (HER2E agrupado y no agrupado).

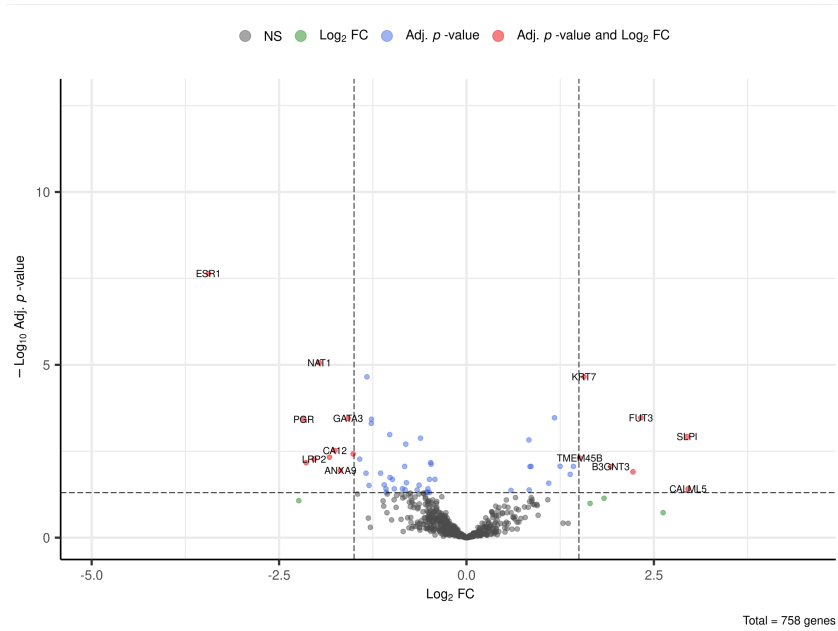


Figura 37. Volcano plot para los genes diferencialmente expresados entre grupos (HER2E agrupado y no agrupado).

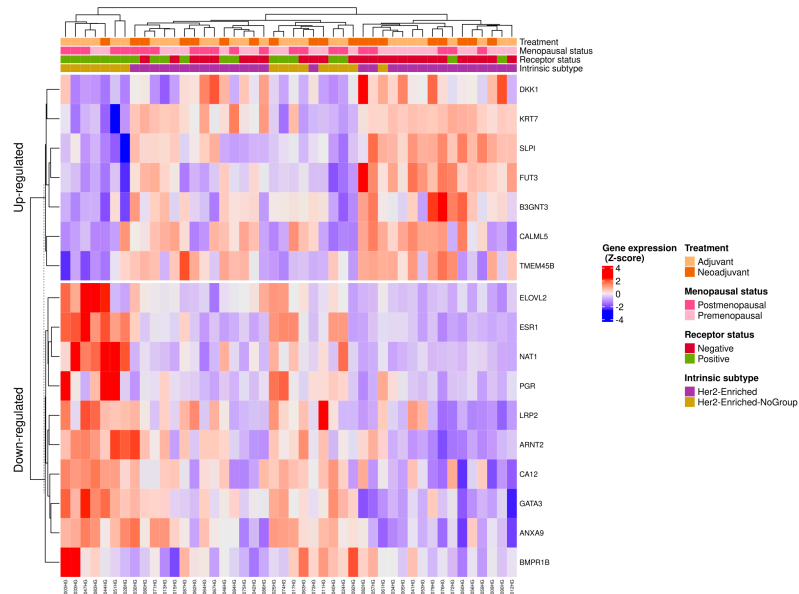


Figura 38. Heatmap de casos y genes expresados diferencialmente entre grupos (HER2E agrupado y no agrupado).

Seguidamente, se realizó el análisis de enriquecimiento ontológico-funcional, y en la Figura 39 se muestran los términos GO y KEGG asociados a los DEG entre los grupos. Dicho análisis revela que los genes diferencialmente expresados se enriquecieron esencialmente en la vía de *señalización de estrógenos* (Fig. Anexo 5).

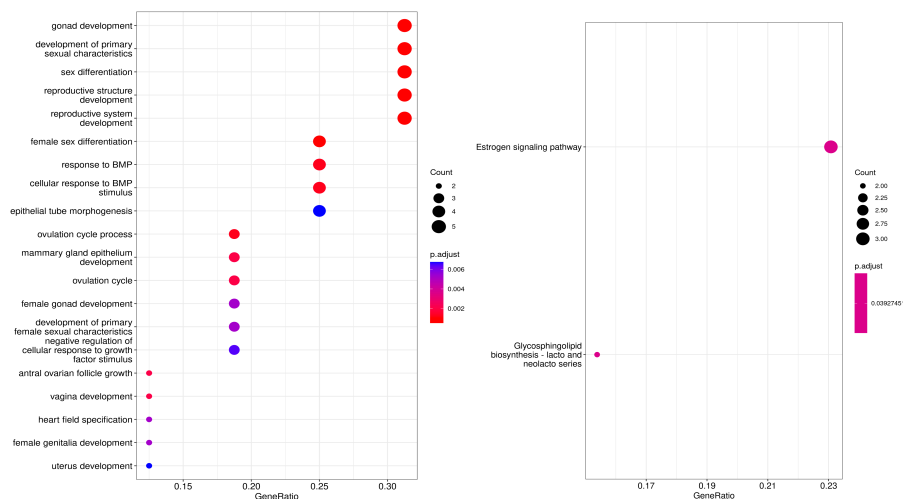
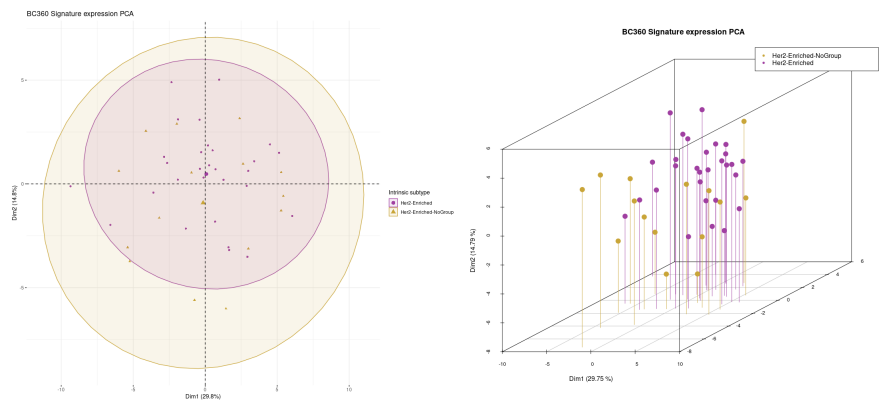


Figura 39. Análisis funcional de los genes diferencialmente expresados entre grupos (HER2E agrupado y HER2E no agrupado) con términos GO (izquierda) y KEGG (derecha).

El eje y indica el proceso biológico (dotplot GO izquierda) o nombre de la vía (dotplot KEGG, derecha); el eje x indica el factor enriquecido en proceso biológico o vía. Para ambos, el tamaño de la burbuja indica la cantidad de genes asociados al término, y la barra de color indica el valor p corregido, de forma que el azul representa el valor más alto y el rojo el valor más bajo.

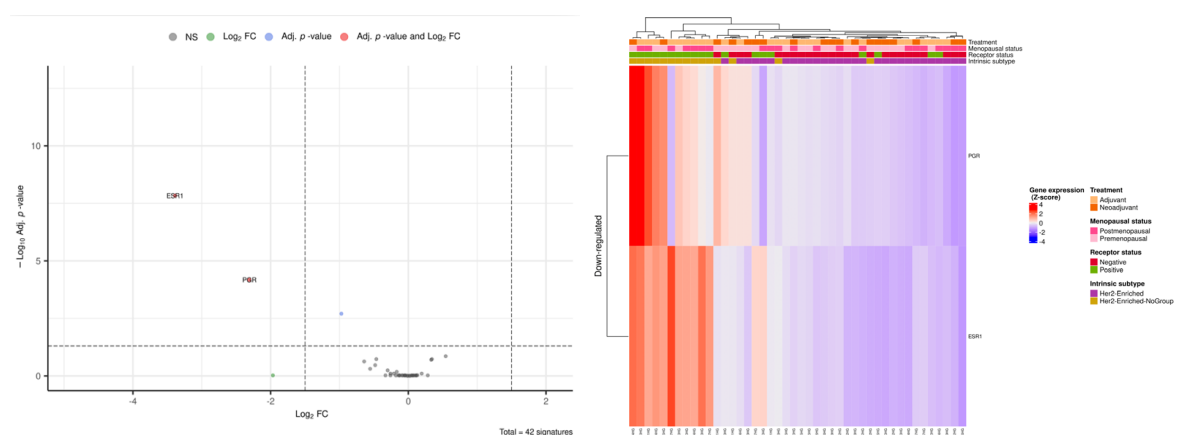
### 4.3.3.2 HER2E agrupado versus no agrupado a nivel de FIRMA

Se realiza un análisis AED para firmas entre los casos *HER2E agrupados* y *HER2E no agrupados*, empezando con un análisis exploratorio inicial de los datos de expresión de firmas normalizados mediante PCA (Figura 40).



**Figura 40.** Análisis exploratorio inicial de los datos de expresión de firmas normalizados mediante PCA (*HER2E agrupado* y *no agrupado*).

Tras el análisis GSEA, sólo 2 firmas se expresan diferencialmente entre grupos: 0 firmas sobreexpresadas y 2 firmas subexpresados en la condición *HER2E agrupado* (Figura 41 y Tabla A4). Las 2 firmas subexpresadas en la condición *HER2E agrupado* son *ESR1* y *PGR*.



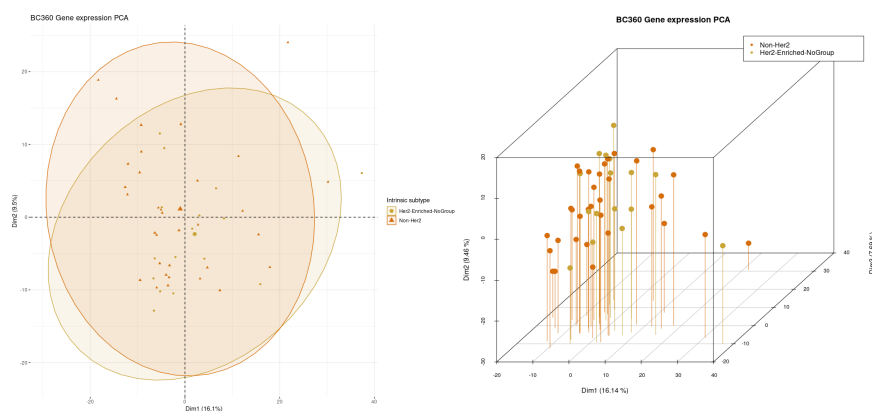
**Figura 41.** Volcano plot (izquierda) y Heatmap (derecha) de casos y firmas diferencialmente expresadas entre grupos (*HER2E agrupado* y *no agrupado*).

### 4.3.4 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL *Her2-Enriched* no agrupado versus no *Her2 Enriched*

Se realiza un AED entre los casos HER2E con expresión de genes divergente (*HER2E no agrupado*, 16 casos) frente al resto de casos no HER2E (*no HER2E*, 33 casos).

#### 4.3.4.1 HER2E no agrupado versus no HER2E a nivel de GEN

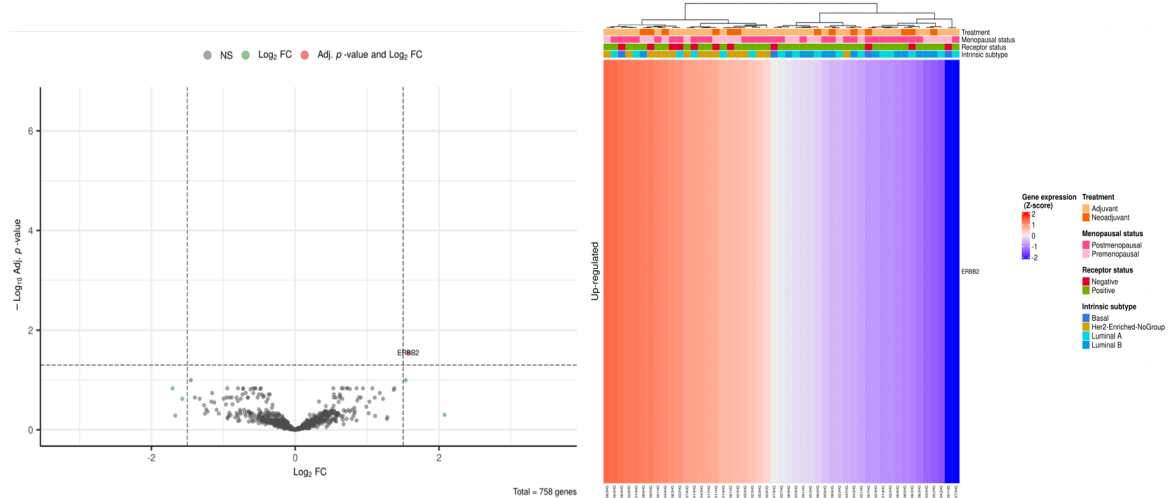
En primer lugar, llevamos a cabo el análisis exploratorio inicial de los datos de expresión de genes mediante PCA. En el PCA inicial, la práctica totalidad de los casos *HER2E no agrupados* caen dentro de la categoría no HER2E (Figura 42).



**Figura 42.** Análisis exploratorio inicial de los datos de expresión de genes normalizados mediante PCA (*HER2E no agrupado* y *no HER2E*).

Tras el análisis GSEA, solo 1 gen ( $padj \leq 0,05$ ) se expresa diferencialmente diferencial entre grupos: 1 gen regulado al alza y 0 genes subexpresados en la condición HER2E no agrupado respecto a los casos no HER2E (Figura 43).

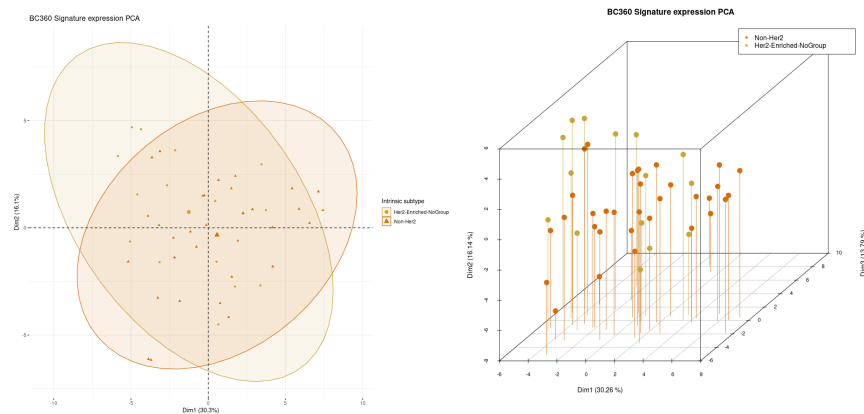
El gen sobreexpresado en la condición HER2E no agrupado es *ERBB2*.



**Figura 43.** Volcano plot (izquierda) y Heatmap (derecha) de casos y genes diferencialmente expresados entre grupos (HER2E no agrupado y no HER2E).

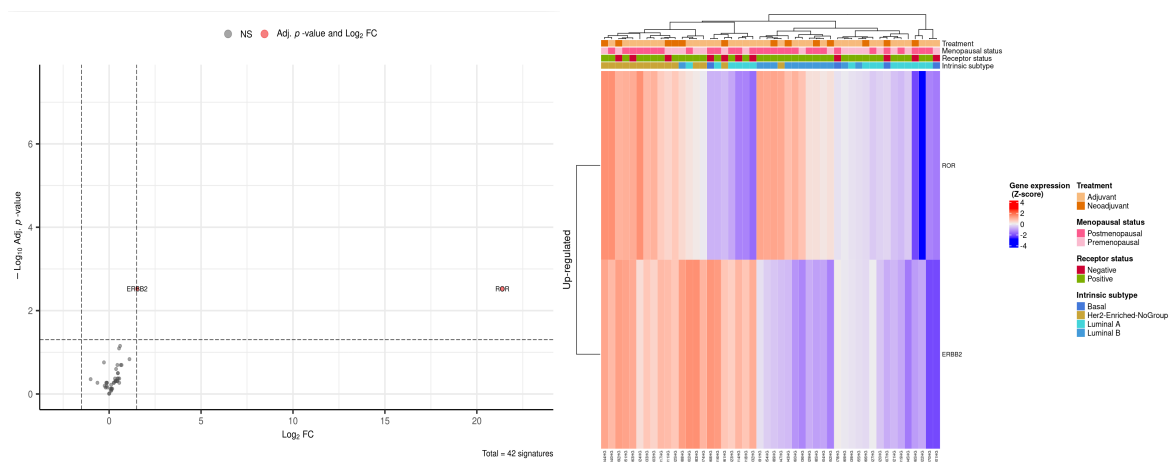
#### 4.3.4.2 HER2E no agrupado versus no HER2E a nivel de FIRMA

Se realiza un AED para firmas entre los casos HER2E no agrupados y casos no HER2E. De nuevo, iniciamos el AED con un análisis exploratorio inicial de los datos de expresión normalizados mediante PCA (Figura 42 y Tabla A6).



**Figura 44.** Análisis exploratorio inicial de los datos de expresión de firmas normalizados mediante PCA (HER2E no agrupado y no HER2E).

Del total, 2 firmas presentan expresión diferencial entre grupos: 2 firmas sobreexpresadas y 0 firmas subexpresadas en la condición *HER2E no agrupado*. Las firmas sobreexpresadas son ROR y ERBB2 (Figura 45).



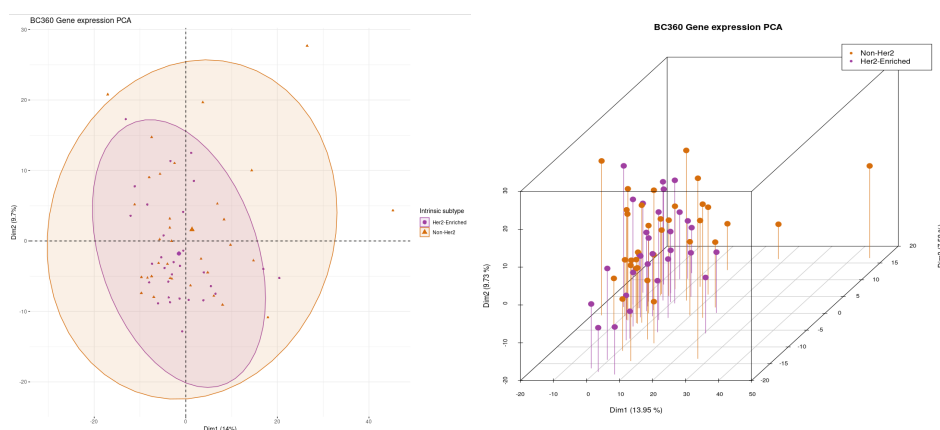
**Figura 45.** Volcano plot (izquierda) y Heatmap (derecha) de casos y firmas expresados diferencialmente entre grupos (HER2E no agrupado y no HER2E).

### 4.3.5 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL *Her2-Enriched* agrupado versus no *Her2-Enriched*

Se realiza un AED entre los casos HER2E con expresión de genes común (*HER2E agrupado*, 30 casos) frente al resto de subtipos intrínsecos (*no HER2E*, total 33).

#### 4.3.5.1 HER2E agrupado versus no HER2E a nivel de GEN

Comenzamos con un análisis exploratorio inicial de los datos de expresión de genes normalizados mediante PCA (Figura 46).



**Figura 46.** Análisis exploratorio inicial de los datos de expresión de genes normalizados mediante PCA (*HER2E agrupado y no HER2E*).

Tras el análisis GSEA, se expresan diferencialmente entre grupos un total de 50 genes: 18 genes regulados al alza y 32 genes subexpresados en la *condición HER2E agrupado* (Figura 47 y 48) frente a los casos *no HER2E*. Los 18 genes sobreexpresados son *ERBB2*, *TMEM45B*, *FUT3*, *GRB7*, *B3GNT3*, *KRT7*, *EGLN3*, *LAD1*, *DKK1*, *TMPRSS4*, *FGFR4*, *SLPI*, *S100A7*, *CXCL9*, *CALML5*, *CEACAM6*, *PROM1* y *PIP*. Los 32 genes subexpresados son *ESR1*, *BCLC2*, *IGF1R*, *SLC39A6*, *PGR*, *FGFR2*, *NAT1*, *TBC1D9*, *SCUBE2*, *ELOVL2*, *FREM2*, *IRX1*, *BMPR1B*, *THBS4*, *ARNT2*, *LAMA3*, *GATA3*, *AGTR1*, *IL24*, *CA12*, *DNAJC12*, *MAPT*, *OGN*, *ANXA9*, *CBLC*, *ERBB4*, *SOX10*, *CHAD*, *KRT14*, *TFF1* y *FGFR3* (Figura 48, Figura 49 y Tabla A7).

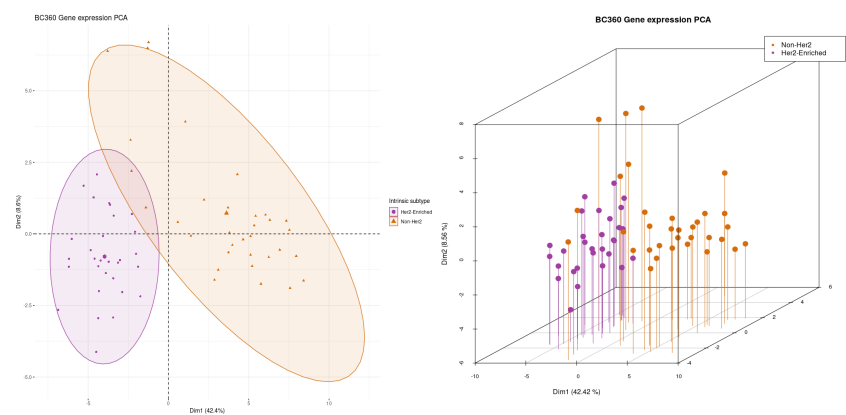


Figura 47. PCA de casos y genes expresados diferencialmente entre grupos (*HER2E agrupado* y *no HER2E*).

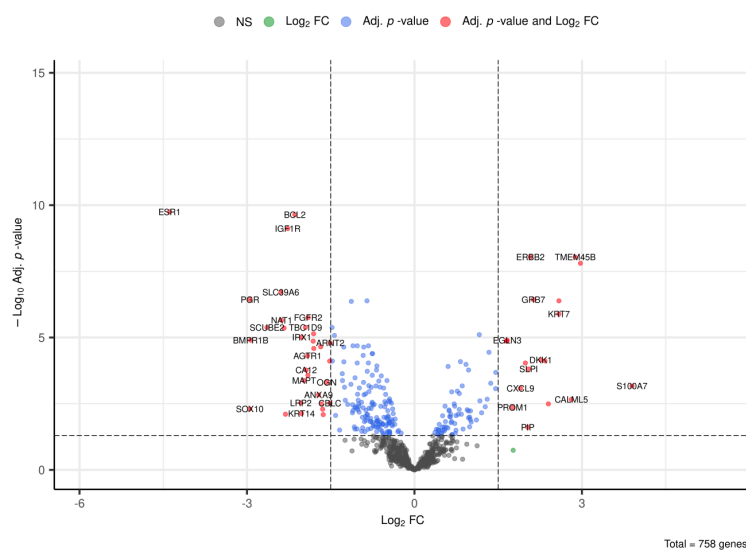
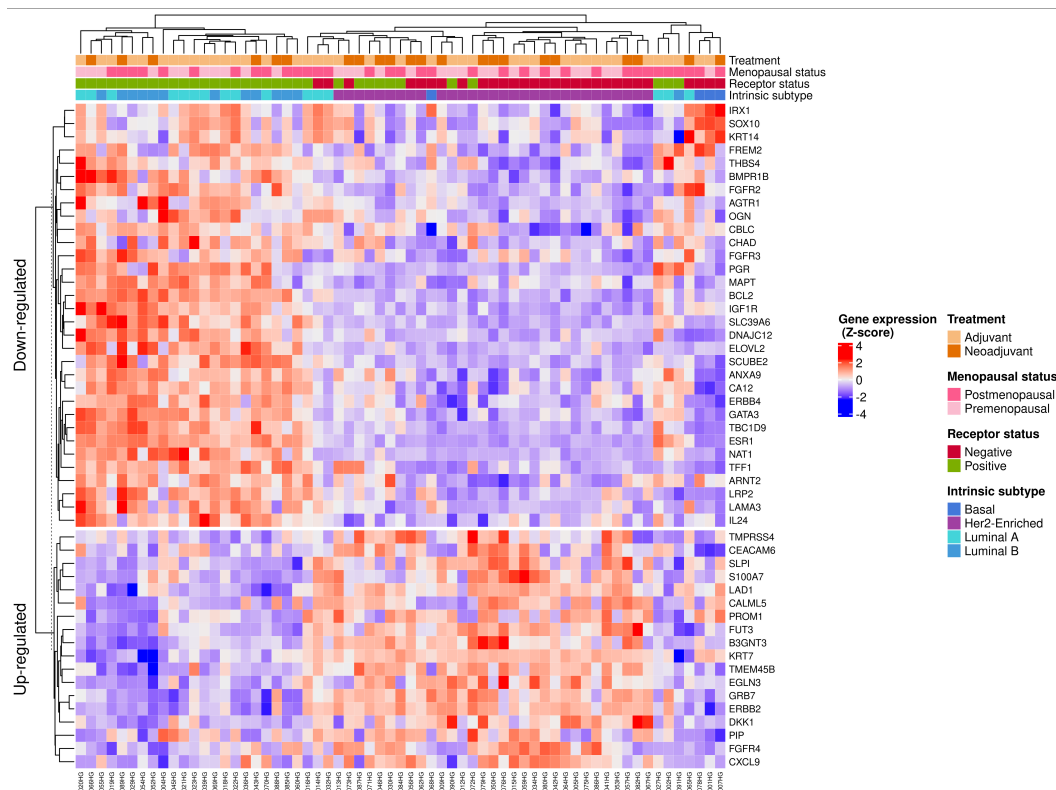
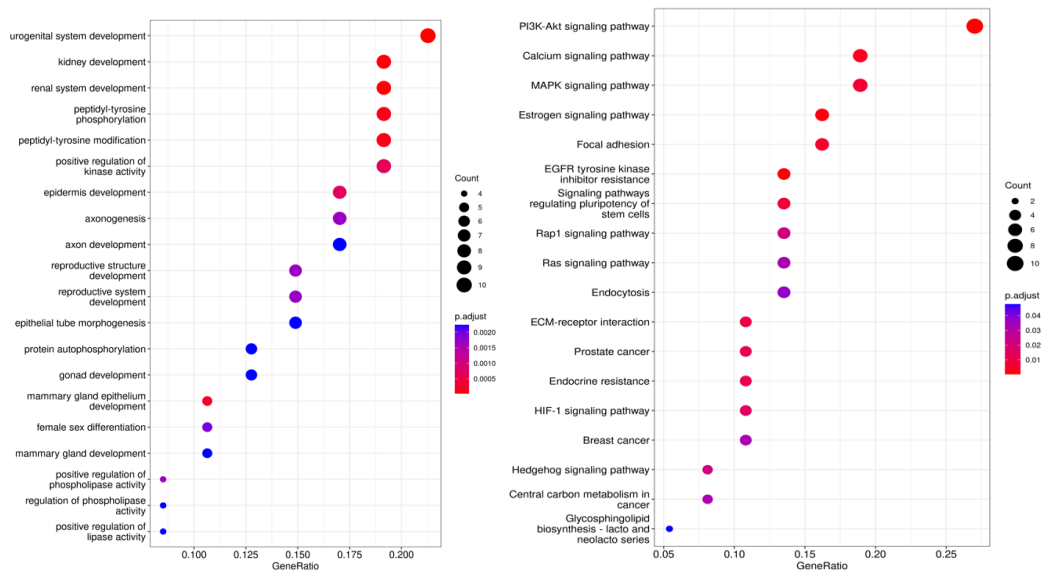


Figura 48. Volcano plot para los genes diferencialmente expresados entre grupos (*HER2 agrupado* y *no HER2E*).



**Figura 49.** Heatmap de casos y genes expresados diferencialmente entre grupos (*HER2* agrupado y no *HER2E*).

Seguidamente, se realizó el análisis funcional, recogiendo los términos GO y KEGG asociados a los genes diferencialmente expresados entre los grupos *HER2E* agrupado y no *HER2E* en la Figura 50. El análisis de enriquecimiento ontológico-funcional puso de que los DEG se enriquecieron significativamente en *vías de señalización de PI3K-Akt*, siendo la que presenta la mayor ratio de genes asociados (Fig. Anexo 2). Le siguen las *vías de señalización del calcio* (Fig. Anexo 8) y la *vía MAPK* (Fig. Anexo 1) y finalmente de las *vías de señalización de estrógeno* ((Fig. Anexo 5), la *vía de adhesión celular* (Fig. Anexo 9), la de *resistencia a inhibidor tirosina cinasa de EGFR* (Fig. Anexo 3), *vías de señalización que regulan la pluripotencialidad de las células madre* (Fig. Anexo 6), *Rap1*(Fig. Anexo 10), *Ras* (Fig. Anexo 11) y *endocitosis* (Fig. Anexo 7).

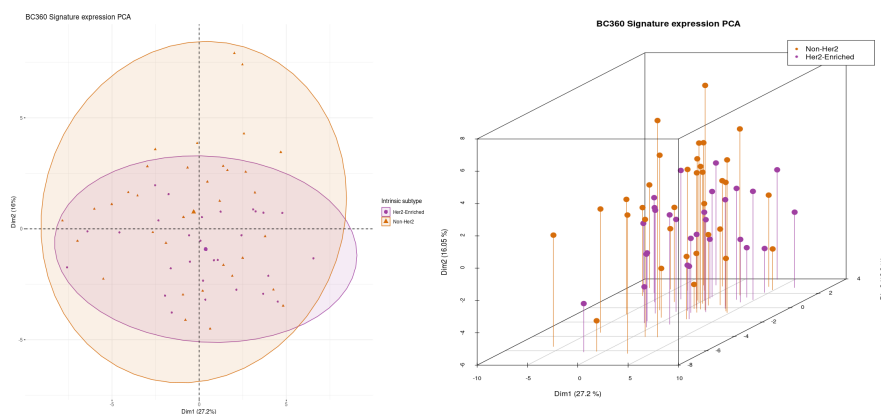


**Figura 50.** Análisis funcional de genes diferencialmente expresados entre grupos (*HER2E* no agrupado y no *HER2E*) con términos GO (izquierda) y KEGG (derecha).

El eje y indica el proceso biológico (dotplot GO) o nombre de la vía (dotplot KEGG); el eje x indica el factor enriquecido en proceso biológico o vía. Para ambos, el tamaño de la burbuja indica la cantidad de genes asociados al término, y la barra de color indica el valor p corregido, el azul representa el valor más alto y el rojo representa el valor más bajo.

