



MEMÒRIA

25è RETORN SOCIAL DE LA RECERCA
CÀNCER

PERFILS MOLECULARS I MICROESPECTROSCÒPICS INTEGRALS DE CARCINOMES DE MAMA I LA SEVA RESISTÈNCIA AL TRACTAMENT NEOADJUVANT

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. Resum

El tractament neoadjuvant és una estratègia que s'utilitza cada vegada més en carcinomes de mama, especialment en els subtipus HER2+ i triple negatiu (TNBC), ja que aconseguix una taxa de respostes completes patològiques de prop del 30-50% dels casos, segons diferents estudis. Això ha suposat un gran avenç en el pronòstic d'aquesta malaltia, ja que s'ha associat a una supervivència més alta en aquests subtipus. No obstant això, un percentatge de pacients no responen bé a la neoadjuvència, i encara cal aclarir en gran manera els mecanismes subjacents a la resistència a aquest tipus de tractament, entre els quals es comencen a conèixer certes alteracions genètiques i fenotípiques encara escassament definides.

En aquest projecte hem analitzat una sèrie de pacients amb carcinomes mamaris infiltrants primaris que incloïen casos retrospectius i prospectius de fenotips HER2+ i triple negatiu tractats amb quimioteràpia neoadjuvant, entre els quals hi havia bons responedors (resposta patològica completa, RPC) i mals responedors. Per analitzar l'existència d'alteracions en diversos processos i vies, es va utilitzar un panel ampli d'expressió gènica (nCounter® BreastCancer 360 Panel) proveït per una plataforma multigènica (nCounter, NanoString Technologies, Inc.). Aquesta caracterització transcripcional es va fer en mostres de biòpsia pretractament i, en els casos sense RPC, en tumor residual. En alguns casos es van considerar metàstasis a distància aparellades, per tal de tipificar la progressió tumoral al llarg de diverses fases. També es va analitzar el tipus de resposta inflamatòria pre- i posttractament, així com l'expressió del marcador PD-L1 en cèl·lules tumorals i inflamatòries. Les troballes moleculars es van validar en models *in vitro* i *in vivo* utilitzant línies cel·lulars de càncer de mama naïf i resistents a la teràpia. S'ha avaluat l'ús de la microespectroscòpia Raman per tipificar les mostres de mama i el seu ús en l'entorn clínic.

2. Resultats

En aquest estudi es van identificar 214 casos candidats: 117 HER2+ (60 dels quals havien assolit resposta patològica completa) i 97 TNBC (49 amb resposta patològica completa). El perfil transcriptòmic es va caracteritzar mitjançant el panel nCounter Breast Cancer 360 (NanoString Technologies), que conté 776 gens humans en 23 vies

clau del càncer de mama. Finalment, vam analitzar 124 mostres humanes: 72 HER2+, 31 de les quals amb cPR i 40 amb resposta parcial, en què 17 biòpsies eren posteriors al tractament, i 53 TNBC, 20 dels quals amb cPR i 33 amb mala resposta o parcial, en què 17 biòpsies eren posteriors al tractament i una era de metàstasi a distància. També vam caracteritzar el perfil transcriptòmic de 14 línies cel·lulars: 8 HER2+ i 6 TNBC parentals i resistents a diversos tractaments. Es va fer l'anàlisi d'expressió gènica diferencial, que es va basar tant en gens individuals com en signatures biològiques. Vam identificar diversos gens amb baix nivell d'expressió (*AGTR1*, *LAMA3*, *SCUBE2*, *SLC39A6*, *TBC1D9*, *IFT140*) i un amb sobreexpressió (*MARCO*) en les biòpsies pretractades de responedors HER2+ en comparació amb les mostres pretractades de mals responedors o no responedors.

Quan vam fer la comparació per a la cohort pre-NAT TN (pCR = 20; no pCR = 14), no es va observar cap expressió diferent significativa en cap gen entre els que responen i els que no responen, tot i que s'estan afegint més casos.

