

---

## Explorando el rol nuclear de ErbB-2 en cáncer de mama y en la respuesta a la terapia dirigida al ErbB-2

**Tema:** Estudio sobre la función de la proteína ErbB-2 ubicada en el compartimiento nuclear como impulsora del crecimiento del cáncer de mama y sobre el rol de ErbB-2 nuclear en la respuesta a la acción del Trastuzumab.

**Alumno:** Sharon S. Merin

**Matrícula:** 14-7627

**Directora:** Dra. Rosalia I. Cordo Russo

Laboratorio de Mecanismos Moleculares de Carcinogénesis y Endocrinología Molecular - Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), CONICET.

Universidad de Belgrano, Facultad de Ciencias Exactas.

Licenciatura en Ciencias Químicas, 2022.

Firma:





## Resumen

El cáncer de mama (CM) es una enfermedad con efectos devastadores en la salud global. La sobreexpresión y/o amplificación del receptor de membrana con actividad tirosina-quinasa ErbB-2 (MErbB-2) está asociada a un peor pronóstico en pacientes HER2-positivos. Otro subtipo de tumores con mal pronóstico es el agrupado bajo la denominación CM triple negativo (CMTN): estos no expresan niveles significativos de receptores hormonales (RH) y carecen de sobreexpresión y/o amplificación de ErbB-2. Actualmente no existen biomarcadores para predecir la evolución clínica ni terapias blanco-específicas para CMTN. Se ha identificado que la presencia nuclear de ErbB-2 (NErbB-2) induce el crecimiento tumoral, la metástasis y la resistencia a las terapias dirigidas al ErbB-2 en CM.

Es por ello, que en este trabajo de investigación se estudiará la relevancia clínica y la funcionalidad de la proteína ErbB-2 ubicada en el núcleo responsable de impulsar el crecimiento del cáncer de mama a través de distintas técnicas ensayadas como la tinción por inmunofluorescencia de biopsias de pacientes proveniente de una cohorte latinoamericana donde se explorará su uso como biomarcador clínico de respuesta a terapias asociadas a cáncer de mama HER2-positivo. Por otra parte, se emplearán modelos preclínicos de CM para investigar el rol del bloqueo de la localización nuclear de ErbB-2 sobre el crecimiento tumoral *in vivo*. A su vez, se evaluará, el rol del inhibidor del retrotransporte Retro-2.1, sobre la proliferación celular en líneas celulares de los subtipos de CM presentados con anterioridad. De esta manera, el presente plan brindará una mirada novedosa hacia los tratamientos conocidos en CM y posibles alternativas para el tratamiento clínico.

Palabras claves: crecimiento del cáncer de mama, ErbB-2, ErbB-2 nuclear, cáncer de mama triple negativo, HER2-positivo.

## Abstract

Breast cancer (BC) is a disease with devastating effects on global health. Overexpression and/or amplification of the membrane receptor tyrosine kinase activity ErbB-2 (MErbB-2) is associated with a worse prognosis in HER2-positive patients. Another subtype of tumors with a poor prognosis is grouped under the denomination triple negative BC (TNBC): these do not express significant levels of hormone receptors (HR) and lack ErbB-2 overexpression and/or amplification. Currently there are no biomarkers to predict clinical evolution or specific target therapies for TNBC. The nuclear presence of ErbB-2 (NErbB-2) has been identified to induce tumor growth, metastasis, and resistance to ErbB-2-targeted therapies in BC.

For this reason, this research work will study the clinical relevance and functionality of the ErbB-2 protein located in the nucleus responsible for promoting the growth of breast cancer through different techniques, such as immunofluorescence staining of biopsies of patients from a Latin American cohort

Firma:



where its use as a clinical biomarker of response to therapies associated with HER2-positive breast cancer will be explored. On the other hand, preclinical models of BC will be used to investigate the role of ErbB-2 nuclear localization blockade on tumor growth *in vivo*. In turn, the role of retrotransport inhibitor Retro-2.1 on cell proliferation in cell lines of the BC subtypes presented above will be evaluated. In this way, this plan will provide a novel look at the known treatments in BC and possible alternatives for clinical treatment.

Key words: breast cancer growth, ErbB-2, nuclear ErbB-2, triple negative breast cancer, HER2-positive.

Firma:



## Agradecimientos

*A mis abuelos, Dorita, David y Simon, y a mi tío Jorge,  
quienes ya no están aquí presentes conmigo  
pero estarán siempre en mi corazón.*

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Patricia Elizalde, por haberme abierto las puertas a su equipo y haberme dado la oportunidad de formar parte de su laboratorio. Por motivarme a desarrollarme en la investigación, por sus aportes e ideas invaluable en este trabajo.

Agradezco también, a mi directora, la Dra. Rosalia Cordo Russo quien estuvo presente desde el comienzo ayudándome y enseñándome en mesada, quien me guió en estos primeros pasos en el ámbito científico y me mostró que cuando hay pasión en lo que uno hace, todo vale la pena. Ro, agradezco profundamente tu paciencia y calidez a la hora de enseñar, siempre vas a ser un gran referente para mí.

Al Dr. Santiago Madera, quien ha sido mi maestro, no solo en lo profesional sino en lo personal. La ciencia me ha regalado un gran amigo.

A la Dra. Cecilia Piroietti quien me ha dado palabras de aliento y cariño en todo momento y de quien también he aprendido un montón. Gracias por tu profunda generosidad.

A todo el equipo del Laboratorio de Mecanismos Moleculares de Carcinogénesis y Endocrinología Molecular quienes hicieron que la tarea del día a día sea compartida, de mucho disfrute y un placer.

A los miembros y autoridades del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), especialmente al Dr. Eduardo Charreau, por fomentar la excelencia en investigación y propiciar un buen ambiente de trabajo. Fue un gran orgullo haber formado parte de esta Institución.

A la educación y formación que me brindó la Universidad de Belgrano. Agradezco a todos los docentes que me transmitieron parte de su conocimiento y estímulo, lo que me permitió esforzarme para llegar a donde estoy hoy.

A mis amigos y familia, que son el pilar fundamental de mi vida, son quienes le dan sentido y hacen que la vida compartida con ellos sea maravillosa.

Agradezco a mis hermanas, Sheila y Shazmin. Gracias por motivarme a ser mejor persona y profesional día a día. Ustedes son mis verdaderas maestras en esta vida, gracias por enseñarme tanto. Son mi mayor inspiración.

Firma:

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'P. de'.

Y, sobre todo, a mis padres. Gracias por su esfuerzo incansable para que siempre tenga la mejor educación. Ustedes son quienes me dieron el privilegio de estudiar y voy a estar toda la vida agradecida por ello. Gracias por enseñarme que con esfuerzo y dedicación las cosas llegan. Gracias por los valores, su apoyo y amor incondicional cada día. Los admiro profundamente.

## Índice

1. Marco Teórico	6
1.1 Cáncer de mama	6
1.2 Subtipos de cáncer de mama	7
1.3 ErbB-2 y cáncer de mama	11
1.3.1 ErbB-2: características estructurales y mecanismos clásicos de acción	11
1.3.2 Mecanismo de acción no canónico: NErbB-2	14
1.3.3 Mecanismos de transporte nuclear de ErbB-2	14
2. Antecedentes	17
3. Objetivo general	20
4. Objetivos específicos	20
5. Hipótesis	22
6. Metodología, técnicas y materiales	23
6.1 Pacientes	23
6.2 Líneas celulares	24
6.3 Reactivos generales	25
6.4 Ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal en biopsias	25
6.4.1 Protocolo detallado de la inmunofluorescencia en tejidos desparafinados	25
6.4.2 Reactivos utilizados	27
6.4.3 Puntuación y análisis de muestras	28
6.5 Modelos preclínicos	28
6.5.1 Protocolo detallado de los ensayos in vivo	29
6.6 Ensayos de proliferación celular	30
6.6.1 Protocolo de proliferación por recuento celular en Countess II P/N AMQAX1000	30
6.6.2 Ensayos de inmunofluorescencia en cultivos celulares	31
6.6.3 Ensayo de viabilidad CellTiter-Glo 2.0	31
6.7 Análisis estadístico	32
7. Resultados obtenidos	33
7.1 La expresión de ErbB-2 nuclear se asocia con mal pronóstico en pacientes HER2-positivos tratados con Trastuzumab	33
7.2 ¿NErbB-2 está asociado al pronóstico sólo en CM HR+/HER2+ o HR-/HER2+?	41
7.3 Análisis de ErbB-2 en el núcleo en una segunda cohorte independiente de cáncer de mama	43
7.4 El bloqueo de la localización nuclear de ErbB-2 inhibe el crecimiento tumoral in vivo en un modelo preclínico del CM HER2-positivo resistente a Trastuzumab	48

Firma:



7.5 Retro-2.1 inhibe la localización nuclear de ErbB-2 en células de CM	53
7.6 El bloqueo de la localización nuclear de ErbB-2 con Retro-2.1 inhibe la proliferación celular en células de cáncer de mama	55
8. Discusión	58
9. Conclusión	61
9.1 Aportes del presente trabajo al conocimiento científico y la práctica clínica	61
10. Bibliografía	62
11. Anexo - Datos crudos y análisis estadístico	68
Anexo 1. Resultado clínico de los pacientes con CM HER2-positivo en la cohorte.	68
Anexo 2. Resultado clínico de la cohorte de pacientes en función del estadio clínico.	70
Anexo 3 A. Estudio de la relevancia clínica de ErbB-2 nuclear en CM HER2-positivo (datos no mostrados).	71
Anexo 3 B. La expresión de NErbB-2 se asocia a un mal pronóstico clínico en pacientes con CM HER2-positivos.	76
Anexo 4. Resultado clínico en pacientes con subtipo de CM RH+/HER2+ y HR-/HER2+.	81
Anexo 5. La expresión de NErbB-2 se asocia a un mal pronóstico clínico en pacientes con CM HR-/HER2-positivos.	83
Anexo 6. La HRGβ1 induce el crecimiento tumoral in vivo de los tumores inducidos por las JIMT-1.	86
Anexo 7 A. Tasa de crecimiento de xenoinjertos de JIMT-1.	88
Anexo 7 B. La HRGβ1 induce el crecimiento tumoral in vivo de los tumores inducidos por las JIMT-1 (datos no mostrados).	90
Anexo 8. Efecto del bloqueo de la localización nuclear de ErbB-2 sobre el crecimiento tumoral in vivo.	93
Anexo 9. La inyección de la mutante hErbB-2ΔNLS inhibe la localización nuclear de ErbB-2 en los tumores extraídos al final del experimento.	97
Anexo 10. El enantiómero S de Retro-2.1, inhibe los niveles nucleares en ErbB-2 de las JIMT-1.	98
Anexo 11. Efectos de los enantiómeros de Retro-2.1 sobre la proliferación celular en células JIMT-1.	99
Anexo 12. Efectos de los enantiómeros de Retro 2.1 sobre la proliferación celular en células 4T1.	101
Anexo 13. Efecto de (S)-Retro-2.1 sobre la viabilidad celular en MDA-231.	103

## Introducción

### 1. Marco Teórico

#### 1.1 Cáncer de mama

El cáncer de mama (CM) es una enfermedad compleja y heterogénea que comprende múltiples subtipos de tumores asociados con distintos patrones histológicos, diferentes características biológicas y comportamientos clínicos. De esta manera, el cáncer de mama es la enfermedad que se diagnostica con mayor frecuencia en mujeres, donde anualmente se diagnostican 2.1 millones de casos nuevos siendo así, el cáncer de mama la causa prevalente de muerte en las mujeres con cerca de 626.679 muertes al año en todo el mundo (Bray, 2018).

En Argentina, el CM constituye la primera causa de muerte por patología maligna en mujeres, registrándose 21.500 nuevos casos por año. Si bien la incidencia en nuestro país no es significativamente distinta que la de los países desarrollados, la mortalidad se ve incrementada respecto de dichos países debido a la escasa cobertura médica (obras sociales o prepagas) que alcanzaría sólo al 65% de las mujeres. Esto, sumado a factores socioeconómicos y educacionales adversos, hace que muchos diagnósticos se realicen en forma tardía cuando el tumor se encuentra en estado avanzado.

Asimismo, y si bien no se cuenta aún con estadísticas publicadas en nuestro país, debido a la pandemia de COVID-19 se ha reportado una disminución significativa de los diagnósticos de CM por lo que se estima un aumento de los pacientes diagnosticados con tumores en estadios más avanzados en los próximos años, con un consecuente aumento de la morbilidad y mortalidad por CM (London, 2020).

#### 1.2 Subtipos de cáncer de mama

El diagnóstico del CM se lleva a cabo a través de estudios histopatológicos realizados sobre la biopsia del paciente que incluyen la determinación de los receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP), la expresión de ErbB-2/HER2 en la membrana, y el estudio de la tasa proliferativa por medio de la evaluación del Ki-67 en las células tumorales.

En base a estas determinaciones y siguiendo las normas del Consenso Internacional de Saint Gallen, el CM se ordena, según su clasificación clínica, en cuatro subtipos (Curigliano, 2017):



Firma:



1. Receptor de hormonas-positivo y HER2-negativo (RH+/HER2-) y este a su vez comprende 2 subtipos:
  - “Luminal A-like” donde los RE y RP son positivos, ErbB-2/HER2 es negativo y tiene un Ki-67 bajo. Este subtipo se caracteriza por tener alta presencia de receptores, baja proliferación y por ende, un grado histológico menor.
  - “Luminal B-like” donde el RE es positivo pero el RP es negativo o bajo y tiene un Ki-67 alto. Se caracteriza por tener bajos niveles de los receptores, alta proliferación y por ende, un alto grado histológico.
2. Receptor de hormonas-positivo y HER2-positivo (RH+/HER2+) donde el RE es positivo, RP puede ser positivo o negativo, ErbB-2/HER2-positivo.
3. Receptor de hormonas-negativa y HER2-positivo (RH-/HER2+) que tiene los RE y RP negativos y el ErbB-2/HER2-positivo.
4. Triple negativo que tiene todos los parámetros negativos (RE, RP y ErbB-2/HER2-negativos).

Por otra parte, los cánceres se clasifican en estadios clínicos de I a IV en base al tamaño tumoral, el compromiso ganglionar y la presencia de metástasis a distancia (Singletary, 2002).

- Estadio I: tumores pequeños, sin afectación metastásica de la axila.
- Estadio II: tumores de más de 2 cm o con afectación metastásica de la axila moderada.
- Estadio III: tumores muy grandes o con afectación de piel o músculo pectoral o afectación axilar masiva.
- Estadio IV: metástasis en órganos distantes como el pulmón, hígado, hueso, cerebro, entre otros.

A partir del diagnóstico histopatológico y del estadio clínico, se asigna a cada paciente un esquema de tratamiento que puede incluir estrategias como la cirugía, ya sea conservadora o radical (que incluye la mastectomía), la radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal y/o terapias dirigidas contra blancos moleculares.

Una vez identificado el tipo de tumor y estadio del cáncer, éste puede tener dos alternativas respecto a su tratamiento, la adyuvancia o la neoadyuvancia. La adyuvancia es el tratamiento que se aplica luego de la cirugía ya que, gracias al tipo de tratamiento aplicado, este puede eliminar cualquier célula maligna que pueda quedar en la mama o en el resto del cuerpo. Por otro lado, otro método aplicado particularmente dirigido al cáncer de mama local avanzado es la neoadyuvancia. La terapia

Firma:



neoadyuvante tiene dos objetivos principales. Por un lado, permite desescalar la cirugía para muchas mujeres con tumores más grandes y/o ganglios axilares ya que el mismo consiste en administrar un tratamiento sistémico a fin de reducir el tamaño del tumor antes de que el paciente se someta a cirugía. Por otro lado, proporciona un efectivo tratamiento sistémico (equivalente a la terapia adyuvante) para prevenir la recurrencia del cáncer (Curigliano, 2017).