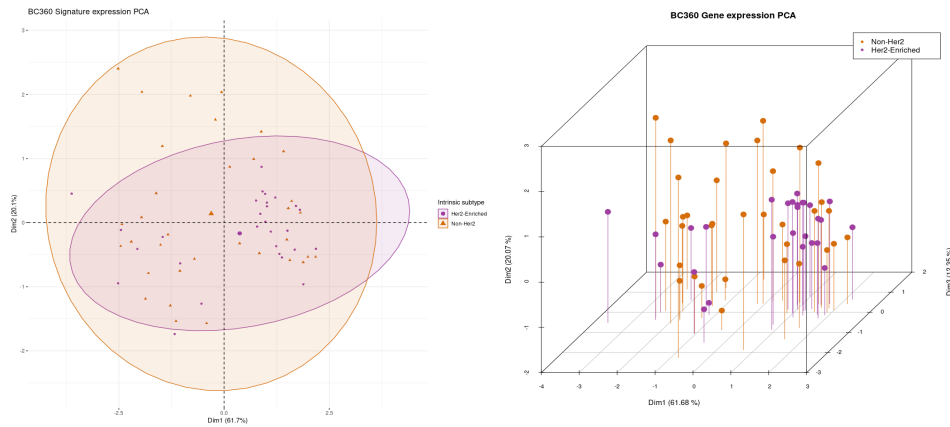
#### 4.3.5.2 *HER2E* agrupado versus no *HER2E* a nivel de FIRMA

Se realiza un AED entre los casos *HER2E* agrupados y casos no *HER2E*. A continuación, se muestra el análisis exploratorio inicial de los datos de expresión de firmas normalizados mediante PCA (Figura 51).



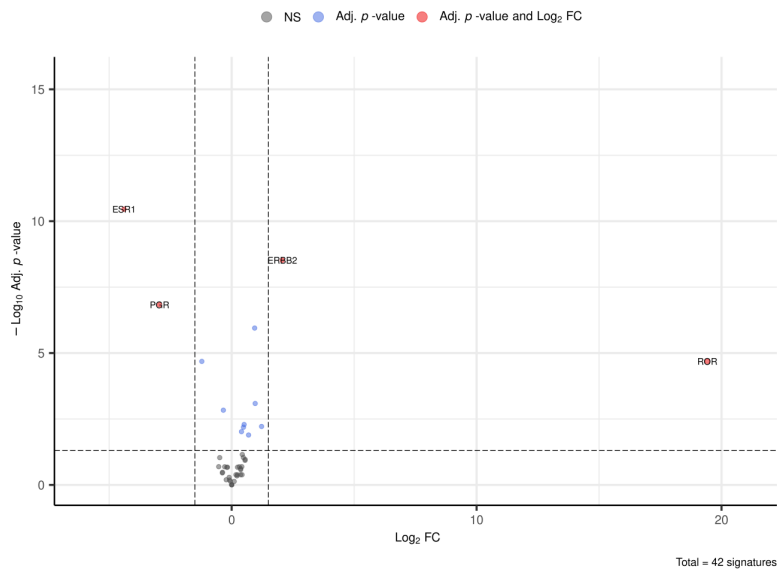
**Figura 51.** Análisis exploratorio inicial de los datos de expresión de firmas normalizados mediante PCA (*HER2E* agrupado y no *HER2E*).

Tras el análisis GSEA, del total de las firmas analizadas, un total de 4 firmas se expresan diferencialmente entre grupos: 2 firmas sobreexpresadas y 2 firmas subexpresadas en la condición HER2E agrupado (Figura 52, Figura 53 y Tabla A8).

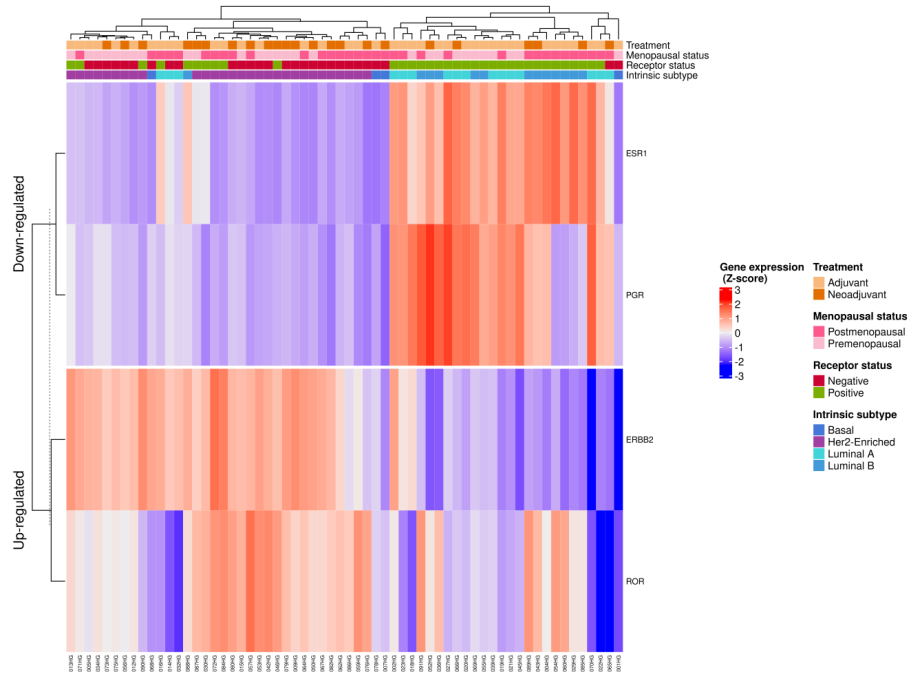


**Figura 52.** PCA de casos y firmas expresadas diferencialmente entre grupos (HER2E agrupado y no HER2E).

Las 2 firmas sobreexpresadas en la condición HER2E agrupado son: *ERBB2* y *ROR*. Las 2 firmas subexpresadas son *ESR1* y *PGR* (Figura 53 y 54).



**Figura 53.** Volcano plot para las firmas diferencialmente expresadas entre grupos (HER2 agrupado y no HER2E).



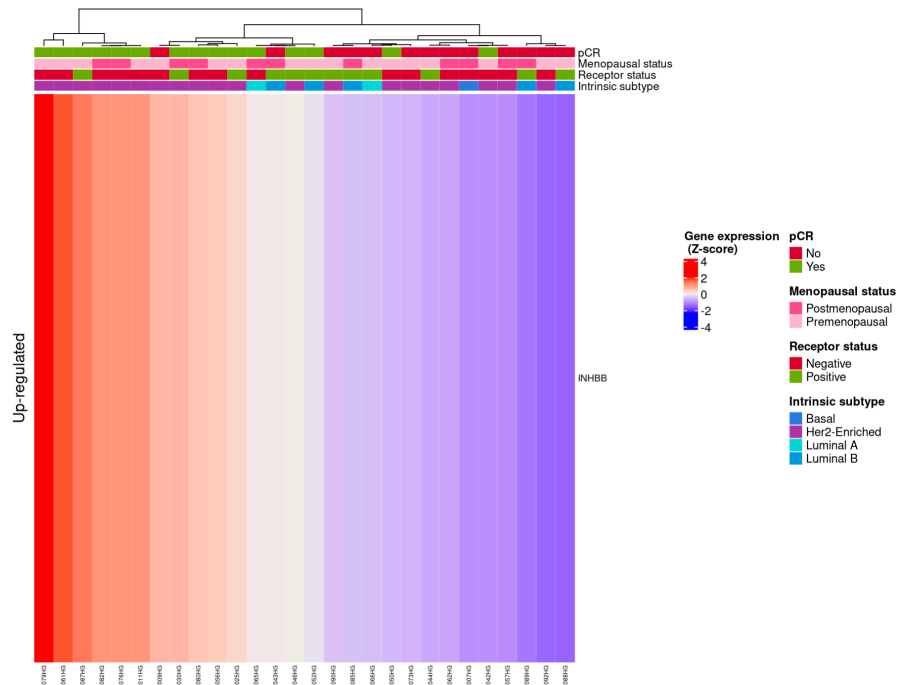
**Figura 54.** Heatmap de casos y firmas expresados diferencialmente entre grupos (HER2 agrupado y no HER2E).

### 4.3.6 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN SUBGRUPOS CLÍNICOS DE INTERÉS

Se realiza un AED entre los casos que recibieron tratamiento sistémico y anti-HER2 pre-cirugía (28 casos), comparando aquellos que obtuvieron una rPC (*Neo pCR*; 15 casos) frente a los casos en los que no se obtiene tal respuesta (*Neo No-pCR*; 13 casos).

#### 4.3.6.1 Análisis de expresión a nivel de GEN

Tras llevar a cabo un análisis exploratorio inicial de los datos de expresión de genes normalizados mediante PCA, y análisis funcional tipo GSEA, se obtuvo que del total de genes analizados solo 1 gen presentó expresión diferencial entre grupos: 1 gen regulado al alza y 0 genes subexpresados en la condición *Neo pCR*. El gen en cuestión es el *INHBB* (Figura 53).



**Figura 55.** Heatmap de casos y genes expresados diferencialmente entre grupos (Neo pCR y Neo No-pCR).

#### 4.3.6.2 Análisis de expresión a nivel de FIRMA

Tras llevar a cabo un análisis exploratorio inicial de los datos de expresión de genes normalizados mediante PCA, y análisis tipo GSEA, del total de firmas analizadas, ninguna firma presenta expresión diferencial entre grupos.

## 4.4 ANÁLISIS DE DATOS GENÓMICOS

Como se detalla en el capítulo de metodología, llevamos a cabo el análisis genómico empleando el panel *Oncomine Comprehensive Assay v3C* para 79 pacientes. Siguiendo el procedimiento bioinformático detallado en apartado referido, obtenemos el resumen de mutaciones SNVs e *indels* antes (Figura 56A) y después del filtrado (Figura 56B). Se realizó un análisis descriptivo general por grupo mediante el paquete *mafTools* de R. Para los distintos grupos y comparaciones bajo estudio se

determinó la existencia de diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de presentar mutaciones en cada uno de los genes recogidos en el panel mediante la prueba de Fisher (bilateral y unilateral). Se consideraron diferencias significativas cuando el p-valor ajustado (FDR) < 0.05.

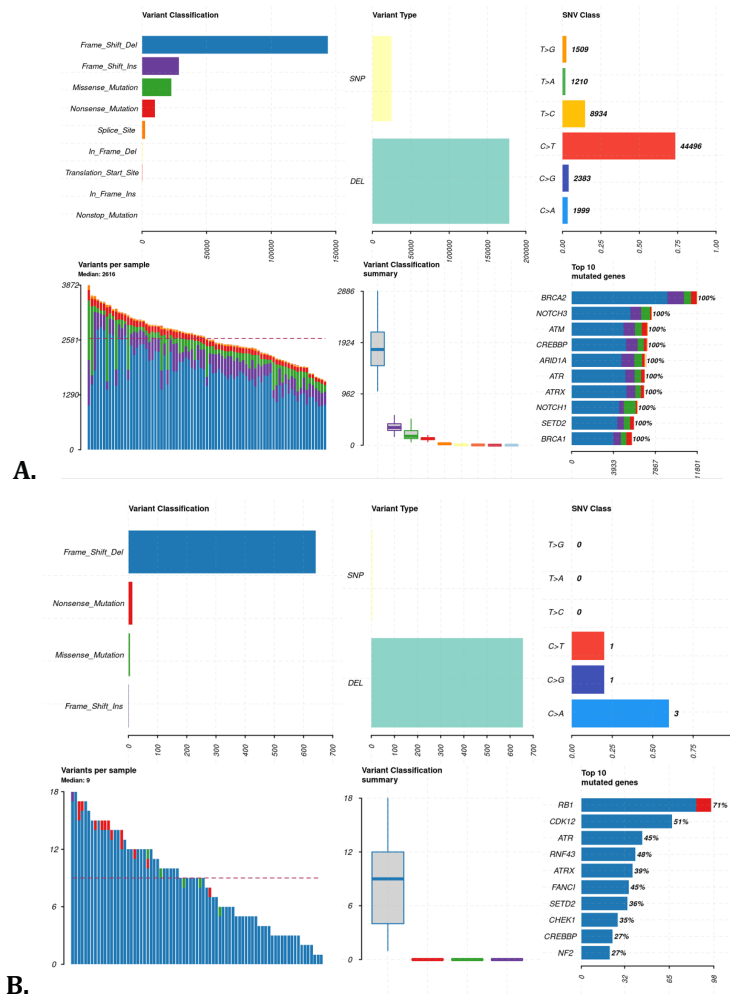


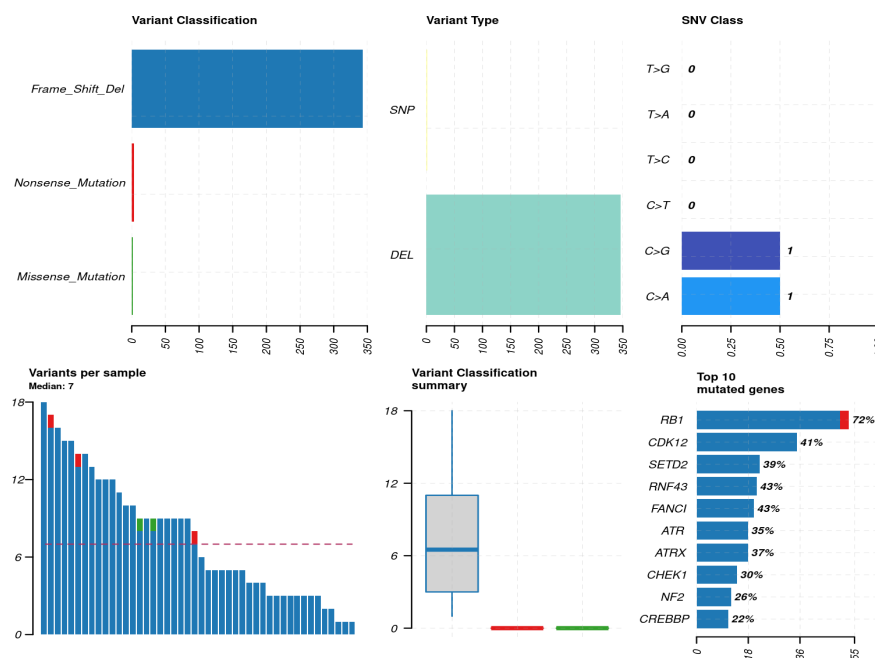
Figura 56. Resumen de las alteraciones genómicas SNVs e indels pre (A) y post (B) filtrado.

#### 4.4.1 ALTERACIONES GENÓMICAS SEGÚN SUBTIPO INTRÍN- SECO: HER2E *versus* no HER2

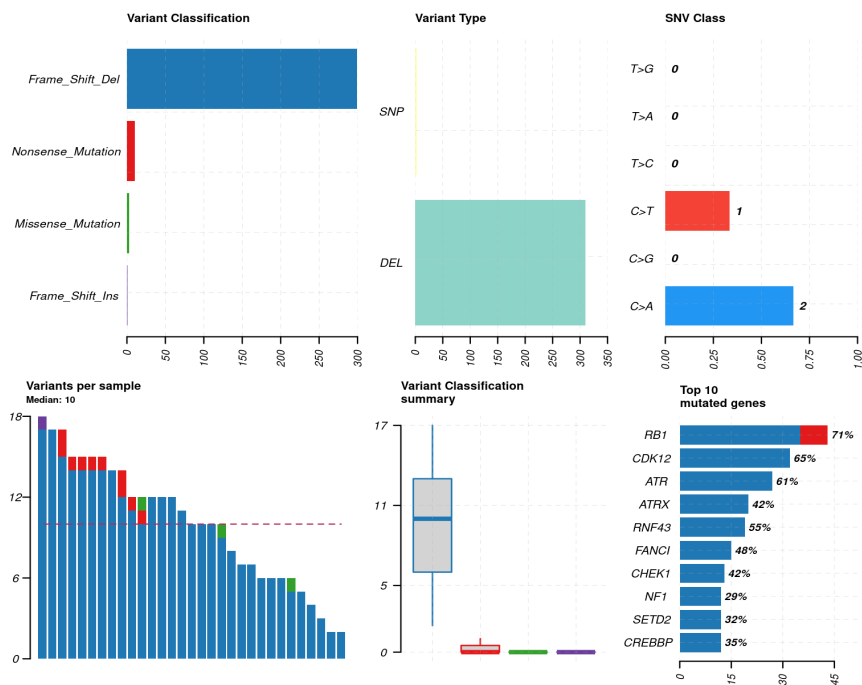
Se llevo a cabo un análisis de diferencias a nivel de alteraciones genómicas (SNVs-*indels* y CNVs) entre los tumores con subtipo HER2E (46 casos) y no HER2E (33 casos).

##### 4.4.1.1 Análisis de SNVs-*indels*

Los 10 genes más frecuente mutados en los casos HER2E analizados fueron por orden de frecuencia *RB1*, *CDK12*, *SETD2*, *RNF43*, *FANCI*, *ATR*, *ATRX*, *CHEK1*, *NF2* y *CREBBP* (Figura 57). En los casos no HER2E, por orden de frecuencia tenemos los genes *RB1*, *CDK12*, *ATR*, *ATRX*, *RNF43*, *FANCI*, *CHEK1*, *NF1*, *SETD2* y *CREBBP* (Figura 58).



**Figura 57.** Número de variantes por muestra, los tipos de variantes y los 10 genes más frecuentemente mutados en los casos HER2E.



**Figura 58.** Número de variantes por muestra, los tipos de variantes y los 10 genes más frecuentemente mutados en los casos no HER2E.

A continuación se muestran para cada una de las condiciones comparadas, los *onco-plot* de genes mutados por muestra/tipo de mutación (Figura 59), frecuencia alélica de las variantes (VAF) para los genes más frecuentemente mutados (Figura 60), resultados de análisis de interacciones somáticas para analizar pares de genes co-mutados o mutuamente excluyentes (Figura 61), interacciones fármaco-gen y farmacabilidad de los genes en base a la información recopilada en *Drug Gene Interaction Database* (DGIdb; [www.dgldb.org](http://www.dgldb.org)) (Figura 62), y para concluir, resumen del enriquecimiento en rutas de señalización oncogénica según la información recogida en TCGA (Figura 63).

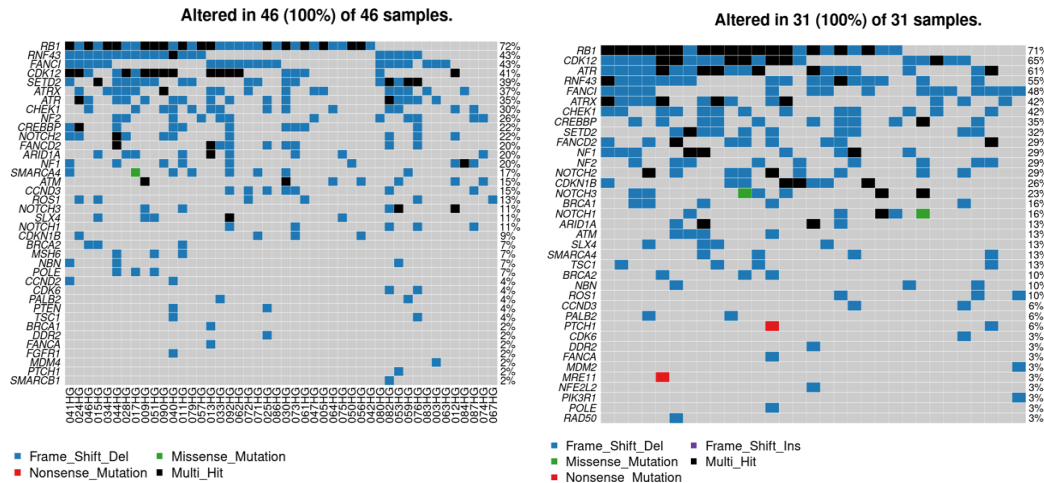


Figura 59. Oncoplot de genes mutados por muestra y tipo de mutación (izquierda, HER2E; derecha no HER2E).

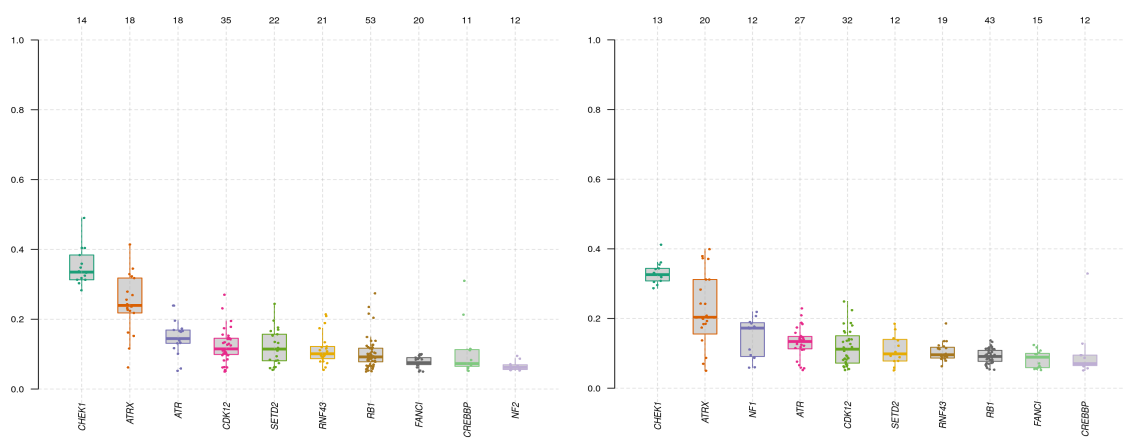


Figura 60. Frecuencia alélica de las variantes para los genes más frecuentemente mutados (izquierda, HER2E; derecha no HER2E).

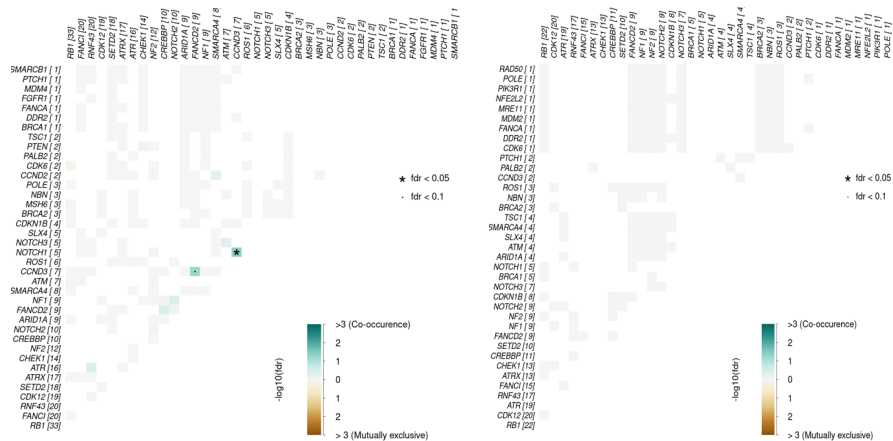


Figura 61. Análisis de interacciones somáticas con descripción de pares de genes co-mutados o mutuamente excluyentes (izquierda, HER2E; derecha no HER2E).

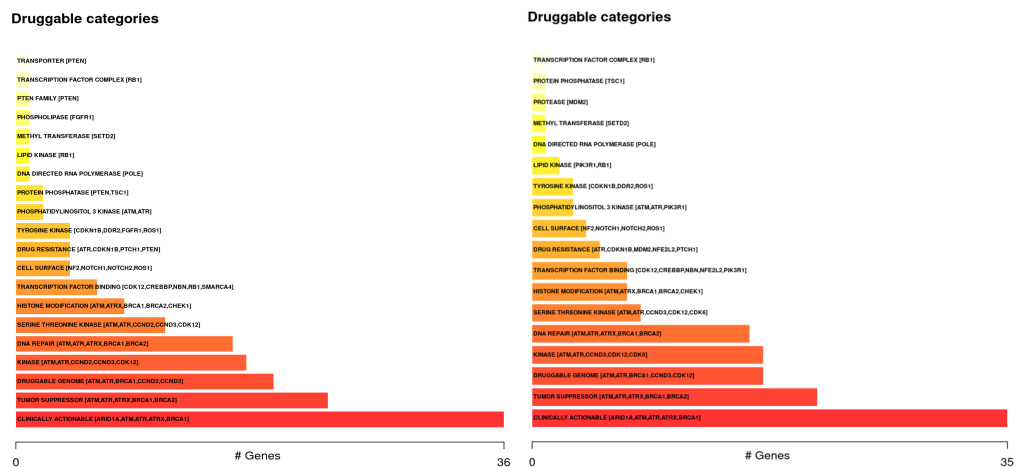


Figura 62. Análisis de interacciones fármaco-gen según la DGIdb ((izquierda, HER2E; derecha no HER2E)

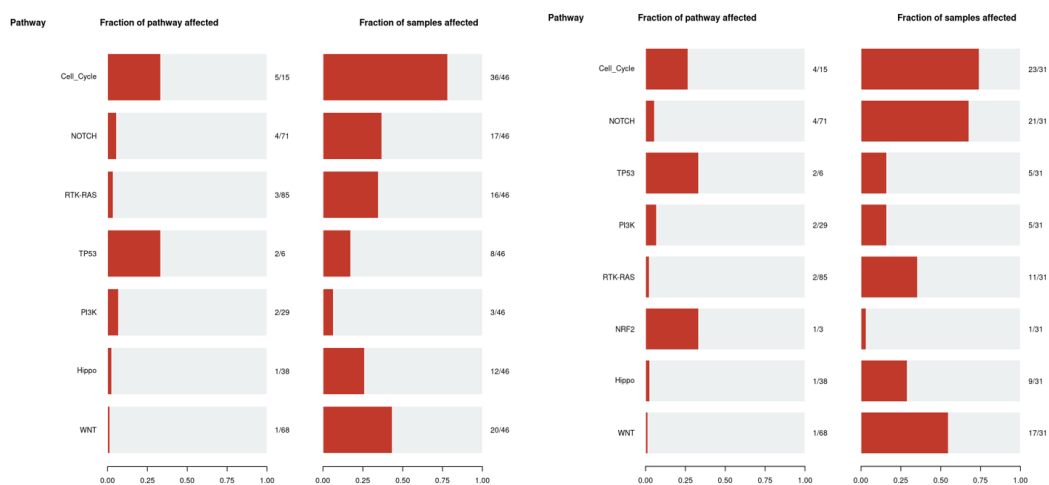
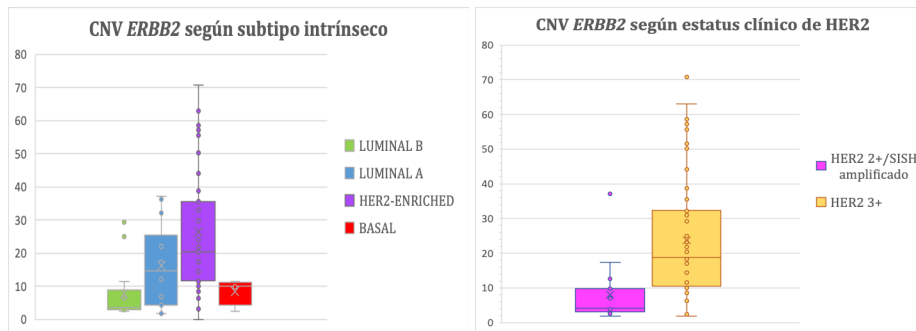


Figura 63. Resumen del enriquecimiento en rutas de señalización oncogénica en base a la información reco-gida en TCGA (izquierda, HER2E; derecha no HER2E)

Bajo la hipótesis de que para los grupos en estudio existen diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de presentar mutaciones en cada uno de los genes recogidos en el panel, se realiza el análisis estadístico mediante el test de Fisher (bilateral y unilateral), considerando diferencias significativas cuando el  $p$ -valor ajustado (FDR) < 0.05. Del total, ningún gen presentó diferente frecuencia de SNVs-indels entre los grupos HER2E y no HER2E (Tabla A9).

#### 4.4.1.2 Análisis de CNVs

Respecto a las CNVs (ganancias) del gen *ERBB2*, fueron mayores en los tumores con subtipo intrínseco HER2E y en el CM-HER2 positivo con HER2 3+ por IHQ (Figura 64).



**Figura 64.** CNVs de *ERBB2* según subtipo intrínseco (izquierda) y según estatus clínico-diagnóstico de HER2 (derecha).

El análisis de CNVs, a partir de los resultados de CNVs para todos los genes alterados incluidos en el panel de *Oncomine™ Comprehensive Assay v3C*, se expone por varias fases:

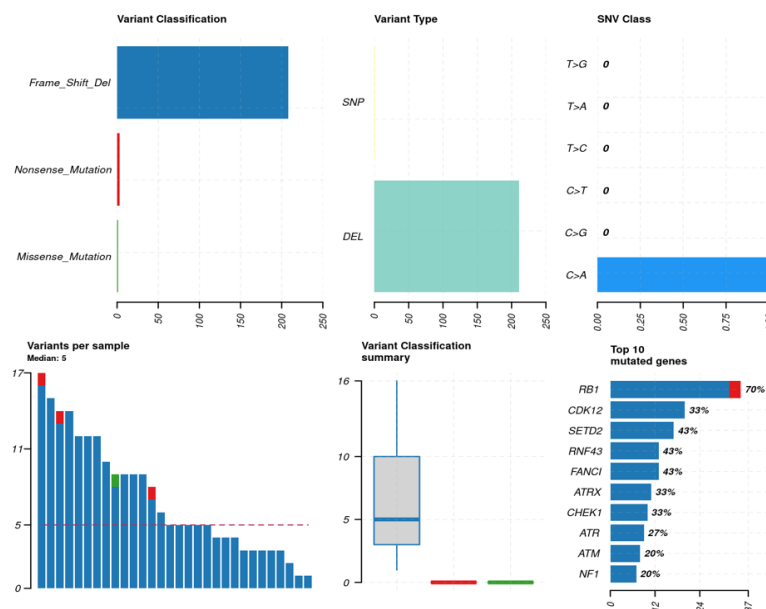
1. Análisis de Copy Number (CN) (media) entre los grupos HER2E y no HER2E, empleando el Test de Wilcoxon. Del total de genes, **solo el gen *ERBB2* presenta diferente CN (media)** (*Wilcox-Test two-tailed, Wilcox-Test one-tailed -greater-*).
2. Análisis de frecuencia CNVs (ganancias y pérdidas) entre grupos (test de Fisher). Del total, ningún gen presenta diferente frecuencia de CNVs (ganancias y pérdidas).
3. Análisis de frecuencia CNVs (ganancias) entre grupos (test de Fisher). Del total, ningún gen presenta diferente frecuencia de CNVs (ganancias).
4. Análisis de frecuencia CNVs (pérdidas) entre grupos (test de Fisher). Del total, ningún gen presenta diferente frecuencia de CNVs (pérdidas).
- 5.

#### 4.4.2 ALTERACIONES GENÓMICAS POR SUBTIPO INTRÍN- SECO: HER2E agrupado *versus* no agrupado

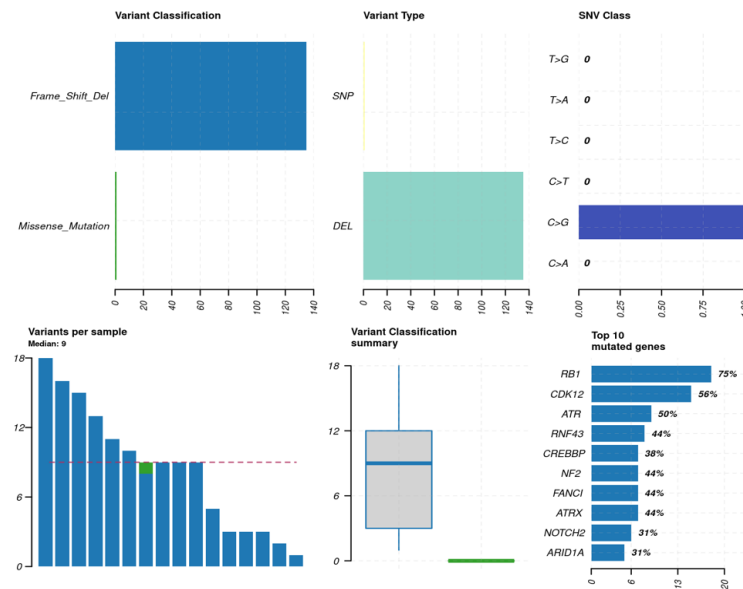
Se estudian las diferencias a nivel de alteraciones genómicas (SNVs-*indels*, CNVs) entre los casos HER2E con expresión de genes común (*HER2E agrupado*, 30 casos) y aquellos casos HER2E con una expresión de genes divergente (*HER2E no agrupado*, 16 casos).

