



MEMORIA

25.º RETORNO SOCIAL DE LA INVESTIGACIÓN
CÁNCER

PERFILES MOLECULARES Y MICROESPECTROSCÓPICOS INTEGRALES DE CARCINOMAS DE MAMA Y SU RESISTENCIA AL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE

Dr. Pedro Luis Fernández Ruiz

Hospital Universitari Germans Trias i Pujol - IIGTiP Institut d'Investigació Germans
Trias i Pujol

Dra. Mònica Marro Sánchez

ICFO Institut de Ciències Fotòniques

1. Resumen

El tratamiento neoadyuvante es una estrategia cada vez más utilizada en carcinomas de mama, especialmente en los subtipos HER2+ i triple negativo (TNBC), ya que consigue una tasa de respuesta completa patológica de cerca del 30-50% de los casos, según diferentes estudios. Esto ha supuesto un gran avance en el pronóstico de esta enfermedad al asociarse con una mayor supervivencia en estos subtipos. No obstante, un porcentaje de pacientes no responden bien a la neoadjuvancia, y queda por aclarar en gran medida los mecanismos subyacentes a la resistencia a este tipo de tratamiento. Entre ellos, se empiezan a conocer ciertas alteraciones genéticas i fenotípicas aún escasamente definidas.

En este proyecto hemos analizado una serie de pacientes con carcinomas mamarios infiltrantes primarios que incluían casos retrospectivos y prospectivos de fenotipos HER2+ y triple negativos tratados con quimioterapia neoadyuvante y que constaba de buenos respondedores (respuesta patológica completa, RPC) y malos respondedores. Para analizar la existencia de alteraciones en diversos procesos y vías, se utilizó un panel amplio de expresión génica (nCounter ®BreastCancer 360 Panel) suministrado por una plataforma multigénica (nCounter, NanoString Technologies, Inc.). Esta caracterización transcripcional se realizó en muestras de biopsia pretratamiento y, en los casos sin RPC, en tumor residual. En algunos casos se consideraron metástasis a distancia apareadas para tipificar la progresión tumoral a lo largo de diversas fases. También se analizó el tipo de respuesta inflamatoria pre- y postratamiento, así como la expresión del marcador PD-L1 en células tumorales e inflamatorias. Los hallazgos moleculares se validaron en modelos *in vitro* e *in vivo* utilizando líneas celulares de cáncer de mama naif y resistentes a la terapia. Se ha evaluado el uso de la microespectroscopia Raman para tipificar las muestras de mama y su uso en el entorno clínico.

2. Resultados

En el presente estudio se identificaron 214 casos candidatos: 117 HER2+ (60 de ellos lograron respuesta patológica completa) y 97 TNBC (49 con respuesta patológica completa). El perfil transcriptómico se caracterizó mediante el uso del panel nCounter

Breast Cancer 360 (NanoString Technologies), que contiene 776 genes humanos en 23 vías clave del cáncer de mama. En total, finalmente analizamos 124 muestras humanas: 71 HER2+, 31 de ellas con cPR y 40 con respuesta parcial, de las cuales hubo 17 biopsias postratamiento, y 53 TNBC, 20 de las cuales con RCP y 33 con respuesta parcial o mala, y que incluyeron 17 biopsias postratamiento y una metástasis a distancia. También caracterizamos el perfil transcriptómico de 14 líneas celulares: 8 HER2+ y 6 TNBC parentales y resistentes a diferentes tratamientos. Realizamos un análisis diferencial de expresión génica basado tanto en genes como en firmas biológicas. Identificamos varios genes regulados negativamente (*AGTR1*, *LAMA3*, *SCUBE2*, *SLC39A6*, *TBC1D9*, *IFT140*) y un gen regulado positivamente (*MARCO*) en las biopsias pretratadas de respondedores HER2+ en comparación con las muestras pretratadas con respondedores pobres o no respondedores.