Los tumores HR+/HER2- son el subgrupo con mayor incidencia, comprendiendo aproximadamente el 70% de los casos de CM. Estos tumores comparten la expresión del RE, cuya participación en CM ha sido reconocida desde hace tiempo. El RE constituye un marcador de pronóstico predictivo muy importante en CM que se basa en la deprivación de estrógenos (Henderson, 2000). Particularmente, resultados de modelos animales y evidencia epidemiológica y clínica indican que los progestágenos y el RP también juegan un rol importante en la tumorigénesis mamaria (Carnevale, 2007). Dentro de los tumores HR+/HER2-, aquellos tumores que son más agresivos y tienen reducida sensibilidad a las terapias endocrinas (Kennecke, 2010; Osborne Schiff, 2011), se denominan tumores *Luminal B-like*, en contraposición a los tumores *Luminal A-like*. Además del mayor grado proliferativo, otra de las características distintivas de los tumores *Luminal B-like* es su menor expresión del RP (Prat, 2013; Curigliano, 2017). Los pacientes con tumores *Luminal B-like* reciben además de hormonoterapia, quimioterapia.

La sobreexpresión del receptor tirosina quinasa ErbB-2 a nivel de la membrana, o su amplificación génica, ocurre en 15-20% de los tumores de mama humanos y define el subtipo de CM ErbB-2-positivo (ErbB-2+), el cual tiene valor pronóstico, predictivo y relevancia terapéutica (Slamon, 1987; Frahm, 2007). Este subgrupo comprende tanto a los subtipos clínicos HR+/HER2+ como HR-/HER2+. La sobreexpresión de ErbB-2 presenta un rol clave en la tumorigénesis mamaria ya que los subtipos de CM que sobreexpresan MErbB-2 o presentan amplificación génica del mismo están asociados a un mayor poder metastásico y peor pronóstico (Slamon, 1989; Ross, 2009; Henderson, 1998). Luego del desarrollo de las terapias dirigidas al ErbB-2, la supervivencia global de pacientes con CM metastásico y la tasa de curación en adyuvancia aumentaron significativamente (Slamon, 2001). Actualmente, existen terapias para pacientes cuyos tumores sobreexpresan ErbB-2. Estas incluyen anticuerpos monoclonales (Trastuzumab (Tzm) y Pertuzumab), inhibidores de la actividad tirosina quinasa (Lapatinib, Neratinib, Tucatinib), y también anticuerpos conjugados a drogas citotóxicas como lo es el Tz-DM1 o el Tz-deruxtecan. El primer tratamiento anti-ErbB-2 aprobado para estadios tempranos y avanzados de CM ErbB-2+ fue el anticuerpo monoclonal humanizado llamado Trastuzumab (Tzm). El Tzm posee beneficios clínicos sustanciales en pacientes con CM avanzado y mejora la supervivencia cuando se administra como terapia única o junto con la quimioterapia. Se sabe que Tzm se une al dominio extracelular IV de ErbB-2 y así suprime la capacidad del ErbB-2 de inducir la activación de vías de señalización (como la vía de supervivencia de PI3K/Akt), lo cual conduce al arresto del ciclo celular e inhibición de la angiogénesis. Además, produce citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Si bien el Tzm proporciona beneficios clínicos sustanciales,

cerca del 60% de los pacientes con CM avanzado que sobreexpresan ErbB-2 no responden al tratamiento inicial con Ttzm (resistencia de novo) o desarrollan resistencia al Ttzm luego del tratamiento (resistencia adquirida) (Slamon, 2001; Esteva, 2002). De esta manera, una gran cantidad de pacientes que sobreexpresan ErbB-2, presentan una problemática y requieren de nuevas terapias. A pesar de la utilidad clínica del Lapatinib en pacientes que presentan resistencia a Ttzm, menos del 25% responde satisfactoriamente al tratamiento, desarrollando resistencia adquirida al Lapatinib (Geyer, 2006). Esto pone de manifiesto que la resistencia a los agentes anti-ErbB-2 constituye un problema clínico relevante. Lamentablemente, no se dispone de biomarcadores clínicos capaces de predecir la respuesta a dichos agentes al momento del diagnóstico (Fig. 1).

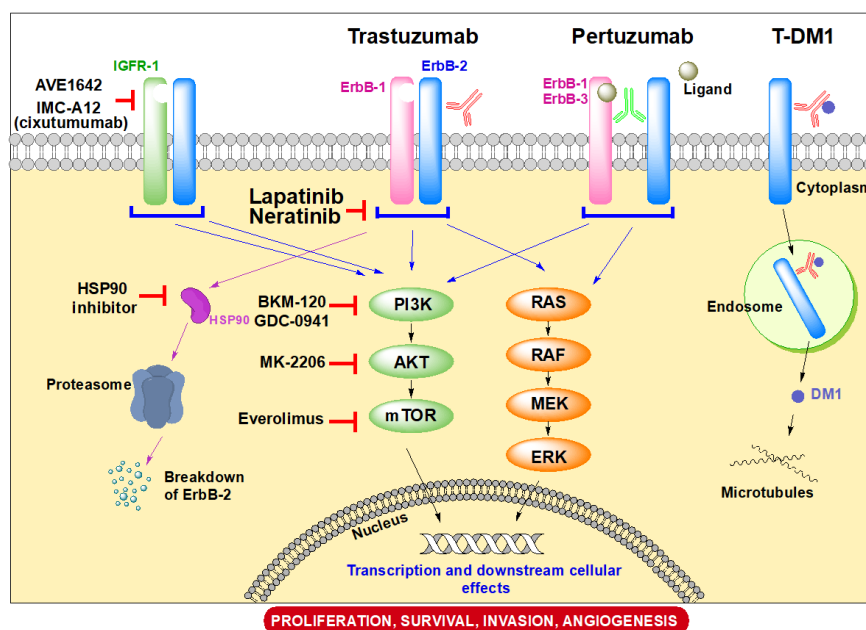


Figura 1. Enfoques moleculares de la terapia dirigida a HER2. Adaptado de Singh, BJC (2014).

Asimismo, el CM triple negativo representa un 12-17% de los CM. Éste se asocia a un curso más agresivo, de peor evolución clínica y no posee una terapia específica, siendo el tratamiento más recomendado la quimioterapia (Dent, 2007). Esto se debe a que este subtipo de tumores no expresa niveles clínicamente significativos de los receptores hormonales de estrógeno (RE) y progesterona (RP), como así también carecen de sobreexpresión y/o amplificación génica del receptor tirosina quinasa ErbB-2. Además de su diagnóstico de exclusión, en la actualidad no existen biomarcadores que permitan predecir su evolución clínica y su respuesta a las terapias, como así tampoco terapias blanco-específicas para ofrecerles a las pacientes además de la quimioterapia convencional (Carey, 2007). En efecto, la baja supervivencia en pacientes con CMTN se debe principalmente a la alta tasa de metástasis viscerales y a la falta de tratamientos efectivos luego de la recaída (Liedtke, 2008).

En la tabla 1 se resumen los subtipos clínicos de CM y los tratamientos de referencia según el subtipo.

Tabla 1. **Clasificación clínico-patológica de CM en base a las determinaciones de marcadores moleculares y estrategias terapéuticas generales recomendadas.** Adaptado del St. Gallen International Expert Consensus 2017.

Definición Clínico-patológica	Subtipos Moleculares	Marcadores Moleculares	Tratamiento de Referencia
<b>RH+/HER2-</b>	<i>Luminal A-like</i>	RE y RP positivos ErbB-2/HER2-negativo Ki-67 bajo	Terapia Endocrina
	<i>Luminal B-like</i>	RE positivo RP negativo o bajo ErbB-2/HER2-negativo Ki-67 alto	Terapia Endocrina y Quimioterapia
<b>RH+/HER2+</b>		RE positivo RP positivo o negativo ErbB-2/HER2-positivo Ki-67 positivo o negativo	Terapia anti-ErbB-2, Endocrina y Quimioterapia
<b>RH-/HER2+</b>		RE y RP negativos ErbB-2/HER2-positivo	Terapia anti-ErbB-2 y Quimioterapia
<b>Triple Negativo</b>		RE y RP negativos ErbB-2/HER2-negativo	Quimioterapia

### 1.3 ErbB-2 y cáncer de mama

#### 1.3.1 ErbB-2: características estructurales y mecanismos clásicos de acción

La familia de receptores tirosina-quinasa tipo I (RTQ-I) se compone de cuatro receptores relacionados: ErbB-1 (EGF-R), ErbB-2 (Neu/HER2), ErbB-3 y ErbB-4 (Yarden and Sliwkowski, 2001) (Fig. 2). En presencia de ligandos, los receptores forman hetero u homodímeros que son transfosforilados por los dominios quinasa activos en su contraparte. Las excepciones son el ErbB-3, que tiene una actividad tirosina-quinasa muy baja, y el ErbB-2, para quien no se conocen ligandos (Arteaga & Engelman, 2014). En cambio, se han descrito hasta el momento una gran cantidad de ligandos para los demás RTQ-I, incluyendo seis ligandos del EGF-R, y todas las isoformas conocidas

del factor de crecimiento Neu/Heregulina/Neuregulina (HRG $\beta$ 1), que se unen al ErbB-3 y ErbB-4 (Harris, 2003; Tzahar, 1996).

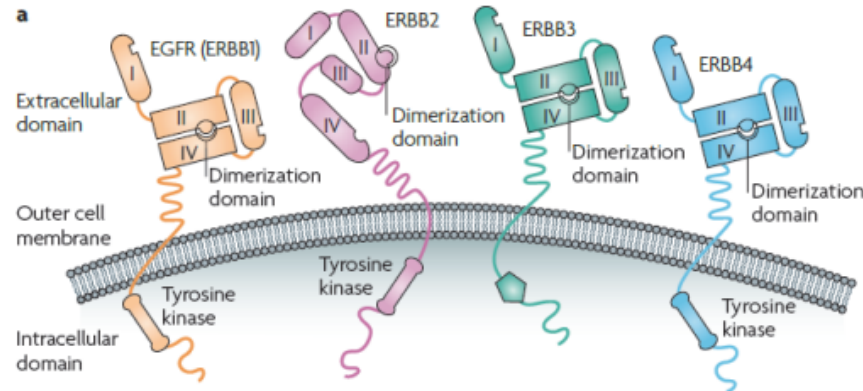


Figura 2. **Estructura de los receptores ErbB.** La familia ErbB está compuesta por 4 miembros. Cada receptor presenta tres dominios funcionales: un dominio extracelular responsable de la unión al ligando, un dominio transmembrana con estructura  $\alpha$ -hélice, y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa, el cual contiene además motivos y residuos específicos que median sus interacciones con los miembros de otras vías de señalización. EGF-R, ErbB-3 y ErbB-4 presentan una conformación “cerrada” en la cual el dominio de dimerización no se encuentra disponible para interactuar con otro de sus compañeros en ausencia de ligando. No existen ligandos conocidos para ErbB-2; este receptor se encuentra en una conformación extendida o “abierta” por lo cual está permanentemente disponible para la dimerización. (Baselga & Swain, 2009).

Una vez fosforilados, los receptores actúan como sitios de anclaje para el reclutamiento de proteínas adaptadoras o enzimas, las cuales inician cascadas de señalización capaces de controlar múltiples procesos celulares. Dos de las principales vías activadas por estos receptores son la de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la de la fosfatidil inositol 3-quinasa/ proteína quinasa B (PI3K/AKT) (Fig. 3). Otras proteínas efectoras importantes para la señalización de los ErbBs son: la tirosina-quinasa soluble Src, la serina-treonina quinasa mTOR (por sus siglas en inglés, mammalian target of rapamycin) y las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (Stats) (Yarden & Sliwkowski, 2001). La respuesta biológica específica desencadenada depende de las interacciones cruzadas entre las vías de señalización activadas.

El ErbB-2, como todos los miembros de la familia de RTQ-I, es una proteína de un solo paso de membrana con 4 dominios extracelulares (I al IV), siendo el dominio IV el más próximo a la membrana plasmática. Los dominios I y III son dominios con capacidad de unión a ligando, y el brazo de dimerización del dominio II promueve la interacción receptor-receptor (Burgess, 2003) (Fig. 2).

Asimismo, el ErbB-2 posee un dominio hidrofóbico que lo ancla y posiciona en la membrana, y una región carboxilo-terminal citoplasmática, donde se encuentra la actividad de tirosina-quinasa y los residuos blanco de esa actividad (Fig. 2). Aunque la molécula de ErbB-2 no puede unir ligandos, la

misma presenta una conformación abierta y extendida que le permite homo o heterodimerizar con los demás ErbBs. De hecho, el ErbB-2 constituye el compañero de dimerización más frecuentemente encontrado formando dímeros con cualquier otro receptor ErbB (Graus-Porta, 1997). Además, de todos los dímeros posibles, el de ErbB-2/ErbB-3 es el de mayor potencial oncogénico, debido en parte a la capacidad única que posee el ErbB-3 de unirse a la subunidad reguladora p85 de la PI3K, y de activar así la vía de AKT (Fig. 3) (Fedi, 1994; Graus-Porta, 1997).

La sobreexpresión de ErbB-2 a nivel de la membrana plasmática, resulta en su homodimerización espontánea y dispara la activación ligando-independiente de la actividad tirosina-quinasa. En este sentido, la desregulación de la expresión y actividad del ErbB-2 ha sido implicada en el desarrollo y la agresividad de numerosos tipos de cánceres humanos (Yan, 2014).

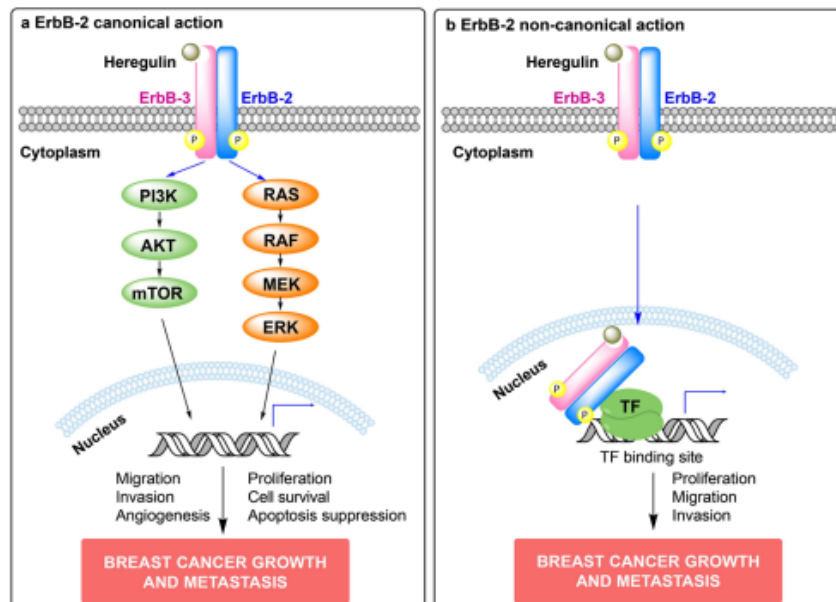


Figura 3. **Acciones canónicas y no canónicas del ErbB-2 en cáncer de mama.** A) Vía de señalización canónica de ErbB-2. Tras la unión del ligando, los ErbB forman homodímeros o heterodímeros, que activan cascadas de señalización aguas abajo y transducen los efectos del ErbBs. Se ilustran los heterodímeros ErbB-2 y ErbB-3 inducidos por heregulina. Las dos vías de señalización clave activadas son las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) p42/p44 y la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/AKT. La activación de la vía MAPK conduce a la transcripción de genes que impulsan la proliferación celular, la migración y angiogénesis, mientras que la activación de la vía PI3K/AKT conduce a los puntos finales aguas abajo, incluida la supervivencia celular y la supresión de la apoptosis. En conjunto, la activación de estas cascadas de señalización promueve el crecimiento y la metástasis de CM. B) Vía no canónica de ErbB-2. La acción no canónica de ErbB-2 implica la translocación nuclear de ErbB-2. Se representa la heterodimerización y la translocación nuclear de ErbB-2/ErbB-3 inducida por heregulina. Una vez en el núcleo, el ErbB-2 puede unirse directamente a sus elementos de respuesta y funcionar como un factor de transcripción, o puede unirse a otros FT y actuar como un coactivador transcripcional. Se muestra un ejemplo de ErbB-2 que actúa como coactivador

Firma:



transcripcional. Las acciones de ErbB-2 nuclear (NErbB-2) también impulsan el crecimiento y metástasis de cáncer de mama. (Cordo Russo, 2019).