##### 4.4.2.1 Análisis de SNVs-*indels*

Los 10 genes más frecuente mutados en los casos *HER2E agrupado* son por orden de frecuencia *RB1*, *CDK12*, *ATR*, *RNF43*, *FANCI*, *ATRX*, *CHEK1*, *ATR*, *ATM* y *NF1* (Figura 65). En los casos *HER2E no agrupado* por orden de frecuencia tenemos los genes *RB1*, *CDK12*, *ATR*, *RNF43*, *CREEBP*, *NF2*, *FANCI*, *ATRX*, *NOTCH2* y *ARID1A* (Figura 66).



**Figura 65.** Número de variantes por muestra, los tipos de variantes y los 10 genes más frecuentemente mutados en los casos *HER2E agrupados*.



**Figura 66.** Número de variantes por muestra, los tipos de variantes y los 10 genes más frecuentemente mutados en los casos HER2E no agrupados.

A continuación, se muestra para cada uno de los grupos los *oncoplot* de genes mutados por muestra y tipo de mutación (Figura 67), la VAF para los genes más frecuentemente mutados (Figura 68), resultados de análisis de interacciones somáticas de pares de genes co-mutados o mutuamente excluyentes (Figura 69), interacciones fármaco-gen y farmacabilidad (Figura 70), y el resumen del enriquecimiento en rutas de señalización oncogénica en base a la información del TCGA (Figura 71).

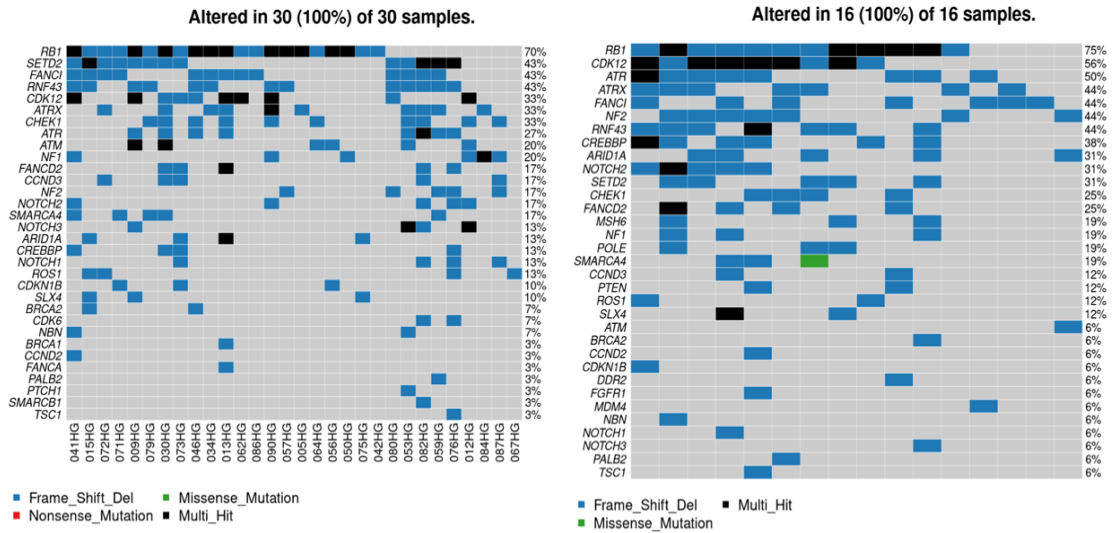


Figura 67. Oncoplot de genes mutados por muestra/tipo de mutación (izquierda, HER2E agrupados; derecha HER2E no agrupados).

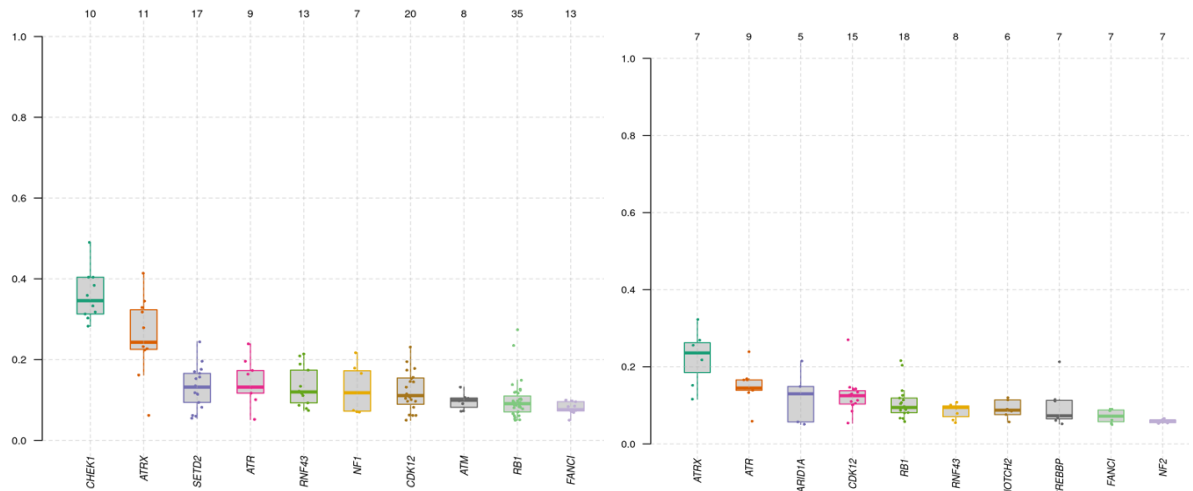


Figura 68. Frecuencia alélica de variantes para los genes más frecuentemente mutados (izquierda, HER2E agrupados; derecha HER2E no agrupados).

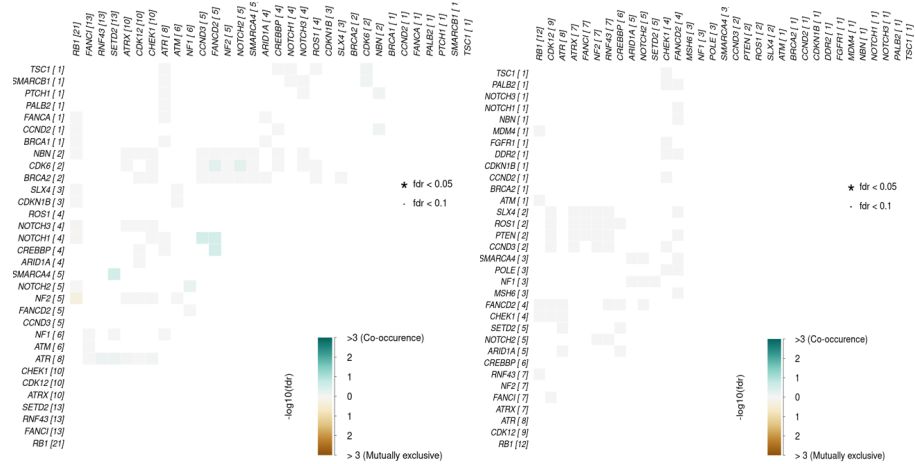


Figura 69. Análisis de interacciones somáticas con descripción de pares de genes co-mutados o mutuamente excluyentes (izquierda, HER2E agrupados; derecha HER2E no agrupados).

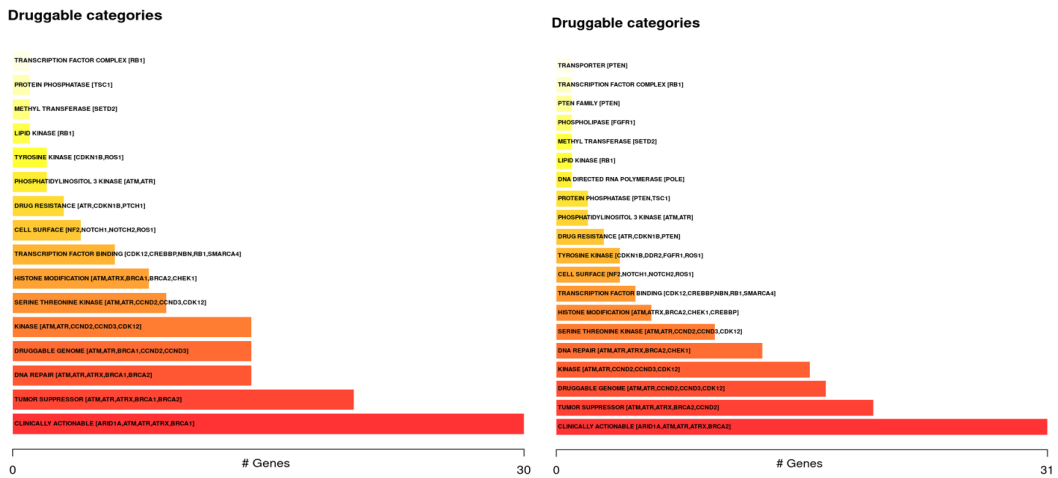


Figura 70. Análisis de interacciones fármaco-gen según la DGIdb (izquierda, HER2E agrupados; derecha HER2E no agrupados).

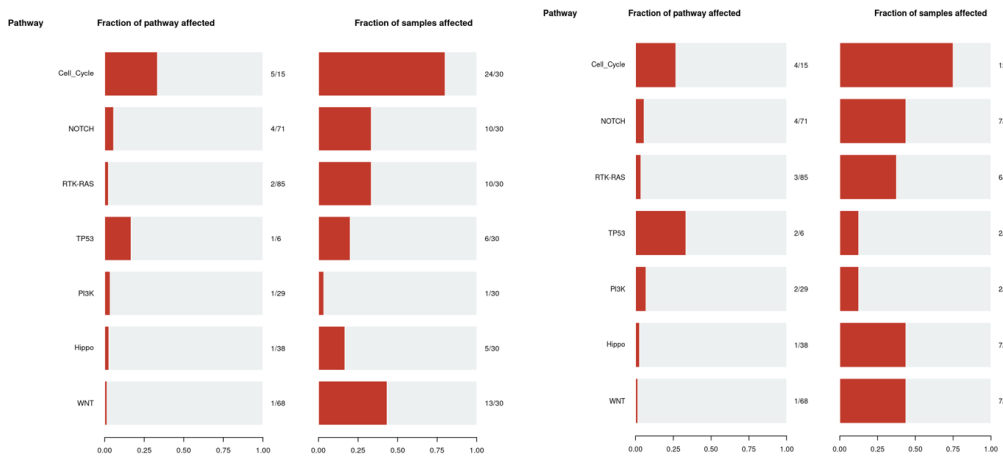


Figura 71. Resumen del enriquecimiento en rutas de señalización oncogénica en base a la información recogida en el TCGA (izquierda, HER2E agrupados; derecha HER2E no agrupados).

De la misma forma que la comparativa inicial, bajo la hipótesis de que, entre los dos grupos en estudio, *HER2E agrupados y no agrupados*, existen de diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de presentar mutaciones en cada uno de los genes recogidos en el panel, se realiza el análisis estadístico con el test de Fisher (bilateral y unilateral), de nuevo considerando diferencias significativas cuando el *p*-valor ajustado (FDR) < 0.05. Tras este análisis, del total, ningún gen presenta diferente frecuencia de SNVs-*indels* entre los grupos.

#### **4.4.2.2 Análisis de CNVs**

El análisis de CNVs, a partir de los resultados del análisis de CNVs para todos los genes alterados incluidos en el panel tenemos:

1. Análisis de Copy Number (CN) (media) entre los grupos *HER2E agrupado y no agrupado*, empleando el Test de Wilcoxon. Del total, **3 genes presentan diferente CN (media) entre grupos** (*Wilcox-Test two-tailed, Wilcox-Test one-tailed -greater-*). Estos genes son *FGFR1, FGFR2* y *RAD51*.
2. Análisis de frecuencia CNVs (ganancias y pérdidas) empleando la prueba de Fisher. Del total, ningún gen presenta diferente frecuencia de CNVs (ganancias y pérdidas) entre grupos.
3. Análisis de frecuencia CNVs (ganancias), empleando la prueba de Fisher. Del total, ningún gen presenta diferente frecuencia de CNVs (ganancias) entre grupos.
4. Análisis de frecuencia CNVs (pérdidas), empleando la prueba de Fisher. Del total, ningún gen presenta diferente frecuencia de CNVs (pérdidas) entre grupos.

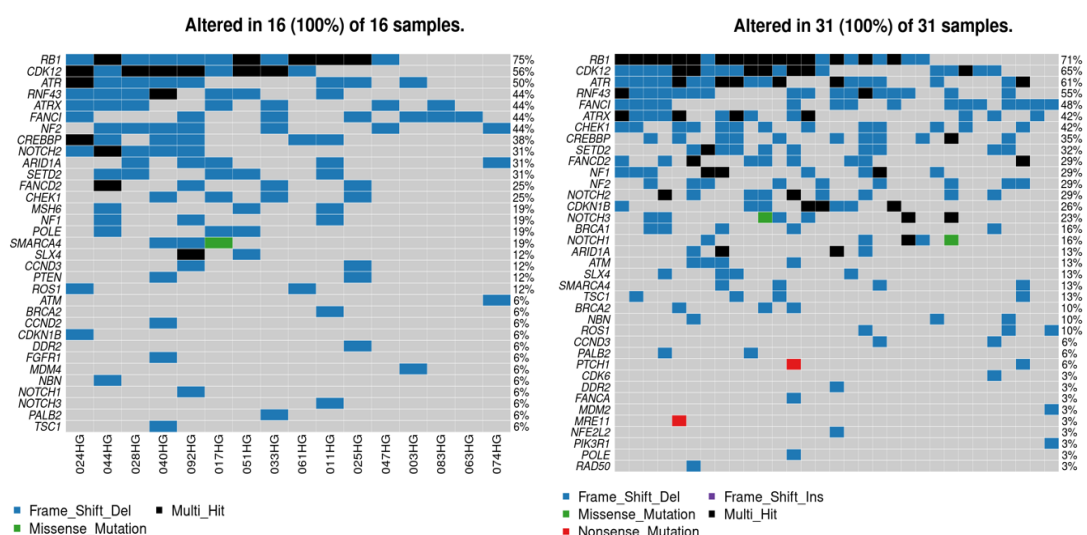
#### 4.4.3 ALTERACIONES GENÓMICAS POR SUBTIPO INTRÍN- SECO: HER2E no agrupado *versus* no HER2E

Se estudian las diferencias a nivel de alteraciones genómicas (SNVs-*indels*, CNVs) entre los casos HER2E con expresión de genes divergente (*HER2E no agrupado*, 16 casos) frente a los casos con subtipo no HER2E (*no HER2E*, 33 casos).

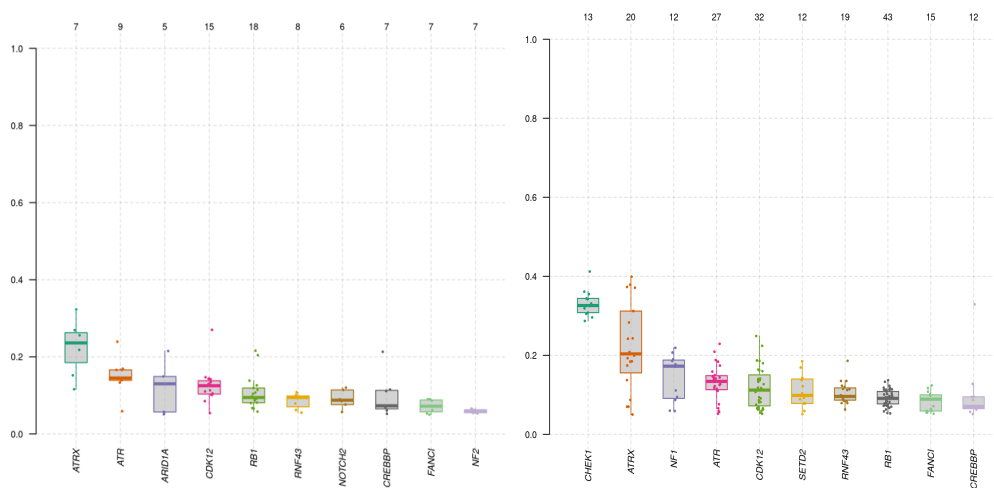
##### 4.4.3.1 Análisis de SNVs-*indels*

Los 10 genes más frecuente mutados en los casos *HER2E no agrupado* son por orden de frecuencia *RB1*, *CDK12*, *ATR*, *RNF43*, *CREBBP*, *NF2*, *FANCI*, *ATRAX*, *NOTCH2*, *ARID1A* (véase Fig. 66). En los casos *no HER2E*, por orden de frecuencia tenemos *RB1*, *CDK12*, *ATR*, *ATRAX*, *RNF43*, *FANCI*, *CHEK1*, *NF1*, *SETD2* y *CREBBP* (véase Fig. 58).

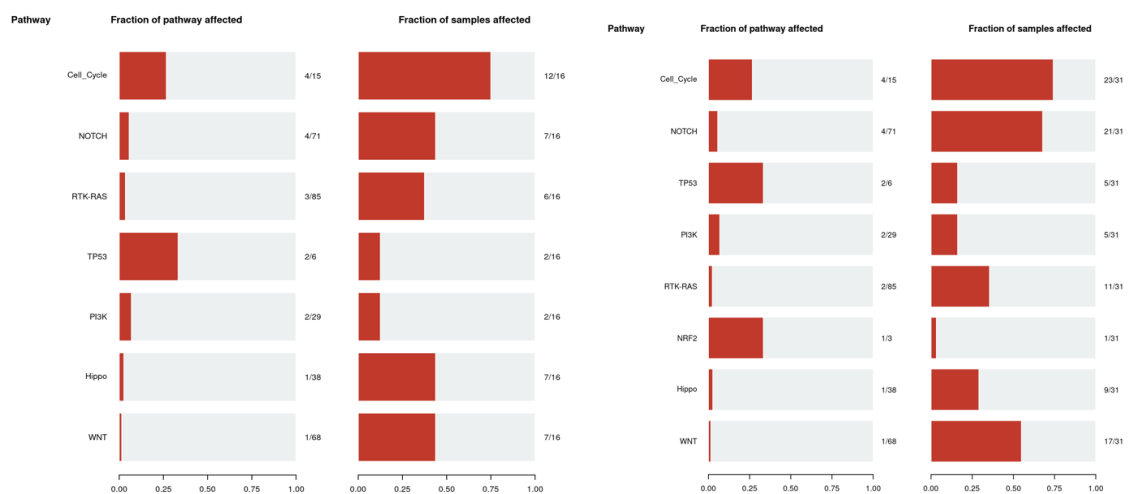
Al igual que en las comparaciones previas, se exponen para cada una de las condiciones (*HER2E no agrupados* y *no HER2E*), los *oncoplot* de genes mutados por muestra y tipo de mutación (Figura 72), la VAF para los genes más frecuentemente mutados (Figura 73), y el resumen del enriquecimiento en rutas de señalización oncogénica en base a la información recogida en TCGA (Figura 74).



**Figura 72.** Oncoplot de genes mutados por muestra y tipo de mutación (izquierda, *HER2E no agrupado*; derecha *no HER2E*)



**Figura 73.** Frecuencia alélica de las variantes para los genes más frecuentemente mutados (izquierda, HER2E no agrupado; derecha no HER2E)



**Figura 74.** Resumen del enriquecimiento en rutas de señalización oncogénica en base a la información recogida en TCGA (izquierda, HER2E no agrupado; derecha no HER2E)

De nuevo siguiendo bajo la hipótesis de que existen de diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de presentar mutaciones en cada uno de los genes recogidos en el panel entre los grupos comparados HER2E no agrupados y no HER2E, se realiza el análisis estadístico con el test de Fisher (bilateral y unilateral). Tras este análisis, del total, ningún gen presenta diferente frecuencia de SNVs-indels.

#### **4.4.3.2 Análisis de CNVs**

El análisis de CNVs, a partir de los resultados del análisis de CNVs para todos los genes alterados incluidos en el panel de *Oncomine™ Comprehensive Assay v3C*, se compone de:

1. Análisis de Copy Number (CN) (media) entre grupos *HER2E no agrupado* y *no HER2E*, empleando el Test de Wilcoxon. Del total, ningún gen presenta diferente CN (media) entre grupos (*Wilcox-Test two-tailed, Wilcox-Test one-tailed -greater-*)
2. Análisis de frecuencia CNVs (ganancias y pérdidas) empleando test de Fisher. Del total, ningún gen presenta diferente frecuencia de CNVs (ganancias y pérdidas) entre grupos.
3. Análisis de frecuencia CNVs (ganancias) empleando test de Fisher. Del total, ningún gen presenta diferente frecuencia de CNVs (ganancias) entre grupos.
4. Análisis de frecuencia CNVs (pérdidas) empleando test de Fisher. Del total, ningún gen presenta diferente frecuencia de CNVs (pérdidas) entre grupos.

#### **4.4.4 ALTERACIONES GENÓMICAS SEGÚN SUBTIPO INTRÍN- SECO: HER2E agrupado versus no HER2**

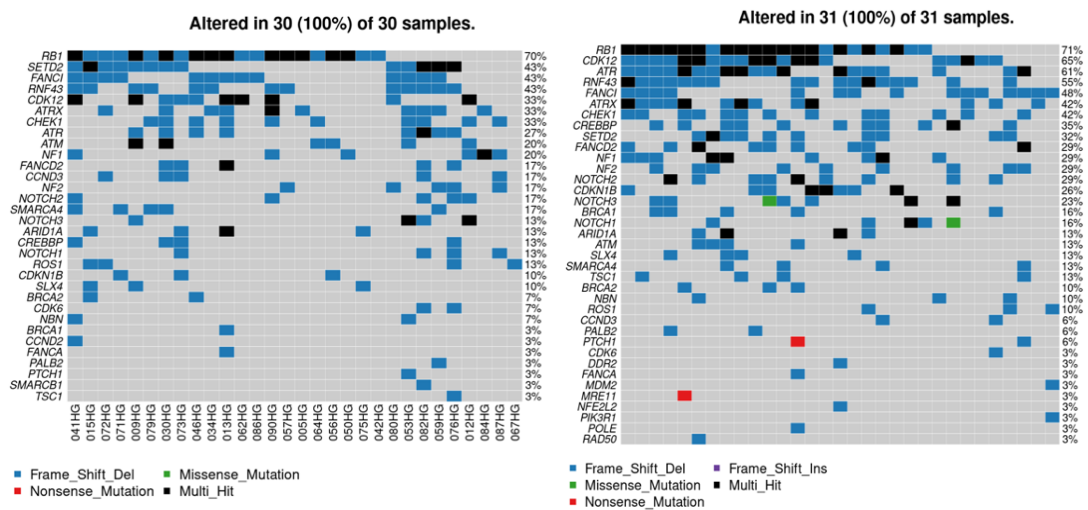
Se estudian las diferencias a nivel de alteraciones genómicas (SNVs-*indels*, CNVs) entre los casos *HER2E* con una expresión de genes común (*HER2E agrupado*, 30 casos) frente al resto de casos con subtipo no enriquecido (*no HER2E*, 33 casos).

##### **4.4.4.1 Análisis de SNVs-*indels***

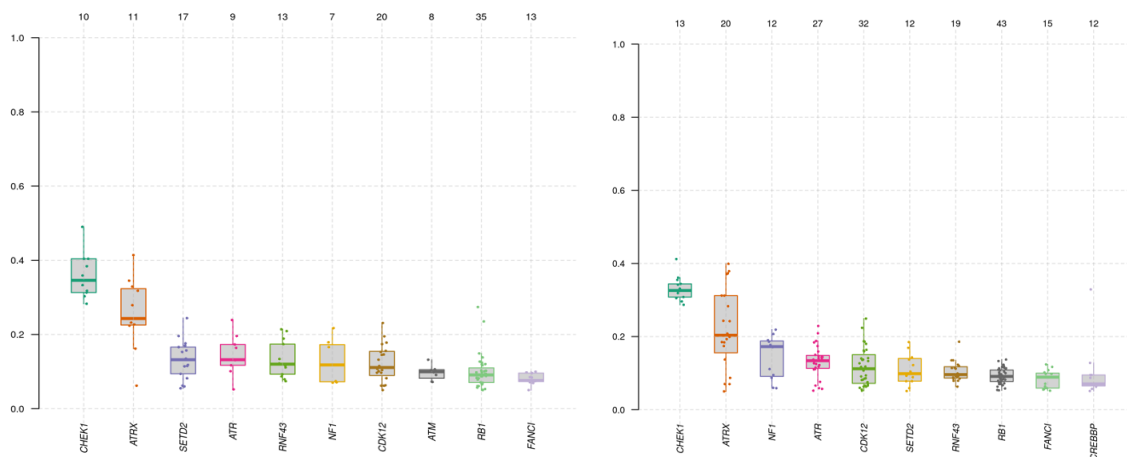
Los 10 genes más frecuente mutados en los casos del grupo *HER2E agrupado* son por orden de frecuencia *RB1, CDK12, SETD2, RNF43, FANCI, ATRX, CHEK1, ATR, ATM*

y *NF1* (véase Fig. 65). En los casos no *HER2E*, los genes son *RB1*, *CDK12*, *ATR*, *ATRX*, *RNF43*, *FANCI*, *CHEK1*, *NF1*, *SETD2* y *CREBBP* (véase figura 58).

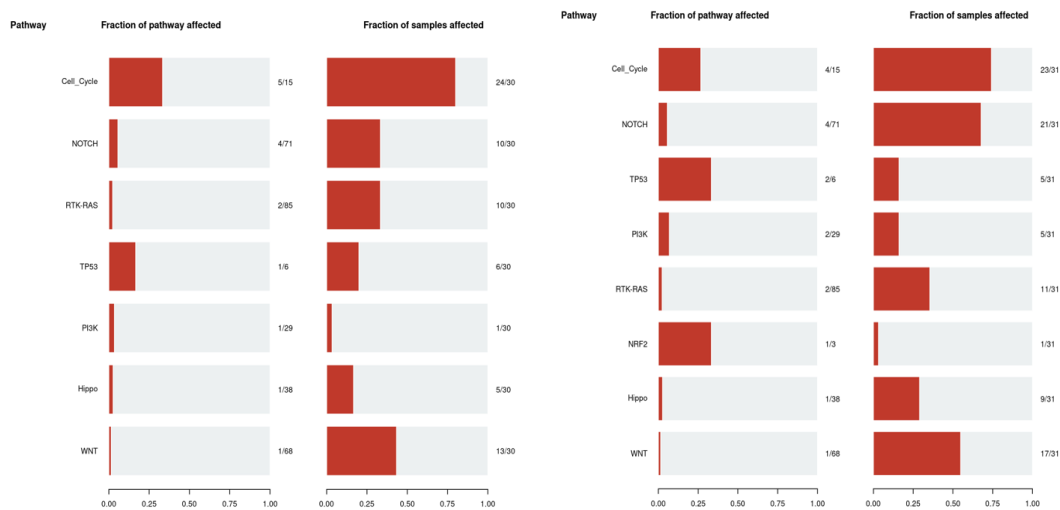
Al igual que en las anteriores comparaciones entre grupos, para cada una de las condiciones (*HER2E* agrupados y no *HER2E*), se muestran los *oncoplot* de genes mutados por muestra y tipo de mutación (Figura 75), la VAF para los genes más frecuentemente mutados (Figura 76), y para concluir, resumen del enriquecimiento en rutas de señalización oncogénica en base a la información recogida en TCGA (Figura 75).



**Figura 75.** *Oncoplot* de genes mutados por muestra y tipo de mutación (izquierda, *HER2E* agrupados; derecha no *HER2E*).



**Figura 76.** Frecuencia alélica de las variantes para los genes más frecuentemente mutados (izquierda, *HER2E* agrupados; derecha no *HER2E*).



**Figura 77.** Resumen del enriquecimiento en rutas de señalización oncogénica en base a la información recogida en el TCGA.

(izquierda, *HER2E* agrupados; derecha no *HER2E*).

Por último y siguiendo la misma hipótesis que en previas comparativas, así como igual test estadístico, se analiza la existencia de diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de presentar mutaciones en cada uno de los genes recogidos en el panel. Tras este análisis, del total, ningún gen presenta diferente frecuencia de SNVs-*indels* entre los grupos *HER2E* agrupado y no *HER2E*.

#### 4.4.4.2 Análisis de CNVs

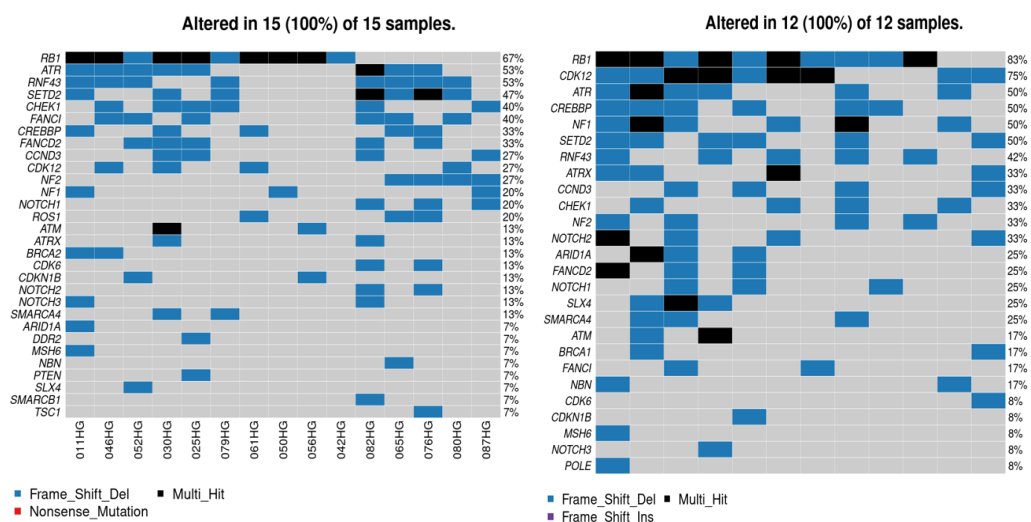
El análisis de CNVs, a partir de los resultados del análisis de CNVs para todos los genes alterados incluidos en el panel de *Oncomine™ Comprehensive Assay v3C*, se expone por varias fases.

1. Análisis de Copy Number (CN) (media) entre grupos *HER2E* agrupado y no *HER2E*, empleando el Test de Wilcoxon. Del total, **solo el gen *ERBB2* gen presenta diferente CN (media)** entre grupos (*Wilcox-Test two-tailed, Wilcox-Test one-tailed -greater-*).
2. Análisis de frecuencia CNVs (ganancias y pérdidas) empleando el test de Fisher. Ningún gen presentó diferente frecuencia de CNVs (ganancias y pérdidas) entre grupos.