També vam identificar, en la cohort de HER2+, gens significativament sobreexpressats (*FOS*, *NR4A1*, *NR4A3*, *IL6*, *PDK4*, *OGN*, *FHL1*, *GADD45B*, *FGF2*, *JUN*, *FLNC*, *LPL* i *SPRY*) en el grup posttractament neoadjuvant en comparació amb el grup d'abans del tractament que no va respondre bé. Quan vam comparar la cohort TNBC, vam obtenir resultats similars: sobreexpressió de *FOS*, *NR4A3*, *NR4A1*, *IL6*, *HBB*, *PDK4*, *JUN* i *GADD45*.

També vam analitzar la possible associació entre assajos immunohistoquímics i paràmetres clínics i patològics. Els nostres resultats semblen indicar que els tumors amb TIL alts presenten un grau histològic significativament més elevat i s'associen a una millor resposta al tractament.

Actualment s'està duent a terme l'anàlisi comparativa d'aquests grups i mostres tumorals pel que fa a l'expressió de signatures biològiques.

D'altra banda, vam desenvolupar línies cel·lulars resistents a trastuzumab o lapatinib (MDA-MB-453, SK-BR-3 i BT-474) i dues línies metastàtiques de pulmó derivades d'un model metastàtic de ratolí immunosuprimit (MDA-MB-453). També vam desenvolupar tres línies cel·lulars de TNBC resistents als tractaments habituals com són paclitaxel i

adriamicina: MDA-MB-468, classificada com a línia cel·lular del subtipus basal A, i dues d'elles, BT-549 i MDA-MB-231, com a subtipus baix en claudina (basal B).

Les línies cel·lulars resistents presentaven fenotips resistents a múltiples drogues o fàrmacs, i presentaven una sobreexpressió d'algunes de les proteïnes transportadores tipus ABC, com són l'ABCB1 (proteïna de resistència a múltiples fàrmacs, 1MDR1, o glucoproteïna-P, Pgp) i ABCG2 (proteïna de resistència al càncer de mama, BCRP). Aquestes línies resistents van desenvolupar estratègies metabòliques més oxidatives, una disminució de la senyalització proliferativa i una resistència a l'apoptosi i a l'autofàgia. Aquests resultats concorden amb l'adquisició del fenotip resistent cel·lular. Vam caracteritzar el perfil transcriptòmic d'aquestes línies cel·lulars resistents i els seus parentals. L'expressió gènica d'aquestes cèl·lules semblava molt diferent comparada amb la de les mostres tumorals humanes. Això podria ser perquè les línies cel·lulars estan compostes per grups homogenis de cèl·lules (cèl·lules tumorals), mentre que les biòpsies humanes no només contenen aquestes cèl·lules tumorals, sinó també un microambient tumoral, que inclou cèl·lules estromals i inflamatòries que també poden tenir un paper important en el desenvolupament del càncer.

A més, mitjançant anàlisi *in vitro* vam confirmar alguns membres de la família NR4A com a mediadors comuns putatius de la resistència a la quimioteràpia en TNBC i sobre el potencial metastàtic dels subtipus HER2+. També hem desvelat la rellevància del gen *HBB* en els fenotips resistents, especialment relacionats amb les teràpies dirigides a HER2 i el potencial metastàtic HER2+. D'acord amb els nostres resultats, la sobreexpressió d'*NR4A1* i *HBB* s'ha relacionat anteriorment amb una mala supervivència i un mal pronòstic en diferents càncers, inclòs el de mama, però mai s'havia relacionat amb la predicció de la resposta al tractament. Amb els nostres resultats, proposem *NR4A1* i *HBB* com a potencials predictors de biomarcadors de la resistència al tractament neoadjuvant en pacients amb HER2+ i TNBC.

Mitjançant la implementació de l'espectroscòpia Raman i l'anàlisi multivariant, hem estat capaços de classificar amb una precisió excel·lent les cèl·lules no resistents de tipus salvatge i les cèl·lules resistents als tractaments neoadjuvants de la mateixa línia. Per a les cèl·lules HER2+, les cèl·lules MDA-MB-453 i BT474 no resistents es van distingir de les cèl·lules resistents als tractaments amb lapatinib i trastuzumab, i es van detectar canvis significatius en les seves abundàncies de fosfolípids, DNA i citocrom C.