### 1.3.2 Mecanismo de acción no canónico: NErbB-2

Notablemente, el dogma del mecanismo de acción del ErbB-2, que lo identifica como un receptor tirosina quinasa de membrana (MErbB-2) con capacidad de inducir vías de señalización mitogénicas que promueven el crecimiento del CM, ha sido desafiado por el descubrimiento de que el MErbB-2 es capaz de migrar al núcleo celular donde actúa como factor de transcripción (FT) por unión directa a secuencias específicas en el ADN llamadas HAS (*HER2-associated sequences*) (Wang, 2004). Trabajos pioneros del Laboratorio de Mecanismos Moleculares de Carcinogénesis y Endocrinología Molecular (IBYME, CONICET) demostraron que por acción de los progestágenos (ligandos del RP), el ErbB-2 migra al núcleo (NErbB-2) donde actúa como coactivador del FT Stat3 en el promotor de Ciclina D1 y p21<sup>CIP1</sup>, genes involucrados en la regulación del ciclo celular, para promover el crecimiento de tumores de mama progestágeno-dependientes (Beguelin, 2010; Diaz Flaque, 2013; Diaz Flaque, 2013). De hecho, se identificó por primera vez que la localización nuclear de ErbB-2 es un biomarcador de mal pronóstico en pacientes con CM ErbB-2-positivos (Schillaci, 2012).

Investigaciones previas, han demostrado que el NErbB-2 presenta un rol fundamental en el crecimiento del CM resistente a Trastuzumab y que el bloqueo de la localización nuclear de ErbB-2 constituye una estrategia terapéutica novedosa para superar la resistencia a los agentes anti-ErbB-2 actuales, que tienen como blanco al MErbB-2 (Cordo Russo, 2015). También se demostró el rol de NErbB-2 como modulador de la expresión del microRNA-21 y de la metástasis (Cordo Russo, 2015). Recientemente, se identificó que ErbB-2, tanto su forma *wild type* como la isoforma c, están presentes en el núcleo de las células de CM triple negativo y poseen un rol crucial en el crecimiento de dichos tumores (Chervo, 2020).

### 1.3.3 Mecanismos de transporte nuclear de ErbB-2

En la actualidad, los mecanismos a través de los cuales ErbB-2 es transportado al núcleo celular constituyen un campo de intensa investigación, desde las moléculas intervinientes en el reconocimiento hasta los procesos por los cuales ocurre la invaginación de la membrana. De hecho, es de conocimiento que el ErbB-2 es transportado al núcleo a través del transporte retrógrado. Estudios realizados en células modelo de CM ErbB-2+ han permitido dilucidar que ErbB-2 se

Firma:



internaliza desde la membrana plasmática por endocitosis y que se transporta en vesículas endocíticas (Giri, 2005; Wang, 2010) que conducen al reciclaje, la degradación o que continúan con el transporte hacia el núcleo (Chen & Hung, 2015; Wang, 2012). Así, luego de la endocitosis, las vesículas endocíticas bifurcan su camino dependiendo de las proteínas cargo a las cuales se asocian, tales como las GTPasas de la familia Rab (Wandinger-Ness & Zerial, 2014), las sintaxinas o las proteínas adaptadoras de clatrin (APs) (Johannes & Popoff, 2008). Las clatrin son proteínas oligoméricas con cadenas pesadas y livianas que se entrecruzan y conforman vesículas revestidas (*clathrin-coated pits*, en inglés). Al internalizar el receptor, las clatrin forman un plegamiento de membrana que rodea al receptor constituyendo la vesícula y dejando al extremo N-terminal hacia dentro del endosoma y al extremo C-terminal, de actividad quinasa y con la señal de localización nuclear expuesta (NLS por sus siglas en inglés: *Nuclear localization sequence*) hacia el citosol. Esto último permite que la NLS interactúe con la Importina  $\beta 1$  (Wang, 2010). Sin embargo, este medio no es el único, sino que también se han encontrado evidencias de internalización mediante mecanismos independientes de clatrin (Austin, 2005; Pedersen, 2008; Sak, 2012; Sorkin & Goh, 2008). La translocación del ErbB-2 continúa hacia la red de trans-Golgi (en inglés, *trans-Golgi network*, TGN) mediante el movimiento dependiente de microtúbulos asistido por la proteína motora dineína. Ésta permite el acercamiento de las membranas de los endosomas tempranos con las membranas del Golgi y su fusión asistida por la proteína Sintaxina 6, perteneciente a la familia de proteínas SNARE (Du, 2014). Durante el transporte citoplasmático-nuclear, el ErbB-2 se asocia a la Importina  $\beta 1$ , un miembro de la familia de proteínas de transporte nuclear, a través de su NLS. El complejo formado por ErbB-2 e Importina  $\beta 1$  interactúa con la proteína del poro nuclear Nup358, lo cual culmina con la inserción nuclear de ErbB-2 (proceso denominado INTERNET) (Giri, 2005; Wang, 2012; Carpenter & Liao, 2013) (Fig. 4). También se ha reportado que la molécula de ErbB-2 intacta es extraída de la doble capa lipídica de los endosomas para translocar al núcleo como una molécula no asociada a membranas por el sistema de degradación asociado al retículo endoplásmico (ERAD, del inglés *Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*) (Tsai, 2002). Tanto para EGF-R como para ErbB-2, el translocon Sec61 situado en el retículo endoplásmico media la retrotranslocación de dichos receptores al citoplasma y su importación en el núcleo (Fig. 4) (Carpenter & Liao, 2013).



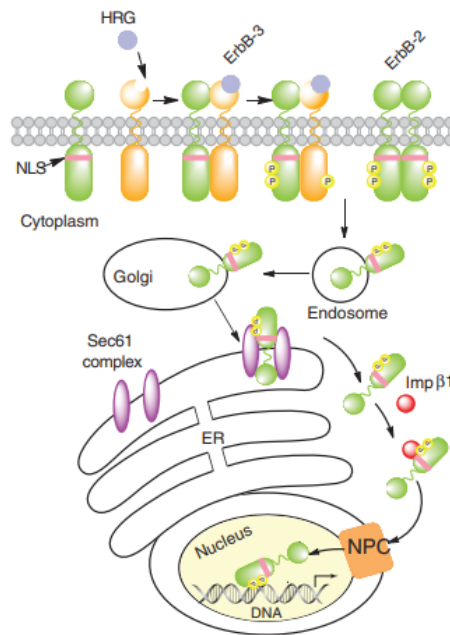
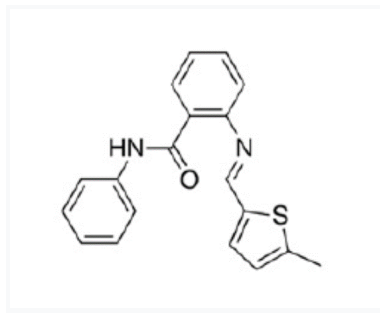


Figura 4. **Modelo propuesto de transporte nuclear de ErbB-2 constitutivo e inducido por ligando (HRG $\beta$ 1) desde la superficie celular hasta el núcleo.** En este modelo, el translocon Sec61, parte de la vía ERAD, se asocia con ErbB-2 en el retículo endoplasmático (ER) y extrae a la molécula de ErbB-2 intacta de la bicapa de la membrana, lo que permite su interacción con la importina  $\beta$ 1 (Imp $\beta$ 1). El complejo ErbB-2/importina  $\beta$ 1 luego interactúa con la proteína de poro nuclear Nup358 lo que da como resultado la translocación nuclear de ErbB-2. NLS, secuencia de localización nuclear. (Elizalde, 2016)

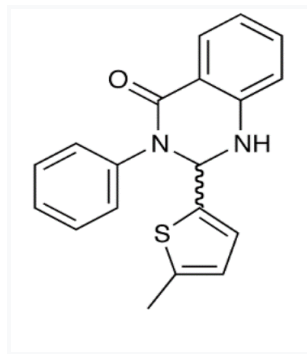
Por otra parte, toxinas exógenas y distintos virus también hacen uso de las vías de transporte retrógrado para favorecer su internalización e infectar células eucariotas. Un análisis de alto rendimiento (*high-throughput*) publicado identificó al compuesto farmacológico Retro-2 como una droga capaz de inhibir el transporte retrógrado de las toxinas bacterianas tipo Shiga (Stechmann, 2010). Gracias a sus características, este compuesto también sería capaz de proteger ratones de intoxicación por exposición a ricinas (Stechmann, 2010).

El Retro-2 (R2) se cicla espontáneamente a su derivado cíclico dihidroquinazolinona (Retro-2cycl), que es el compuesto activo. En consecuencia, los compuestos cíclicos de R2 con actividad mejorada fueron desarrollados. Entre los derivados cíclicos de R2, Retro-2.1 (R2.1) se ha sintetizado como un compuesto racémico en donde sus enantiómeros poseen diferente actividad biológica. Su (S)-enantiómero [(S)-R2.1] mostró más potencia como inhibidor del retrotransporte que su (R)-enantiómero [(R)-R2.1] (Gupta, 2014).

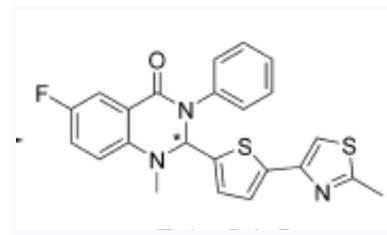
Firma:



Retro-2



Retro-2cycl



Retro-2.1

Figura 5. **Retro-2 y sus derivados cíclicos.** Imágenes de la estructura química de Retro-2, Retro-2cycl, Retro-2.1.

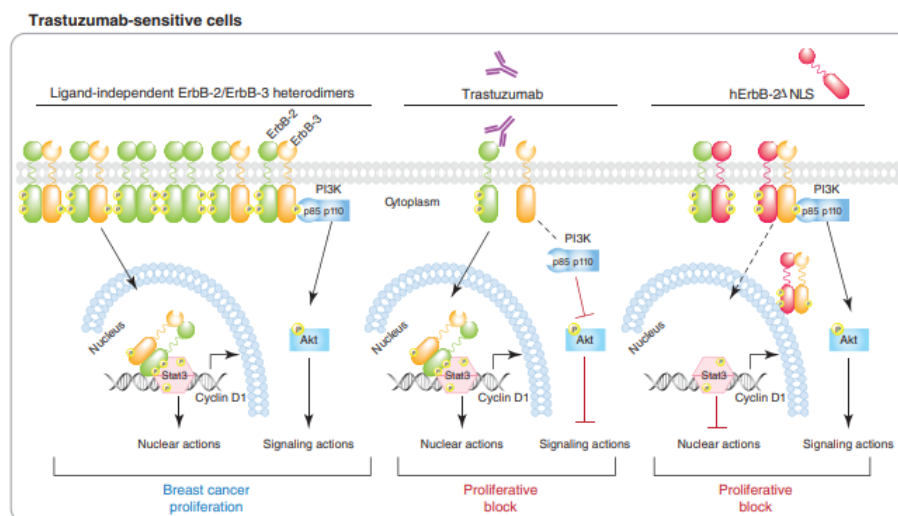
Otros estudios han mostrado la capacidad del Retro-2 y sus análogos de interferir en la infección de virus incluyendo el poliovirus, el papilomavirus, y el reciente coronavirus SARS-CoV2. R2 inhibe el transporte retrógrado principalmente a través de la alteración en la localización subcelular de las sintaxinas 5 y 6, proteínas de fusión involucradas en el transporte retrógrado entre el endosoma temprano y el aparato de Golgi (Stechmann, 2010).

Estudios más recientes revelaron que R2 afecta al retículo endoplasmático al interferir con el componente de salida del retículo endoplasmático, Sec16A, reteniendo la sintaxina 5 (STX5) en el retículo endoplasmático y evitando que esta proteína se recicle hacia la interfaz endosoma temprano/TGN (Forrester, 2020).

De esta manera, el bloqueo del transporte retrógrado podría ser una estrategia novedosa que permitiría modular los niveles nucleares de ErbB-2 en CM y, por ende, de la proliferación celular en diferentes modelos de CM.

## 2. Antecedentes

Descubrimientos del laboratorio de Mecanismos Moleculares de Carcinogénesis y Endocrinología Molecular demostraron que NErbB-2 posee un rol fundamental en la proliferación del CM resistente a Ttzm (Fig. 6). Particularmente, en tumores de este tipo también se hallaron elevados niveles de NErbB-2. Estudios moleculares identificaron que en modelos de CM MErbB-2-positivos, el NErbB-2 promueve el crecimiento tumoral a través de la formación de un complejo transcripcional junto con Stat3 y ErbB-3 (complejo ErbB-2/ErbB-3/Stat3) sobre el promotor de la Ciclina D1 (CCND1), revelando así la primera función nuclear del dímero ErbB-2/ErbB-3. El bloqueo de la localización nuclear de ErbB-2 por transfección con hErbB-2 $\Delta$ NLS, una mutante humana de ErbB-2 que posee delecionada su señal de localización nuclear ( $\Delta$ NLS) y que por ello es incapaz de migrar al núcleo (Beguelin, 2010), permitió identificar que NErbB-2 posee un rol fundamental en la proliferación del CM resistente a Trastuzumab. De hecho, se demostró que en dichos tumores resistentes el Trastuzumab era incapaz de inhibir el crecimiento tumoral por ser incapaz de desensamblar el complejo ErbB-2/ErbB-3/Stat3 (Cordo Russo, 2015). Estos antecedentes ponen de manifiesto la importancia del NErbB-2 en los fenómenos de resistencia a terapias anti-ErbB-2 y resaltan al NErbB-2 como un novedoso blanco terapéutico en CM MErbB-2-positivo resistente.



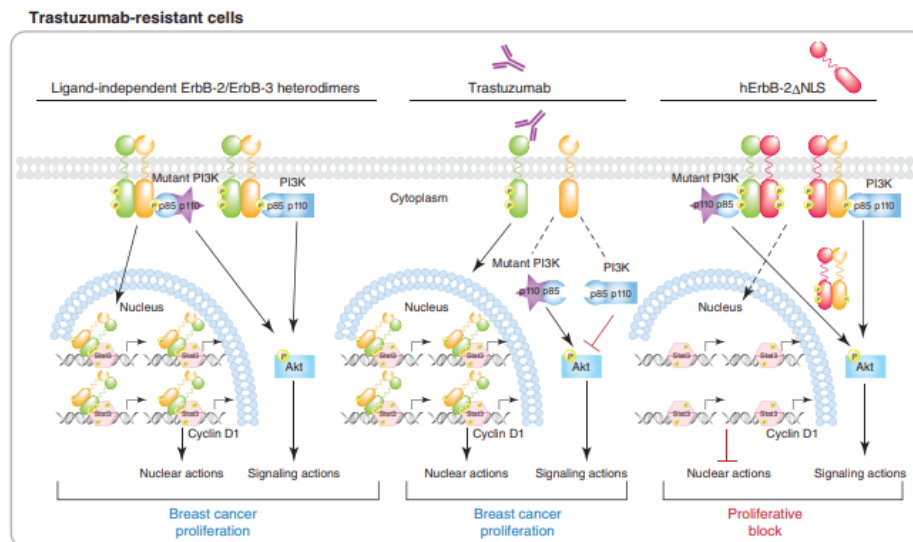


Figura 6. **Rol del ErbB-2 nuclear en la respuesta a Trastuzumab (Tzm).** Las células de CM sensibles a Tzm muestran niveles más altos de MErbB-2 que de NErbB-2. Su proliferación es estimulada por la señalización de ErbB-2 (por ejemplo, PI3K/AKT) y acciones nucleares (por ejemplo, complejo transcripcional Stat3/ErbB-2/ErbB-3 en el promotor de Ciclina D1), ambas, jerárquicamente iguales. La inhibición de la señalización con Tzm o la acción nuclear con hErbB-2ΔNLS inhibe la proliferación. Las células resistentes a Tzm muestran altos niveles de NErbB-2, que suelen ser mayores a los de MErbB-2. De esta manera, el efecto de ErbB-2 nuclear sobre la proliferación es más fuerte que el de MErbB-2. El bloqueo del efecto nuclear de ErbB-2 con hErbB-2ΔNLS previene el crecimiento de CM a pesar de la activación de las cascadas de señalización. Adaptado de Cordo Russo, Oncogene 2015.