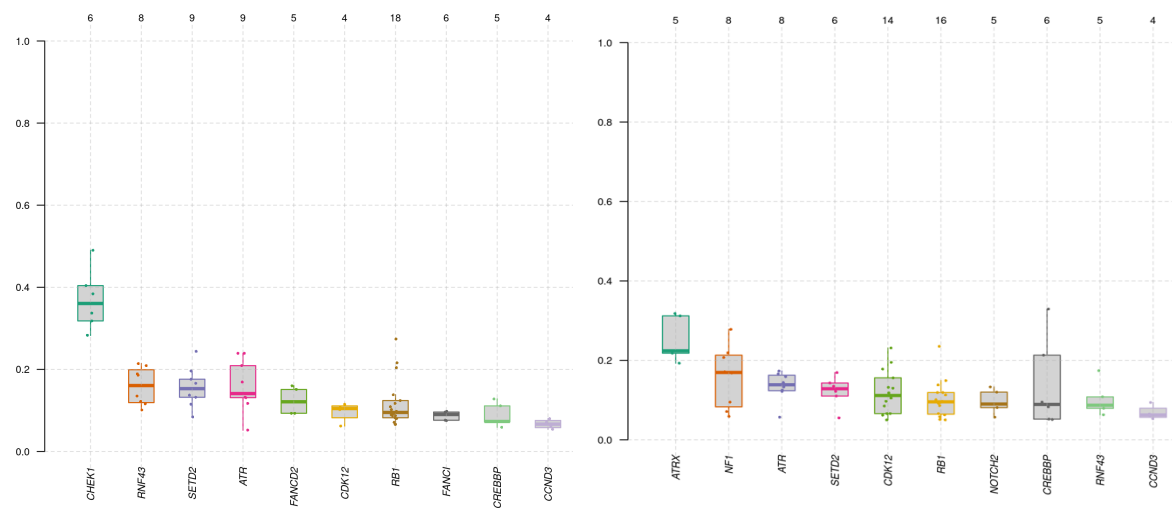
3. Análisis de frecuencia CNVs (ganancias) empleando el test de Fisher. Ningún gen presentó diferente frecuencia de CNVs (ganancias) entre grupos.
4. Análisis de frecuencia CNVs (pérdidas) empleando el test de Fisher. Ningún gen presentó diferente frecuencia de CNVs (pérdidas) entre grupos.

#### 4.4.5 ALTERACIONES GENÓMICAS SEGÚN RESPUESTA PATOLÓGICA A NEOADYUVANCIA

Se estudian diferencias a nivel de alteraciones genómicas (SNVs-*indels*, CNVs) entre los casos tratados con TNA (28 casos) en los que se obtiene rPC (*Neo pCR*, 15 casos) frente a aquellos en los que no se obtiene respuesta patológica completa (*Neo No-pCR*, 13 casos). En la figura 78 podemos ver los *oncoplot* genes mutados por muestra y tipo de mutación en la población con rPC y en la población que no obtiene respuesta completa patológica a TNA (*Neo No-pCR*). La figura 79 refleja las VAF para los genes más frecuentemente mutados en cada población.



**Figura 78.** Oncoplot de genes mutados por muestra y tipo de mutación (izquierda, *Neo pCR*; derecha *Neo No-pCR*).



**Figura 79.** Frecuencia alélica de variantes para los genes más frecuentemente mutados (izquierda, Neo pCR.; derecha Neo No-pCR).

Se analizó existencia de diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de presentar mutaciones en cada uno de los genes recogidos en el panel mediante la prueba de Fisher (bilateral y unilateral) entre ambos grupos. Del total, ningún gen presenta diferente frecuencia de SNVs-indels entre los grupos Neo pCR y Neo No-pCR. Respecto al análisis de CNVs, ningún gen presentó diferente CN (media) entre grupos, como tampoco ningún gen presentó diferente frecuencia de CNVs (ganancias y pérdidas; ganancias; pérdidas).

## 4.5 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

Usando el lenguaje de programación R, con el paquete `Survival`, analizamos SLE y SG, basado en *a)* aproximación de Kaplan-Meier y Log Rank Test y *b)* *Cox Proportional Hazards Models* corrigiendo el efecto de las covariables “Tratamiento” (Adyuvante o Neoadyuvante) y “Estado del receptor” (Positivo o Negativo), y empleando el paquete `survival` de R. Los resultados obtenidos para *b)* no se muestran al no mejorar los resultados obtenidos para *a)*

Tanto para SLE como para SG no se detectaron diferencias estadísticamente significativas:

1. *HER2 versus no HER2E* → SLE p=0.87; SG p=0.52
2. *HER2E agrupado versus HER2 no agrupado* → SLE p=0.072; SG p =0.18
3. *HER2E no agrupado versus no HER2* → SLE p=0.14; SG p =0.55
4. *HER2E agrupado versus no HER2* → SLE p =0.59; SG p =0.25
5. *Neo pCR versus Neo No-pCR* → SLE p =0.82; SG p =0.39

# 5. DISCUSIÓN

---

*“No tengo talentos especiales.  
Simplente soy apasionadamente curioso”*

**Albert Einstein** (1879 - 1955)

Como ya hemos revisado a lo largo del primer capítulo de este trabajo, la amplificación de *ERBB2* y/o sobreexpresión de HER2 sigue siendo el único biomarcador con el que sub-clasificamos el CM en tumores HER2 positivo y el que determina los algoritmos de uso de las terapias anti-HER2, terapias que han cambiado el paradigma de la enfermedad y modificado drásticamente su pronóstico. Sin embargo, también hemos visto que por sí solo esto es insuficiente para explicar los resultados terapéuticos heterogéneos de la práctica clínica. La compleja heterogeneidad del CM-HER2 positivo es un aspecto crítico descrito a múltiples niveles: intra-tumoral, de expresión génica, transcriptómica y genómica, con cada vez una mayor evidencia del impacto de esta en la evolución de las pacientes, respuesta a los tratamientos y en los mecanismos de resistencia tumoral. Quizás, combinando características fenotípicas (es decir, grupos de expresión génica) y mecanísticas (por ejemplo, co-amplificaciones), se pueda mejorar la clasificación actual del CM-HER2 positivo con la búsqueda de subgrupos más homogéneos y ampliando el conocimiento de los mecanismos genéticos implicados en la heterogeneidad de este tipo de CM. Esto ayudaría a diseñar estrategias terapéuticas racionales, explorando vías adicionales y genes coamplificados con *ERBB2*, especialmente para aquellos casos que muestran una respuesta débil inicial o que exhiben resistencia primaria al tratamiento, pacientes con un pronóstico particularmente pobre.

Como parte de esta heterogeneidad biológica, tenemos que dentro del CM-HER2 positivo podemos encontrar cada uno de los 4 subtipos intrínsecos moleculares, siendo el más representativo el subtipo HER2E. La amplificación génica de *ERBB2*, parece ser un n conductor oncogénico presente en todos los tipos de CM, en lugar de un biomarcador en sí mismo de un subtipo intrínseco, y su fuerte enriquecimiento en el subtipo HER2E puede haber favorecido la errónea asociación de amplificación de *ERBB2* como equivalencia a dicho subtipo intrínseco. Por otro lado, considerando únicamente el subtipo intrínseco, hemos visto que desaparece cualquier valor pronóstico atribuible a variables clínicas y patológicas como el grado, ER/PR, valor de HER2 por IHC y/o ISH, y TILS, al igual que ocurre con la amplificación génica de *ERBB2*. Tenemos datos de eficacia de terapia anti-HER2 en pacientes con CM-HER2 negativo, siendo los más actuales aquellos provenientes de los ensayos clínicos con

trastuzumab-deruxtecan<sup>174,175</sup>, y por contraposición, una proporción considerable de pacientes con CM-HER2 positivo no logran dicho beneficio clínico. En general, la evidencia hasta el momento sugiere que todos los CM con subtipo intrínseco HER2E se beneficiarán del tratamiento anti-HER2. En el escenario terapéutico actual del CM-HER2 positivo, los futuros los ensayos clínicos más recientes continúan intentando mejorar los resultados de los pacientes añadiendo nuevos fármacos dirigidos a HER2, pero sin un diseño que implique una selección molecular, consiguiendo así un beneficio terapéutico en la mayoría de los ensayos discreto, con aumento de toxicidad y costos.

La subtipificación molecular del CM ha ampliado considerablemente nuestro conocimiento sobre el comportamiento de esta neoplasia y debería tener un lugar consolidado en la práctica clínica. Con la evidencia disponible y los datos presentados en esta revisión, parece que el subtipo intrínseco HER2E sería un el mejor predictor pronóstico y predictivo de beneficio real del tratamiento anti-HER2 para los tumores de mama con este subtipo intrínseco. Así, diseñamos la hipótesis de esta tesis doctoral, con el objetivo de profundizar en la heterogeneidad del CM-HER2 positivo y analizar diferencias clave nivel de expresión génica y/o de alteraciones genómicas entre los casos con subtipo HER2E frente al resto de subtipos intrínsecos dentro de un mismo fenotipo tumoral.

Para homogeneizar la muestra, seleccionados tumores de mama HER2 positivo (sobrexpresión de HER2 determinada por IHQ y/o amplificación por ISH en la biopsia del tumor primario) con una representación más o menos uniforme de casos con RH positivos y negativos. Tras el subtipificado por PAM50 un 58% de los casos correspondieron al subtipo HER2E, 20% a LumA, 17% a LumB y 5% a BAL. De la cohorte con RH negativos (44%), un 80% de casos presentaron subtipo HER2E, 11% BAL y 9% LumA. En la cohorte con RH positivos, 41% de los casos fueron HER2E y el resto se distribuyeron entre los dos subtipos luminales (30% LumB y 29% LumA). Respecto a las características clínico-patológicas, hay que destacar que se trata de una población con factores de mal pronóstico (>70% de los casos grado histológico 3 y afectación axilar en el 20%). En el grupo tratado con TNA, la tasa de rPC de nuestra

población fue similar a las tasas publicadas en la literatura, un 53%, siendo más del 80% de los casos tumores con subtipo HER2E.

Cuando llevamos a cabo el AED, en un primer paso analizamos si existía una expresión diferencial de genes y/o de firmas recogidas en el panel *Breast Cancer 360*<sup>TM</sup> según estatus menopáusico, estado del RH, y en la cohorte tratada con TNA, entre pacientes con rPC y aquellas con enfermedad residual postneoadyuvancia. Los resultados más interesantes provienen de la comparativa entre estado de los RH y entre las pacientes con rPC tras TNA y las que no.

En la primera, encontramos que múltiples firmas se expresaban diferencialmente entre grupos, destacando firmas inmunes (*células citotóxicas, citotoxicidad, macrófagos, PD-L1, PD-L2, TIGIT, IFN-Gamma, TIS*) que se subexpresan en las pacientes con RH positivos frente a los tumores HER2 positivos con RH negativos, lo que podría impactar en el futuro diseño de ensayos clínicos con inmunoterapia y terapia anti-HER2 debiendo considerar *a priori* a la población de tumores RH negativos/HER2 positivo como la más susceptible de beneficio clínico. Como era de esperar, la cohorte de pacientes con RH positivos/HER2 positivo tiene una expresión diferencial de firmas relacionadas con la señalización del RE, ESR1 y PGR, además de FOXA1.

En el AED en función de la respuesta patológica tras TNA, encontramos que en aquellos tumores con rPC, del total de genes analizados solo 1 gen y ninguna firma presentó expresión diferencial entre grupos: 1 gen regulado al alza y 0 genes subexpresados en la condición rPC. El gen en cuestión es el gen de la subunidad  $\beta$ B de la inhibina o *INHBB*. En la Tabla 10, se resumen las características de aquellas pacientes tratadas con TNA, rPC y sobreexpresión del gen *INHBB* (Z-score de  $\geq 1$ ). Todas las pacientes presentan subtipo HER2E y HER2 clínico 3+ por IHQ, un 72% son RH negativos y 54% premenopáusicas. Además, en esta cohorte pacientes se incluyen 2 de las 11 recaídas detectadas durante el seguimiento de nuestro estudio ambas a nivel de SNC.

	Muestra/Caso	Estado Menopáusico	Estado RH	HER2 clínico	Estadio clínico	Recurrencia
1	079GH	Pre	NEG	HER2 3+	cT3N0	No
2	011HG	Pre	NEG	HER2 3+	cT3N0	No
3	025HG	Pre	POS	HER2 3+	cT2N0	No
4	030HG	Post	POS	HER2 3+	cT2N1	No
5	056HG	Pre	NEG	HER2 3+	cT2N1	No
6	061HG	Pre	NEG	HER2 3+	cT2N0	Sí (SNC)
7	076HG	Post	NEG	HER2 3+	cT4dN2	No
8	080HG	Post	NEG	HER2 3+	cT2N0	No
9	087HG	Pre	POS	HER2 3+	cT1N1	Sí (SNC)
10	082HG	Post	NEG	HER2 3+	cT2N0	No
11	065HG	Post	NEG	HER2 3+	cT4dN2	No

**Tabla 10.** Principales características clínico-patológicas en el grupo tratado con terapia neoadyuvante, respuesta patológica completa y sobreexpresión de *INHBB*.

El gen *INHBB* se localiza en el cromosoma 2 y codifica para una preproteína que se procesa proteolíticamente para generar una subunidad de los complejos proteicos diméricos activina e inhibina, glicoproteínas estructuralmente relacionadas que actúan como citocinas funcionales y que forman parte de la superfamilia de ligandos del *TGF-β*. Se descubrieron inicialmente como reguladores de la hormona estimulante del folículo (FSH), con estudios en los últimos años que le han otorgado funciones emergentes en cáncer<sup>1</sup>. La inhibina es una hormona de origen exclusivamente gonadal, formada por dos subunidades únicas covalentemente: una subunidad α y una subunidad β de la que existen 2 isoformas, la A y la B (βA y βB). Mientras que *INHBA* (βA) e *INHBB* (βB) se expresan en el tejido mamario normal, sólo *INHBB* está sobrerregulada por los estrógenos. La Activina A esta compuesta por un homodímero de subunidad βA unido por disulfuro. La activina A puede encontrarse altamente expresada en CM y se ha asociado a peor pronóstico. De forma similar a lo que ocurre con el *TGF-β*, la señalización canónica de la activina A se produce a través de la activación de la vía de señalización SMAD. Los SMAD fosforilados activos se liberan en el citoplasma, donde forman complejos SMAD, Smad4, y se translocan al núcleo, se unen al ADN y modulan la transcripción de genes diana. Además de activar la señalización SMAD canónica en el CM, la activina A también puede también enviar señales a través de las vías p38/MAPK, PIK3CA/AKT y WNT/β-catenina, a menudo de forma independiente de los SMAD<sup>176</sup>, constituyendo esto el grupo de vías no clásicas de vías de transducción por *TGF-β*. No existen hasta la fecha publicaciones que analicen ni relacionen la

expresión del gen *INHBB* con el CM-HER2 positivo ni tampoco con respuesta a neoadyuvancia. El trabajo más interesante que estudio la relación de la sobreexpresión del gen *INHBB* a una mayor actividad proliferativa tumoral, en concreto, a nivel de SNC, consiste en un estudio que analiza la actividad proliferativa de 9 líneas celulares de CM-HER2 positivo en tejido cerebral no tumoral. Las células de las líneas UACC-893 y MDA-MB-453 proliferaron rápidamente en el parénquima cerebral, mientras que las otras siete proliferaron de manera moderada o lenta. Los autores, realizaron un análisis *de microarrays* encontrando que ambas líneas celulares compartían hasta 138 patrones de expresión génica. Entre los genes sobreexpresados se encontraba *INHBB*. Los autores realizaron seguidamente un análisis de supervivencia empleando el conjunto de datos METABRIC para analizar el impacto de la expresión de los genes diferencialmente expresados. En concreto, el gen *INHBB* junto a otros entre los que se incluye *EGLN3* (también sobreexpresado en las líneas rápidamente proliferativas), no fueron incluidos en el análisis al no disponer de datos clínico-patológicos para estos genes en la base de datos METABRIC<sup>2</sup>.

Como parte del objetivo primario de nuestro proyecto, continuamos analizando los resultados del AED y análisis de datos genómicos resultado de la comparativa de tumores con HER2E frente al resto de subtipos intrínsecos.

#### **A) HER2E versus subtipos no HER2E**

A nivel de datos genómicos, encontramos que los genes alterados y sus variantes presentaban entre grupos un **similar enriquecimiento en rutas de señalización oncogénica** (ciclo celular, *TP53* y *PIK3CA*), con **ningún gen que presentara diferente frecuencia de SNV-indels** y siendo **solo el gen *ERBB2* el único con diferencias en la ratio de CN**. Respecto a los genes más frecuentemente alterados, hay que destacar que en ambos grupos encabezan la lista los genes *RB1* y *CDK12*.

La quinasa dependiente de ciclina 12 (*CDK12*) pertenece a la familia de las ciclinas dependientes de quinasa (*CDK*) y tiene funciones pleiotrópicas en la regulación de la transcripción genética, el empalme y la traducción del ARN, la progresión del ciclo

celular, la respuesta al daño del ADN actuando como un regulador transcripcional positivo de genes del sistema de reparación por recombinación homóloga, y el mantenimiento de la estabilidad genómica<sup>177</sup>. Se ha descrito que *CDK12* puede favorecer el crecimiento y diseminación de las células tumorales en una amplia variedad de tumores al regular múltiples vías, entre estas, WNT/ $\beta$ -catenina, la vía MAPK, la vía del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) y como se ha comentado, la vía de reparación de daños en el ADN. También se ha publicado su implicación escape tumoral a la vigilancia inmunológica y en la regulación positiva de los genes de los puntos de control inmunológico<sup>178</sup>. Este gen se ubica en el locus Ch17q12, de forma que está incluido en el amplificación de *ERBB2* y su amplificación a menudo ocurre simultánea a la de *ERBB2*<sup>179</sup>. La sobreexpresión de *CDK12* se ha correlacionado con indicadores de enfermedad agresiva en CM, lo que sugiere que CDK12 podría actuar como un oncogén primario<sup>178</sup>. Parece que al igual que la amplificación de *ERBB2*, por lo publicado en la literatura y coincidiendo con nuestro análisis de datos genómicos, las alteraciones de *CDK12* constituyen un evento independiente al subtipo intrínseco dentro del CM-HER2 positivo.

A nivel de expresión génica, encontramos un total de **29 genes y 4 firmas diferencialmente expresados entre tumores HER2E y no HER2E**. De los 29 genes diferencialmente expresados, 11 están regulados al alza (*ERBB2*, *GRB7*, *TMEM45B*, *FUT3*, *KRT7*, *B3GNT3*, *FGFR4*, *CXCL9*, *TMPRSS4*, *S100A7* y *CEACAM6*) y 18 subexpresados en la condición HER2E (*IGFR1*, *BLC2*, *ESR1*, *SLC39A6*, *FGFR2*, *SCUBE2*, *AGTR1*, *TBC1D9*, *IRX1*, *PGR*, *NAT1*, *BMPR1B*, *MAPT*, *ELOVL2*, *DNAJC12*, *CBLC*, *KRT14* y *SOX10*). En el análisis funcional, el mayor conteo de genes y con el p-valor más significativo para los genes diferencialmente expresados se encuentra en las rutas de señalización de las *MAPK* y *PI3K-Akt*, en consonancia con lo hallado en el análisis de datos genómicos. Respecto al AED de firmas, encontramos el resultado más destacable de la comparativa: **cuatro firmas diferencialmente expresadas, siendo estas ESR1, PGR, ERBB2 y ROR**, las dos primeras sub-expresadas en HER2E y las últimas sobre-expresadas.

Tras este primer análisis de comparación, encontramos un subgrupo de casos dentro de HER2E con una expresión de genes divergente, que no parecían agrupar dentro del total de los casos HER2E. Este subgrupo llamado “HER2E no agrupado” ha sido comparado con los *HER2E agrupados* y con los subtipos no enriquecidos. Los casos correspondientes al grupo *HER2E no agrupado* (16 casos) y las principales características clínico-patológicas incluyendo el CN (valor) de *ERBB2* se describen en la Tabla 11. La mayoría de estos casos presentan RH positivos (69%) y HER2 clínico por IHQ 3+ (87,5%), con una mediana de CNV *ERBB2* de 21,31 (r: 3,09 – 87,8).

Muestra/Caso	Estado menopausico	Estado RH	Ki67 (%)	HER2 IHQ/FISH	HER2 CNV (valor)	Estrategia de tratamiento	Tamaño tumor primario (mm)	Afectación axilar clínica y/o patológica	Tipo de respuesta tras Neoadyuvancia (Symmans)
003HG	Post	POS	40	HER2 2+/SISH+	12,59	ADJUVANT	23	SI	NA
011HG	Pre	NEG	20	HER2 3+	87,8	NEOADJUVANT	50	NO	rCP
025HG	Pre	POS	75	HER2 3+	25,44	NEOADJUVANT	18	NO	rCP
028HG	Post	POS	75	HER2 3+	20,29	ADJUVANT	12	NO	NA
033HG	Post	POS	10	HER2 3+	70,85	ADJUVANT	8	NO	NA
040HG	Post	POS	60	HER2 3+	22,33	ADJUVANT	16	NO	NA
042HG	Pre	NEG	90	HER2 3+	10,04	NEOADJUVANT	18	SI	rCP
044HG	Pre	POS	60	HER2 3+	3,09	NEOADJUVANT	30	SI	RCB-II
047HG	Post	POS	75	HER2 3+	3,15	ADJUVANT	42	NO	NA
051HG	Post	POS	60	HER2 2+/SISH+	17,41	ADJUVANT	15	NO	NA
061HG	Pre	NEG	20	HER2 3+	9,27	NEOADJUVANT	40	NO	rCP
063HG	Post	NEG	80	HER2 3+	11,48	ADJUVANT	16	NO	NA
071HG	Post	POS	14	HER2 3+	44,18	ADJUVANT	22	NO	NA
074HG	Pre	POS	50	HER2 3+	32,96	ADJUVANT	15	NO	NA
083HG	Pre	POS	15	HER2 3+	25,28	ADJUVANT	14	NO	NA
092HG	Pre	NEG	85	HER2 3+	57,20	NEOADJUVANT	56	SI	RCB-III

Tabla 11. Principales características clínico-patológicas, CNV *ERBB2* del grupo *HER2E no agrupado*.

## B) HER2E agrupado versus no agrupado

A nivel de datos genómicos, de nuevo tenemos que *RB1* y *CDK12* encabezan la lista de los 10 genes más frecuentemente mutados, y que los genes alterados y sus variantes presentan entre grupos un **enriquecimiento similar en rutas de señalización oncogénica** (ciclo celular, *TP53* y *PIK3CA*). **Ningún gen presentó diferente frecuencia de SNV-indels entre grupos** y respecto a diferencias en el ratio de CN, sí encontramos diferencias, siendo en este caso los genes *FGFR1*, *FGFR2* y *RAD51* **los genes con diferencias significativas en la ratio de CN, con una mayor ratio CN en el grupo HER2E no agrupado**.

A nivel de expresión génica, encontramos un **total de 17 genes y 2 firmas diferencialmente expresados entre grupos**. De los 17 genes diferencialmente expresados, dentro de los 10 regulados al alza en el grupo *HER2E agrupado* aparecen genes ya descritos en la comparativa previa, a excepción de *ERBB2* que desaparece como gen diferencialmente expresado entre grupos. Entre los genes subexpresados de nuevo tenemos los genes ESR1 y PGR. En el análisis de enriquecimiento ontológico-funcional, los genes expresados diferencialmente en el conjunto *HER2E no agrupado* se enriquecieron en la ruta de señalización de estrógenos. Es con el AED de firmas donde de nuevo encontramos el resultado más llamativo: los casos HER2E con expresión divergente de genes parecen no agrupar dentro del conjunto global de tumores HER2E por el peso a nivel de expresión diferencial que tienen las firmas ESR1 y PGR, al alza en los casos HER2E no agrupados.

### **C) HER2E no agrupado versus subtipos no HER2E**

En esta comparativa se dieron prácticamente los **mismos hallazgos** respecto al análisis de datos genómicos a los **encontrados en la comparativa inicial de casos HER2E versus no HER2E**, a excepción de que aquí no se dieron diferencias significativas la ratio de CN, ni siquiera para el gen *ERBB2*. En cuanto al análisis de expresión génica, el AED evidenció que el único gen diferencialmente expresado entre grupos es *ERBB2*, y a nivel de firma sólo las firmas *ROR* y *ERBB2* se expresan diferencialmente, ambas sobreexpresadas en el conjunto de casos *HER2E no agrupado*.

### **D) HER2E agrupado versus no HER2E**

Para concluir, tenemos la comparativa de casos HER2E frente restos de subtipos intrínsecos aislados, excluyendo al grupo de casos HER2E con una expresión divergente. En este caso, se obtuvieron los mismos hallazgos del análisis de datos genómicos del apartado A), incluyendo diferencias significativas en la ratio de CN limitadas al gen *ERBB2*. Los datos de expresión génica tras el AED muestran **4 firmas diferencialmente expresadas**: *ROR* y *ERBB2* sobreexpresadas en HER2E agrupado, con las firmas ESR1 y PGR subexpresadas. A nivel de gen, el AED refleja un total de 50 genes

diferencialmente expresados, 18 genes expresados al alta en la condición HER2E agrupado con 7 genes adicionales a los diferencialmente expresados en la comparativa inicial. Estos genes son *EGLN3*, *LAD1*, *DKK1*, *SLPI*, *CALML5*, *PROM1* y *PIP*.

Realizamos una búsqueda y revisión exhaustiva de estos genes, con la intención de conocer lo publicado al respecto de su implicación en el CM-HER2 positivo y heterogeneidad biológica en CM.

- ***EGLN3***. La expresión de *EGLN3* está asociada con la inmuno-infiltración de una variedad amplia de células, incluidos los macrófagos en el microambiente inmune del tumor y los fibroblastos asociados al tumor, de forma que su inactivación en células tumorales y estromales suprimiría el crecimiento tumoral al parar las interacciones positivas mediadas por *EGLN3* entre las células y el microambiente tumoral<sup>180</sup>. También ha sido descrito como un oncogén potencial, al estar involucrado en la regulación de la apoptosis independiente de *HIF-1* de las células tumorales y al encontrarse sobre-expresado en gran medida en una amplia variedad de tumores incluyendo CM<sup>181</sup>. La principal evidencia de su asociación a tumores HER2 positivos proviene de estudio en líneas celulares donde se encontraron mayores niveles de ARNm de *EGLN3* en los tumores con RE negativos y HER2 positivos<sup>3</sup>, tumores con comportamiento más agresivo y peores resultados en supervivencia respecto a aquellos con RH positivos, y en los que se concentran la mayoría de los subtipos HER2E.
- ***LAD1***. El gen *LAD1* codifica para la proteína ladinin-1, una proteína hoy en día aun no completamente caracterizada, filamento de anclaje componente de las membranas basales y que parece contribuir a la estabilidad de la asociación de las capas epiteliales con la capa de mesénquima subyacente. Como se ha expuesto anteriormente, los factores de crecimiento de la familia EGF activan las RTK del grupo *HER/ERBB*, iniciando cascadas de fosforilación. En un trabajo basado en análisis fosfoproteómico con el objetivo de descubrir efectos de fosforilación distales a la activación de *EGFR*, los autores encontraron que *LAD1* actuaba en respuesta al estímulo con EGF como un mediador regulado por fosforilación de la vía EGF-ERK, favoreciendo la migración y proliferación

celular de las células mamarias al participar en el control de la polimerización y entrecruzamiento de las fibras de actina. Esto le confirió el papel de un nuevo regulador de citoesqueleto. También se reportó *LAD1* confiere un peor pronóstico, y que se expresa de forma significativa en subtipos agresivos de CM, en dicho trabajo caracterizados dentro de los *InsClust* 5 y 10, que en su mayoría se corresponden a CMTN y a tumores HER2 positivos<sup>4</sup>.

- ***DKK1***. El gen *DKK1* codifica para la proteína *Dickkopf-1*, un antagonista secretor de la vía de señalización canónica de Wnt, favoreciendo en última instancia la degradación de la  $\beta$ -catenina, por lo que ha sido considerado un supresor tumoral al inhibir una de las vías de señalización oncogénica en el CM. Sin embargo, el patrón de expresión y papel de *DKK-1* parecen variables según el cáncer y el estadio. Respecto al CM, tenemos estudios con resultados contradictorios. Parece que una baja expresión citoplasmática y/o nuclear de *DKK1* en las células tumorales se asocia a un mayor estadio, afectación ganglionar, grado y pleomorfismo celular y más importante, a una peor supervivencia específica de CM<sup>182</sup>. Dicha asociación también se ha establecido con el hecho de presentar niveles séricos elevados de *DKK1* en pacientes con CM. Esto último, parece explicarse porque la secreción de *DKK1* por parte de las células tumorales parece relacionarse con el organotropismo de las metástasis en CM, comportándose, así como una molécula con “dos caras”. Así, se ha publicado una relación entre niveles séricos altos y bajos de *DKK1* asociados a metástasis óseas y pulmonares respectivamente<sup>183</sup>. Se ha encontrado sobreexpresión de la proteína *DKK1* en líneas celulares de CM formadoras de metástasis osteolíticas, y en suero de pacientes con CM con metástasis óseas osteolíticas. Sin embargo, la función de *DKK1* dentro del contexto de la carcinogénesis del CM sigue sin ser concluyente, así como tampoco tenemos evidencia actual de mayor expresión de este gen/proteína en un determinado fenotipo o subtipo intrínseco de CM.
- ***SLPI***. El gen *SLPI* es un gen que actúa como inhibidor de la inflamación, en la modulación de la respuesta inmune y en la motilidad celular, favoreciendo la capacidad metastásica de tumores epiteliales. Tiene actividad anti-proteasa y suprime la transcripción de genes proinflamatorios a través de la vía del NF-

κB. Se ha reportado una mayor expresión de *SLPI* en células de CMTN, con varios estudios que le han otorgado un papel pro-metastásico en este fenotipo de CM. No hay publicaciones que lo asocien al CM-HER2 positivo<sup>184</sup>.

- **CALML5.** Este gen codifica para una proteína, la *calmodulina-like 5*, que comparte similitud funcional con la calmodulina (proteína de unión al calcio) expresada en la epidermis y uno de los genes con mayor sobreexpresión en CMTN. Se ha publicado que forma parte de las proteínas que interactúan con el receptor de motilidad mediado por hialuronano (Rhamm, CD168). Los cambios oncogénicos clave en el microambiente tumoral incluyen síntesis, procesamiento y señalización aberrante del ácido hialurónico. Las interacciones entre las células tumorales y su microambiente son de máxima relevancia para favorecer la invasión tumoral y las metástasis. La expresión de Rhamm dentro del parénquima tumoral no es uniforme, sino que se detecta dentro de regiones discretas en el margen invasivo del tumor (áreas de remodelación activa de la matriz extracelular). Se regula dinámicamente en el contexto de estrés celular, de forma que permite que las células tumorales detecten y respondan a la remodelación de la matriz celular, estando vinculado entonces en la adhesión celular y la transición epitelial-mesenquimal (EMT). En un estudio se detectó una mayor expresión en tumores con RE positivos de alto grado, CMTN y tumores HER2 positivo, y asociación a peor pronóstico<sup>5</sup>. En otro trabajo en líneas celulares de CM, se vio que la proteína Rhamm de la superficie celular y el CD44 actúan juntos en un mecanismo autocrino dependiente del ácido hialurónico para coordinar la señalización sostenida a través de ERK1,2, lo que conduce a una alta motilidad basal de las células de cáncer de mama invasivo<sup>6</sup>. Además, se ha asociado una sobreexpresión de mucina 4 y de CD44 con enmascaramiento del sitio de unión a trastuzumab, por lo que se considera un proceso biológico de resistencia a dicha terapia anti-HER2 por pérdida de dominio extracelular<sup>7</sup>. Dado que el gen que codifica para la proteína Rhamm, no se incluye en el panel que hemos empleado, solo podemos llegar a la hipótesis de que, si la *calmodulina-like 5* interacciona con Rhamm y éste participa en los procesos de remodelación de la matriz celular, adhesión celular, EMT, y junto a CD44, en el mantenimiento de la señalización a través de ERK1,2

componente de la vía MAPK, la sobreexpresión del gen CALML5 en el subtipo HER2E podría implicar un comportamiento agresivo y de evolución clínica más propia de un fenotipo basal.