Cuando realizamos la comparación para la cohorte TN pre-NAT (pCR = 20; no pCR = 14), no se observó una expresión diferente significativa en ningún gen entre los que respondieron y los que no respondieron, si bien estamos añadiendo un mayor número de casos.

También identificamos en la cohorte HER2+ genes sobreexpresados significativos (*FOS*, *NR4A1*, *NR4A3*, *IL6*, *PDK4*, *OGN*, *FHL1*, *GADD45B*, *FGF2*, *JUN*, *FLNC*, *LPL* y *SPRY*) en el grupo posneoadyuvante en comparación con el grupo pretratamiento de los pacientes que no respondieron bien. Cuando comparamos la cohorte de TNBC, obtuvimos resultados similares: sobreexpresión de *FOS*, *NR4A3*, *NR4A1*, *IL6*, *HBB*, *PDK4*, *JUN* y *GADD45*.

También analizamos la posible asociación entre los ensayos inmunohistoquímicos y los parámetros clínicos y patológicos. Nuestros resultados parecen indicar que los tumores con TIL elevados presentan un grado histológico significativamente mayor y se asocian con una mejor respuesta al tratamiento.

El análisis comparativo de estos grupos tumorales y muestras en cuanto a la expresión de firmas biológicas se está realizando en estos momentos.

Por otro lado, desarrollamos líneas celulares HER2+ resistentes a trastuzumab o lapatinib (MDA-MB-453, SK-BR-3 y BT-474) y dos líneas celulares metastásicas de

pulmón derivadas de un modelo de metástasis pulmonar en ratones inmunodeprimidos (MDA-MB-453). También desarrollamos tres líneas celulares de TNBC resistentes a tratamientos habituales como son paclitaxel o adriamicina: MDA-MB-468, clasificada como línea celular del subtipo basal A, y BT-549 y MDA-MB-231, como tumores bajos en claudina (basal B).

Las líneas celulares resistentes mostraron un fenotipo de resistencia a múltiples fármacos asociado a la sobreexpresión de transportadores de tipo ABC como ABCB1 (proteína de resistencia a múltiples fármacos, 1 MDR1, o glicoproteína-P, Pgp) y ABCG2 (proteína de resistencia al cáncer de mama, BCRP). Estas líneas celulares resistentes desarrollaron una estrategia metabólica más oxidativa, una reducción de la señalización proliferativa y una resistencia a la autofagia y apoptosis, de acuerdo con el fenotipo resistente adquirido. Caracterizamos el perfil transcriptómico de estas líneas celulares resistentes y sus parentales. La expresión genética de estas células parecía ser muy diferente en comparación con las muestras de tumores humanos. Esto podría estar relacionado con el hecho de que las líneas celulares están compuestas por grupos homogéneos de células (células tumorales), mientras que las biopsias humanas no solo contienen células tumorales sino también un microambiente tumoral que incluye células estromales e inflamatorias que también pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo del cáncer.

Además, mediante análisis *in vitro* hemos confirmado algunos miembros de la familia NR4A como mediadores comunes putativos de la resistencia a la quimioterapia en TNBC y del potencial metastásico de los subtipos HER2+. También hemos desvelado la relevancia del gen *HBB* en los fenotipos resistentes, especialmente relacionados con las terapias dirigidas a HER2 y el potencial metastásico de HER2+. De acuerdo con nuestros resultados, la sobreexpresión de *NR4A1* y *HBB* se ha relacionado previamente con una mala supervivencia y mal pronóstico en diferentes cánceres, incluido el de mama; sin embargo, nunca se habían relacionado con la predicción de la respuesta al tratamiento. Con nuestros resultados, proponemos *NR4A1* y *HBB* como posibles biomarcadores predictores de resistencia al tratamiento neoadyuvante en pacientes HER2+ y TNBC.