Por otro lado, hallazgos más recientes del laboratorio demostraron que el NErbB-2 posee un rol fundamental en la proliferación y crecimiento del CMTN (Fig. 7). En efecto, estudios de la distribución subcelular de ErbB-2 en líneas celulares de CMTN demostraron que efectivamente dichos modelos expresan el receptor, el cual en lugar de estar localizado en la membrana plasmática se encuentra principalmente localizado en el compartimento nuclear (Chervo, 2020). Se reveló que tanto el ErbB-2 de tipo salvaje (WT ErbB-2), codificado por el transcripto canónico T1 (NM\_004448.4), como la isoforma C de ErbB-2, codificada por el transcripto alternativo T3 (NM\_001289936.2), se encuentran en el núcleo e inducen el crecimiento del CMTN a través de su función como reguladores transcripcionales (Chervo, 2020). Asimismo, se descubrió que NErbB-2 es un biomarcador de mal pronóstico en CMTN (Chervo, 2020).

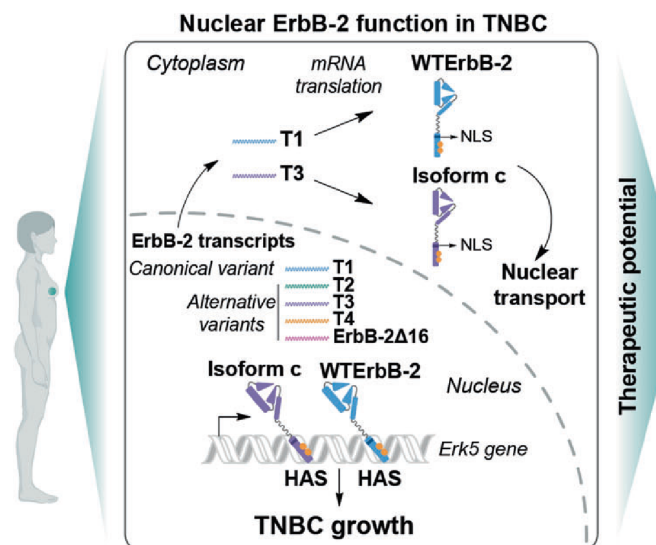


Figura 7. **Acción de NErbB-2 en CMTN.** Adaptado de Chervo, 2020.

Recientemente se ha demostrado que el inhibidor del retrotransporte Retro-2 inhibe la localización nuclear de ErbB-2, tanto de la isoforma canónica WTErbB-2 como de la isoforma c (ErbB-2c), e inhibe la proliferación celular *in vitro* y el crecimiento tumoral *in vivo* del CMTN (Madera, 2022). Los estudios mecanísticos identificaron que R2 induce la acumulación diferencial de WTErbB-2 en los endosomas tempranos y la membrana plasmática y del ErbB-2c en el aparato de Golgi. Estos estudios proporcionan evidencias para el reposicionamiento de Retro-2 como un nuevo agente terapéutico en CMTN (Madera, 2022).

Dado este trasfondo, en el presente trabajo se buscará explorar la funcionalidad nuclear de ErbB-2 y su influencia en los mecanismos de carcinogénesis mamaria. De esta manera, el objetivo del presente trabajo es presentar una potencial herramienta que permita desarrollar un tratamiento para aquellos pacientes a quienes las terapias actuales no les resultan funcionales y además, que NErbB-2 pueda ser utilizado como biomarcador de pronóstico y/o respuesta al tratamiento.

### 3. Objetivo general

El objetivo general del presente plan es el estudio de la funcionalidad nuclear del ErbB-2 en células que sobreexpresan MErbB-2 resistentes a las terapias actuales y también, en las células humanas de CMTN. De esta manera, la intención del mismo es demostrar que la localización nuclear del ErbB-2 posee un rol central en el crecimiento de dichos tumores y que el bloqueo de su localización nuclear constituiría una estrategia terapéutica muy prometedora. Asimismo, se investigará el significado clínico de la localización nuclear de ErbB-2 en biopsias de pacientes teniendo como propósito demostrar que el ErbB-2 nuclear podría ser utilizado como nóvel biomarcador clínico en CM que permitiría predecir ya sea el pronóstico del paciente, como también su respuesta a la terapéutica actual.

Siguiendo con esta línea de investigación, se plantean los siguientes objetivos específicos para este plan de tesis:

### 4. Objetivos específicos

Primera Parte: Explorar el significado clínico de la presencia nuclear de ErbB-2 como biomarcador de pronóstico en biopsias de pacientes con CM.

**Objetivo específico 1-** Explorar la expresión de ErbB-2 nuclear en biopsias de pacientes con CM HER2-positivos tratados con Trastuzumab. Se investigará la presencia nuclear de ErbB-2 por inmunofluorescencia (IF) en muestras de biopsias embebidas en parafina de pacientes con CM utilizando la técnica puesta a punto y validada en el laboratorio (Schillaci, 2012).

1.1. Investigar si la presencia de ErbB-2 nuclear se correlaciona con parámetros histopatológicos del tumor como el tamaño tumoral, el estadio clínico, el grado nuclear, la expresión de receptores hormonales, entre otros.

1.2. Estudiar si la presencia de ErbB-2 nuclear se correlaciona con cambios en la sobrevida general (OS) o en la sobrevida libre de enfermedad (DFS) en pacientes con CM HER2+. Se explorará la utilidad clínica de la determinación de ErbB-2 nuclear como biomarcador de respuesta a las terapias utilizadas actualmente en el tratamiento del CM HER2+.

1.3. Estudiar si la presencia de ErbB-2 nuclear está relacionada con la respuesta a los agentes anti-ErbB-2, en pacientes con CM pertenecientes al subtipo HER2-positivo con receptores de hormonas positivo y HER2-positivo con receptores de hormonas negativas.

Firma:



**Objetivo específico 2-** Explorar la presencia de ErbB-2 nuclear (NErbB-2) en una segunda cohorte independiente de pacientes con CM.

2.1. Se investigará la presencia nuclear de ErbB-2 por IF (Schillaci, 2012) en una colección de tejidos embebidos en parafina y dispuestos en microarreglos de tejidos (TMAs, Tissue Microarray). Dichos TMAs contienen las biopsias de pacientes correspondientes a una cohorte independiente de CM.

Segunda Parte: Explorar la presencia y funcionalidad de ErbB-2 nuclear en modelos de CM.

**Objetivo específico 3-** Investigar el rol de ErbB-2 nuclear en el crecimiento tumoral *in vivo* en un modelo preclínico de CM MErbB-2-positivo resistente a Trastuzumab. Como estrategia para el bloqueo de la localización nuclear de ErbB-2 se utilizará la estrategia de terapia génica ya caracterizada en el laboratorio que es el mutante hErbB-2 $\Delta$ NLS.

**Objetivo específico 4-** Investigar el rol del inhibidor del transporte retrógrado Retro-2.1 (R2.1) como modulador de la presencia nuclear de ErbB-2 y la proliferación en CM. R2.1 es sintetizado como una mezcla racémica, teniendo sus enantiómeros S ((S) Retro-2.1) y R ((R) Retro-2.1) diferente actividad biológica. La capacidad de modular la localización nuclear de ErbB-2 será evaluada por inmunofluorescencia y microscopía confocal. La proliferación celular será evaluada por recuento celular y, a través, de la determinación de ATP.

## 5. Hipótesis

De acuerdo con los antecedentes y objetivos previamente mencionados, la hipótesis central del presente plan es que la determinación de ErbB-2 nuclear podría ser utilizada como biomarcador de pronóstico en CM. En particular, en los pacientes con CM MErbB-2+, la presencia nuclear de ErbB-2 podría además definir la respuesta a las terapias anti-ErbB-2 disponibles en la clínica. En efecto se postula que aquellos pacientes que no responden a las terapias anti-MErbB-2 (como el Tzm) presentan elevados niveles de NErbB-2, los cuales estarían favoreciendo el crecimiento de dichos tumores, mientras que los pacientes sensibles a las mencionadas terapias presentan bajos o nulos niveles de NErbB-2. De esta forma, el ErbB-2 nuclear constituiría una herramienta que permitiría la diferenciación de pacientes capaces de responder o no a las terapias anti-MErbB-2. Se expone además que la presencia nuclear de ErbB-2 juega un rol fundamental en el crecimiento tumoral y es el responsable del mal pronóstico observado en pacientes con CMTN.

En tumores de mama MErbB-2-positivos, la heregulina (HRG $\beta$ 1) presenta un rol clave en la localización nuclear y función del ErbB-2. Se ha reportado la sobreexpresión de HRG $\beta$ 1 en tumores de mama MErbB-2-positivos resistentes a las terapias actuales como el Tzm. Por otro lado, en CMTN se postula que el mecanismo canónico de transporte de ErbB-2 desde el retículo endoplasmático hacia la membrana celular se encuentra alterado, de manera que el ErbB-2 naciente, posiblemente por transporte retrógrado, migraría y se acumularía en el núcleo celular, resultando esto en una alta expresión de ErbB-2 en el núcleo y en una baja o nula expresión a nivel de membrana. En ambos modelos, una vez que el ErbB-2 se encuentra en el compartimento nuclear ejercería sus efectos actuando como FT o como co-activador de FTs y así permitiría la activación de genes clave involucrados en la proliferación y el crecimiento del CM. Entonces, el bloqueo de la localización nuclear de ErbB-2, por ejemplo, utilizando la estrategia de terapia génica que incluye la transfección con una mutante humana de ErbB-2 que posee delecionada su señal de localización nuclear, hErbB-2- $\Delta$ NLS, (Cordo Russo, 2015; Chervo, 2020), inhibiría la proliferación de dichas células e inhibiría el crecimiento *in vivo* del tumor, resultando ésta una estrategia terapéutica muy prometedora para el tratamiento del CM.

Recientemente se ha reportado que la inhibición del transporte retrógrado por tratamiento con Retro-2, conduciría a la disminución de los niveles nucleares de ErbB-2 y a la inhibición de la proliferación en CMTN, constituyendo ésta una estrategia novedosa para el tratamiento de dichos tumores (Madera, 2022). Se postula ahora que el derivado cíclico de Retro-2 llamado Retro-2.1, con sus respectivos enantiómeros (S y R), podrían tener un efecto más potente de forma que podrían ser utilizados en dosis más bajas para el tratamiento de dichos tumores.





## 6. Metodología, técnicas y materiales

El enfoque del presente trabajo será uno cuantitativo ya que el procedimiento de este será secuencial y probatorio para obtener repetitividad en los métodos y así lograr mayor precisión en los resultados. A su vez, se medirán las variables deseables y se analizarán las mediciones obtenidas utilizando métodos estadísticos.

Por otro lado, será un estudio de alcance experimental, porque el desarrollo de este se hará en el laboratorio, y exploratorio ya que se abordará un tema del cual el abordaje e incursión de éste es relativamente nuevo.

### 6.1 Pacientes

Los Comités de Ética de las siguientes instituciones revisaron y aprobaron la colección de especímenes tumorales, la recopilación de datos clínicos y patológicos de los pacientes, así como el análisis retrospectivo de biomarcadores en especímenes anonimizados, provenientes de sus cohortes archivadas: Universidad de La Frontera - Hospital de Temuco (Chile), Hospital de Agudos "Juan A. Fernández" (Buenos Aires, Argentina), Hospital Aeronáutico Central (Buenos Aires, Argentina) e Instituto Henry Moore (Buenos Aires, Argentina).

El estudio se condujo de acuerdo con los principios éticos para investigación médica delineados en la Declaración de Helsinki, y se obtuvieron consentimientos informados por escrito de todos los pacientes previo a su inclusión en el estudio. El estadio de los pacientes antes del tratamiento fue clasificado de acuerdo con el sistema del American Joint Committee on Cancer (EE. UU.) (Singletary, 2002). Para la determinación del grado histológico se utilizó el sistema de Elston y Ellis (Page, 1995).

Para explorar la presencia de ErbB-2 nuclear postulada con biomarcador, se utilizaron biopsias embebidas en parafina de pacientes obtenidas a través de los hospitales e institutos mencionados previamente. Para ello, las distintas instituciones brindaron la información recopilada del paciente, ante la aprobación de éste, y cooperaron en el análisis de sus respectivos datos clínicos y patológicos.

De esta manera, se seleccionaron 105 muestras de tejido correspondientes a carcinomas mamarios invasivos HER2-positivos, con una mediana de seguimiento de 60 meses. Los criterios preestablecidos de inclusión para el estudio fueron: mujeres de 20 a 89 años (vivas o difuntas) diagnosticadas con CM, en estadios I-III, tratadas con cirugía, que recibieron Trastuzumab (en

Firma:



condiciones de adyuvancia o neoadyuvancia); y/o radioterapia; y/o quimioterapia con antraciclinas, taxanos, y/o compuestos derivados del platino; y/u hormonoterapia, siguiendo los protocolos estandarizados. Todas las pacientes fueron sometidas a terapia dirigida a ErbB-2 donde el 98% de ellas recibió Tzm en adyuvancia y el 2% restante en neoadyuvancia. El recorrido de la paciente se evaluó teniendo en cuenta en un determinado tiempo y si la misma tuvo recaída o no, entre otros factores (Schillaci, 2012).

Una observación a tener en cuenta es que las pacientes cuyo estado era IV, fueron excluidas del análisis en cuestión ya que las mismas son metastásicas.

Para llevar a cabo el estudio de asociación entre la expresión de NErbB-2 y el pronóstico clínico, se tomaron en cuenta distintos factores. Los principales a considerar fueron la supervivencia libre de enfermedad (DFS), supervivencia libre de metástasis a distancia (DMFS) y supervivencia libre de recaída local (LRFS). La DFS se definió como el tiempo desde el diagnóstico de CM hasta el primer registro de recurrencia o muerte, cualquiera haya ocurrido primero. Por otra parte, la DMFS y LRFS se definieron como el tiempo desde el diagnóstico al primer registro de metástasis a distancia o una recurrencia local, respectivamente. A su vez, la recurrencia local es la definida como la recurrencia dentro de los límites de la mama ipsilateral y los ganglios linfáticos regionales. Por otra parte, la recaída a distancia fue definida como recurrencias de CM que ocurren más allá de los límites de la mama, la pared torácica o los ganglios linfáticos regionales. Los sitios de recaída a distancia incluyeron el cerebro (y el sistema nervioso central), hígado, pulmón, hueso, peritoneo y ganglios supraclaviculares. Finalmente, el criterio de valoración secundario fue la supervivencia global (OS, en inglés, *overall survival*).

## 6.2 Líneas celulares

Se utilizaron líneas celulares de CMTN: MDA-231 (humanas) y las 4T1 (murinas); y de CM ErbB-2-positivo: JIMT-1 (humanas). Las células MDA-231 fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EE. UU.) y se mantuvieron en DMEM/F12 (Corning Inc., NY, EE. UU.) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) (Suero Biotecnológico, Internegocios S.A., Buenos Aires, Argentina). De la misma manera que las 4T1. Las JIMT-1 fueron obtenidas a través del Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Alemania) y también se mantuvieron en DMEM/F12 + 10%SFB. Las líneas celulares MDA-MB-231, JIMT-1 y 4T1 fueron utilizadas para los ensayos de proliferación celular. Además, las JIMT-1 para ensayos de crecimiento tumoral *in vivo* y microscopía confocal. En todos los casos se controló en forma periódica la contaminación de los cultivos celulares y se renovó su respectivo medio de cultivo.