- **PROM1.** El gen *PROM1*, también conocido como CD133, codifica la prominina-1, informado comúnmente como un marcador de células madre neuronales y hematopoyéticas, pero también con expresión en células tumorales y células madre tumorales, incluyendo células madre de CM<sup>185</sup>. A pesar de haberse estudiado durante las dos últimas décadas como un marcador de células madre tumorales y con actividad como regulador de la progresión tumoral, no se han realizado estudios específicos que arrojen información acerca de la relación entre la expresión de PROM1 y el pronóstico. Igualmente, no se ha establecido asociación de tumores HER2 positivos o subtipo HER2E.
- **PIP.** El gen *PIP*, codifica para una pequeña glicoproteína producida por los tejidos de glándulas apocrinas, la *Proteína Inducida por Prolactina*. Está ampliamente expresada en el tejido mamario normal, pero también se ha publicado su expresión en el CM especialmente aquellos con propiedades apocrinas y en tumores con RH positivos. Respecto a los subtipos intrínsecos, se ha descrito una mayor expresión en tumores luminal-A y HER2-like<sup>186,187</sup>. Aunque disponemos de varios estudios sobre su papel en el desarrollo del CM y la progresión tumoral, estos han dado resultados contradictorios y hoy en día el papel de PIP en la carcinogénesis del CM y el papel pronóstico de su expresión no está completamente explicado.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# 6. CONCLUSIONES

---

*“La ciencia siempre vale la pena porque sus descubrimientos,  
tarde o temprano, siempre se aplican”*

**Severo Ochoa** (1905 - 1993)



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

En nuestra cohorte de pacientes con CM localizado HER2-positivo por amplificación del gen *ERBB2* y/o sobreexpresión de la proteína HER2 encontramos diferencias relevantes a nivel clínico y molecular:

1. Expresión génica diferencial al alza de firmas inmunes (*APM, células citotóxicas, citotoxicidad, Macrófagos, PD-L1, PD-L2, TIGIT, IFN-Gamma, TIS*) en aquellos tumores con RH negativos y subtipo HER2E. Esto podría impactar en el diseño de ensayos clínicos con inmunoterapia y terapia anti-HER2, ya que se debería considerar a priori a la población de los tumores RH negativos/HER2 positivo y subtipo HER2E como la más susceptible de beneficio clínico.
2. Expresión génica diferencial de un único gen, el gen *INHBB* y ninguna firma en la población que siguió TNA y obtuvo una respuesta completa patológica frente a aquellas con enfermedad residual. Más del 70% de estas pacientes presentaron subtipo HER2E y paradójicamente en esta serie de pacientes se localizan 2 de las 11 recaídas de nuestra cohorte, ambas a nivel de SNC. La sobreexpresión de *INHBB*, no tanto en relación con una mayor probabilidad de respuesta a TNA, si no en relación con una mayor actividad proliferativa y agresividad en CM, sólo se ha publicado en un estudio que analiza la actividad proliferativa de líneas células de CM-HER2 positivo sobre tejido cerebral sano, con sobreexpresión génica de *INHBB* en las dos líneas celulares que proliferaron rápidamente en el parénquima cerebral. A nivel genómico, no se encontraron diferencias significativas en SNVs-indels ni en CNV entre ambas poblaciones.
3. Analizando diferencias entre tumores HER2E y no HER2E, a nivel de expresión génica, encontramos un total de 29 genes expresados diferencialmente los grupos, y sólo 4 de las 42 firmas analizadas con expresión diferencial, las firmas *ERBB2* y *ROR* sobreexpresada en HER2E, y las firmas *ESR1* y *PGR* en los subtipos no enriquecidos. Los genes expresados diferencialmente se enriquecieron significativamente en las vías **MAPK** y **PI3K-Akt**, vías de señalización *downstream* de HER2, y en menor medida en las vías de resistencia a inhibidor tirosin-quinasa, de resistencia endocrina, vía de señalización de estrógeno, vías de señalización que regulan la pluripotencialidad de las células madre,

endocitosis y vía de señalización del calcio. A nivel genómico, ningún gen incluido en el panel presentó diferente frecuencia de SNVs/indels entre tumores HER2E y no HER2E encabezando los genes RB1 y CDK12 la mayor tasa de alteraciones genómicas en ambos grupos. La única diferencia a nivel genómico la encontramos en el análisis de CNV con una mayor ratio de CN (ganancia) a nivel del gen *ERBB2* en el primer grupo. Por lo tanto, parece que las diferencias dentro del CM-HER2 positivo si tenemos en cuenta la subtipificación molecular radican en la expresión génica, sin alteraciones genómicas relevantes más allá de la amplificación de *ERBB2*.

4. Detectamos un conjunto de casos dentro del global de los tumores HER2E con una expresión de genes divergentes. Este grupo al que llamamos *HER2E no agrupado* presentaba diferencias a nivel de expresión y de alteraciones genómicas respecto a su contraparte con expresión común de genes, y respecto a los subtipos no HER2E. Respecto a los primeros, los genes diferencialmente expresados se enriquecieron significativamente en la **vía de señalización de estrógenos** y a nivel de firma, sólo 2 firmas se expresan diferencialmente diferencial entre grupos, ambas sobreexpresadas en la condición *HER2E no agrupado*. En comparación con los subtipos no HER2E, las diferencias radicaron únicamente en la expresión diferencial del gen *ERBB2* y de las firmas ROR y ERBB2 en los *HER2E no agrupados*. Respecto a los resultados tras el análisis genómico tenemos que destacar diferencias con una mayor ratio de CN (ganancias) en el grupo *HER2E no agrupado* para los genes *FGFR1*, *FGFR2* y *RAD51*, dos de estos genes (*FGFR1* y *FGFR2*) cuya amplificación es característica de subtipos intrínsecos luminales, y ninguna diferencia significativa ni siquiera en la ratio de CN del gen *ERBB2* con respecto a los subtipos no HER2E. Por lo tanto, el conjunto de casos *HER2E no agrupado* parecen ser casos HER2E por subtipificado molecular, pero con una expresión génica diferencial enriquecida por genes de la vía de señalización estrogénica y una expresión diferencial al alza de las firmas ESR1 y PGR respecto al resto de casos HER2E, pero de las firmas ROR y ERBB2 respecto a los tumores no HER2E. Este hallazgo a falta de ser valorado en una serie de pacientes más amplia supondría un añadido a la heterogeneidad del CM-HER2 positivo con subtipo HER2E, con tumores cuya expresión génica es más cercana a

5. tumores no HER2E, esencialmente luminales, frente a los que ni siquiera la ratio de CN de *ERBB2* marcaría la diferencia. Esto podría explicar parte de los resultados heterogéneos en cuanto a respuesta y evolución clínica que se dan en práctica clínica en tumores HER2E.
6. No detectamos diferencias en SLE ni en SG en ninguno de los grupos analizados.
7. La ausencia de diferencias en supervivencia y el resto de resultados obtenidos pudieran estar condicionados por el pequeño tamaño muestral de nuestro estudio y por el análisis de genes con relación ya establecida con CM que podría excluir nuevos genes aún no identificados.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# REFERENCIAS

---

*“Las ideas no duran mucho. Hay que hacer algo con ellas”*

**Santiago Ramón y Cajal** (1852 - 1934)



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

1. Liu, Y., Zhou, Q., Zou, G. & Zhang, W. Inhibin subunit beta B (INHBB): an emerging role in tumor progression. *J Physiol Biochem* (2024) doi:10.1007/s13105-024-01041-y.
2. Kuroiwa, Y. *et al.* Proliferative Classification of Intracranially Injected HER2-positive Breast Cancer Cell Lines. *Cancers* **12**, 1811 (2020).
3. Zhang, Q. *et al.* Control of Cyclin D1 and Breast Tumorigenesis by the EglN2 Prolyl Hydroxylase. *Cancer Cell* **16**, 413–424 (2009).
4. Roth, L. *et al.* SILAC identifies LAD1 as a filamin-binding regulator of actin dynamics in response to EGF and a marker of aggressive breast tumors. *Science Signaling* **11**, eaan0949 (2018).
5. Tarullo, S. E. *et al.* Receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) defines an invasive niche associated with tumor progression and predicts poor outcomes in breast cancer patients. *The Journal of Pathology* **260**, 289–303 (2023).
6. Hamilton, S. R. *et al.* The Hyaluronan Receptors CD44 and Rhamm (CD168) Form Complexes with ERK1,2 That Sustain High Basal Motility in Breast Cancer Cells\*. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 16667–16680 (2007).
7. Swain, S. M., Shastry, M. & Hamilton, E. Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions. *Nat Rev Drug Discov* **22**, 101–126 (2023).
8. Harbeck, N. *et al.* Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers* **5**, 1–31 (2019).
9. Wang, Z. ErbB Receptors and Cancer. in *ErbB Receptor Signaling: Methods and Protocols* (ed. Wang, Z.) 3–35 (Springer, New York, NY, 2017). doi:10.1007/978-1-4939-7219-7\_1.
10. Semba, K., Kamata, N., Toyoshima, K. & Yamamoto, 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* **82**, 6497–6501 (1985).

11. Shih, C., Padhy, L. C., Murray, M. & Weinberg, R. A. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* **290**, 261–264 (1981).
12. Schechter, A. L. *et al.* The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* **312**, 513–516 (1984).
13. Bargmann, C. I., Hung, M.-C. & Weinberg, R. A. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* **319**, 226–230 (1986).
14. Coussens, L. *et al.* Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* **230**, 1132–1139 (1985).
15. Schechter, A. L. *et al.* The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* **229**, 976–978 (1985).
16. King, C. R., Kraus, M. H. & Aaronson, S. A. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* **229**, 974–976 (1985).
17. Slamon, D. J. *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**, 177–182 (1987).
18. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
19. Harbeck, N. Insights into biology of luminal HER2 vs. enriched HER2 subtypes: Therapeutic implications. *The Breast* **24**, S44–S48 (2015).
20. Wolff, A. C. *et al.* Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J. Clin. Oncol.* **36**, 2105–2122 (2018).
21. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**, 61–70 (2012).
22. Ferrari, A. *et al.* A whole-genome sequence and transcriptome perspective on HER2-positive breast cancers. *Nature Communications* **7**, (2016).

23. Cejalvo, J. M. *et al.* Clinical implications of the non-luminal intrinsic subtypes in hormone receptor-positive breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* **67**, 63–70 (2018).
24. Giuliano, A. E., Edge, S. B. & Hortobagyi, G. N. Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **25**, 1783–1785 (2018).
25. Hortobagyi, G. N., Edge, S. B. & Giuliano, A. New and Important Changes in the TNM Staging System for Breast Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 457–467 (2018) doi:10.1200/EDBK\_201313.
26. Elston, C. W., Ellis, I. O. & Pinder, S. E. Pathological prognostic factors in breast cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **31**, 209–223 (1999).
27. Loibl, S. & Gianni, L. HER2-positive breast cancer. *Lancet* **389**, 2415–2429 (2017).
28. SR, L., IO, E., SJ, S., PH, T. & MJ, van de V. *WHO Classification of Tumours of the Breast.*
29. Tan, P. H. *et al.* The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. *Histopathology* **77**, 181–185 (2020).
30. Rakha, E. A. *et al.* Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res.* **12**, 207 (2010).
31. Makki, J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clin Med Insights Pathol* **8**, CPath.S31563 (2015).
32. Hammond, M. E. H. *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* (2010) doi:10.1200/JCO.2009.25.6529.
33. Allison, K. H. *et al.* Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. *JCO* **38**, 1346–1366 (2020).
34. Hefti, M. M. *et al.* Estrogen receptor negative/progesterone receptor positive breast cancer is not a reproducible subtype. *Breast Cancer Research* **15**, R68 (2013).

35. Li, Y. *et al.* Clinicopathological Characteristics and Breast Cancer-Specific Survival of Patients With Single Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. *JAMA Network Open* **3**, e1918160 (2020).
36. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials - ClinicalKey. <https://www-clinicalkey-es.bvsspa.idm.oclc.org/#!/content/playContent/1-s2.0-S0140673611609938?returnurl=https:%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0140673611609938%3Fshowall%3Dtrue&referrer=>.
37. Harris, L. *et al.* American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **25**, 5287–5312 (2007).
38. Schettini, F. *et al.* Clinical, pathological, and PAM50 gene expression features of HER2-low breast cancer. *NPJ Breast Cancer* **7**, 1 (2021).
39. Tarantino, P., Curigliano, G. & Tolaney, S. M. Navigating the HER2-Low Paradigm in Breast Oncology: New Standards, Future Horizons. *Cancer Discov* **12**, 2026–2030 (2022).
40. Prat, A. *et al.* An Overview of Clinical Development of Agents for Metastatic or Advanced Breast Cancer Without ERBB2 Amplification (HER2-Low). *JAMA Oncol* (2022) doi:10.1001/jamaoncol.2022.4175.
41. Anestis, A., Zoi, I., Papavassiliou, A. G. & Karamouzis, M. V. Androgen Receptor in Breast Cancer—Clinical and Preclinical Research Insights. *Molecules* **25**, 358 (2020).
42. Vera-Badillo, F. E. *et al.* Androgen receptor expression and outcomes in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* **106**, djt319 (2014).
43. Xu, M. *et al.* Prognostic Significance of Androgen Receptor Expression in Triple Negative Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical Breast Cancer* **20**, e385–e396 (2020).

44. de Azambuja, E. *et al.* Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br. J. Cancer* **96**, 1504–1513 (2007).
45. Turashvili, G. & Brogi, E. Tumor Heterogeneity in Breast Cancer. *Front Med (Lausanne)* **4**, 227 (2017).
46. Yerushalmi, R., Woods, R., Ravdin, P. M., Hayes, M. M. & Gelmon, K. A. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol.* **11**, 174–183 (2010).
47. Wirapati, P. *et al.* Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res.* **10**, R65 (2008).
48. Sørliie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 10869–10874 (2001).
49. Sorlie, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 8418–8423 (2003).
50. Carey, L. A. *et al.* Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* **295**, 2492–2502 (2006).
51. Rouzier, R. *et al.* Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **11**, 5678–5685 (2005).
52. Hugh, J. *et al.* Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J. Clin. Oncol.* **27**, 1168–1176 (2009).
53. Prat, A. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* **12**, R68 (2010).
54. Nielsen, T. O. *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**, 5222–5232 (2010).

55. Prat, A., Ellis, M. J. & Perou, C. M. Practical implications of gene-expression-based assays for breast oncologists. *Nat Rev Clin Oncol* **9**, 48–57 (2011).
56. Cheang, M. C. U. *et al.* Responsiveness of Intrinsic Subtypes to Adjuvant Anthracycline Substitution in the NCIC.CTG MA.5 Randomized Trial. *Clin Cancer Res* **18**, 2402–2412 (2012).
57. Chia, S. K. *et al.* A 50-gene intrinsic subtype classifier for prognosis and prediction of benefit from adjuvant tamoxifen. *Clin. Cancer Res.* **18**, 4465–4472 (2012).
58. Esserman, L. J. *et al.* Chemotherapy response and recurrence-free survival in neoadjuvant breast cancer depends on biomarker profiles: results from the I-SPY 1 TRIAL (CALGB 150007/150012; ACRIN 6657). *Breast Cancer Res. Treat.* **132**, 1049–1062 (2012).
59. Prat, A. *et al.* Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **31**, 203–209 (2013).
60. Ellis, M. J. *et al.* Randomized phase II neoadjuvant comparison between letrozole, anastrozole, and exemestane for postmenopausal women with estrogen receptor-rich stage 2 to 3 breast cancer: clinical and biomarker outcomes and predictive value of the baseline PAM50-based intrinsic subtype--ACOSOG Z1031. *J. Clin. Oncol.* **29**, 2342–2349 (2011).
61. Dowsett, M. *et al.* Comparison of PAM50 risk of recurrence score with oncotype DX and IHC4 for predicting risk of distant recurrence after endocrine therapy. *J. Clin. Oncol.* **31**, 2783–2790 (2013).
62. Curtis, C. *et al.* The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* **486**, 346–352 (2012).
63. Lesurf, R. *et al.* Genomic characterization of HER2-positive breast cancer and response to neoadjuvant trastuzumab and chemotherapy--results from the ACOSOG Z1041 (Alliance) trial. *Ann. Oncol.* **28**, 1070–1077 (2017).
64. Prat, A. *et al.* Correlative Biomarker Analysis of Intrinsic Subtypes and Efficacy Across the MONALEESA Phase III Studies. *J Clin Oncol* **39**, 1458–1467 (2021).

65. Vidal, M. *et al.* Gene expression-based classifications of fibroadenomas and phyllodes tumours of the breast. *Mol Oncol* **9**, 1081–1090 (2015).
66. Tran, B. & Bedard, P. L. Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets. *Breast Cancer Research* **13**, 221 (2011).
67. Parker, J. S. *et al.* Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J. Clin. Oncol.* **27**, 1160–1167 (2009).
68. Schettini, F., Brasó-Maristany, F., Kuderer, N. M. & Prat, A. A perspective on the development and lack of interchangeability of the breast cancer intrinsic subtypes. *npj Breast Cancer* **8**, 1–4 (2022).
69. Bastien, R. R. L. *et al.* PAM50 breast cancer subtyping by RT-qPCR and concordance with standard clinical molecular markers. *BMC Med Genomics* **5**, 44 (2012).
70. Carey, L. A. *et al.* Clinical and translational results of CALGB 40601: A neoadjuvant phase III trial of weekly paclitaxel and trastuzumab with or without lapatinib for HER2-positive breast cancer. *JCO* **31**, 500–500 (2013).
71. Prat, A. & Perou, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology* **5**, 5–23 (2011).
72. Prat, A. *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**, 511–521 (2014).
73. Prat, A. *et al.* Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *The Breast* **24**, S26–S35 (2015).
74. Prat, A. *et al.* Molecular features and survival outcomes of the intrinsic subtypes within HER2-positive breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **106**, (2014).
75. Lerebours, F. & Lidereau, R. Molecular alterations in sporadic breast cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **44**, 121–141 (2002).
76. Dawson, S.-J., Rueda, O. M., Aparicio, S. & Caldas, C. A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications. *EMBO J.* **32**, 617–628 (2013).

77. cBioPortal for Cancer Genomics. [https://www.cbioportal.org/study/summary?id=brca\\_metabric](https://www.cbioportal.org/study/summary?id=brca_metabric).
78. Mukherjee, A. *et al.* Associations between genomic stratification of breast cancer and centrally reviewed tumour pathology in the METABRIC cohort. *npj Breast Cancer* **4**, 1–9 (2018).
79. Baselga, J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. *Oncologist* **7 Suppl 4**, 2–8 (2002).
80. Gianni, L. *et al.* Neoadjuvant and adjuvant trastuzumab in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (NOAH): follow-up of a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet Oncol.* **15**, 640–647 (2014).
81. Rimawi, M. F. *et al.* Multicenter phase II study of neoadjuvant lapatinib and trastuzumab with hormonal therapy and without chemotherapy in patients with human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: TBCRC 006. *J. Clin. Oncol.* **31**, 1726–1731 (2013).
82. Valenza, C. *et al.* Targeting HER2 heterogeneity in breast and gastrointestinal cancers. *Trends Cancer* **10**, 113–123 (2024).
83. Godoy-Ortiz, A. *et al.* Deciphering HER2 Breast Cancer Disease: Biological and Clinical Implications. *Front. Oncol.* **9**, (2019).
84. Wolff, A. C. *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **25**, 118–145 (2006).
85. Wolff, A. C. *et al.* Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J. Clin. Oncol.* **31**, 3997–4013 (2013).
86. Bethune, G. C. *et al.* Impact of the 2013 American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human

epidermal growth factor receptor 2 (HER2) testing of invasive breast carcinoma: a focus on tumours assessed as 'equivocal' for HER2 gene amplification by fluorescence in-situ hybridization. *Histopathology* **67**, 880–887 (2015).

87. Varga, Z. & Noske, A. Impact of Modified 2013 ASCO/CAP Guidelines on HER2 Testing in Breast Cancer. One Year Experience. *PLoS One* **10**, (2015).

88. Nitta, H. *et al.* The assessment of HER2 status in breast cancer: the past, the present, and the future. *Pathol. Int.* **66**, 313–324 (2016).

89. Seol, H. *et al.* Intratumoral heterogeneity of HER2 gene amplification in breast cancer: its clinicopathological significance. *Mod. Pathol.* **25**, 938–948 (2012).

90. Hou, Y., Nitta, H. & Li, Z. HER2 Gene Protein Assay Is Useful to Determine HER2 Status and Evaluate HER2 Heterogeneity in HER2 Equivocal Breast Cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* **147**, 89–95 (2017).

91. Hanna, W. M. *et al.* HER2 in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity. *Mod. Pathol.* **27**, 4–18 (2014).

92. Yang, Y.-L. *et al.* Genetic heterogeneity of HER2 in breast cancer: impact on HER2 testing and its clinicopathologic significance. *Breast Cancer Res. Treat.* **134**, 1095–1102 (2012).

93. Brunelli, M. *et al.* Genotypic intratumoral heterogeneity in breast carcinoma with HER2/neu amplification: evaluation according to ASCO/CAP criteria. *Am. J. Clin. Pathol.* **131**, 678–682 (2009).

94. Bartlett, A. I. *et al.* Heterogeneous HER2 gene amplification: impact on patient outcome and a clinically relevant definition. *Am. J. Clin. Pathol.* **136**, 266–274 (2011).

95. Nitta, H. *et al.* A gene-protein assay for human epidermal growth factor receptor 2 (HER2): brightfield tricolor visualization of HER2 protein, the HER2 gene, and chromosome 17 centromere (CEN17) in formalin-fixed, paraffin-embedded breast cancer tissue sections. *Diagn Pathol* **7**, 60 (2012).

96. Hou, Y. *et al.* HER2 intratumoral heterogeneity is independently associated with incomplete response to anti-HER2 neoadjuvant chemotherapy in HER2-positive breast carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.* **166**, 447–457 (2017).

97. Carey, L. A. *et al.* Molecular Heterogeneity and Response to Neoadjuvant Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Targeting in CALGB 40601, a Randomized Phase III Trial of Paclitaxel Plus Trastuzumab With or Without Lapatinib. *J. Clin. Oncol.* **34**, 542–549 (2016).
98. Dieci, M. V. *et al.* Integrated evaluation of PAM50 subtypes and immune modulation of pCR in HER2-positive breast cancer patients treated with chemotherapy and HER2-targeted agents in the CherLOB trial. *Ann. Oncol.* **27**, 1867–1873 (2016).
99. Roberts, S. A. *et al.* An APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers. *Nat Genet* **45**, 970–976 (2013).
100. Kuong, K. J. & Loeb, L. A. APOBEC3B mutagenesis in cancer. *Nat Genet* **45**, 964–965 (2013).
101. Llombart-Cussac, A. *et al.* HER2-enriched subtype as a predictor of pathological complete response following trastuzumab and lapatinib without chemotherapy in early-stage HER2-positive breast cancer (PAMELA): an open-label, single-group, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **18**, 545–554 (2017).
102. Robidoux, A. *et al.* Lapatinib as a component of neoadjuvant therapy for HER2-positive operable breast cancer (NSABP protocol B-41): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **14**, 1183–1192 (2013).
103. Pivot, X. *et al.* 6 months versus 12 months of adjuvant trastuzumab for patients with HER2-positive early breast cancer (PHARE): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **14**, 741–748 (2013).
104. Kramar, A. *et al.* Trastuzumab duration effects within patient prognostic subgroups in the PHARE trial. *Ann. Oncol.* **25**, 1563–1570 (2014).
105. Ferrari, A. *et al.* A phenotypic and mechanistic perspective on heterogeneity of HER2-positive breast cancers. *Mol Cell Oncol* **3**, e1232186 (2016).
106. Keller, P. J. *et al.* Defining the cellular precursors to human breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 2772–2777 (2012).

107. Regan, J. L. & Smalley, M. J. Integrating single-cell RNA-sequencing and functional assays to decipher mammary cell states and lineage hierarchies. *npj Breast Cancer* **6**, 1–9 (2020).
108. Hoadley, K. A. *et al.* Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10,000 Tumors from 33 Types of Cancer. *Cell* **173**, 291–304.e6 (2018).
109. Visvader, J. E. & Stingl, J. Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes Dev.* **28**, 1143–1158 (2014).
110. Skibinski, A. & Kuperwasser, C. The origin of breast tumor heterogeneity. *Oncogene* **34**, 5309–5316 (2015).
111. Bohlander, S. K., Kakadiya, P. M. & Coysh, A. Chromosome Rearrangements and Translocations. in *Encyclopedia of Cancer (Third Edition)* (eds. Boffetta, P. & Hainaut, P.) 389–404 (Academic Press, Oxford, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.65105-X.
112. Mechanisms generating cancer genome complexity from a single cell division error | Science. <https://www-science-org.bvsspa.idm.oclc.org/doi/10.1126/science.aba0712>.
113. Greenman, C. D. *et al.* Estimation of rearrangement phylogeny for cancer genomes. *Genome Res.* **22**, 346–361 (2012).
114. Daemen, A. & Manning, G. HER2 is not a cancer subtype but rather a pan-cancer event and is highly enriched in AR-driven breast tumors. *Breast Cancer Res* **20**, (2018).
115. Wilson, T. R. *et al.* The molecular landscape of high-risk early breast cancer: comprehensive biomarker analysis of a phase III adjuvant population. *NPJ Breast Cancer* **2**, 16022 (2016).
116. A pan-cancer analysis of HER2 index revealed transcriptional pattern for precise selection of HER2-targeted therapy - eBioMedicine. [https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964\(20\)30450-3/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964(20)30450-3/fulltext).
117. Downs-Kelly, E. *et al.* The influence of polysomy 17 on HER2 gene and protein expression in adenocarcinoma of the breast: a fluorescent in situ hybridization,

immunohistochemical, and isotopic mRNA in situ hybridization study. *Am J Surg Pathol* **29**, 1221–1227 (2005).

118. Cocco, E., Lopez, S., Santin, A. D. & Scaltriti, M. Prevalence and role of HER2 mutations in cancer. *Pharmacology & Therapeutics* **199**, 188–196 (2019).

119. Connell, C. M. & Doherty, G. J. Activating HER2 mutations as emerging targets in multiple solid cancers. *ESMO Open* **2**, (2017).

120. Zehir, A. *et al.* Erratum: Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med* **23**, 1004 (2017).

121. Pahuja, K. B. *et al.* Actionable Activating Oncogenic ERBB2/HER2 Transmembrane and Juxtamembrane Domain Mutations. *Cancer Cell* **34**, 792-806.e5 (2018).

122. Slamon, D. J. *et al.* Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* **344**, 783–792 (2001).

123. Dennis, S. *et al.* Adjuvant Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer. *n engl j med* **11** (2011).

124. Viani, G. A., Afonso, S. L., Stefano, E. J., De Fendi, L. I. & Soares, F. V. Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. *BMC Cancer* **7**, 153 (2007).

125. Baselga, J. *et al.* Biomarker analyses in CLEOPATRA: a phase III, placebo-controlled study of pertuzumab in human epidermal growth factor receptor 2-positive, first-line metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **32**, 3753–3761 (2014).

126. Baselga, J. *et al.* Relationship between Tumor Biomarkers and Efficacy in EMILIA, a Phase III Study of Trastuzumab Emtansine in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **22**, 3755–3763 (2016).

127. Kim, S.-B. *et al.* Relationship between tumor biomarkers and efficacy in TH3RESA, a phase III study of trastuzumab emtansine (T-DM1) vs. treatment of physician's choice in previously treated HER2-positive advanced breast cancer. *Int. J. Cancer* **139**, 2336–2342 (2016).

128. Schneeweiss, A. *et al.* Evaluating the predictive value of biomarkers for efficacy outcomes in response to pertuzumab- and trastuzumab-based therapy: an exploratory analysis of the TRYPHAENA study. *Breast Cancer Res.* **16**, R73 (2014).
129. Denkert, C. *et al.* HER2 and ESR1 mRNA expression levels and response to neoadjuvant trastuzumab plus chemotherapy in patients with primary breast cancer. *Breast Cancer Res.* **15**, R11 (2013).
130. Scaltriti, M. *et al.* High HER2 expression correlates with response to the combination of lapatinib and trastuzumab. *Clin. Cancer Res.* **21**, 569–576 (2015).
131. Arnould, L. *et al.* Pathologic complete response to trastuzumab-based neoadjuvant therapy is related to the level of HER-2 amplification. *Clin. Cancer Res.* **13**, 6404–6409 (2007).
132. Paik, S., Kim, C. & Wolmark, N. HER2 status and benefit from adjuvant trastuzumab in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1409–1411 (2008).
133. Perez, E. A. *et al.* The relationship between quantitative HER2 gene expression by the 21-gene RT-PCR assay and adjuvant trastuzumab (H) benefit in NCCTG (Alliance) N9831. *JCO* **31**, 520–520 (2013).
134. van Mackelenbergh, M. T. *et al.* Pathologic Complete Response and Individual Patient Prognosis After Neoadjuvant Chemotherapy Plus Anti-Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Therapy of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Early Breast Cancer. *JCO* **41**, 2998–3008 (2023).
135. Bradley, R. *et al.* Trastuzumab for early-stage, HER2-positive breast cancer: a meta-analysis of 13 864 women in seven randomised trials. *The Lancet Oncology* **22**, 1139–1150 (2021).
136. Measurement of Residual Breast Cancer Burden to Predict Survival After Neoadjuvant Chemotherapy | Journal of Clinical Oncology. <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2007.10.6823>.
137. Filho, O. M. *et al.* Impact of HER2 Heterogeneity on Treatment Response of Early-Stage HER2-Positive Breast Cancer: Phase II Neoadjuvant Clinical Trial of T-DM1 Combined with Pertuzumab. *Cancer Discovery* **11**, 2474–2487 (2021).