De la mateixa manera, per a les cèl·lules triple negatives, les cèl·lules MDA-MB-231 i BT549 no resistents es van distingir de les cèl·lules resistents als tractaments amb paclitaxel i adriamicina, i es van detectar canvis significatius en els seus nivells d'insaturació lipídica. La informació química proporcionada es va extreure de manera no destructiva i ajudarà a desentranyar mecanismes de resistència al tractament que encara no s'entenen completament.

També, mitjançant la implementació de la mateixa tècnica, s'ha establert un protocol per comparar els mesuraments Raman de talls de biòpsia de teixit i biòpsies d'agulla gruixuda cilíndrica (*tru-cuts*) amb l'anàlisi histopatològica posterior. S'ha demostrat el seu potencial per identificar diferents seccions de teixit segons el contingut en proteïnes, lípids, col·lagen i carotè, la qual cosa permet la diferenciació del teixit sa del teixit cancerós, validada posteriorment amb l'anàlisi histopatològica. Amb més treball, aquesta tècnica podria ajudar els metges en temps real a avaluar la qualitat de la biòpsia i a diagnosticar el càncer.

3. Rellevància i possibles implicacions futures

Comparant mostres tumorals de pacients que havien respost a tractament amb mostres de pacients que hi havien respost malament o no hi havien respost, es van identificar diversos oncogens i supressors tumorals expressats diferencialment (com *AGTR1*, *LAMA3*, *SLC39A6* i *SCUBE2*). Un cop validats en futurs experiments (amb tècniques d'immunohistoquímica i seguiment clínic, per exemple) que van més enllà d'aquest projecte, podran servir com a biomarcadors predictius de resposta en tumors HER2+ i TNBC. La confirmació experimental tant *in vivo* com *in vitro* també es completarà amb l'anàlisi clínica prospectiva de l'expressió d'aquests marcadors en mostres pretractament de pacients amb càncer de mama. Si aquests biomarcadors demostren la capacitat predictiva clínica dels tractaments neoadjuvants actuals (per exemple, anti-HER2, taxans), es podria proposar el seu ús rutinari en el tractament diari d'aquests dos subtipus de càncer de mama, que podria afectar entorn de 1.000 dones a Catalunya a l'any i millorar-ne la supervivència mitjançant un millor ajust del tractament.

D'altra banda, la troballa dels gens diferencialment expressats en el mateix tumor, abans i després del tractament (*NR4A1*, *NR4A3* i *HBB*), ajuda a entendre millor els canvis metabòlics que afecten les cèl·lules canceroses després del tractament neoadjuvant, cosa que ajuda a desenvolupar noves estratègies terapèutiques i fàrmacs per al tractament del càncer de mama.

Altres biomarcadors, com PD-L1 i TIL, semblen estar associats a la predicció de la resposta. A causa de la seva fàcil implementació, creiem que ara podem utilitzar-los en la gestió d'aquests pacients. De fet, ja s'inclou la informació dels TIL en els informes de diagnòstic de carcinomes invasius de manera rutinària.

A més, el nostre projecte ha demostrat la viabilitat d'analitzar tant línies cel·lulars com mostres fresques de tumor de mama mitjançant Raman i d'obtenir una composició important de la secció de teixit (contingut de proteïnes, lípids, col·lagen i carotè) i informació metabòlica relacionada amb la resistència als fàrmacs d'una manera no destructiva. Això proporciona un nou enfocament diagnòstic per a la gestió del càncer de mama aplicable també a altres tipus de tumors. A més, l'ús viable de les biòpsies d'agulla indica que la microespectroscòpia Raman té el potencial d'implementar-se en la pràctica clínica habitual una vegada que els nostres resultats es confirmen en sèries més grans, i es dissenyin i s'instal·lin dispositius més manejables a les instal·lacions de l'hospital.

4. Bibliografia científica generada

Articles

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" (previst a finals d'abril del 2024).

Comunicacions en congressos

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 (Alemanya) 2024. Pòster (acceptat).

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 Corunya (Espanya), 2023. Pòster.

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 Angeles (EUA), 2022. Pòster.

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 (França), 2022. Presentació de pòster i *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 (Espanya), 2022. Conferència.

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. Congrés virtual i interactiu. Març del 2021. Pòster.