Firma:



### 6.3 Reactivos generales

Las sales y solventes orgánicos utilizados en este trabajo, de calidad pro-análisis certificada, fueron comprados a Merck (Millipore Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.), Mallinckrodt Pharmaceuticals (St. Louis, MO, EE. UU.) o Millipore Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.). Los enantiómeros S y R purificados de Retro-2.1 (6-Fluoro-1-methyl-2-(5-(2-methylthiazol-4-yl)thiophen-2-yl)-3-phenyl-2,3-dihydroquinazolin-4(1H)-one; C<sub>23</sub>H<sub>18</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>; R2.1) fueron adquiridos a ChiroBook (Wlfen, Alemania), resuspendidos en DMSO (50 mg/ml) y almacenados a -20°C hasta su uso. La heregulina β1 (HRGβ1) se obtuvo de R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, EE. UU.).

### 6.4 Ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal en biopsias

Una vez recibidos los cortes de las biopsias fijadas en formalina y embebidas en parafina de los pacientes, la recuperación del antígeno se realizó sumergiendo las secciones en ácido cítrico 10 mM a pH 6 y calentando en microondas a alta potencia durante 4 min. Luego, se bloquearon con buffer Hanks modificado (MHB) con 5% albúmina durante 30 min y se incubaron durante la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios ErbB-2: C-18, que reconoce la región terminal carboxi (C) ErbB-2 (C18, Santa Cruz Biotechnologies, sc-284), Posteriormente se incubaron los portaobjetos con el correspondiente anticuerpo conjugado, AlexaFluor 488. La reducción del fondo autofluorescente se realizó mediante incubación con Sudan Black B 0.1%. Los núcleos se tiñeron con DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindol) dado que es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN. Los vidrios fueron analizados por un sistema de microscopía láser confocal Olympus DSU. Los controles negativos se realizaron con MHB en lugar de anticuerpos primarios o utilizando un ErbB-2 péptido competitivo. Las expresiones de ErbB-2, tanto en membrana y núcleo se evaluaron en matrices duplicadas (Schillaci, 2012).

#### 6.4.1 Protocolo detallado de la inmunofluorescencia en tejidos desparafinados

Para llevar a cabo la inmunofluorescencia en cuestión se siguió el siguiente protocolo establecido (Schillaci, 2012):

- 1) Desparafinado

Se utilizó un coplin. Se realizaron los siguientes lavados ya que el tejido contiene parafina:

Firma:



- 15 minutos con xilol en campana química.
- 15 minutos con xilol puro en campana química.
- 7 minutos con etanol 100%.
- 7 minutos con etanol 96%.
- 7 minutos con etanol 70%.
- 7 minutos con etanol 50%.
- Enjuague con agua hexa destilada.

## 2) Recuperación del antígeno

Se incubó con ácido cítrico (10 mM) a pH 6 en un recipiente de plástico con canasta para portaobjetos en el microondas 3 minutos a máxima potencia. Luego, se dejó un minuto a temperatura ambiente, se controló el volumen y se agregó agua por pérdida del mismo. A continuación, se incubó por un minuto más en ácido cítrico (10 mM) a pH 6 en el microondas. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se realizaron dos lavados, uno con agua y otro con buffer MHB.

## 3) Bloqueo

Los vidrios se incubaron con MHB + BSA 5% 30 minutos con agitación constante y se secó el tejido con papel absorbente. Posteriormente se marcó un círculo con un lápiz hidrófobo "Dako pen" alrededor del tejido para que la tinción quede contenida en la zona de interés.

## 4) Incubación con anticuerpo primario

Se preparó una cámara húmeda con un recipiente plástico con papel absorbente humedecido con agua y se colocaron los vidrios toda la noche en la cámara con 100  $\mu$ l de la dilución 1/100 del anticuerpo primario (ErbB-2, C18) en buffer MHB.

## 5) Incubación con anticuerpo secundario

Pasada la noche, se lavaron los vidrios dos veces con MHB por 10 minutos en un coplin con agitación constante. Estos se secaron y se colocaron 100  $\mu$ l de la dilución 1/750 del anticuerpo secundario (anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con el fluorocromo AlexaFluor 488) en buffer MHB.

Firma:



Luego, se incubó el anticuerpo secundario 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad (sin el parafilm) y se lavó con MHB 10 minutos con agitación constante. Por último, se lavó con MHB + tritón 0.1% 10 minutos.

#### 6) Bajada de autofluorescencia

Posteriormente se incubó con Sudan Black B 0.1% en etanol 70% y se lavó dos veces con MHB por 10 minutos.

#### 7) Tinción de núcleos y montaje

Por consiguiente, se incubó con DAPI (solución madre 2 mg/ml, 1/1000 en agua) por 10 minutos a temperatura ambiente y se colocaron 100  $\mu$ l de la solución de DAPI. Para finalizar esta técnica se lavó con MHB 2 veces, se secó el tejido con papel absorbente, se puso una gota del líquido de montaje (Vectashield) y se selló la placa con esmalte.

### 6.4.2 Reactivos utilizados

Buffer MHB (Modified Hank's Buffer)

- MgSO<sub>4</sub>. 7 H<sub>2</sub>O 0.4012 g.
- KCl 0.8 g.
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.12 g.
- NaCl 16 g.
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.0956 g.
- Glucosa 2 g.
- NaHCO<sub>3</sub> 0.70 g.
- EGTA 8 ml de solución 0.5 M.
- MES 40 ml de la solución 0.25 M.
- NaN<sub>3</sub> 0.10 g.

Ácido Cítrico: 2.1g en un litro de agua hexa destilada.

Sudan Black B: 0.1 g de Sudan Black B en 100 ml de etanol 70%.

Firma:



### 6.4.3 Puntuación y análisis de muestras

Una vez que las tinciones fueron analizadas a través de la microscopía confocal, las imágenes fueron visualizadas utilizando el programa Image J donde de cada muestra se evaluó la fluorescencia correspondiente al canal verde (AF488, en que se marcó ErbB-2) y al canal azul (DAPI, núcleos). Se analizó la tinción de cada canal por separado y también la superposición de ambos canales para poder identificar si la marca en verde de ErbB-2 posee superposición o no con la marca en azul de los núcleos. El campo claro da evidencia de la morfología de la muestra en cuestión. Luego, estas fueron evaluadas para la expresión de ErbB-2 en el núcleo por 2 patólogos, Pablo Guzman y Agustina Dupont, y la Dra. Rosalia Cordo Russo según la intensidad de la tinción y el porcentaje de células que representan esa tinción. En la evaluación ellos puntuaron lo siguiente (Schillaci, 2012):

- 0: se observa una tinción/marcación débil o inexistente en el núcleo en menos de un 10% de las células.
- 1+: se observa una tinción débil en el núcleo en un 10-25% de las células.
- 2+: se observa una tinción moderada en el núcleo en un 26-50% de las células.
- 3+: se observa una marcación intensa/fuerte en el núcleo en más del 50% de las células.

En caso de los TMAs los mismos fueron puntuados para la expresión de ErbB-2 en el núcleo y en membrana por Pablo Guzman. El ErbB-2 de membrana fue puntuado de acuerdo con las guías establecidas por la American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists (ASCO/CAP) (Wolff, 2013).

### 6.5 Modelos preclínicos

Se utilizaron ratones hembra vírgenes inmunocomprometidos [N:NIH (S)-Foxn1 nu, procedentes del National Institute of Health (NIH, Estados Unidos)] para los experimentos de xenotransplantes de la línea celular JIMT-1 siendo estas representativas de CM ErbB-2-positivo resistente a Tzm. Los mismos fueron criados en el bioterio de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de La Plata, y alojados en el bioterio del IBYME. Estos tenían 5 semanas cuando llegaron de La Plata, y los experimentos fueron realizados con animales de aproximadamente 2 meses de edad (6-8 semanas). El transporte y alojamiento se realizó bajo condiciones de asepsia. Todos los estudios se realizaron de acuerdo con los estándares de cuidado y uso de animales de laboratorio del NIH (Guide for the

Firma:



Care and Use of Laboratory Animals, 1996). Todos los ensayos presentados fueron revisados y aprobados por La Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL).

Para todos los casos se asignaron unidades experimentales a los distintos grupos experimentales de manera aleatoria empleando un diseño de grupos paralelos. Brevemente, cada animal de un grupo fue designado para recibir un tratamiento dado empleando una tabla de números al azar para continuar con los ensayos *in vivo* descritos a continuación.

### 6.5.1 Protocolo detallado de los ensayos *in vivo*

Las células JIMT-1 ( $3 \times 10^6$ /tumor) se inocularon por vía subcutánea (s.c.) en el flanco en ratones hembra vírgenes NIH (S)-nude. Simultáneamente, los ratones fueron inyectados s.c. con un *depot* de 5  $\mu\text{g}$  de un *pellet* de liberación lenta de heregulina (HRG $\beta$ 1). El *pellet* fue elaborado encapsulando una mezcla de HRG $\beta$ 1 liofilizada con seroalbúmina bovina (BSA) en un copolímero de acetato de etileno (“Elvax”) disuelto previamente en diclorometano.

El *pellet* de HRG $\beta$ 1 se preparó según lo reportado previamente (Cordo Russo, 2015) Brevemente, una mezcla liofilizada que contenía 100  $\mu\text{g}$  de HRG $\beta$ 1 humana recombinante y 25 mg de albúmina de suero bovino (BSA) como vehículo, se suspendió en 125  $\mu\text{l}$  de copolímero de acetato de etileno (Elvax 40W, generosamente donado por Simko, Bs As, Argentina) disueltos previamente en diclorometano (20% p/v). La mezcla se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se secó al vacío. El sedimento seco de Elvax se comprimió entre pinzas y se cortó al peso (1,0 mg = 5  $\mu\text{g}$  HRG $\beta$ 1). A los ratones se les implantaron pellets por vía subcutánea usando un trocar en el costado del inóculo celular. Como control, se preparó un *pellet* de Elvax con BSA solo.

Una vez que los tumores alcanzaron un volumen medio de 50  $\text{mm}^3$ , los animales del grupo con *pellet* de HRG $\beta$ 1 fueron divididos al azar en dos grupos experimentales y fueron tratados con inyecciones intratumorales del mutante hErbB-2 $\Delta$ NLS o del vector vacío (pEGFPN-1) como control, una vez por semana durante 5 semanas. Para cada inyección, tanto el vector mutante como el vector control fueron diluidos en DMEM/F12 a una concentración final de 11  $\mu\text{g}$  de DNA/25  $\mu\text{l}$  medio (0.44  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) y se llevaron a un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  con el reactivo de transfección X-treme GENE HP (Roche) (Chervo, 2020).

Los tumores de todos los experimentos fueron medidos dos a tres veces por semana con un calibre vernier. El volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ) fue calculado como  $(L \times A^2)/2$ , donde L=largo (mm) y A=ancho (mm). La tasa de crecimiento tumoral fue determinada como la pendiente de la curva de crecimiento,

Firma:



utilizando el software GraphPad Prism. Cuando los animales fueron sacrificados, se extrajeron los tumores y fueron fijados con formalina (PBS + formaldehído 10%) para su posterior análisis histopatológico y/o inmunomarcación (Chervo, 2020; Madera, 2022).

## 6.6 Ensayos de proliferación celular

Para llevar a cabo los ensayos de proliferación celular se repicaron las células dejándolas crecer en su respectivo medio de cultivo y luego se sembraron en placas de 12 hoyos de fondo plano (P12) a una densidad de 20.000 - 40.000 células por hoyo (según la línea celular). Luego de 24h, las mismas fueron tratadas con el enantiómero R y S del fármaco Retro-2.1 en distintas concentraciones (100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 20  $\mu$ M) por 48 hs. Para este ensayo se realizaron los controles de células no tratadas y tratadas con DMSO (vehículo utilizado para resuspender Retro-2.1) (Madera, 2022).

Luego de las 48 horas de tratamiento, la densidad celular fue evaluada a través de un contador de células automatizado, Countess™ II, Thermo Fisher (AMQAX1000). De manera alternativa, la viabilidad fue evaluada utilizando el kit CellTiter-Glo 2.0 basado en la determinación de ATP. Este método evalúa el metabolismo celular y constituye una medida indirecta de la proliferación celular.

### 6.6.1 Protocolo de proliferación por recuento celular en Countess II P/N AMQAX1000

El siguiente protocolo se utilizó para realizar el recuento de la proliferación celular con las células 4T1 y JIMT-1 (Madera, 2022):

- 1) Aspirar el medio, lavar con PBS 1x suavemente y agregar 200  $\mu$ l de tripsina-EDTA.
- 2) Incubar de 5 a 10 minutos en estufa a 37 °C.
- 3) Agregar el doble de volumen que se utilizó con la tripsina de medio con suero y pasar a tubos eppendorf. Hacer un lavado con aproximadamente 200  $\mu$ l de PBS 1x para quitar el resto de las células.
- 4) Centrifugar 10 minutos a 2000 rpm, sacar el sobrenadante y dejar solo el pellet.
- 5) Agregar 500  $\mu$ l de PBS.
- 6) Centrifugar nuevamente 10 minutos a 2000 rpm y descartar el sobrenadante con pipeta hasta dejar el pellet solo.
- 7) Resuspender 200  $\mu$ l de trypan blue 1x.



Firma:



- 8) Homogeneizar bien las células, aguardar 30 segundos y poner 10  $\mu\text{l}$  en la cámara de conteo.

### **6.6.2 Ensayos de inmunofluorescencia en cultivos celulares**

Las células JIMT-1 crecidas sobre cubreobjetos sujetas al tratamiento con (S)-Retro-2.1 en dosis de 50 y 100  $\mu\text{M}$ , se fijaron con metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se incubaron con anticuerpos específicos para ErbB-2, y anticuerpos secundarios conjugados a AlexaFluor 546 (rojo, Molecular Probes). Los núcleos se tiñeron con DAPI. De esta manera, las células fluorescentes fueron analizadas utilizando la microscopía confocal. El análisis cuantitativo de las imágenes de microscopía confocal se realizó con el programa ImageJ donde se estudió la localización del ErbB-2 en el núcleo, y en la totalidad de las células, según lo reportado previamente (Cordo Russo, 2015; Chervo, 2020).

### **6.6.3 Ensayo de viabilidad CellTiter-Glo 2.0**

El siguiente protocolo se utilizó para realizar el ensayo de viabilidad CellTiter-Glo 2.0 con las células MDA-231:

Las condiciones en las que se realiza el ensayo son con poca luz ambiente.

- 1) Pipetear la cantidad necesaria de CellTiter-Glo, poner en baño de agua y llevar a  $22^{\circ}\text{C}$ .
- 2) Agregar a una P96 de fondo plano 100  $\mu\text{l}$  de medio.
- 3) Equilibrar la P96 por 30 minutos a temperatura ambiente.
- 4) Agregar 100  $\mu\text{l}$  de CTG y con ayuda de un shaker orbital, mezclar durante 2 minutos.
- 5) Con una pipeta multicanal pasar el contenido de la P96 de cultivo a la P96 opaca.
- 6) Tapar con papel aluminio y dejar reposar 10 minutos.
- 7) Medir la luminiscencia (RLU) con el luminómetro. (Fig. 8)

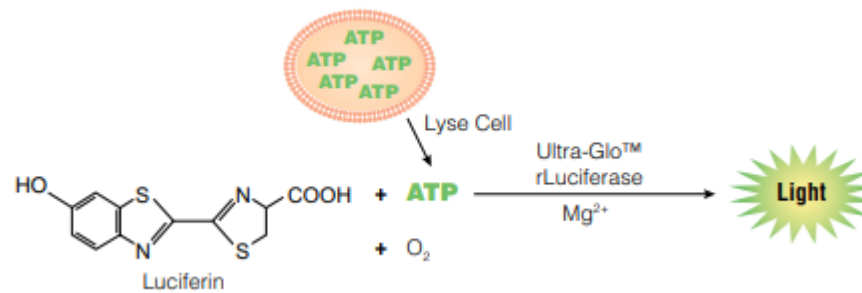


Figura 8. **Descripción general del principio del ensayo CellTiter-Glo 2.0.** La monooxigenación de la luciferina es catalizada por luciferasa en presencia de Mg<sup>2+</sup>, ATP, que aportan las células viables y oxígeno molecular. (Manual técnico del CellTiter-Glo 2.0, instrucciones para el uso de productos, revisado el 10-18).