138. Baselga, J. *et al.* Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet* **379**, 633–640 (2012).
139. Swain, S. M. *et al.* Pertuzumab, trastuzumab, and standard anthracycline- and taxane-based chemotherapy for the neoadjuvant treatment of patients with HER2-positive localized breast cancer (BERENICE): a phase II, open-label, multicenter, multinational cardiac safety study. *Ann. Oncol.* **29**, 646–653 (2018).
140. Swain, S. M. *et al.* Pathologic complete response and outcomes by intrinsic subtypes in NSABP B-41, a randomized neoadjuvant trial of chemotherapy with trastuzumab, lapatinib, or the combination. *Breast Cancer Res Treat* **178**, 389–399 (2019).
141. Pogue-Geile, K. L. *et al.* Intrinsic subtypes, PIK3CA mutation, and the degree of benefit from adjuvant trastuzumab in the NSABP B-31 trial. *J. Clin. Oncol.* **33**, 1340–1347 (2015).
142. Perez, E. A. *et al.* Intrinsic Subtype and Therapeutic Response Among HER2-Positive Breast Tumors from the NCCTG (Alliance) N9831 Trial. *J. Natl. Cancer Inst.* **109**, (2017).
143. Rimawi, M. F. *et al.* TBCRC023: A Randomized Phase II Neoadjuvant Trial of Lapatinib Plus Trastuzumab Without Chemotherapy for 12 versus 24 Weeks in Patients with HER2-Positive Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* **26**, 821–827 (2020).
144. Prat, A. *et al.* HER2-enriched subtype and ERBB2 mRNA as predictors of pathological complete response following trastuzumab and lapatinib without chemotherapy in early-stage HER2-positive breast cancer: A combined analysis of TBCRC006/023 and PAMELA trials. *JCO* **36**, 509–509 (2018).
145. Iglesia, M. D. *et al.* Prognostic B-cell signatures using mRNA-seq in patients with subtype-specific breast and ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **20**, 3818–3829 (2014).

146. Fernandez-Martinez, A. *et al.* Prognostic and Predictive Value of Immune-Related Gene Expression Signatures vs Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Early-Stage ERBB2/HER2-Positive Breast Cancer: A Correlative Analysis of the CALGB 40601 and PAMELA Trials. *JAMA Oncology* **9**, 490–499 (2023).
147. Galon, J. & Bruni, D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat Rev Drug Discov* **18**, 197–218 (2019).
148. Salgado, R. *et al.* The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol* **26**, 259–271 (2015).
149. Loi, S. Tumor-infiltrating lymphocytes, breast cancer subtypes and therapeutic efficacy. *Oncoimmunology* **2**, (2013).
150. Degnim, A. C. *et al.* Immune cell quantitation in normal breast tissue lobules with and without lobulitis. *Breast Cancer Res Treat* **144**, 539–549 (2014).
151. Ochi, T. *et al.* Predictive and prognostic value of stromal tumour-infiltrating lymphocytes before and after neoadjuvant therapy in triple negative and HER2-positive breast cancer. *European Journal of Cancer* **118**, 41–48 (2019).
152. Xu, T. *et al.* The Predictive and Prognostic Role of Stromal Tumor-infiltrating Lymphocytes in HER2-positive Breast Cancer with Trastuzumab-based Treatment: a Meta-analysis and Systematic Review. *J Cancer* **8**, 3838–3848 (2017).
153. Solinas, C. *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes in patients with HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy plus trastuzumab, lapatinib or their combination: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Cancer Treat. Rev.* **57**, 8–15 (2017).
154. Bianchini, G. *et al.* Immune modulation of pathologic complete response after neoadjuvant HER2-directed therapies in the NeoSphere trial. *Ann. Oncol.* **26**, 2429–2436 (2015).
155. Luen, S. J. *et al.* Tumour-infiltrating lymphocytes in advanced HER2-positive breast cancer treated with pertuzumab or placebo in addition to trastuzumab and

docetaxel: a retrospective analysis of the CLEOPATRA study. *Lancet Oncol.* **18**, 52–62 (2017).

156. Salgado, R. *et al.* Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Associations With Pathological Complete Response and Event-Free Survival in HER2-Positive Early-Stage Breast Cancer Treated With Lapatinib and Trastuzumab: A Secondary Analysis of the NeoALTTO Trial. *JAMA Oncol* **1**, 448–454 (2015).

157. Nuciforo, P. *et al.* A predictive model of pathologic response based on tumor cellularity and tumor-infiltrating lymphocytes (CelTIL) in HER2-positive breast cancer treated with chemo-free dual HER2 blockade. *Ann. Oncol.* **29**, 170–177 (2018).

158. Loi, S. *et al.* Pembrolizumab plus trastuzumab in trastuzumab-resistant, advanced, HER2-positive breast cancer (PANACEA): a single-arm, multicentre, phase 1b–2 trial. *The Lancet Oncology* **20**, 371–382 (2019).

159. Vernieri, C. *et al.* Resistance mechanisms to anti-HER2 therapies in HER2-positive breast cancer: Current knowledge, new research directions and therapeutic perspectives. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **139**, 53–66 (2019).

160. Kennedy, S. P., Hastings, J. F., Han, J. Z. R. & Croucher, D. R. The Under-Appreciated Promiscuity of the Epidermal Growth Factor Receptor Family. *Front. Cell Dev. Biol.* **4**, (2016).

161. Hurvitz, S. A. *et al.* Combination of everolimus with trastuzumab plus paclitaxel as first-line treatment for patients with HER2-positive advanced breast cancer (BOLERO-1): a phase 3, randomised, double-blind, multicentre trial. *Lancet Oncol.* **16**, 816–829 (2015).

162. André, F. *et al.* Everolimus for women with trastuzumab-resistant, HER2-positive, advanced breast cancer (BOLERO-3): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **15**, 580–591 (2014).

163. André, F. *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. *JCO* **34**, 2115–2124 (2016).

164. Yang, J. *et al.* Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Molecular Cancer* **18**, 26 (2019).
165. Giuliano, M. *et al.* Upregulation of ER Signaling as an Adaptive Mechanism of Cell Survival in HER2-Positive Breast Tumors Treated with Anti-HER2 Therapy. *Clinical Cancer Research* **21**, 3995–4003 (2015).
166. Goel, S. *et al.* Overcoming Therapeutic Resistance in HER2-Positive Breast Cancers with CDK4/6 Inhibitors. *Cancer Cell* **29**, 255–269 (2016).
167. Tolaney, S. M. *et al.* Overall Survival and Exploratory Biomarker Analyses of Abemaciclib plus Trastuzumab with or without Fulvestrant versus Trastuzumab plus Chemotherapy in HR+, HER2+ Metastatic Breast Cancer Patients. *Clin Cancer Res* **30**, 39–49 (2024).
168. Ciruelos, E. *et al.* Primary results from PATRICIA cohort C (SOLTI-1303), a randomized phase II study evaluating palbociclib with trastuzumab and endocrine therapy in pretreated HER2-positive and PAM50 luminal advanced breast cancer. *JCO* **42**, 1008–1008 (2024).
169. Malumbres, M. CDK4/6 Inhibitors resTORe Therapeutic Sensitivity in HER2+ Breast Cancer. *Cancer Cell* **29**, 243–244 (2016).
170. Gianni, L. *et al.* Neoadjuvant treatment with trastuzumab and pertuzumab plus palbociclib and fulvestrant in HER2-positive, ER-positive breast cancer (NAPHER2): an exploratory, open-label, phase 2 study. *The Lancet Oncology* **19**, 249–256 (2018).
171. Symmans, W. F. *et al.* Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* **25**, 4414–4422 (2007).
172. nCounter® Breast Cancer 360™. *Nanostring* <https://www.nanostring.com/products/ncounter-assays-panels/oncology/breast-cancer-360/>.
173. Homo sapiens genome assembly GRCh37. *NCBI* [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/assembly/GCF\\_000001405.13/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/assembly/GCF_000001405.13/).
174. Modi, S. *et al.* Trastuzumab deruxtecan (T-DXd) versus treatment of physician's choice (TPC) in patients (pts) with HER2-low unresectable and/or metastatic

breast cancer (mBC): Results of DESTINY-Breast04, a randomized, phase 3 study. *JCO* **40**, LBA3–LBA3 (2022).

175. Mosele, F. *et al.* Trastuzumab deruxtecan in metastatic breast cancer with variable HER2 expression: the phase 2 DAISY trial. *Nat Med* **29**, 2110–2120 (2023).

176. Xueqin, T., Jinhong, M. & Yuping, H. Inhibin subunit beta A promotes cell proliferation and metastasis of breast cancer through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Bioengineered* **12**, 11567–11575 (2021).

177. Chilà, R., Guffanti, F. & Damia, G. Role and therapeutic potential of CDK12 in human cancers. *Cancer Treatment Reviews* **50**, 83–88 (2016).

178. Lu, K.-Q. *et al.* CDK12 is a potential biomarker for diagnosis, prognosis and immunomodulation in pan-cancer. *Sci Rep* **14**, 6574 (2024).

179. Mertins, P. *et al.* Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer. *Nature* **534**, 55–62 (2016).

180. Jin, Y. *et al.* Inactivation of EGLN3 hydroxylase facilitates Erk3 degradation via autophagy and impedes lung cancer growth. *Oncogene* **41**, 1752–1766 (2022).

181. Shi, Y.-X., Dai, P.-H., Chen, T. & Yan, J.-H. Comprehensive analysis and experimental verification reveal the molecular characteristics of EGLN3 in pan-cancer and its relationship with the proliferation and apoptosis of lung cancer. *Heliyon* **10**, e33206 (2024).

182. Saidy, B. *et al.* Unravelling transcriptomic complexity in breast cancer through modulation of DARPP-32 expression and signalling pathways. *Sci Rep* **13**, 21163 (2023).

183. Zhuang, X. *et al.* Differential effects on lung and bone metastasis of breast cancer by Wnt signalling inhibitor DKK1. *Nat Cell Biol* **19**, 1274–1285 (2017).

184. Di Cosimo, S. *et al.* A gene expression-based classifier for HER2-low breast cancer. *Sci Rep* **14**, 2628 (2024).

185. Saha, S. K., Islam, S. M. R., Kwak, K.-S., Rahman, M. S. & Cho, S.-G. PROM1 and PROM2 expression differentially modulates clinical prognosis of cancer: a multiomics analysis. *Cancer Gene Ther* **27**, 147–167 (2020).
186. Gangadharan, A. *et al.* Prolactin Induced Protein (PIP) is a potential biomarker for early stage and malignant breast cancer. *The Breast* **39**, 101–109 (2018).
187. Darb-Esfahani, S. *et al.* Gross cystic disease fluid protein 15 (GCDFP-15) expression in breast cancer subtypes. *BMC Cancer* **14**, 546 (2014).



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# ANEXOS

---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## **Documento 1.**

Revisión bibliográfica sobre las implicaciones clínicas y biológicas de la heterogeneidad tumoral en el CM HER2 positivo





# Deciphering HER2 Breast Cancer Disease: Biological and Clinical Implications

Ana Godoy-Ortiz<sup>1,2\*</sup>, Alfonso Sanchez-Muñoz<sup>1,2</sup>, María Rosario Chica Parrado<sup>2</sup>, Martina Álvarez<sup>2</sup>, Nuria Ribelles<sup>1,2</sup>, Antonio Rueda Dominguez<sup>1,2</sup> and Emilio Alba<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Gestión Clínica Intercentros de Oncología Médica, Hospitales Universitarios Regional y Virgen de la Victoria de Málaga, Málaga, Spain, <sup>2</sup> Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigaciones Médico-Sanitarias de Málaga (CIMES), Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Universidad de Málaga (UMA), Málaga, Spain, <sup>3</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Oncología, CIBERONC-ISCIII, Madrid, Spain

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Mothaffar Rimawi,  
Baylor College of Medicine,  
United States

### Reviewed by:

Howard Donninger,  
University of Louisville, United States  
Parvin Mehdipour,  
Tehran University of Medical  
Sciences, Iran

### \*Correspondence:

Ana Godoy-Ortiz  
anagodort@gmail.com

### Specialty section:

This article was submitted to  
Cancer Genetics,  
a section of the journal  
Frontiers in Oncology

**Received:** 16 June 2019

**Accepted:** 09 October 2019

**Published:** 29 October 2019

### Citation:

Godoy-Ortiz A, Sanchez-Muñoz A,  
Chica Parrado MR, Álvarez M,  
Ribelles N, Rueda Dominguez A and  
Alba E (2019) Deciphering HER2  
Breast Cancer Disease: Biological and  
Clinical Implications.  
Front. Oncol. 9:1124.  
doi: 10.3389/fonc.2019.01124

The main obstacle for designing effective treatment approaches in breast cancer is the extensive and the characteristic heterogeneity of this tumor. The vast majority of critical genomic changes occurs during breast cancer progression, creating a significant variability within primary tumors as well as between the primary breast cancer and their metastases, a hypothesis have already demonstrated in retrospective studies (1). A clear example of this is the HER2-positive breast cancer. In these tumors, we can find all of the transcriptional subtypes of breast cancer, even the basal like or luminal A subtypes. Although the HER2-enriched is the most representative transcriptional subtype in the HER2-positive breast cancer, we can find it too in breast cancers with HER2-negative status. This intrinsic subtype shows a high expression of the HER2 and is associated with proliferation-related genes clusters, among other features. Therefore, two hypotheses can be suggested. First, the HER2 amplification can be a well-defined driver event present in all of the intrinsic subtypes, and not a subtype marker isolated. Secondly, HER2-enriched subtype can have a distinctive transcriptional landscape independent of HER2 amplification. In this review, we present an extensive revision about the last highlights and advances in clinical and genomic settings of the HER2-positive breast cancer and the HER2-enriched subtype, in an attempt to improving the knowledge of the underlying biology of both entities and to explaining the intrinsic heterogeneity of HER2-positive breast cancers.

**Keywords:** breast cancer, HER2-positive, intrinsic subtype, heterogeneity, HER2-enriched, molecular

## INTRODUCTION

Breast cancer (BC) is the most common malignant tumor in women and one of the principal causes of cancer mortality in this sex, despite significant improvements obtained in the last decades. Conversely, male breast cancer is a rare disease with an incidence of <1% and mainly classified by immunohistochemistry as a luminal disease (2). BC is modeled by a group of heterogeneous diseases, at both an inter- and intra-tumoral level. All of them share a substantial morphological and molecular heterogeneity, what affect to his clinical behavior and therapeutic response. A crucial objective in the treatment of any cancer disease is to perform clinical decisions through a comprehensive insight of the molecular profile of the tumor to predict the probable clinical outcome of the disease individually. By the expansion of high-throughput





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## **Documento 2.**

Documento que acredita la aprobación del estudio por parte del  
Comité Coordinador de Ética de la Investigación Biomédica de  
Andalucía



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



Servicio Andaluz de Salud  
CONSEJERÍA DE SALUD

*Comité de Ética de la Investigación Provincial de Málaga*

Dra. Dña. Gloria Luque Fernández, Secretaria del CEI Provincial de Málaga

CERTIFICA:

Que en la sesión de CEI de fecha: 26/04/2018 ha evaluado la propuesta de D/Dña.: Ana Godoy Ortiz, referido al Proyecto de Investigación: "Análisis exhaustivo de genomas de cáncer de mama HER2-positivo: investigar posibles diferencias genómicas entre el subtipo HER2 enriquecido y no-enriquecido, para mejorar la comprensión de la heterogeneidad inherente a su comportamiento biológico y a los resultados terapéuticos".

Este Comité lo considera ética y metodológicamente correcto.

La composición del CEI en esta sesión es la siguiente:

- Dra. Encarnación Blanco Reina (Farmacología Clínica)                      Dra. M<sup>a</sup> Victoria de la Torre Prados (UGC UMI)
- Dr. José C. Fernández García (UGC Endocrinología y Nutrición)
- Dr. Andrés Fontalba Navas (UGC Salud Mental)
- Dra. Ana Alonso Torres (UGC Neurociencias)
- Dra. Paloma Campo Mozo (UGC Alegia)
- Dr. Ricardo Guijarro Merino (UGC M. Interna)
- Dr. Manuel Herrera Gutiérrez (UGC UCI)
- Dr. José Leiva Fernández (Médico Familia)
- Dña. Carmen López Gálvez del Postigo (Miembro Lego)
- Dr. Antonio López Téllez (Médico de Familia)
- Dra. Gloria Luque Fernández (Investigación)
- Dra. M<sup>a</sup> Mercedes Márquez Castilla (Médico Familia)
- Dra. Cristobalina Mayorga Mayorga (Laboratorio)
- Dra. M<sup>a</sup> Carmen Vela Márquez (Farmacéutica Distrito)
- Dr. Antonio Pérez Rielo (UGC UCI)
- D. Ramón Porras Sánchez (RRHH-Abogado)
- Dra. M<sup>a</sup> Angeles Rosado Souvirón (UGC Farmacia)
- Dra. Leonor Ruíz Sicilia (UGC Salud Mental)

Lo que firmo en Málaga, a 13 de Mayo de 2018



Fdo.: Dra. Gloria Luque Fernández  
Secretaria del CEI



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## **Documento 3.**

Consentimiento específico de proyecto



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## CONSENTIMIENTO INFORMADO – HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

**Título del proyecto:** “Análisis exhaustivo de genomas de cáncer de mama HER2-positivo: investigar posibles diferencias genómicas entre el subtipo HER2 enriquecido y no-enriquecido, para mejorar la comprensión de la heterogeneidad inherente a su comportamiento biológico y a los resultados terapéuticos”

**Investigador principal:** Ana Godoy Ortiz

**Centro coordinador:** Hospitales Universitarios Regional y Virgen de la Victoria de Málaga  
Centros colaboradores: Universidad de Málaga (UMA) y Centro de Investigaciones Médico-Sanitarias (CIMES). de la Universidad de Málaga

Quisiéramos solicitar su colaboración para participar en un proyecto de investigación cuyo objetivo es realizar un análisis genómico en muestra tumoral de pacientes con cáncer de mama clínicamente HER2+ (inmunoquímica +/- FISH) tratadas mediante los estándares de tratamiento (cirugía y posterior tratamiento adyuvante de quimioterapias y terapias biológicas antiHER2 +/- radioterapia) con identificación del subtipo intrínseco molecular mediante el uso de PAM50®. Con ello, pretendemos encontrar diferencias genómicas entre dos variantes de tumores HER2+, los tumores HER2-enriquecidos y no-enriquecidos, con el fin de establecer las bases de la heterogeneidad propia en el comportamiento biológico de este tipo de tumores y los diferentes resultados y eficacia terapéutica, así como ayudar a la identificación de posibles vías o dianas terapéutica, con el objetivo primordial de mejorar el pronóstico de las pacientes con este tipo de enfermedad. Para ello, vamos a pedir la participación de pacientes a las que se les ha diagnosticado una neoplasia de mama con unas características determinadas que usted cumple y que hayan sido tratadas en alguno de los hospitales participantes.

De los pacientes que acepten participar y firmen el consentimiento informado se recogerán datos de la historia clínica y se analizará y estudiará una muestra de tejido tumoral (procedente de cirugía o de biopsia) sobrante tras realizar todas las pruebas diagnósticas que hayan sido requeridas. En ningún momento se realizarán maniobras extras u otros procedimientos con el mero objetivo de obtener muestras para el estudio. La obtención de muestras no interferirá con el proceso diagnóstico ni terapéutico de la enfermedad.

Los datos de la historia clínica que se recogerán serán datos sociodemográficos básicos, como la edad y sexo, así como de factores relacionados con la enfermedad tumoral (estados de

los receptores hormonales, estadio, tratamiento, etc...). El equipo investigador garantiza que en todo momento se aplicaran las leyes y normativas referentes a los aspectos éticos y de protección de datos de carácter personal. El manejo de la muestra en estudio se realizará de forma totalmente anónima, sin que los científicos que lo analicen sean capaces de identificar al paciente.

El paciente podrá solicitar la retirada y destrucción de sus muestras mediante solicitud al médico investigador clínico que le está tratando, en cuyo caso, el equipo investigador se compromete a la destrucción de las mismas.

Todos los datos (personales, clínicos, económicos y datos que procedan de la muestra de tumor) serán tratados de acuerdo con la “directiva de la protección de los sujetos con respecto al procesamiento de los datos personales” y la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de “protección de datos de carácter personal”. Para ello las muestras se identificarán de forma codificada y anónima, no teniendo acceso ningún miembro del laboratorio a la identificación de la persona física de la que procede la muestra.

Los potenciales resultados de esta investigación no tendrán efecto directo sobre el tratamiento o seguimiento del paciente, y los resultados de los análisis genéticos realizados no determinarán su terapia.

Este proyecto de investigación no tiene ánimo de lucro y ningún participante será re-compensado económicamente por su inclusión en el mismo.

### **Implicaciones para el donante/paciente:**

- La donación/participación es totalmente voluntaria.
- Donante/paciente puede retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Todos los datos carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- La donación/información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.

### **Riesgos de la investigación para el donante/paciente:**

La participación en el proyecto no supondrá ningún riesgo adicional para la paciente, más allá de los propios derivados de los procedimientos necesarios para el diagnóstico.

Si requiere información adicional se puede poner en contacto con:

Dra. Ana Godoy Ortiz

Tfno.: +34 951 032 083

email: [ana.godoy.ortiz.sspa@juntadeandalucia.es](mailto:ana.godoy.ortiz.sspa@juntadeandalucia.es)

**CONSENTIMIENTO INFORMADO – CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE**

**Análisis exhaustivo de genomas de cáncer de mama HER2-positivo: investigar posibles diferencias genómicas entre el subtipo HER2 enriquecido y no-enriquecido, para mejorar la comprensión de la heterogeneidad inherente a su comportamiento biológico y a los resultados terapéuticos.**

Yo \_\_\_\_\_ (Nombre \_\_\_\_\_ y Apellidos):  
.....

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (*Información al Paciente*)
- He podido hacer preguntas sobre el estudio “Análisis exhaustivo de genomas de cáncer de mama HER2-positivo: investigar posibles diferencias genómicas entre el subtipo HER2 enriquecido y no-enriquecido, para mejorar la comprensión de la heterogeneidad inherente a su comportamiento biológico y a los resultados terapéuticos”.
- He recibido suficiente información sobre el estudio “Análisis exhaustivo de genomas de cáncer de mama HER2-positivo: investigar posibles diferencias genómicas entre el subtipo HER2 enriquecido y no-enriquecido, para mejorar la comprensión de la heterogeneidad inherente a su comportamiento biológico y a los resultados terapéuticos”
- He hablado con el profesional sanitario informador:  
.....
- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la donación/información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Firma del paciente  
(o representante legal en su caso)

Firma del profesional  
sanitario informador

Nombre y apellidos: .....

Nombre y apellidos: .....

Fecha: .....

Fecha: .....



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## **Figuras Anexo**

*KEGG Pathways*



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

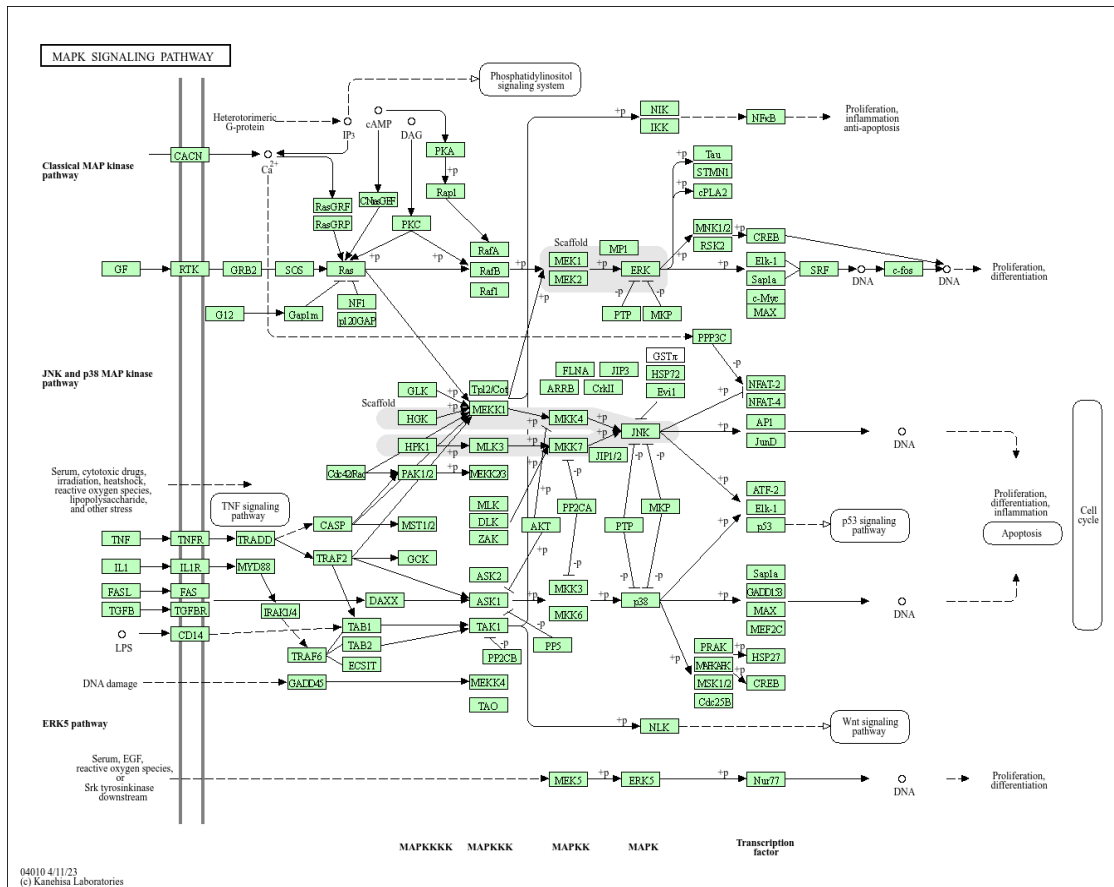
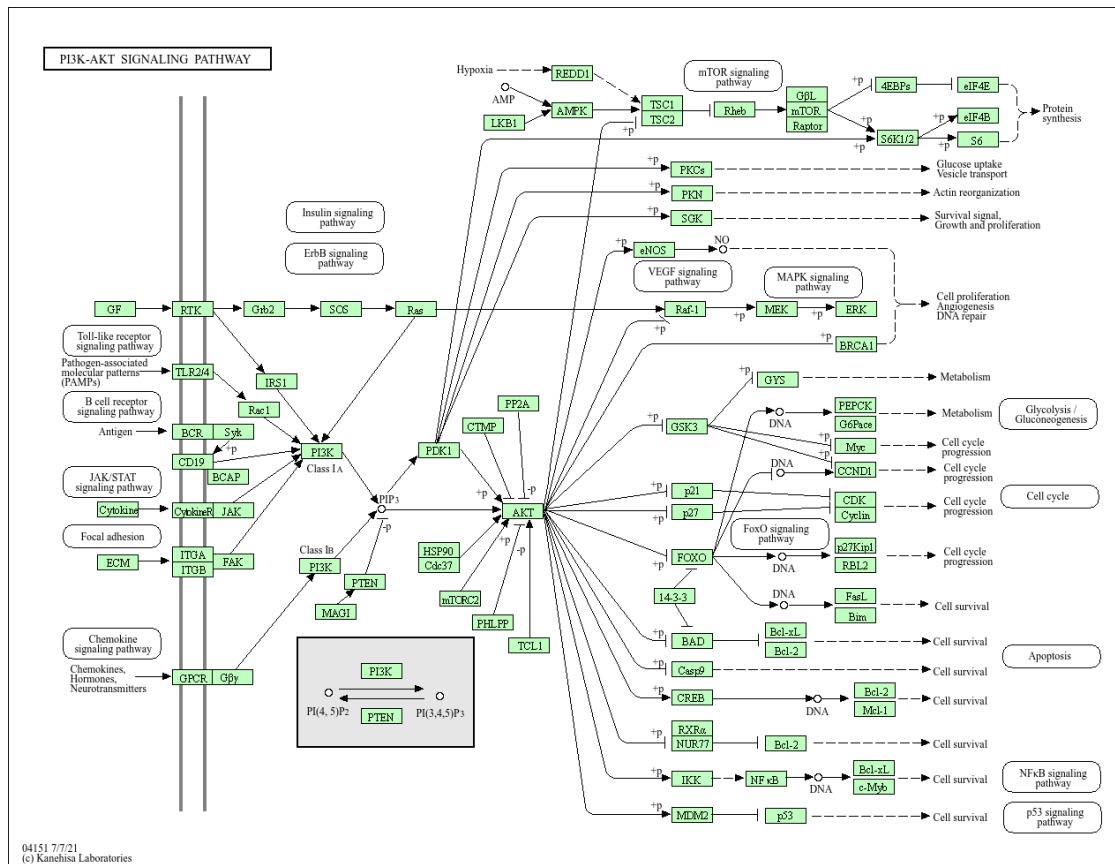


Figura Anexo 1. MAPK SIGNALING PATHWAY (KEGG)

La cascada de proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) es un módulo altamente conservado que participa en diversas funciones celulares, incluida la proliferación, diferenciación y migración celular. Los mamíferos expresan al menos cuatro grupos claramente regulados de MAPK: quinasas relacionadas con señales extracelulares (ERK) -1/2, quinasas amino terminales Jun (JNK1/2/3), proteínas p38 (p38alfa/beta/gamma/delta) y ERK5., que se activan mediante MAPKK específicos: MEK1/2 para ERK1/2, MKK3/6 para p38, MKK4/7 (JNKK1/2) para JNK y MEK5 para ERK5. Sin embargo, cada MAPKK puede ser activado por más de un MAPKKK, lo que aumenta la complejidad y diversidad de la señalización MAPKKK. Presumiblemente, cada MAPKKK confiere capacidad de respuesta a distintos estímulos. Por ejemplo, la activación de ERK1/2 por factores de crecimiento depende de MAPKKK c-Raf, pero otros MAPKKK pueden activar ERK1/2 en respuesta a estímulos proinflamatorios.



**Figura Anexo 2. PI3K-AKT SIGNALING PATHWAY (KEGG)**

La vía de señalización de fosfatidilinositol 3' -quinasa (PI3K) -Akt se activa mediante muchos tipos de estímulos celulares o agresiones tóxicas y regula funciones celulares fundamentales como la transcripción, traducción, proliferación, crecimiento y supervivencia. La unión de los factores de crecimiento a su receptor tirosina quinasa (RTK) o receptores acoplados a proteína G (GPCR) estimula las isoformas PI3K de clase Ia y Ib, respectivamente. PI3K cataliza la producción de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) en la membrana celular. PIP3 a su vez sirve como segundo mensajero que ayuda a activar Akt. Una vez activo, Akt puede controlar procesos celulares clave mediante la fosforilación de sustratos involucrados en la apoptosis, la síntesis de proteínas, el metabolismo y el ciclo celular.