Mediante la implementación de la espectroscopia Raman y el análisis multivariado, hemos podido clasificar con excelente precisión células no resistentes de tipo salvaje

respecto a células resistentes a los tratamientos neoadyuvantes de la misma línea. Para las células HER2+, las células MDA-MB-453 y BT474 no resistentes se distinguieron de las células resistentes a los tratamientos con lapatinib y trastuzumab, y se detectaron cambios significativos en sus abundancias de fosfolípidos, ADN y citocromo C. De manera similar, para las células triple negativas, las células MDA-MB-231 y BT549 no resistentes se distinguieron de las células resistentes a los tratamientos con paclitaxel y adriamicina, y se detectaron cambios significativos en sus niveles de insaturación lipídica. La información química proporcionada se extrajo de forma no destructiva y ayudará a desentrañar los mecanismos de resistencia al tratamiento que aún no se comprenden completamente.

Además, mediante la implementación de la misma técnica, se ha establecido un protocolo para comparar las mediciones Raman de cortes de biopsia de tejido y biopsias con aguja gruesa cilíndrica (*tru-cuts*) con su posterior análisis histopatológico. Se ha demostrado su potencial para identificar diferentes secciones de tejido según su contenido proteico, lipídico, colágeno y caroteno, lo que permite la diferenciación del tejido sano del canceroso, algo que se ha validado posteriormente con análisis histopatológico. Con más trabajo, esta técnica podría ayudar a los médicos en tiempo real a evaluar la calidad de la biopsia y el diagnóstico del cáncer.

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

Comparando muestras tumorales de pacientes que habían respondido a tratamiento con muestras de pacientes que no habían respondido, se identificaron varios oncogenes y supresores tumorales diferencialmente expresados (como *AGTR1*, *LAMA3*, *SLC39A6* y *SCUBE2*). Una vez validados en próximos experimentos (con técnicas de inmunohistoquímica y seguimiento clínico, por ejemplo), que van más allá de este proyecto, podrán servir como biomarcadores predictivos de respuesta en tumores HER2+ y TNBC. La confirmación experimental, tanto *in vivo* como *in vitro*, también se complementará con el análisis clínico prospectivo de la expresión de estos marcadores en muestras previas al tratamiento de pacientes con cáncer de mama. Si estos biomarcadores demuestran la capacidad predictiva clínica para el tratamiento neoadyuvante actual (por ejemplo, anti-HER2, taxanos), se podría proponer su uso rutinario en el manejo clínico de estos subtipos de cáncer de mama, que podría

favorecer a alrededor de 1.000 mujeres en Cataluña al año y mejorar su supervivencia mediante un mejor ajuste de su tratamiento.

Por otro lado, el hallazgo de genes diferencialmente expresados en el mismo tumor, antes y después del tratamiento (*NR4A1*, *NR4A3* y *HBB*), permite entender mejor los cambios metabólicos que afectan a las células cancerosas tras el tratamiento neoadyuvante, lo que ayuda a desarrollar nuevas estrategias terapéuticas y fármacos para el tratamiento del cáncer de mama.

Otros biomarcadores como PD-L1 y TIL parecen estar asociados a la predicción de la respuesta. Debido a su fácil implementación, creemos que podemos utilizarlos en el manejo de estos pacientes. De hecho, ya se incluye la información de los TIL en los informes de diagnóstico de carcinomas invasivos de forma rutinaria.

Además, nuestro proyecto ha demostrado la viabilidad de analizar tanto líneas celulares como muestras tumorales frescas de tumores de mama mediante Raman, y de obtener una composición importante de una sección de tejido (contenido proteico, lipídico, colágeno y caroteno) e información metabólica relacionada con la resistencia a fármacos sin destruir la muestra. Esto proporciona un nuevo enfoque en el diagnóstico del cáncer de mama, también aplicable a otros tipos de tumores. El uso viable de biopsias de aguja indica que la microespectroscopia Raman tiene el potencial para ser implementada en la práctica clínica de rutina, una vez nuestros resultados se confirmen en series mayores y se diseñen e implementen dispositivos más manejables en las instalaciones hospitalarias.