## 6.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico del trabajo de investigación en cuestión se conforma de diversas partes:

Cuando se compararon dos grupos se utilizó la prueba t de Student. Cuando tres o más grupos se compararon, se utilizó la prueba de ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Dunnett, para determinar la significación entre grupos.

En los ensayos de crecimiento tumoral *in vivo*, no se emplearon métodos estadísticos a priori para predeterminar los tamaños muestrales, pero los mismos estuvieron en línea con aquellos reportados en trabajos previos (Alonso, 1999; Carnevale, 2007; Cordo Russo, 2015; Peters, 2003; Rivas, 2012). La comparación de los volúmenes tumorales entre los distintos grupos se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguida de una prueba de Tukey. La comparación de la media de los volúmenes tumorales de los distintos grupos al momento de la necropsia (o antes de comenzar el tratamiento) se realizó utilizando la prueba t de Student. Las velocidades de crecimiento se calcularon como las pendientes de las curvas de crecimiento, empleando un análisis de regresión lineal, y las pendientes fueron comparadas mediante un análisis de varianza, seguido de una prueba de paralelismo para determinar la significación estadística de las diferencias. (Madera, 2022).

Las correlaciones entre variables categóricas se llevaron a cabo mediante una prueba de Chi-Cuadrado, o una prueba exacta de Fischer cuando el número de observaciones obtenidas para el análisis resultaba pequeño. Específicamente, se seleccionó la prueba exacta de Fisher cuando el número de valores esperados era menor a cinco, ya que usa la distribución hipergeométrica exacta para calcular el valor *p* (Upton, 1992). Las probabilidades de supervivencia se calcularon de acuerdo con el método de Kaplan-Meier, y la significación estadística se analizó mediante el log-rank test o prueba de Breslow-Wilcoxon. El modelo en cuestión se basa en la estimación de las probabilidades

Firma:



condicionales en cada punto temporal cuando tiene lugar un evento y toma el límite del producto de esas probabilidades para estimar la tasa de supervivencia en cada punto temporal así pudiendo calcular la supervivencia promedio y la supervivencia libre de enfermedad de cada paciente (Madera, 2022).

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA, EE. UU.) y SPSS Software (SPSS, Inc., Chicago, IL, EE. UU.). Todas las pruebas de significación estadística fueron de dos colas. Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (Madera, 2022).

## 7. Resultados obtenidos

### 7.1 La expresión de ErbB-2 nuclear se asocia con mal pronóstico en pacientes HER2-positivos tratados con Trastuzumab

En el presente trabajo se decidió explorar la relevancia clínica de la expresión nuclear de ErbB-2 en CM HER2/MErbB-2-positivo. Para ello, se cuenta con una cohorte de 105 pacientes con tumores de mama primarios MErbB-2-positivos en estadio temprano de mujeres de América Latina. Estas muestras pertenecen al subtipo HER2-positivo, e incluye tanto muestras RH+/HER2+ como RH-/HER2+, de acuerdo con la clasificación de subtipos clínicos de CM (St. Gallent, 2017). Los datos clínico-patológicos completos de la cohorte evaluada se detallan en la Tabla 2. Todas las pacientes fueron operadas y tuvieron un régimen de tratamiento que incluyó Ttzm. El 98% de las pacientes recibieron Ttzm en adyuvancia, y un número menor de las mismas, 2%, lo recibió en neoadyuvancia según los nuevos estándares de tratamiento (St. Gallent, 2017) (Tabla 2). Además, el 96.19% de las pacientes recibieron además quimioterapia en adyuvancia (Tabla 2).

Tabla 2. Características clínico-patológicas en pacientes con cáncer de mama.

Característica	Cohorte total	
	Nº pacientes	%
<b>Número total de pacientes</b>	105	
<b>Edad (años)</b>		
Media	51.29	
SD	11.67	
Rango	25-81	
<b>Duración del seguimiento (meses)</b>		
Mediana	60.1	
Rango	6.2-173	
<b>Estado menopáusico</b>		
Premenopáusico	50	47.62
Postmenopáusico	55	52.38
<b>Tamaño tumoral</b>		
T0	7	6.67
T1	36	34.29
T2	37	35.24
T3	12	11.43
T4	5	4.76
No documentado	8	7.62
<b>Estado de los ganglios linfáticos</b>		
N0	45	42.86
N1	23	21.90
N2	16	15.24
N3	13	12.38
No documentado	8	7.62
<b>Metástasis a distancia al diagnóstico</b>		
M0	105	100.00
M1	0	00.00
<b>Estadio clínico</b>		
I	22	20.95

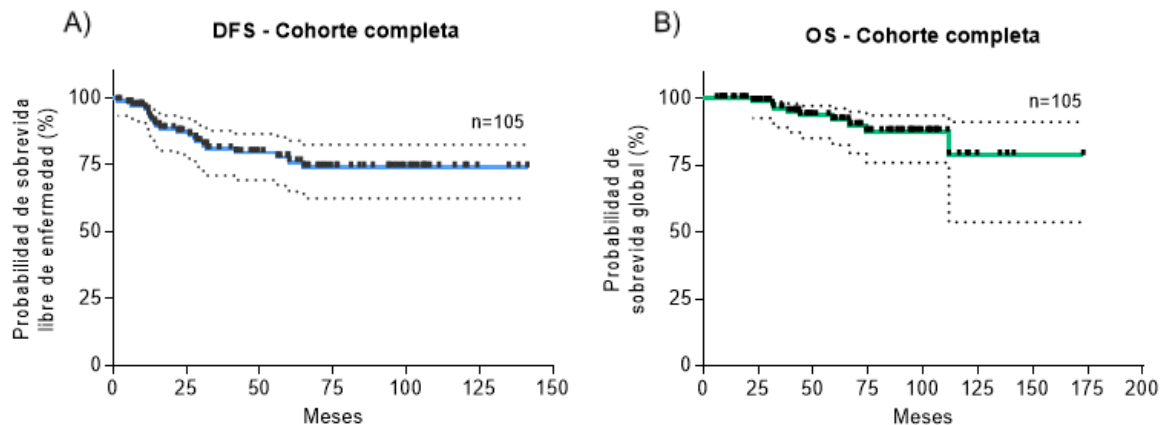
Firma:

II	47	44.76
III	28	26.67
IV	0	0.00
No documentado *	8	7.62
<b>Grado tumoral (Grado Nottingham)</b>		
1	3	2.86
2	41	39.05
3	57	54.29
No documentado	4	3.81
<b>Estado del receptor de estrógeno</b>		
Positivo	67	63.81
Negativo	38	36.19
No documentado	0	0.00
<b>Estado del receptor de progesterona</b>		
Positivo	57	54.29
Negativo	48	45.71
No documentado	0	0.00
<b>Estado Ki-67%</b>		
Alto ( $\geq 14\%$ )	63	60.00
Bajo ( $< 14\%$ )	14	13.33
No documentado	28	26.66
<b>Subtipos clínicos de cáncer de mama **</b>		
HR+/HER2+	67	63.81
HR-/HER2+	38	36.19
No documentado	0	00.00
<b>Operación</b>		
Cirugía conservadora de mama	51	48.57
Mastectomía	45	42.86
No documentado	9	8.57
<b>Terapia endocrina adyuvante</b>		
Si	67	63.80
No	37	35.23
No documentado	1	0.95
<b>Quimioterapia adyuvante</b>		
Si	101	96.19
No	3	2.86
No documentado	1	0.95
<b>Quimioterapia neo-adyuvante</b>		
Si	28	26.67
No	67	63.81
No documentado	10	9.52
<b>Trastuzumab</b>		
Si	105	100.00
No	0	0.00
No documentado	0	0.00
<b>Radioterapia</b>		
Si	79	75.24
No	15	14.29
No documentado	11	10.48
<b>Eventos durante el seguimiento</b>		
No	84	80.00
Si	21	20.00
No documentado	0	0.00
<b>Descripción de los eventos</b>		
Recidiva local más metástasis a distancia	6	28.57
Solo recidiva local	5	23.81
Solo metástasis	10	47.62
No documentado	0	0.00

\* Se hace notar que los 8 pacientes cuyo estadio clínico no se pudo documentar con precisión, no contaban con metástasis al momento del diagnóstico (por lo tanto no eran estadio clínico IV) y por eso fueron incluidos en el estudio.

\*\* Subtipos Clínicos de Cáncer de mama: HR+/HER2+, receptor de hormona-positiva y HER2-positivo; HR-/HER2+, receptor de hormona-negativa y HER2-positivo. (Saint Gallen, 2017)

En una primera instancia se realizaron las curvas de Kaplan Meier a la cohorte total de pacientes para observar, en un lapso de 5 años, como era la probabilidad de sobrevida libre de enfermedad (DFS) y global (OS) (Fig. 9).



	CM HER2- positivo
Número de pacientes	105
Probabilidad de sobrevida libre de enfermedad, % (95%, IC) <sup>a</sup>	76.07 (65.00-84.06)
Probabilidad de sobrevida global, % (95% IC) <sup>a</sup>	91.89 (82.66-96.32)

<sup>a</sup> Intervalo de confianza de 95%.

Figura 9. **Resultado clínico de los pacientes con CM HER2-positivo en la cohorte.** A y B) Estimaciones de Kaplan-Meier sobre la probabilidad de sobrevida libre de enfermedad (DFS) (A) y sobrevida global (OS) (B). Tabla inferior: Las probabilidades de sobrevida libre de enfermedad (DFS) y sobrevida global (OS) a 5 años fueron mostradas como porcentajes incluyendo un intervalo de confianza (IC) del 95%. Los datos crudos junto con su análisis estadístico se encuentran en el anexo 1.

Este análisis reveló que la sobrevida libre de enfermedad de la cohorte después de 5 años fue de 76.07% (95% IC 65.00-84.06) y la sobrevida global fue de 91.89% (95% IC 82.66-96.32), ambos comparables con reportes previos (Brouckaert, 2012).

Por otro lado, se diferenció a la población respecto a su estadio clínico (I, II y III) y el mismo se sometió a un análisis estadístico de Kaplan-Meier (Fig. 10). Lo que se puede observar a través de la figura es que los pacientes que poseen un estadio clínico III, tienen una probabilidad de sobrevida

libre de enfermedad menor en comparación a los pacientes que tienen estadios clínicos menores. Si bien el valor P no llega a ser significativo, esta tendencia se puede ver reflejada en la separación de las curvas que muestra el gráfico. De esta manera se puede corroborar evidencia científica anterior que muestra una correlación entre el estadio clínico avanzado del paciente y el mal pronóstico del mismo (Viniestra, 2010).

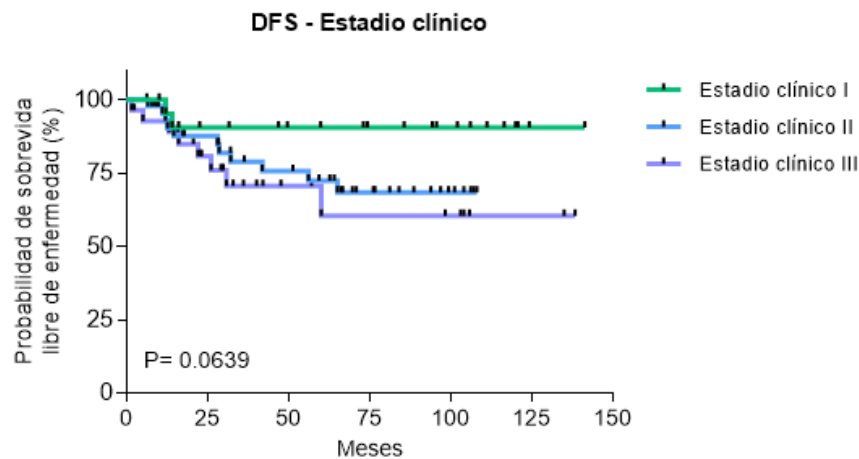


Figura 10. **Resultado clínico de la cohorte de pacientes en función del estadio clínico.** Los datos crudos junto con su análisis estadístico se encuentran en el anexo 2.

Las muestras de las biopsias de CM se tiñeron mediante el protocolo previamente validado de IF y microscopía confocal con el anticuerpo ErbB-2 C-18 (Schillaci, 2012). Si bien este protocolo tiene una especificidad y sensibilidad para detectar MErbB-2 comparables a los ensayos de inmunohistoquímica (IHQ) utilizados en la clínica, es importante mencionar que presenta una sensibilidad significativamente mayor para la detección de NErbB-2 en comparación a los procedimientos de IHQ (Schillaci, 2012).

Gracias a la colaboración de los patólogos, todas las muestras fueron evaluadas según el protocolo para evidenciar la expresión del ErbB-2 tanto en el núcleo como en la membrana. La marcación de NErbB-2 fue cuantificada según el grado ("score") que hemos descripto considerando tanto el porcentaje de células positivas, así como también la intensidad de la tinción. Un puntaje de 0 representa una tinción tenue o ausencia de tinción en menos del 10% de las células, 1+ corresponde a una tinción débil en el 10-25%, 2+ moderada tinción en el 26-50% y 3+ tinción fuerte en >50% de las células (Schillaci, 2012). El ErbB-2 de membrana fue puntuado siguiendo las guías establecidas por ASCO/CAP (Wolff, 2018).

Una característica de los tumores HER2+ es la sobreexpresión de ErbB-2 a nivel de la membrana. Como era de esperar, los resultados obtenidos mostraron una alta expresión de MErbB-2

presentando la mayoría de los tumores con puntaje 3+. En la figura 11 se muestran ejemplos de las tinciones correspondientes a especímenes provenientes de pacientes que sobreexpresan ErbB-2 en la membrana y que poseen distintas puntuaciones de ErbB-2 nuclear (NErbB-2).