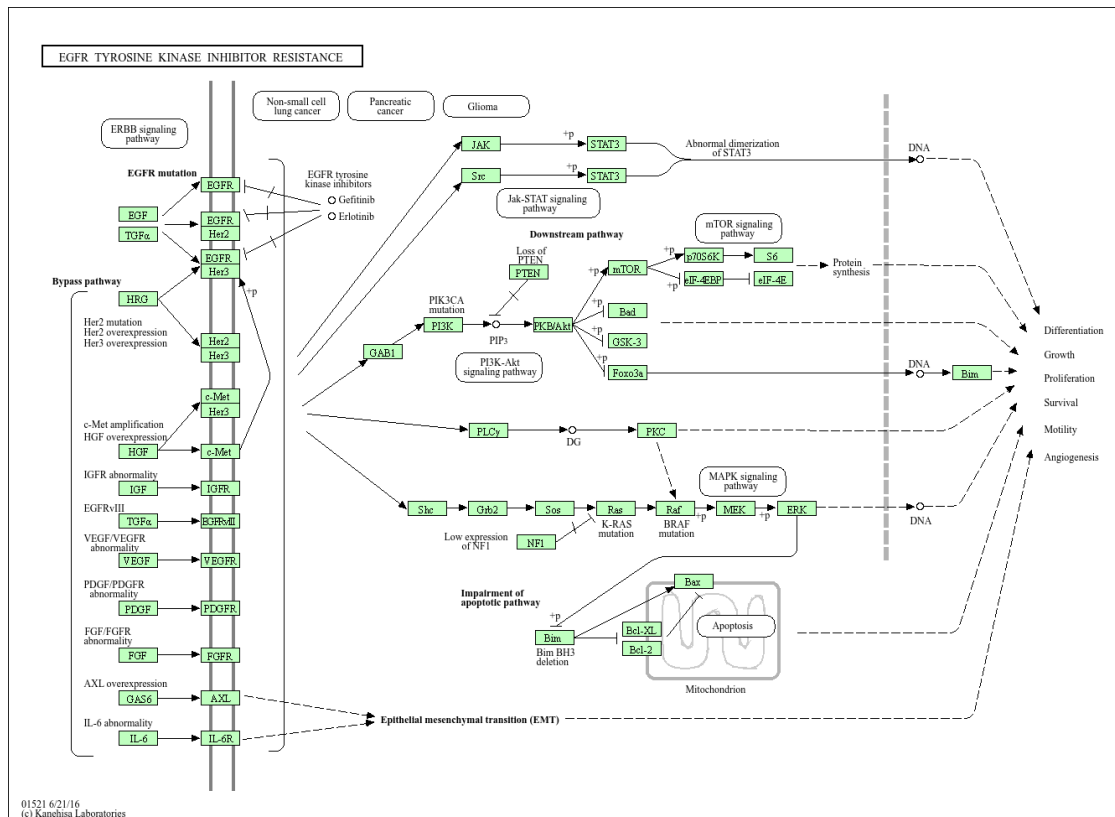


Figura Anexo 3. EGFR TYROSINE KINASE RESISTANCE (KEGG)

EGFR participa en la regulación de la homeostasis celular. EGFR también sirve como estímulo para el crecimiento del cáncer. Las mutaciones del gen EGFR y la sobreexpresión de proteínas, que activan vías posteriores, están asociadas con los cánceres, especialmente el cáncer de pulmón. Actualmente se administran varias terapias con inhibidores de la tirosina quinasa (TKI) contra EGFR y son inicialmente efectivas en pacientes con cáncer que tienen mutaciones de EGFR o activación aberrante de EGFR. Sin embargo, el desarrollo de resistencia a los TKI es común y provoca la recurrencia de tumores. Los estudios realizados durante la última década han identificado mecanismos que impulsan la resistencia al tratamiento con EGFR TKI. Los mecanismos más destacados son: la mutación secundaria de EGFR (T790M), activación de vías alternativas (c-Met, HGF, AXL), aberración de las vías posteriores (mutaciones K-RAS, pérdida de PTEN), deterioro de los EGFR-TKIs- vía de apoptosis mediada (polimorfismo de delección 11/BIM similar a BCL2), transformación histológica, etc.

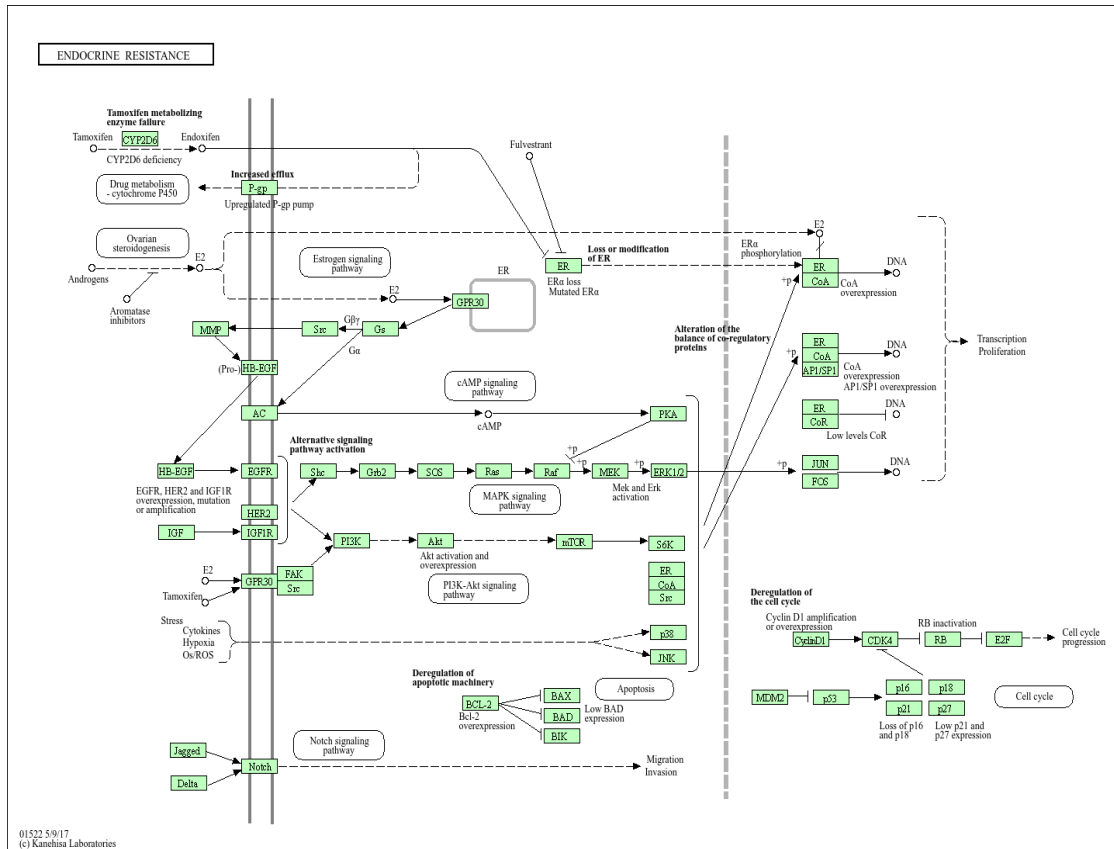


Figura Anexo 4. ENDOCRINE RESISTANCE (KEGG)

Los mecanismos de resistencia endocrina incluyen pérdida de expresión de ER-alfa, expresión alterada de coactivadores o correguladores que desempeñan un papel crítico en la transcripción de genes mediada por el RE, cascadas de señalización del factor de crecimiento independiente del ligando que activan las quinasas y la fosforilación de ER, disponibilidad alterada de tamoxifeno activo metabolitos regulados por enzimas que metabolizan fármacos, como CYP2D6, y desregulación del ciclo celular y la maquinaria apoptótica.

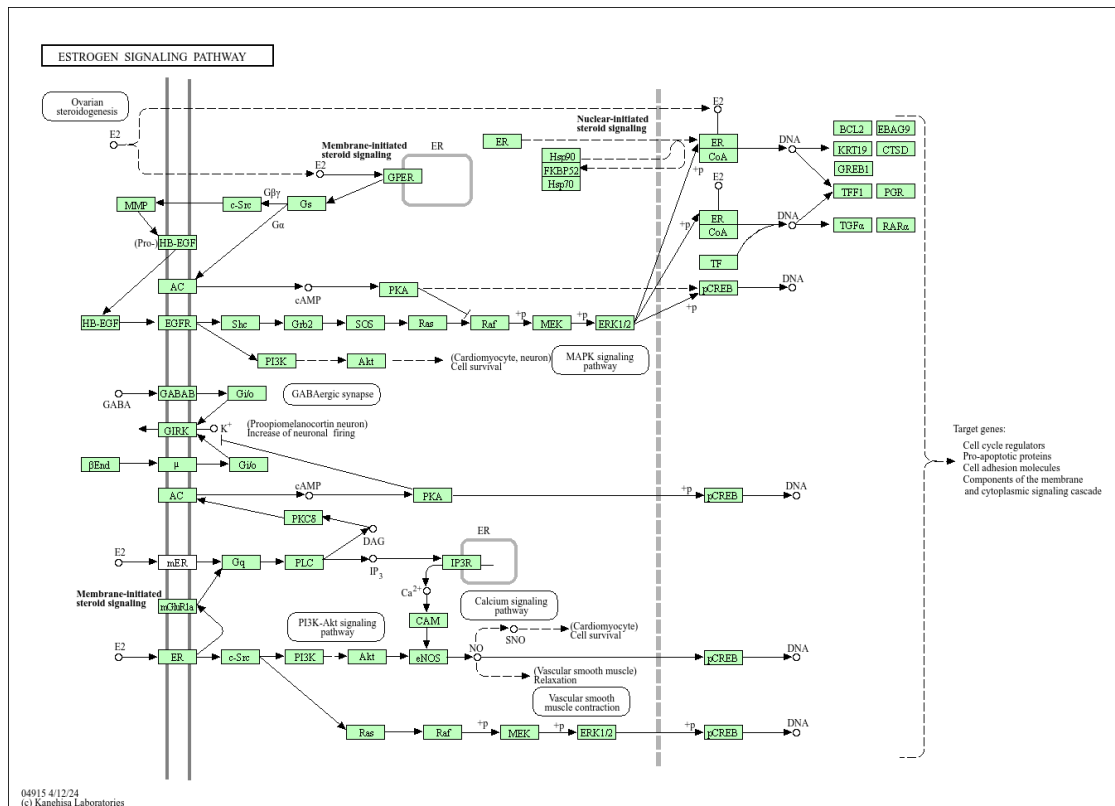
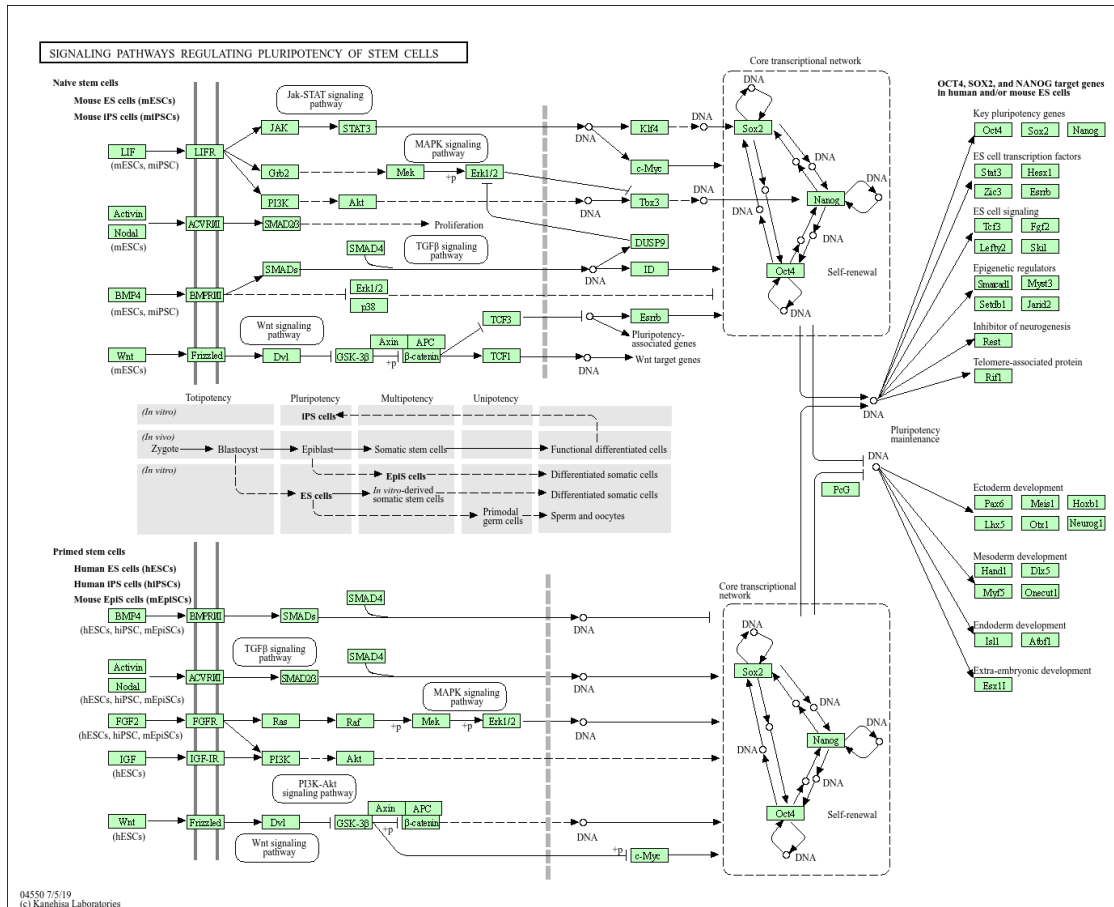


Figura Anexo 5. ESTROGEN SIGNALING PATHWAY (KEGG)

Los estrógenos son hormonas esteroides que regulan una gran cantidad de procesos fisiológicos en los mamíferos, incluyendo la reproducción, la protección cardiovascular, la integridad ósea, la homeostasis celular y el comportamiento. El estrógeno media sus acciones celulares a través de dos vías de señalización clasificadas como "señalización esteroidea iniciada por el núcleo" y "señalización esteroidea iniciada por la membrana". En la vía "nuclear", el estrógeno se une a ERalfa o ERbeta, que a su vez se transloca al núcleo, se une al ADN en los elementos ERE y activa la expresión de genes dependientes de ERE. En la vía "de membrana", el estrógeno puede ejercer sus acciones a través de una subpoblación de ER en la membrana plasmática (mER) o nuevos receptores E2 acoplados a proteína G (GPER). Tras la activación de estos receptores, varias vías de señalización (es decir, Ca<sup>2+</sup>, cAMP, cascadas de proteína quinasa) se activan rápidamente y, en última instancia, influyen en los factores de transcripción posteriores.



**Figura Anexo 6. SIGNALLING PATHWAYS REGULATING PLURIPOTENCY OF STEM CELLS (KEGG)**

Las células madre pluripotentes (CPM) son células básicas con una capacidad indefinida de autorrenovación y el potencial de generar todos los tipos celulares de las tres capas germinales. Los tipos de CPM conocidos hasta la fecha incluyen células madre embrionarias (CE) y células madre pluripotentes inducidas (iPS). Las células madre pluripotentes inducidas (CMI) se derivan de la masa celular interna (MCI) de embriones en etapa de blastocisto. Las células iPS se generan reprogramando células somáticas para que vuelvan al estado pluripotente con factores de reprogramación definidos, Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc (también conocidos como factores de Yamanaka). Las CPM, incluidas las células madre pluripotentes e iPS, se clasifican en dos grupos por su morfología, perfil de expresión génica y dependencia de señales externas. Las células madre pluripotentes e iPS de tipo ratón convencionales se denominan células de "estado ingenuo". Se mantienen principalmente bajo el control de la señalización LIF y BMP. Por otra parte, las células ES/iPS de tipo humano, que necesitan la señalización de activina y FGF, se denominan "estado preparado". Sin embargo, estas vías de señalización convergen hacia la activación de una red transcripcional central que es similar en ambos grupos e involucra a Oct4, Nanog y Sox2. Los tres factores de transcripción y sus genes diana posteriores promueven de manera coordinada la autorrenovación y la pluripotencia.

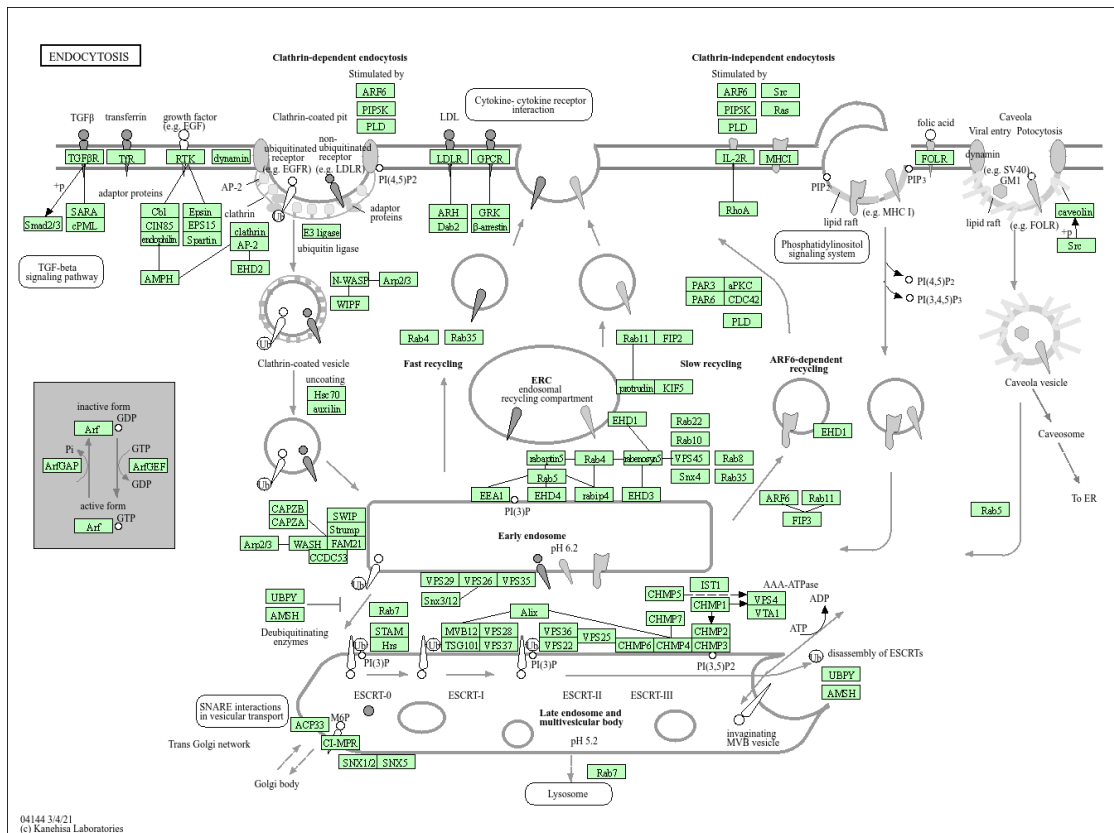


Figura Anexo 7. ENDOCYTOSIS PATHWAY (KEGG)

La endocitosis es un mecanismo para que las células eliminen ligandos, nutrientes, proteínas de la membrana plasmática (PM) y lípidos de la superficie celular, llevándolos al interior de la célula. Las proteínas transmembrana que ingresan a través de la endocitosis dependiente de clatrina (CDE) tienen secuencias en sus dominios citoplasmáticos que se unen a los AP (complejos proteicos relacionados con el adaptador) y permiten su rápida eliminación del PM. Además de las AP y la clatrina, existen numerosas proteínas accesorias, incluida la dinamina. Dependiendo de las diversas proteínas que ingresan a la membrana de la endosoma, estas cargas se clasifican en distintos destinos. Algunas cargas, como los receptores de nutrientes, se reciclan de nuevo al MP. Las proteínas de membrana ubiquitiladas, como los receptores del factor de crecimiento activados, se clasifican en vesículas intraluminales y finalmente terminan en la luz del lisosoma a través de endosomas multivesiculares (MVE). Existen distintos mecanismos de endocitosis independiente de clatrina (CIE) según la carga y el tipo de célula.

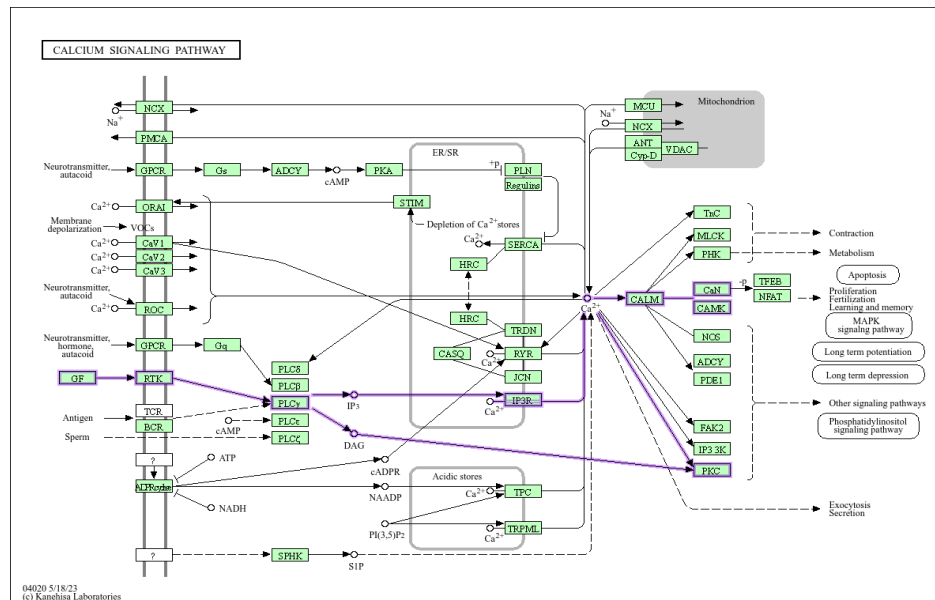
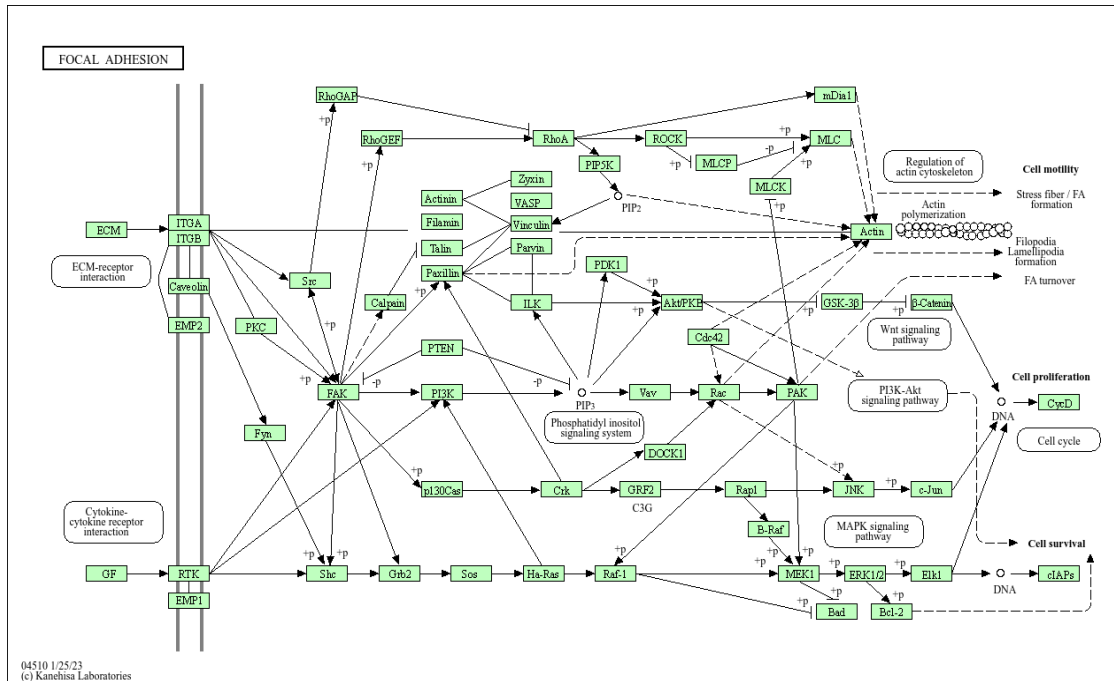


Figura Anexo 8. CALCIUM SIGNALING PATHWAY (KEGG)

El  $Ca^{2+}$  que entra en la célula desde el exterior es la fuente principal de señal de  $Ca^{2+}$ . La entrada de  $Ca^{2+}$  está impulsada por la presencia de un gran gradiente electroquímico a través de la membrana plasmática. Las células utilizan esta fuente externa de señal de  $Ca^{2+}$  activando varios canales de entrada con propiedades muy diferentes. Los canales operados por voltaje (VOC) se encuentran en células excitables y generan los flujos rápidos de  $Ca^{2+}$  que controlan los procesos celulares rápidos. Hay muchos otros canales de entrada de  $Ca^{2+}$ , como los canales operados por receptor (ROC), por ejemplo, los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) (NMDAR) que responden al glutamato. También hay canales operados por segundo mensajero (SMOC) y canales operados por almacén (SOC). La otra fuente principal de  $Ca^{2+}$  para la señalización son los depósitos internos que se encuentran principalmente en el retículo endoplasmático/sarcoplásmico (RE/SR), en los que los receptores de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3R) o los receptores de rianodina (RyR) regulan la liberación de  $Ca^{2+}$ . El principal activador de estos canales es el propio  $Ca^{2+}$  y este proceso de liberación de  $Ca^{2+}$  inducida por  $Ca^{2+}$  es fundamental para el mecanismo de señalización de  $Ca^{2+}$ . Varios segundos mensajeros también controlan la liberación de  $Ca^{2+}$ . El IP3, que se genera por vías que utilizan diferentes isoformas de la fosfolipasa C (PLCbeta, delta, epsilon, gamma y zeta), regula los IP3R. La ADP-ribosa cíclica (cADPR) libera  $Ca^{2+}$  a través de los RyR. El fosfato de dinucleótido de adenina y ácido nicotínico (NAADP) puede activar un mecanismo de liberación de  $Ca^{2+}$  distinto en depósitos de  $Ca^{2+}$  ácidos separados. La liberación de  $Ca^{2+}$  a través del mecanismo sensible al NAADP también puede retroalimentar a los RyR o IP3R. El cADPR y el NAADP son generados por CD38. Esta enzima podría ser sensible al metabolismo celular, ya que el ATP y el NADH lo inhiben. La entrada de  $Ca^{2+}$  del entorno o la liberación de los depósitos internos provoca un aumento muy rápido y espectacular de la concentración de calcio citoplasmático, que se ha aprovechado ampliamente para la transducción de señales.



**Figura Anexo 9. FOCAL ADHESION (KEGG)**

Las adhesiones entre células y matrices desempeñan papeles esenciales en importantes procesos biológicos, como la motilidad celular, la proliferación celular, la diferenciación celular, la regulación de la expresión génica y la supervivencia celular. En los puntos de contacto entre células y matrices extracelulares se forman estructuras especializadas denominadas adhesiones focales, en las que haces de filamentos de actina se anclan a receptores transmembrana de la familia de las integrinas a través de un complejo multimolecular de proteínas de la placa de unión. Algunos de los componentes de las adhesiones focales participan en el vínculo estructural entre los receptores de membrana y el citoesqueleto de actina, mientras que otros son moléculas de señalización, como diferentes proteínas quinasas y fosfatasa, sus sustratos y varias proteínas adaptadoras. La señalización de las integrinas depende de las actividades de las tirosin-quinasa no receptoras de las proteínas FAK y src, así como de las funciones de las proteínas adaptadoras de FAK, src y Shc para iniciar eventos de señalización posteriores. Estos eventos de señalización culminan en la reorganización del citoesqueleto de actina; Un requisito previo para los cambios en la forma y la motilidad celular y la expresión génica. Alteraciones morfológicas similares y modulación de la expresión génica se inician por la unión de factores de crecimiento a sus respectivos receptores, lo que pone de relieve la considerable interacción entre la señalización mediada por factores de crecimiento y de adhesión.

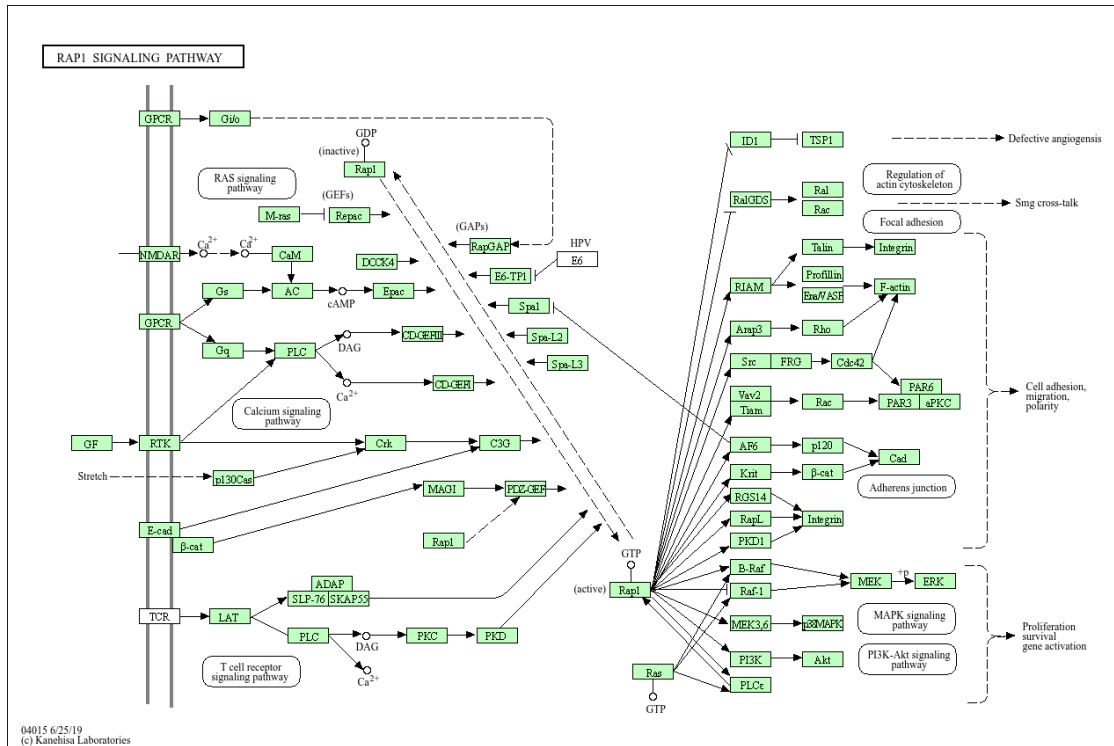


Figura Anexo 10. RAP1 SIGNALING PATHWAY (KEGG)

Rap1 es una pequeña GTPasa que controla diversos procesos, como la adhesión celular, la formación de uniones entre células y la polaridad celular. Como todas las proteínas G, Rap1 pasa de una conformación inactiva unida a GDP a una conformación activa unida a GTP. Una variedad de señales extracelulares controla este ciclo a través de la regulación de varios factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) y proteínas activadoras de GTPasa (GAP). Rap1 desempeña un papel dominante en el control de las interacciones entre células y entre células y matrices al regular la función de las integrinas y otras moléculas de adhesión en varios tipos de células. Rap1 también regula la actividad de la quinasa MAP (MAPK) de una manera que depende en gran medida del contexto de los tipos de células.