4. Bibliografía científica generada

Artículos

Pons L, Hernández L, Urbizu A, Osorio P, Rodríguez-Martínez P, Castellà E, Muñoz-Mármol AM, Sanz C, Arnaldo L, Felip E, Quiroga V, Tapia G, Margelí M, Fernández PL. *Pre- and post-neoadjuvant clinicopathological parameters can help in the prognosis and the prediction of response in Her2+ and triple negative breast cancer.* Cancers (Basel). Jun 6;15(12):3068 (2023). doi: 10.3390/cancers15123068.

Pons L, Hernández-León L, Altaieb A, Ussene E, Iglesias R, Castillo A, Rodríguez-Martínez P, Castella E, Quiroga V, Felip E, Cirauqui B, Margelí M, Fernández PL.

Conventional and digital Ki67 evaluation and their correlation with molecular prognosis and morphological parameters in luminal breast cancer.

Sci Rep 12, 8176 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11411-5>.

Ruiz JJ, Carbó N, Fernández-Nogueira P, Marro M, Fuster G, Loza-Álvarez P.

Robust lipid characterization of breast cancer cells resistant to neoadjuvant treatments by Raman spectroscopy: assessing background removal performance.

Cancers, número especial: "Advances in Oncological Imaging" (previsto a finales de abril de 2024).

Comunicaciones en congresos

Ruiz JJ, Carbó, N, Fernández-Nogueira P, Rivas M, Marro M, Fuster G, Loza-Álvarez P.

Characterizing the lipid composition of breast cancer cells resistant to neoadjuvant treatments by Raman spectroscopy: assessing background removal performance.

ICOPVS. Jena (Alemania) 2024. Póster (aceptado).

Carbó N, Fernández-Nogueira P, Castillo E, Oró M, Risso G, Pons L, Urbizu A, Ruiz JJ, Marro M, Arnaldo L, Hernández L, Felip E, Quiroga V, Sanz C, Castillo Gandía A, Muñoz-Mármol AM, Loza-Alvarez P, Fernández PL, Fuster G.

NR4A1/3 and HBB as new predictive biomarkers of neoadjuvant responses in breast cancer patients.

ASEICA 40th Anniversary Congress. La Coruña (España), 2023. Póster.

Fernández PL, Rodríguez-Martínez P, Margelí M, Sanz C, Muñoz-Mármol AM, Urbizu A, Quiroga V, Castillo Gandia A, Cirauqui B, Teruel I, Castellà E, Felip E, Perelló i Fabregat C, Pons L, Hernández León L.

Characterization of Residual TN and HER2 Breast Carcinomas after Neoadjuvant Therapy.

USCAP 2022 Annual Meeting. Los Ángeles (EE. UU.), 2022. Póster.

Ruiz JJ, Marro M, Fernández-Nogueira P, Fuster G, Carbó N, López Plana A, Loza-Álvarez P.

Identification and biochemical characterization of breast cancer cells resistant to neoadjuvant treatment by Raman Spectroscopy.

ECSBM. Reims (Francia), 2022. Presentación de póster y *flash talk*.

Marro M.

Label-free molecular monitoring, screening, and imaging of human cells and tissues by Raman spectroscopy.

BIST Conference, Precision Medicine: Putting Discoveries to Work. *Flash talk*.

Ruiz JJ, Marro M, Fernández-Nogueira P, Fuster G, Carbó N, López-Plana A, Loza-Álvarez P.

Label-free characterization of breast cancer cells resistant to neoadjuvant treatments by Raman micro-spectroscopy imaging.

SPAOM. Salamanca (España), 2022. Conferencia.

Pons L, Altaleb A, Ussene E, Martínez-Cardús A, Rodríguez-Martínez P, Fernández PL.

Conventional and Digital Ki67 Quantification in Luminal, HER2-Negative Breast Cancer: Which One Correlates Better with Oncotype DX?

USCAP 110th Annual Meeting. Congreso virtual e interactivo. Marzo de 2021. Póster.