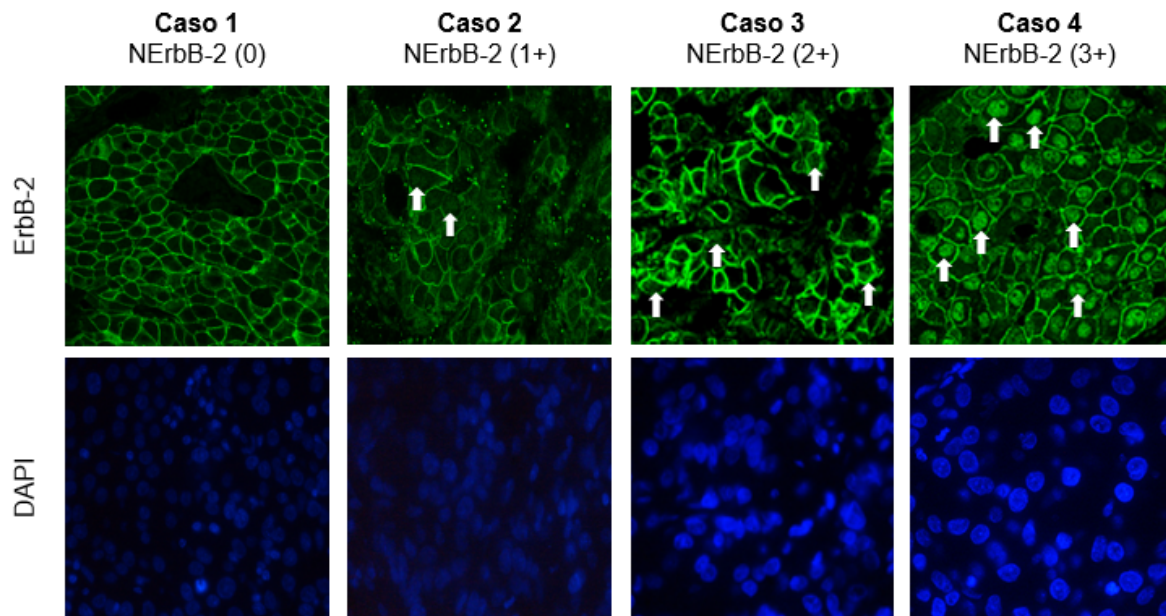


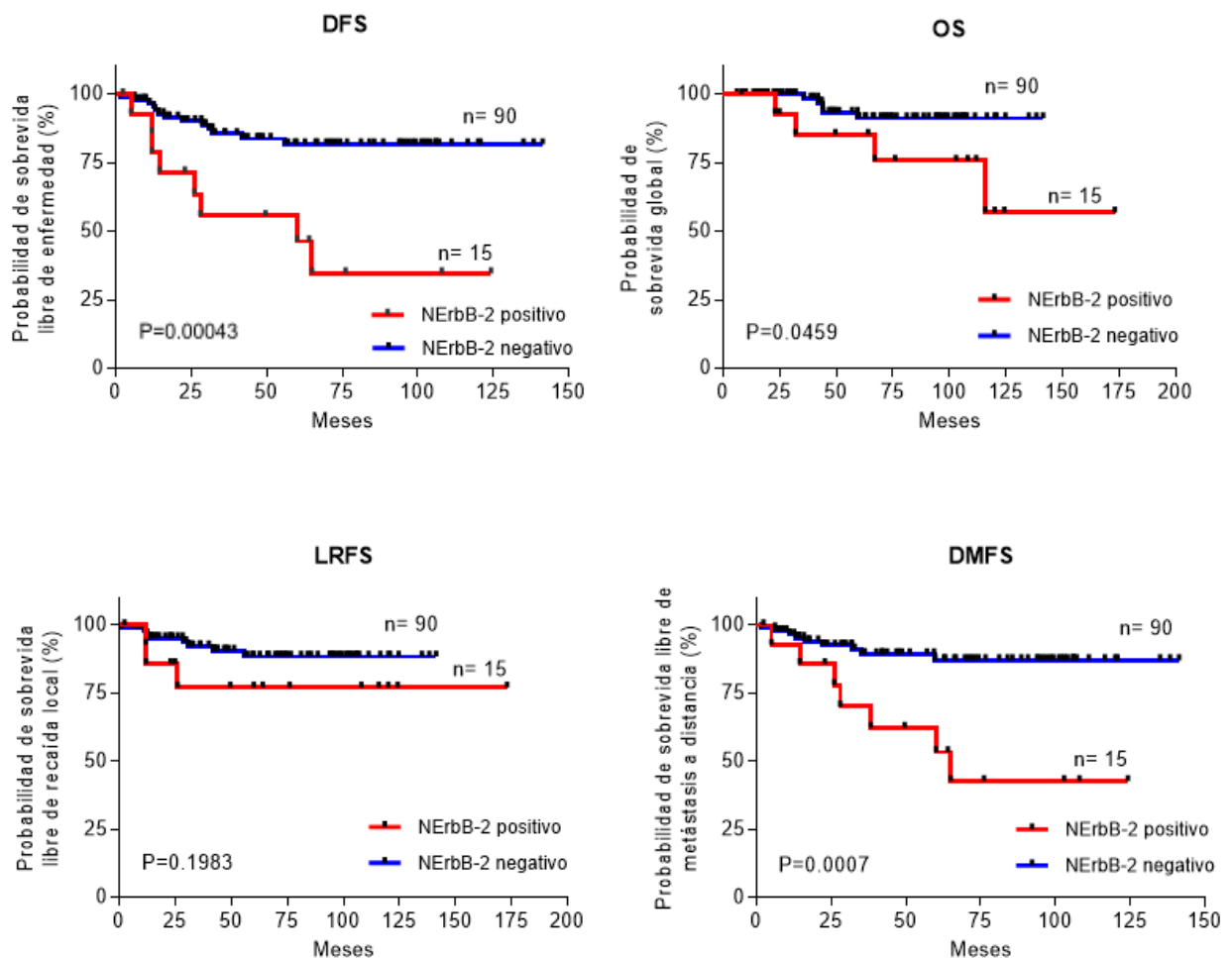
Figura 11. **Expresión de ErbB-2 nuclear en pacientes con CM HER2-positivos utilizando el anticuerpo policlonal ErbB-2 C-18.** Los niveles de expresión de ErbB-2 nuclear se evaluaron mediante IF y microscopía confocal. El score utilizado para evaluar la expresión de ErbB-2 nuclear fue previamente reportado por el laboratorio (Schillaci, 2012). Brevemente, el score tiene en cuenta tanto el porcentaje de células positivas como la intensidad de la tinción. Un score de 0 representa una tinción tenue o nula en menos del 10% de las células, el score +1 tinción nuclear débil en el 10-25% de las células, score +2 tinción moderada en el 26-50% de las células y score +3 tinción fuerte en > 50% de las células. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul).

En los trabajos anteriores del laboratorio, las muestras con puntaje 2+ y 3+ fueron consideradas positivas para la presencia de NErbB-2 (Schillaci, 2012; Chervo, 2020). Al tomar en cuenta estos parámetros en esta cohorte de pacientes con CM HER2-positivos tratados con Ttzm, no se observó valor pronóstico cuando NErbB-2 fue considerado de la forma mencionada (datos mostrados en anexo 3A). El análisis de los niveles nucleares de ErbB-2 en líneas celulares de CM sensibles y resistentes a Ttzm demostró que las líneas resistentes a Ttzm (como JIMT-1 y MDA-453), presentan elevados niveles de ErbB-2 nuclear (mayores o iguales al 50%), mientras que las líneas sensibles a Ttzm (BT-474 y SK-BR-3) presentaron menores niveles basales (entre un 10 y 20%) (Cordo Russo, 2015). Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este análisis, en el que se enfocó en evaluar el rol de NErbB-2 en el pronóstico y la respuesta al tratamiento con Ttzm, se consideró positivo para la expresión de NErbB-2 aquellos tumores con un puntaje de 3+ que corresponden a una tinción nuclear fuerte en más del 50% de las células tumorales. De esta manera, se halló que 15 muestras



del total de las analizadas (14.28%) resultaron NErbB-2+. Por el contrario, 90 muestras de una cohorte de 105 pacientes dieron NErbB-2-negativas, lo que representa un 85.72% del total.

El análisis de Kaplan-Meier reveló que las pacientes con CM HER2-positivo cuyos tumores expresan NErbB-2, mostraron una tasa de supervivencia global (OS: overall survival) y de supervivencia libre de enfermedad (DSF: disease-free survival) significativamente menores en comparación con las pacientes cuyos tumores no presentaron NErbB-2 ( $p=0.0459$  y  $p=0.00043$ , respectivamente; Fig. 12). Así mismo, la tasa de supervivencia libre de metástasis a distancia (DMFS: *distant metastasis-free survival*) fue significativamente menor en los pacientes con tumores NErbB-2-positivos en comparación con aquellos cuyos tumores carecen de NErbB-2 ( $p=0.0007$ ) (Fig. 12). Sin embargo, no se observó una asociación entre la tasa de supervivencia libre de recaída local (LRFS: *local relapse-free survival*) y la expresión de NErbB-2 ( $p=0.1983$ ) (Fig. 12). Por otra parte, el análisis estadístico correspondiente al OS y al BCSS arrojaron el mismo resultado, dado que todas las pacientes incluidas en el estudio fallecieron a raíz de causas relacionadas con el CM.



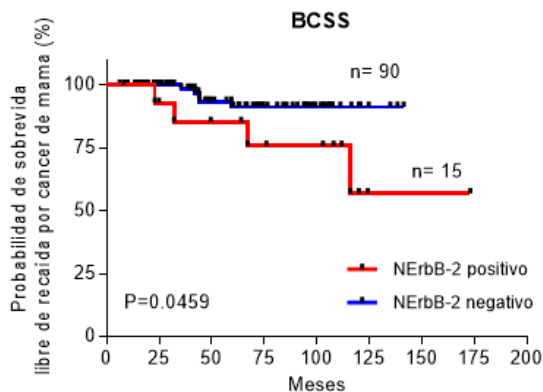


Figura 12. **La expresión de NERbB-2 se asocia a un mal pronóstico clínico en pacientes con CM HER2-positivos.** Se realizó el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para correlacionar la expresión de NERbB-2 con la supervivencia libre de enfermedad (DSF: disease-free survival), la supervivencia global (OS: overall survival), la supervivencia libre de recaída local (LRFS: local relapse free survival), supervivencia libre de metástasis a distancia (DMFS: distant metastasis-free survival) y la supervivencia libre de recaída por cáncer de mama (BCSS) en pacientes con CM HER2-positivo. Los datos aquí mostrados corresponden al análisis realizado con el software GraphPad Prism. Los datos crudos junto con su análisis estadístico se encuentran en el anexo 3B.

A su vez, se correlacionaron los resultados obtenidos de localización de NERbB-2 en la cohorte de pacientes con los parámetros clínicos, patológicos y moleculares (Tabla 3). Sin embargo, no se observa asociación entre la expresión de ErbB-2 nuclear y los parámetros analizados. En resumen, estos resultados indican que la expresión de NERbB-2 está asociada a un resultado clínico desfavorable en pacientes con CM HER2-positivo y a una falla en la respuesta al tratamiento con Tzm.

Tabla 3. **Asociación entre la expresión de NERbB-2 y características clínico-patológicas en CM HER2-positivo.**

	Expresión NERbB-2		Valor P <sup>a</sup>
	NERbB-2, n (%)		
	Positivo N=15	Negativo N=90	
<b>Estado menopáusico</b>			
Premenopausia	4 (27) <sup>b</sup>	46 (51) <sup>c</sup>	0.098
Postmenopausia	11 (73)	44 (49)	
<b>Tamaño tumoral</b>			
≤20 mm	7 (47)	36 (44)	1.00
>20 mm	8 (53)	46 (56)	
<b>Estado de los ganglios linfáticos</b>			
Negativo	6 (40)	39 (48)	0.779
Positivo	9 (60)	43 (52)	
<b>Estadio Clínico</b>			

Firma:

I + II	10 (67)	59 (72)	0.759
III	5 (33)	23 (28)	
<b>Grado tumoral (Grado de Nottingham)</b>			
Bien a moderadamente bien diferenciado <sup>d</sup>	6 (43)	38 (44)	1.00
Mal diferenciado	8 (57)	49 (56)	
<b>Estado RE</b>			
Positivo	9 (60)	58 (64)	0.776
Negativo	6 (40)	32 (36)	
<b>Estado RP</b>			
Positivo	9 (60)	48 (53)	0.781
Negativo	6 (40)	42 (47)	
<b>Estado Ki-67%</b>			
Alto ( $\geq 14\%$ )	6 (86)	57 (81)	1.000
Bajo ( $< 14\%$ )	1 (14)	13 (19)	

<sup>a</sup> Test de Chi-cuadrado.

<sup>b</sup> Porcentaje total de tumores positivos.

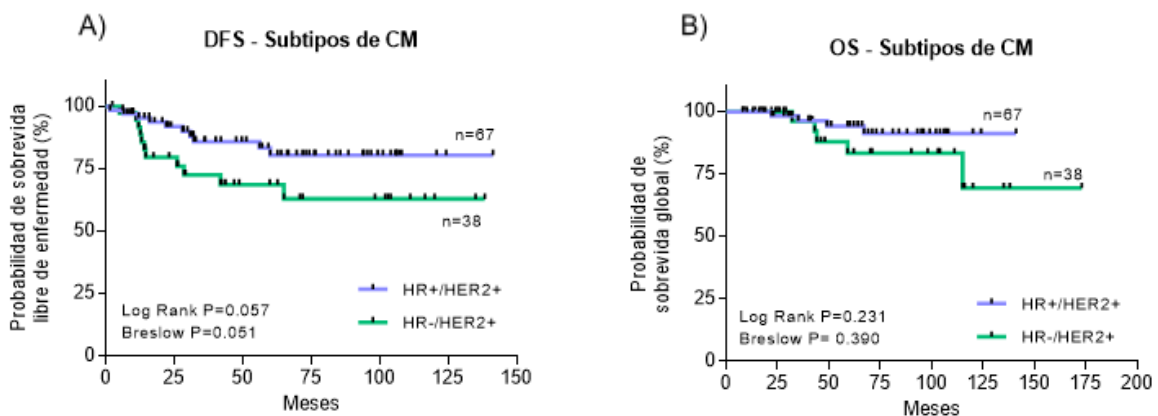
<sup>c</sup> Porcentaje total de tumores negativos.

<sup>d</sup> Bien a moderadamente diferenciado: grado tumoral 1-2, mal diferenciado: grado tumoral 3.

RE, receptor de estrógeno; RP, receptor de progesterona. Los números en cursiva corresponden a valores P estadísticamente significativos.

## 7.2 ¿NERbB-2 está asociado al pronóstico sólo en CM HR+/HER2+ o HR-/HER2+?

Luego se evaluó el valor pronóstico de NERbB-2 dentro de los 2 subtipos clínicos de tumores HER2-positivos: HR+/HER2+ y HR-/HER2+. Para ello, la cohorte fue dividida en los mencionados subtipos, observándose que 67 pacientes presentaron tumores pertenecientes al subtipo HR+/HER2+ y 38 al subtipo HR-/HER2+. La incidencia del subtipo HR+/HER2+ y del HR-/HER2+ respecto del total de tumores HER2+ fue comparable con la observación en otras cohortes de mujeres hispanicas (Banegas, 2014) y caucásicas (Howlader, 2014).



Firma:



	RH+/HER2+	RH-/HER2+
Número de pacientes	67	38
Probabilidad de sobrevida libre de enfermedad, % (95%, IC) <sup>a</sup>	80.46 (66.13-89.20)	68.63 (49.14-81.92)
Probabilidad de sobrevida global, % (95% IC) <sup>a</sup>	94.27 (83.18-98.13)	83.32 (61.29-93.43)

<sup>a</sup> Intervalo de confianza de 95%.

Figura 13. **Resultado clínico en pacientes con subtipo de CM RH+/HER2+ y HR-/HER2+.** A y B) Estimaciones de Kaplan-Meier sobre la probabilidad de sobrevida libre de enfermedad (DFS) (A) y sobrevida global (OS) (B) teniendo en cuenta CM HR+/HER2+ (línea violeta) y HR-/HER2+ (línea verde). Tabla inferior: Las probabilidades de sobrevida libre de enfermedad (DFS) y sobrevida global (OS) a los 5 años fueron mostradas como porcentajes incluyendo un intervalo de confianza (CI) del 95%. Los datos crudos junto con su análisis estadístico se encuentran en el anexo 4.

Como es de conocimiento, los pacientes con tumores HR+/HER2+ presentaron un resultado clínico más favorable que los pacientes con tumores HR-/HER2+ (Hennings, 2016 & Maxmen, 2012). En efecto, los pacientes con tumores del subtipo HR+/HER2+ presentaron una sobrevida global de 94.27% con un intervalo de confianza del 95% entre 83.18-98.13 y una sobrevida libre de enfermedad de 80.46% (95% IC 66.13-89.20) en 60 meses (5 años) en comparación con los pacientes con tumores del subtipo HR-/HER2+ que presentaron una sobrevida global de 83.32% (95% IC 61.29-93.43) y una sobrevida libre de enfermedad de 68.63% (95% IC 49.14-81.92) ya que los pacientes con receptores de hormona positivos tienen una mayor posibilidad de tratamientos, como lo es la terapia endocrina. Las tasas de sobrevida de los pacientes HR+/HER2+ y HR-/HER2+ se encuentran en línea con las reportados previamente (Hennings, 2016).

Al evaluar la relación entre la presencia de receptores de hormonas en pacientes y la positividad de NERbB-2 por separado en ambos grupos, en cuanto al DFS, se encontró que la presencia de ErbB-2 nuclear mantiene el valor pronóstico en los pacientes HR-/HER2+ y se pierde dentro de los pacientes con CM HR+/HER2+ (Fig. 14). Esto se puede observar en la Fig. 4, en la cual en el caso de las pacientes RH-/HER2+ la presencia de NERbB-2 está asociada a una menor DFS y DMFS ( $p=0.00005$  y  $p=0.00009$ , respectivamente), mientras que en las pacientes RH+/HER2+ dicha observación no es estadísticamente significativa.