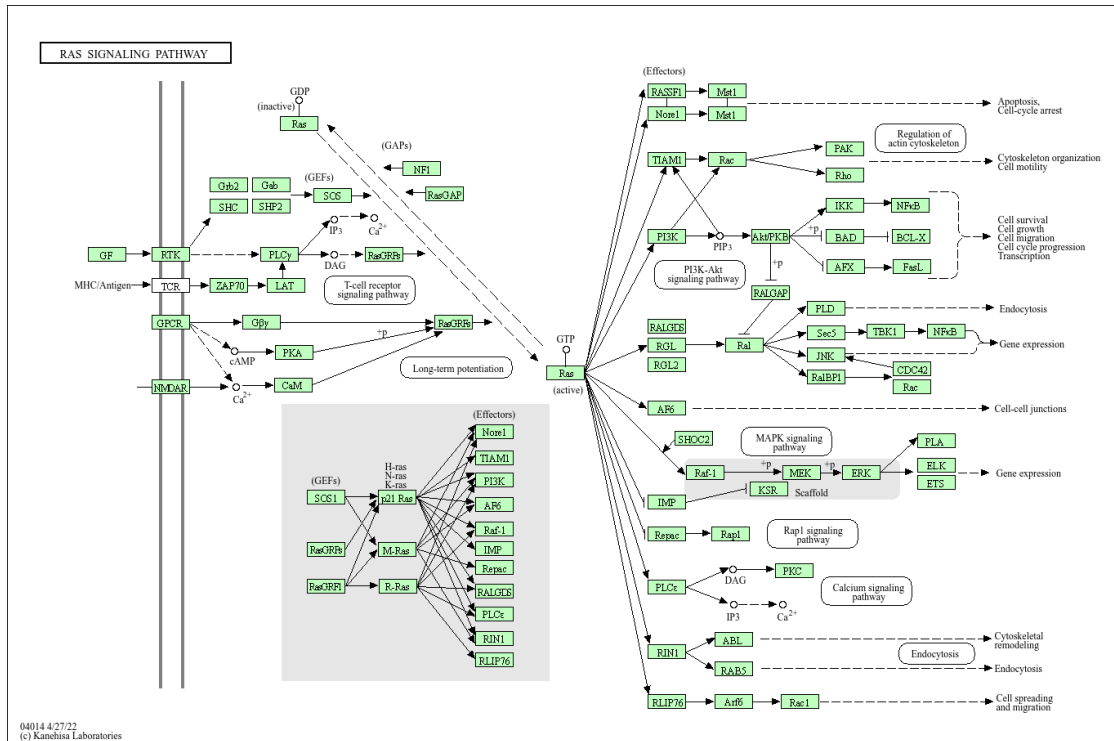


Figura Anexo 11. RAS SIGNALING PATHWAY (KEGG)

Las proteínas Ras son GTPasas que funcionan como interruptores moleculares para las vías de señalización que regulan la proliferación celular, la supervivencia, el crecimiento, la migración, la diferenciación o el dinamismo del citoesqueleto. Las proteínas Ras transducen señales de los factores de crecimiento extracelulares mediante el ciclo entre estados inactivos unidos a GDP y activos unidos a GTP. El intercambio de GTP por GDP en RAS está regulado por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) y proteínas activadoras de GTPasa (GAP). El RAS activado (RAS-GTP) regula múltiples funciones celulares a través de efectores que incluyen Raf, fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y estimulador de disociación de nucleótidos de guanina Ral (RALGDS).



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## **Tablas Anexo**



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Genes con expresión diferencial HER2-enriched versus subtipos no HER2-enriched								
Signature	variable	group	logFC	lcl95	ucl95	t statistic	pvalue	padjust
CD8 T-Cells	Hormonal receptor status	Positive	-0.3434	-0.8047	0.1179	-1.482	0.1424	0.9
BC Proliferation	Hormonal receptor status	Positive	-0.2238	-0.4926	0.04503	-1.657	0.1015	0.6614
Mast Cells	Hormonal receptor status	Positive	0.5784	0.0224	1.134	2.071	0.04166	0.2803
Treg	Hormonal receptor status	Positive	-0.5022	-0.9089	-0.09554	-2.459	0.01617	0.1124
PD-L1	Hormonal receptor status	Positive	-0.3571	-0.6442	-0.06995	-2.476	0.01546	0.1112
PD-1	Hormonal receptor status	Positive	-0.5022	-0.8999	-0.1045	-2.514	0.014	0.1043
BRCAness	Hormonal receptor status	Positive	-0.3119	-0.557	-0.06681	-2.534	0.0133	0.1027
Cell Adhesion	Hormonal receptor status	Positive	0.6404	0.1459	1.135	2.579	0.01181	0.09473
Macrophages	Hormonal receptor status	Positive	-0.4044	-0.6813	-0.1275	-2.908	0.004738	0.03953
Cytotoxic Cells	Hormonal receptor status	Positive	-0.6334	-1.065	-0.2019	-2.923	0.004542	0.03948
Cytotoxicity	Hormonal receptor status	Positive	-0.6685	-1.087	-0.2503	-3.183	0.002098	0.01902
ERBB2	Hormonal receptor status	Positive	-0.9567	-1.544	-0.3697	-3.245	0.001733	0.01643
TIGIT	Hormonal receptor status	Positive	-0.8156	-1.308	-0.3233	-3.298	0.001467	0.01457
APM	Hormonal receptor status	Positive	-0.8388	-1.334	-0.3437	-3.373	0.001162	0.01212
PD-L2	Hormonal receptor status	Positive	-0.6026	-0.9422	-0.2629	-3.532	0.0006967	0.008073
Apoptosis	Hormonal receptor status	Positive	0.2941	0.1305	0.4576	3.58	0.0005954	0.007405
Hypoxia	Hormonal receptor status	Positive	-0.3934	-0.6125	-0.1744	-3.576	0.0006036	0.007405
IFN Gamma	Hormonal receptor status	Positive	-0.8795	-1.347	-0.4123	-3.748	0.0003404	0.00486
HRD	Hormonal receptor status	Positive	-0.4763	-0.7298	-0.2228	-3.74	0.0003495	0.00486
TIS	Hormonal receptor status	Positive	-0.8202	-1.25	-0.3901	-3.797	0.0002885	0.004851
CDK6 Expression	Hormonal receptor status	Positive	-0.5729	-0.8744	-0.2714	-3.783	0.0003023	0.004851
IDO1	Hormonal receptor status	Positive	-1.305	-1.964	-0.6462	-3.943	0.0001746	0.00331
Differentiation	Hormonal receptor status	Positive	0.7484	0.375	1.122	3.99	0.0001482	0.003092
FOXA1	Hormonal receptor status	Positive	1.288	0.6593	1.918	4.077	0.0001091	0.002528
BC p53	Hormonal receptor status	Positive	-0.8003	-1.075	-0.5257	-5.803	1,34E-04	0.00004661
SOX2	Hormonal receptor status	Positive	0.3549	-0.2646	0.9745	1.141	0.2575	1
AR	Hormonal receptor status	Positive	0.2364	-0.3355	0.8084	0.823	0.413	1
PTEN	Hormonal receptor status	Positive	0.1936	-0.1797	0.5669	1.033	0.305	1
Stroma	Hormonal receptor status	Positive	0.1795	-0.1421	0.5011	1.111	0.2699	1
B7-H3	Hormonal receptor status	Positive	0.0637	-0.1433	0.2707	0.6127	0.5419	1
Rb1	Hormonal receptor status	Positive	0.05821	-0.144	0.2604	0.5731	0.5682	1
Claudin-Low	Hormonal receptor status	Positive	0.03813	-0.3994	0.4757	0.1735	0.8627	1
CDK4 Expression	Hormonal receptor status	Positive	0.01791	-0.2068	0.2426	0.1587	0.8743	1
Mammary Stemness	Hormonal receptor status	Positive	0.0167	-0.5518	0.5852	0.05849	0.9535	1
Endothelial Cells	Hormonal receptor status	Positive	0.009262	-0.2236	0.2422	0.07918	0.9371	1
MHC2	Hormonal receptor status	Positive	-0.2566	-0.7414	0.2282	-1.054	0.2953	1
TGF-Beta	Hormonal receptor status	Positive	-0.09266	-0.3202	0.1348	-0.811	0.4199	1
Inflammatory Chemokines	Hormonal receptor status	Positive	-0.04394	-0.4192	0.3314	-0.2331	0.8163	1
Genomic Risk	Hormonal receptor status	Positive	-0.003762	-0.7766	0.7691	-0.009691	0.9923	1
PGR	Hormonal receptor status	Positive	2.683	1.844	3.522	6.366	1.24e-8	5,17E-04
ER Signaling	Hormonal receptor status	Positive	1.675	1.36	1.99	10.59	9,58E-14	1,00E-11
ESR1	Hormonal receptor status	Positive	4.652	3.94	5.364	13.01	3,25E-18	6,79E-16

Tabla Anexo 1. Firmas que presentan expresión diferencial entre grupos (RH negativos y positivos).

Genes con expresión diferencial HER2-enriched versus subtipos no HER2-enriched							
	Gene	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
1	ERBB2	1,901152894	2,770059517	8,34172815	1,63424E-12	1,23875E-09	18,15004546
2	GRB7	1,923244237	1,249334519	7,10197632	4,35739E-10	8,25725E-08	12,77326798
3	TMEM45B	2,354690842	-2,924425598	6,834547679	1,42629E-09	2,16225E-07	11,63259198
4	FUT3	2,163977099	-2,720406961	5,57418392	3,1982E-07	2,06931E-05	6,438913565
5	KRT7	2,041937466	1,952421007	5,466296124	4,99259E-07	2,52292E-05	6,013153896
6	B3GNT3	1,918585147	-2,814430877	5,019128766	3,04008E-06	9,51404E-05	4,290176512
7	FGFR4	1,775243263	-2,882214118	4,86164841	5,649E-06	0,000147653	3,701025542
8	CXCL9	1,662950499	0,578647337	4,037446153	0,000122317	0,001448696	0,796860994
9	TMPRSS4	1,700766054	-4,162207693	3,80664014	0,000273253	0,00258048	0,045363698
10	S100A7	2,984774392	-3,416560045	3,507471193	0,000742372	0,005359216	-0,882681774
11	CEACAM6	1,951389884	-0,313959433	3,289402087	0,001489587	0,008752765	-1,524091681
12	IGF1R	-1,985638176	-0,696008379	-7,879150901	1,32944E-11	5,03857E-09	16,13225399
13	BCL2	-1,682361162	-2,66725362	-7,109472661	4,21437E-10	8,25725E-08	12,8053795
14	ESR1	-3,189234985	-1,863771634	-6,169640188	2,58758E-08	2,98325E-06	8,848050123
15	SLC39A6	-1,953047459	0,809975708	-6,155037923	2,75498E-08	2,98325E-06	8,787898319
16	FGFR2	-1,643744368	-3,164243001	-5,899344161	8,19209E-08	6,89956E-06	7,742869754
17	SCUBE2	-2,146664386	-2,219009839	-5,280642812	1,06546E-06	4,48679E-05	5,289320263
18	AGTR1	-1,655401759	-3,876656242	-5,180162209	1,59845E-06	6,05814E-05	4,902479951
19	TBC1D9	-1,512475036	0,987579817	-5,011137672	3,13788E-06	9,51404E-05	4,260046292
20	IRX1	-1,801388876	-3,92797487	-4,945532241	4,06573E-06	0,000114142	4,013620998
21	PGR	-2,19004356	-3,371499159	-4,869990253	5,46788E-06	0,000147653	3,731984445
22	NAT1	-1,695785796	-3,380693901	-4,475619977	2,47532E-05	0,000507106	2,300933685
23	BMPR1B	-2,189746227	-2,663306778	-4,283328955	5,04569E-05	0,000782173	1,62900283
24	MAPT	-1,720890819	-2,615213522	-4,256405719	5,56725E-05	0,000827446	1,536371261
25	ELOVL2	-1,699981194	-3,507818919	-4,132854193	8,70509E-05	0,001137665	1,116012791
26	DNAJC12	-1,535428563	-2,316397145	-4,0667693	0,000110229	0,001392561	0,894434683
27	CBLC	-1,581689953	-2,729537796	-3,967323201	0,000156603	0,001745663	0,56541256
28	KRT14	-1,755931176	-1,993490788	-3,329655939	0,00131267	0,007907401	-1,408010137
29	SOX10	-2,504123486	-6,661364365	-3,23346882	0,001772801	0,009880756	-1,683606525

Tabla Anexo 2. Genes que presentan expresión diferencial entre grupos (HER2E y no HER2E)

Firmas con expresión diferencial HER2-enriched versus subtipos no HER2-enriched							
	Signature	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
1	ERBB2	1,881547727	10,93224286	8,07360452	7,24649E-12	3,04352E-10	16,62609199
2	ROR	20,09090909	65,02597403	6,104197907	3,8743E-08	5,42402E-07	8,192115713
3	ESR1	-3,239093182	6,236725974	-6,163245325	3,01885E-08	5,42402E-07	8,436159126
4	PGR	-2,156803788	3,677755844	-4,663187524	1,28263E-05	0,000107741	2,55250434

Tabla Anexo 3. Figuras que presentan expresión diferencial entre grupos (HER2E y no HER2E)

Genes con expresión diferencial HER2-enriched agrupado versus HER2-enriched no agrupado							
	Gene	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
1	KRT7	1,566334093	2,805382227	6,279505349	9,70024E-08	2,22164E-05	7,723318044
2	FUT3	2,326376667	-1,81646716	5,354292765	2,44298E-06	0,000340055	4,652797147
3	SLPI	2,940909787	-2,717663708	4,754808219	1,87803E-05	0,001186286	2,718627694
4	TMEM45B	1,509695589	-1,940820563	4,179862785	0,00012413	0,004952152	0,93829573
5	B3GNT3	1,924301675	-2,012996575	3,854410542	0,000347271	0,008774384	-0,024656868
6	DKK1	2,220623877	-4,372075552	3,719665411	0,000526259	0,012465763	-0,411865556
7	CALML5	2,956180519	0,478937139	3,205089119	0,002413283	0,038630726	-1,817878307
8	ESR1	-3,443978888	-3,195983716	-8,597466861	3,01284E-11	2,28373E-08	15,39834845
9	NAT1	-1,963142487	-4,08906012	-6,689165253	2,29685E-08	8,70505E-06	9,095543014
10	GATA3	-1,579573055	1,035167971	-5,271289082	3,25061E-06	0,000351994	4,381456102
11	PGR	-2,171964759	-4,286327482	-5,178475352	4,4689E-06	0,000376381	4,079228165
12	CA12	-1,756510465	-1,182482673	-4,386480811	6,35638E-05	0,003011334	1,567667074
13	ARNT2	-1,511723878	-2,965864473	-4,297823061	8,48294E-05	0,003782393	1,296037697
14	ELOVL2	-1,827491567	-4,217937646	-4,21333166	0,000111465	0,004693934	1,039357951
15	LRP2	-2,033802288	-3,800278705	-4,132527584	0,000144458	0,005343345	0,795977272
16	BMPRI1B	-2,139021746	-3,578010898	-4,026042639	0,000202696	0,006756047	0,478544733
17	ANXA9	-1,682463126	-3,566961472	-3,761630673	0,000462673	0,0113131	-0,292046313

**Tabla Anexo 4.** Genes que presentan expresión diferencial entre grupos (HER2E agrupados y no agrupados)

Firmas con expresión diferencial HER2-enriched agrupado versus HER2-enriched no agrupado							
	Signature	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
1	ESR1	-3,38842	4,848543182	-8,031188514	3,49076E-10	1,46612E-08	13,04643222
2	PGR	-2,307362989	2,753411364	-5,329988599	3,17282E-06	6,66292E-05	4,052692189

**Tabla Anexo 5.** Firmas con expresión diferencial entre grupos (HER2E agrupado y no agrupado)

Resultados análisis de expresión diferencial a nivel de firma para TODAS las firmas incluidas en el BC360 entre grupos (HER2-enriched no agrupado versus no HER2-enriched)							
* Solo las firmas ERBB2 y ROR se expresan diferencialmente diferencial entre grupos (p adj <0,05)							
	Signature	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
1	ERBB2	1,523707273	10,33232125	4,235922487	0,00010224	0,002996512	1,128365606
2	ROR	21,38787879	60,22916667	4,13244252	0,000142691	0,002996512	0,815846491
3	BC_p53	0,595833939	4,8206375	2,940631925	0,005023531	0,07032943	-2,472017723
4	BC_Proliferation	0,538965455	4,887814583	2,782832472	0,007678126	0,080620324	-2,853826931
5	IDO1	1,105515152	5,877491667	2,463822825	0,017373796	0,145939886	-3,578520747
6	Apoptosis	-0,281385455	7,656145833	-2,31460244	0,024949912	0,174649387	-3,894284792
7	Macrophages	0,448733939	6,832135417	2,124258723	0,038816866	0,201680339	-4,27410723
8	IFN_Gamma	0,67822303	7,937808333	2,109739034	0,040110559	0,201680339	-4,301987951
9	TIS	0,632955152	7,050116667	2,076476489	0,043217216	0,201680339	-4,365262193
10	HRD	0,378066667	3,956079167	1,926894841	0,05991255	0,25163271	-4,639363615
11	PD.L2	0,480511515	4,234875	1,749854734	0,086522299	0,316261066	-4,941033436
12	PTEN	0,472004848	6,442083333	1,728250123	0,090360305	0,316261066	-4,976111772
13	TIGIT	0,554612727	5,111577083	1,514754581	0,136380255	0,425111901	-5,301841099
14	MHC2	0,495235758	9,13801875	1,475162964	0,146686327	0,425111901	-5,357991961
15	Treg	0,45007697	3,31451875	1,456235999	0,151825679	0,425111901	-5,38435656
16	PD.L1	0,317615152	6,891872917	1,417998234	0,162639028	0,426927449	-5,436670215
17	ESR1	-1,005816364	7,77331875	-1,365413343	0,178476488	0,440941912	-5,506522439
18	APM	0,439052121	12,25275833	1,249476456	0,21753815	0,490572898	-5,651876363
19	AR	0,446909697	7,18765625	1,208406839	0,232799491	0,490572898	-5,700477434
20	CD8_T.Cells	0,363604242	5,477802083	1,176585752	0,245152188	0,490572898	-5,737084231
21	Cytotoxic.Cells	0,349183636	4,36395625	1,159690601	0,25190041	0,490572898	-5,756146115
22	Cytotoxicity	0,334584242	4,216266667	1,147219109	0,256966756	0,490572898	-5,770050007
23	Inflammatory_Chemokines	0,26319697	5,984652083	0,990352893	0,326958726	0,53852651	-5,932711621
24	B7.H3	-0,130818182	9,243870833	-0,953300096	0,345205398	0,53852651	-5,967796612
25	FOXA1	0,551878788	8,75805	0,946966322	0,348390281	0,53852651	-5,973665299
26	CDK4_Expression	-0,11399697	7,91490625	-0,918444684	0,362969889	0,53852651	-5,999625612
27	PD.1	0,24961697	3,453108333	0,915973715	0,364251284	0,53852651	-6,001838654
28	PGR	-0,636041818	4,711452083	-0,904803975	0,370080024	0,53852651	-6,011770665
29	TGF.Beta	-0,157378788	8,962897917	-0,901454013	0,371839733	0,53852651	-6,01472648
30	Rb1	0,113853333	7,247945833	0,796055471	0,429912048	0,601876867	-6,102295155
31	ER_Signaling	-0,245732727	12,56381458	-0,730109617	0,468865077	0,635236556	-6,15169996
32	BRCAness	-0,134438788	4,9276	-0,690763278	0,493035206	0,647108708	-6,179188848
33	Endothelial_Cells	-0,107447879	5,317077083	-0,597536199	0,552952917	0,696462527	-6,238353835
34	Cell_Adhesion	-0,193911515	8,685154167	-0,581225381	0,563802998	0,696462527	-6,247839068
35	CDK6_Expression	0,116177576	6,09778125	0,467921561	0,641954461	0,750077168	-6,306569522
36	Hypoxia	0,068110303	6,641920833	0,448399013	0,655879146	0,750077168	-6,315420613
37	Mast_Cells	0,174029091	6,184075	0,421629177	0,675174517	0,750077168	-6,326949357
38	Differentiation	0,134139394	7,5703125	0,416852488	0,678641247	0,750077168	-6,328932479
39	SOX2	0,110079394	3,575227083	0,318922293	0,751166601	0,808948647	-6,364638537
40	Mammary_Stemness	0,113244848	5,349704167	0,258911484	0,796808598	0,836649028	-6,381841617
41	Stroma	0,016358182	7,910227083	0,068035553	0,946039432	0,969113565	-6,412833771
42	Claudin.Low	-0,006178788	1,057114583	-0,018401642	0,98539458	0,98539458	-6,414965889

Tabla Anexo 6. Resultados del análisis de expresión diferencial a nivel de firma para las firmas incluidas en el panel Breast Cancer 360™ (HER2E no agrupados y no HER2E)

Genes con expresión diferencial HER2-enriched agrupado versus subtipos no HER2-enriched							
	Gene	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
1	ERBB2	2,076878682	2,652048946	7,867225476	5,14167E-11	9,0932E-09	14,89208334
2	TMEM45B	2,879802351	-2,924176952	7,829498226	5,99815E-11	9,0932E-09	14,74254037
3	FUT3	2,973151592	-2,564657787	7,651390012	1,24135E-10	1,56823E-08	14,03660666
4	GRB7	2,130222171	1,143862296	6,782900666	4,25403E-09	3,69204E-07	10,6079976
5	B3GNT3	2,587907469	-2,699244832	6,70422487	5,84708E-09	4,11466E-07	10,2996944
6	KRT7	2,586749324	1,995230154	6,37296608	2,21726E-08	1,29283E-06	9,008514302
7	EGLN3	1,660951161	-1,447939406	5,630020988	4,18099E-07	1,26767E-05	6,170134372
8	LAD1	1,652621775	-0,449803516	5,589355517	4,89665E-07	1,37469E-05	6,017777018
9	DKK1	2,262027612	-4,784556245	5,052134495	3,81251E-06	7,0485E-05	4,043366471
10	TMPRSS4	2,339097557	-4,038671188	5,024277767	4,23222E-06	7,63814E-05	3,943159302
11	FGFR4	1,986647616	-2,969877394	4,939430889	5,80941E-06	9,16547E-05	3,63941965
12	SLPI	2,043909745	-2,776535795	4,771654106	1,08006E-05	0,000154468	3,045645846
13	S100A7	3,897185115	-3,298727509	4,265597003	6,62662E-05	0,000677007	1,31666701
14	CXCL9	1,898327324	0,514312439	4,18125361	8,88429E-05	0,000831394	1,038602208
15	CALML5	2,809849397	0,035347966	3,852623152	0,000270729	0,00218311	-0,01371455
16	CEACAM6	2,399287051	-0,307694128	3,685461376	0,000468475	0,00321524	-0,528559352
17	PROM1	1,756637603	-2,149541494	3,556330341	0,000709082	0,004369789	-0,916122396
18	PIP	2,028794403	-1,097804849	2,787802455	0,006957933	0,024530759	-3,017288031
19	ESR1	-4,387140685	-2,095863343	-9,189951577	2,37492E-13	1,80019E-10	20,10924843
20	BCL2	-2,144104553	-2,708653087	-8,959350752	6,02994E-13	2,28535E-10	19,20587355
21	IGF1R	-2,270336155	-0,620926453	-8,561182425	3,03449E-12	7,66715E-10	17,63847037
22	SLC39A6	-2,394591421	0,806911586	-6,996735834	1,7879E-09	1,93604E-07	11,44848005
23	PGR	-2,945509563	-3,498907523	-6,775479193	4,38369E-09	3,69204E-07	10,57889209
24	FGFR2	-1,904341715	-3,113955416	-6,276939217	3,25574E-08	1,76275E-06	8,636671147
25	NAT1	-2,378617965	-3,525949546	-6,200370415	4,41892E-08	2,23303E-06	8,34108575
26	TBC1D9	-1,952967023	0,938277186	-6,016835784	9,15964E-08	4,18143E-06	7,636185812
27	SCUBE2	-2,642014497	-2,227155502	-5,996437042	9,92952E-08	4,18143E-06	7,558178515
28	ELOVL2	-2,335630434	-3,630161421	-5,968739162	1,10783E-07	4,41967E-06	7,452372849
29	FREM2	-1,807235383	-5,396248229	-5,831720008	1,90053E-07	7,203E-06	6,93098548
30	IRX1	-2,01807956	-3,840055158	-5,719765851	2,94671E-07	9,71134E-06	6,507638108
31	BMPR1B	-2,93375379	-2,785290285	-5,640112437	4,02002E-07	1,26767E-05	6,20799931
32	THBS4	-1,813985237	-2,104780224	-5,59272967	4,83293E-07	1,37469E-05	6,030404666
33	ARNT2	-1,509338689	-2,701075494	-5,540586128	5,91561E-07	1,60144E-05	5,835546591
34	LAMA3	-1,679405344	-2,998831841	-5,417896496	9,49652E-07	2,24949E-05	5,379569957
35	GATA3	-1,803442305	1,430411511	-5,357542829	1,19716E-06	2,5927E-05	5,156614282
36	AGTR1	-1,915448784	-3,824869889	-5,154421191	2,59348E-06	4,91465E-05	4,413295432
37	IL24	-1,518971113	-5,986903055	-5,00784731	4,50066E-06	7,75341E-05	3,884166023
38	CA12	-1,93969165	-0,777413875	-4,732141877	1,24831E-05	0,000168968	2,907194543
39	DNAJC12	-1,908849247	-2,331325966	-4,583585759	2,14168E-05	0,00026613	2,391643923
40	MAPT	-1,978299522	-2,555223222	-4,432416859	3,68085E-05	0,00042274	1,875541804
41	OGN	-1,571729123	-1,911070919	-4,376232424	4,49069E-05	0,000495045	1,686334664
42	ANXA9	-1,718985969	-3,251744816	-3,983187021	0,000174858	0,001467505	0,398223096
43	LRP2	-2,035574056	-3,441435119	-3,73207307	0,000402578	0,002962659	-0,386459834
44	CBLC	-1,515581204	-2,530259108	-3,72439876	0,000412781	0,003008541	-0,409934428
45	ERBB4	-1,667537138	-3,64058555	-3,689030848	0,000463084	0,00321524	-0,517718227
46	SOX10	-2,950006249	-6,608032026	-3,497221298	0,000854868	0,00498454	-1,090455325
47	CHAD	-1,644824938	-4,576358503	-3,486951079	0,000882938	0,005108907	-1,120544696
48	KRT14	-2,023148805	-1,934454043	-3,332731708	0,001424864	0,007448601	-1,565040957
49	TFF1	-2,310075669	-2,797981753	-3,309208022	0,001531083	0,007894974	-1,631609342
50	FGFR3	-1,634410616	-1,710309749	-3,287030694	0,001638019	0,008168542	-1,694062803

Tabla Anexo 7. Genes con expresión diferencial entre grupos (HER2E agrupado y no HER2E)

Firmas con expresión diferencial HER2-enriched agrupado versus subtipos no HER2-enriched							
	Signature	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
1	ERBB2	2,066637618	10,82372581	7,672386988	1,43987E-10	3,02373E-09	13,69693953
2	ROR	19,4200627	62,62903226	5,139416806	2,95912E-06	2,07138E-05	3,93091888
3	ESR1	-4,394236364	6,032267742	-8,963886565	8,34912E-13	3,50663E-11	18,79689091
4	PGR	-2,943404807	3,53346129	-6,596360734	1,05617E-08	1,47864E-07	9,456303154

Tabla Anexo 8. Firmas con expresión diferencial HER2E agrupado versus no HER2E

Análisis de diferencia de frecuencias de SNVs-indels HER2-enriched versus no HER2-enriched											
Gene	Mutated Samples in Her2-Enriched	Not Mutated Samples in Her2-Enriched	Mutated Samples in No Her2-Enriched	Not Mutated Samples in No Her2-Enriched	Fisher-Test p-value (two-tailed)	Fisher-Test p-value Adj. (two-tailed)	Fisher-Test p-value (one-tailed: greater)	Fisher-Test p-value Adj. (one-tailed: greater)	Fisher-Test p-value (one-tailed: less)	Fisher-Test p-value Adj. (one-tailed: less)	
1	CHEK1	14	32	13	20	0,474362573	1	0,857259386	1	0,277718865	0,938032035
2	CDKN1B	4	42	8	25	0,10911347	1	0,98651608	1	0,057727263	0,766996579
3	RB1	33	13	22	11	0,630705468	1	0,405104399	1	0,768322201	1
4	NF1	9	37	9	24	0,43083755	1	0,859163555	1	0,295182218	0,938032035
5	CDK12	19	27	20	13	0,112797174	1	0,972947576	1	0,071348519	0,766996579
6	RNF43	20	26	17	16	0,502248185	1	0,824969412	1	0,316479946	0,938032035
7	NOTCH3	5	41	7	26	0,223465497	1	0,942272737	1	0,17207929	0,938032035
8	ATRX	17	29	13	20	1	1	0,676210731	1	0,504660844	0,938032035
9	NOTCH1	5	41	5	28	0,733951971	1	0,818263033	1	0,407553343	0,938032035
10	SETD2	18	28	10	23	0,479969438	1	0,285314112	1	0,852617627	1
11	FANCI	20	26	15	18	1	1	0,657184138	1	0,521409246	0,938032035
12	SMARCA4	8	38	4	29	0,751934757	1	0,377268851	1	0,831234263	1
13	NOTCH2	10	36	9	24	0,602351216	1	0,798437349	1	0,379439828	0,938032035
14	CREBBP	10	36	11	22	0,305554563	1	0,92001873	1	0,18588534	0,938032035
15	NF2	12	34	9	24	1	1	0,648351768	1	0,553096192	0,938032035
16	FANCD2	9	37	9	24	0,43083755	1	0,859163555	1	0,295182218	0,938032035
17	ATR	16	30	19	14	0,065861555	1	0,98764788	1	0,037278947	0,766996579
18	CCND3	7	39	2	31	0,290971187	1	0,184506345	1	0,952808766	1
19	CDK6	2	44	1	32	1	1	0,623869801	1	0,808040061	1
20	SMARCB1	1	45	0	33	1	1	0,582278481	1	1	1
21	ARID1A	9	37	4	29	0,540739907	1	0,287021235	1	0,883792261	1
22	SLX4	5	41	4	29	1	1	0,705354845	1	0,567182161	0,938032035
23	ROS1	6	40	3	30	0,727462994	1	0,432817839	1	0,815493655	1
24	ATM	7	39	4	29	0,754001967	1	0,480629369	1	0,761733225	1
25	PALB2	2	44	2	31	1	1	0,805726585	1	0,557986983	0,938032035
26	MSH6	3	43	0	33	0,260954236	1	0,191959939	1	1	1
27	BRCA2	3	43	3	30	0,690024292	1	0,804372216	1	0,493588929	0,938032035
28	BRCA1	1	45	5	28	0,076959406	1	0,996015408	1	0,043261289	0,766996579
29	DDR2	1	45	1	32	1	1	0,828627069	1	0,664070107	1
30	PTEN	2	44	0	33	0,507302824	1	0,335929893	1	1	1
31	PITCH1	1	45	2	31	0,568090138	1	0,931005703	1	0,376130199	0,938032035
32	POLE	3	43	1	32	0,636286432	1	0,442013017	1	0,891391087	1
33	FANCA	1	45	1	32	1	1	0,828627069	1	0,664070107	1
34	MDM4	1	45	0	33	1	1	0,582278481	1	1	1
35	NFE2L2	0	46	1	32	0,417721519	1	1	1	0,417721519	0,938032035
36	NBN	3	43	3	30	0,690024292	1	0,804372216	1	0,493588929	0,938032035
37	PIK3R1	0	46	1	32	0,417721519	1	1	1	0,417721519	0,938032035
38	MDM2	0	46	1	32	0,417721519	1	1	1	0,417721519	0,938032035
39	TSC1	2	44	4	29	0,2293259	1	0,956738711	1	0,195627784	0,938032035
40	CCND2	2	44	0	33	0,507302824	1	0,335929893	1	1	1
41	FGFR1	1	45	0	33	1	1	0,582278481	1	1	1
42	MRE11	0	46	1	32	0,417721519	1	1	1	0,417721519	0,938032035
43	RAD50	0	46	1	32	0,417721519	1	1	1	0,417721519	0,938032035

Tabla Anexo 9. Análisis de diferencia de frecuencias de SNVs-indels (HER2E vs no HER2E)