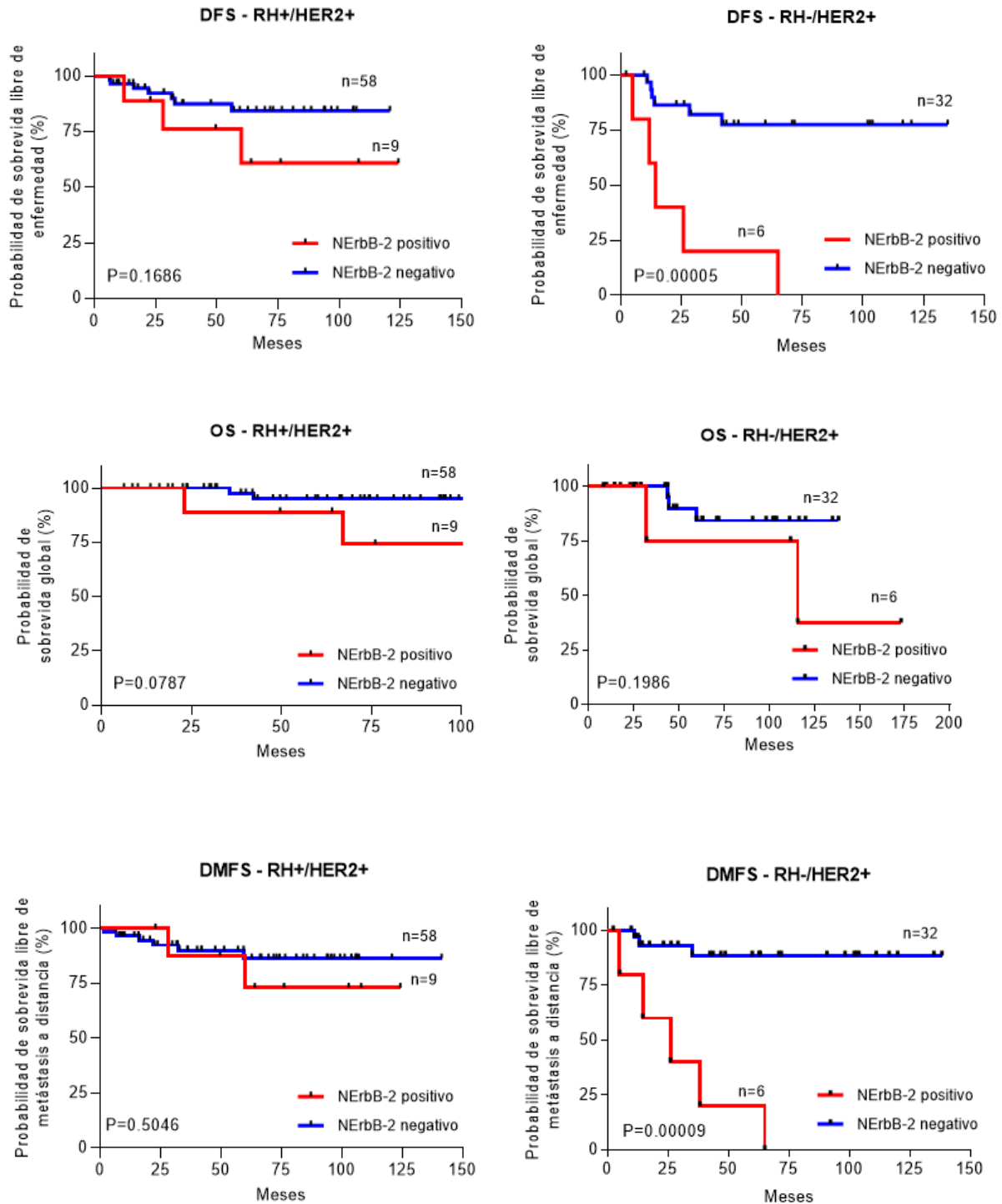



Figura 14. La expresión de NERbB-2 se asocia a un mal pronóstico clínico en pacientes con CM HR-/HER2-positivos. Se realizó el análisis de sobrevida de Kaplan-Meier para correlacionar la expresión de NERbB-2 con la sobrevida libre de enfermedad (DSF: disease-free survival), la sobrevida global (OS: overall survival) y la sobrevida libre de metástasis a distancia (DMFS: distant metastasis-free survival). Los datos crudos junto con su análisis estadístico se encuentran en el anexo 5.

### 7.3 Análisis de ErbB-2 en el núcleo en una segunda cohorte independiente de cáncer de mama

Se dispone de muestras de una cohorte independiente de pacientes con CM. Estas muestras pertenecen a tumores de mama primarios invasivos de pacientes con distintos subtipos de CM y están dispuestas en TMAs. Hasta el momento se tiñeron 5 TMAs conteniendo 555 muestras con la técnica de tinción por inmunofluorescencia ya descrita (Schillaci, 2012) de las cuales 513 casos (92.43%) se consideran en este estudio. La diferencia de porcentaje, el 7.57% restante, corresponde a casos repetidos (25/555, lo que equivale a un 4.50%) o a casos donde en dichos "spots" el tejido no se encontraba en condiciones o se habían levantado durante la tinción (Casos perdidos, 17/555 que corresponde a un 3.06%). Se muestran a continuación imágenes representativas de las tinciones por inmunofluorescencia correspondientes a distintos puntajes de ErbB-2 en el núcleo evaluados como se detalló en la sección anterior (Página 37) (Fig. 15)

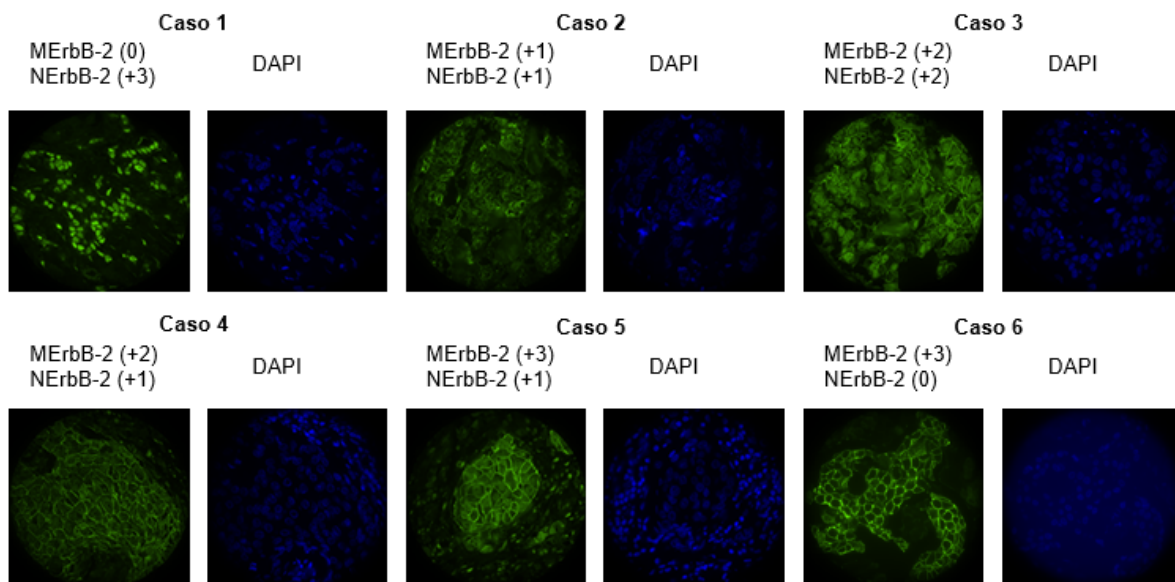
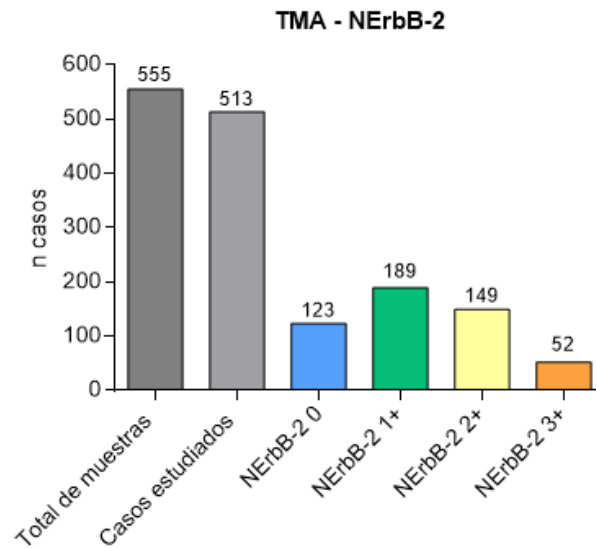


Figura 15. **Expresión de ErbB-2 en pacientes de una segunda cohorte independiente de CM.** Los niveles de expresión de ErbB-2 se evaluaron mediante IF y microscopía confocal. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Se muestran casos representativos con distintos niveles de expresión de NErbB-2 y MErbB-2.

El análisis por microscopía confocal permitió observar que del total de los casos estudiados (513), 123 (23.98%) muestras presentaron un puntaje de ErbB-2 nuclear de 0, 189 (36.84%) de 1+, 149 (29.04%) de 2+ y 52 (10.14%) de 3+. Considerando como positivas para ErbB-2 en el núcleo aquellos casos que presentaron puntaje de 2+ y 3+, se pudo observar que en esta segunda cohorte un 39.26% (201/512) de los casos fueron positivos para ErbB-2 nuclear, lo cual está en línea con los

reportes anteriores del grupo (sobre la población total se observó un 36% de positividad en Schillaci, 2012).

A)



B)

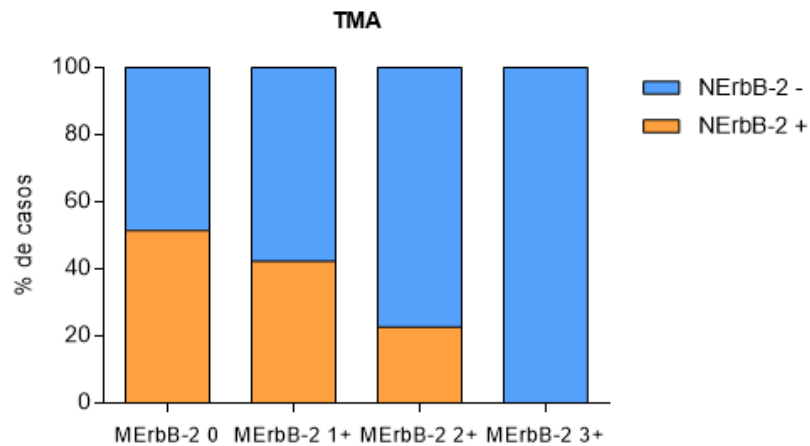
	TMA 3		TMA 13		TMA 14		TMA 15		TMA 17		Totales	
	n	%*	n	%*	n	%*	n	%*	n	%*	n	%*
<b>NErbB-2, puntaje 0</b>	26	27.08	34	33.66	22	21.57	30	28.57	11	10.09	123	23.98
<b>NErbB-2, puntaje 1+</b>	13	13.54	44	43.56	58	56.86	31	29.52	43	39.45	189	36.84
<b>NErbB-2, puntaje 2+</b>	40	41.67	20	19.80	19	18.63	28	26.67	42	38.53	149	29.04
<b>NErbB-2, puntaje 3+</b>	17	17.71	3	2.97	3	2.94	16	15.24	13	11.93	52	10.14
<b>Casos estudiados</b>	96	100	101	100	102	100	105	100	109	100	513	100
<b>Casos perdidos</b>	13		0		0		4		0		17	
<b>Casos repetidos</b>	2		10		9		2		2		25	
<b>Total de muestras</b>	111		111		111		111		111		555	

\* El porcentaje de casos con cada una de las puntuaciones fue calculado sobre el total de casos estudiados

Figura 16. **Porcentaje de muestras que expresan ErbB-2 en el núcleo.** A) Gráfico representativo sobre las muestras que expresan ErbB-2 en el núcleo teniendo en cuenta que un puntaje de 0 representa una tinción tenue o ausencia de tinción en menos del 10% de los núcleos de las células, 1+ corresponde a una tinción débil en el 10-25%, 2+ moderada tinción en el 26-50% y 3+ tinción fuerte en >50% de las mismas. B) Resultados de los casos estudiados con sus respectivos porcentajes.

La técnica de inmunofluorescencia utilizada en este estudio para ErbB-2 permite evaluar no solamente NErbB-2 sino también al ErbB-2 en la membrana, presentando, en este último caso una sensibilidad similar a la del HercepTest™ (Dako) utilizado en la clínica (Schillaci, 2012). De esta manera, se decidió subclasificar a los pacientes en función del puntaje en la membrana y en el núcleo.

A)



B)

Expresión MErbB-2

	TMA 3		TMA 13		TMA 14		TMA 15		TMA 17		Totales	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>MErbB-2 3+/ NErbB-2 -</b>	4	100	1	100	1	100	1	100	1	100	8	100
<b>MErbB-2 3+/ NErbB-2 +</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total MErbB-2 3+</b>	4	100	1	100	1	100	1	100	1	100	8	100
<b>MErbB-2 2+/ NErbB-2 -</b>	2	40.00	5	100	4	80.00	1	100	5	83.33	17	77.27
<b>MErbB-2 2+/ NErbB-2 +</b>	3	60.00	0	0	1	20.00	0	0	1	16.67	5	22.73
<b>Total MErbB-2 2+</b>	5	100	5	100	5	100	1	100	6	100	22	100
<b>MErbB-2 1+/ NErbB-2 -</b>	1	33.33	1	16.67	1	100	1	100	11	73.33	15	57.69
<b>MErbB-2 1+/ NErbB-2 +</b>	2	66.67	5	83.33	0	0	0	0	4	26.67	11	42.31
<b>Total MErbB-2 1+</b>	3	100	6	100	1	100	1	100	15	100	26	100
<b>MErbB-2 0/ NErbB-2 -</b>	32	38.10	71	79.78	21	22.11	59	57.84	39	44.83	222	48.58
<b>MErbB-2 0/ NErbB-2 +</b>	52	61.90	18	20.22	74	77.89	43	42.16	48	55.17	235	51.42



Firma:



<b>Total MErbB-2 0</b>	84	100	89	100	95	100	102	100	87	100	457	89.08
<b>Casos estudiados</b>	96		101		102		105		109		513	

Figura 17. **Porcentaje de muestras que expresan ErbB-2 tanto en membrana como en núcleo.** A) Gráfico representativo sobre las muestras que expresan ErbB-2 tanto el núcleo como membrana teniendo en cuenta que un puntaje de 0 representa una tinción tenue o ausencia de tinción en menos del 10% de los núcleos de las células, 1+ corresponde a una tinción débil en el 10-25%, 2+ moderada tinción en el 26-50% y 3+ tinción fuerte en >50% de las mismas. B) Resultados de los casos estudiados con sus respectivos porcentajes.

A través de la figura 17 se puede observar que a medida que aumenta la expresión de ErbB-2 en la membrana, los casos de ErbB-2 nuclear positivos disminuyen. Esta asociación se puede reflejar en el análisis de correlación entre la expresión de NErbB-2 y MErbB-2 la cual es significativa (Tabla 4, valor  $p=0.0015$ ). Resulta interesante hacer notar que este es un estudio preliminar y en progreso dado que se han analizado 5 de los 18 TMAs con los que se cuenta y en los analizados hasta el momento, se observa un número muy reducido de casos de MErbB-2 con puntaje 3+ (8/513, 1,55%). Se espera que, al aumentar el número de pacientes, las proporciones de pacientes MErbB-2-positivos sean similares a las observadas en las cohortes de pacientes previamente reportadas (15% aproximadamente).

Si bien de estos pacientes no se dispone de los datos de expresión de los receptores hormonales y por lo tanto, no pueden ser clasificados en los distintos subtipos, los MErbB-2 0 y 1+ podrían incluir pacientes de los subtipos luminal (HR+/HER2-) y triple negativo (HR-/HER2-). Reportes previos del laboratorio identificaron que el 45.5% de los pacientes HR+/HER2- expresan NErbB-2 (Schillaci, 2012) y que un 38.4% de los pacientes con CMTN expresan NErbB-2 (Chervo, 2020). Por otro lado, previamente también se identificó que dentro de los pacientes MErbB-2 positivos (MErbB-2 3+ ó MErbB-2 2+ con amplificación génica) el 29% expresa también NErbB-2. Los resultados aquí observados, si bien son preliminares, parecen estar en línea con los reportes previos.

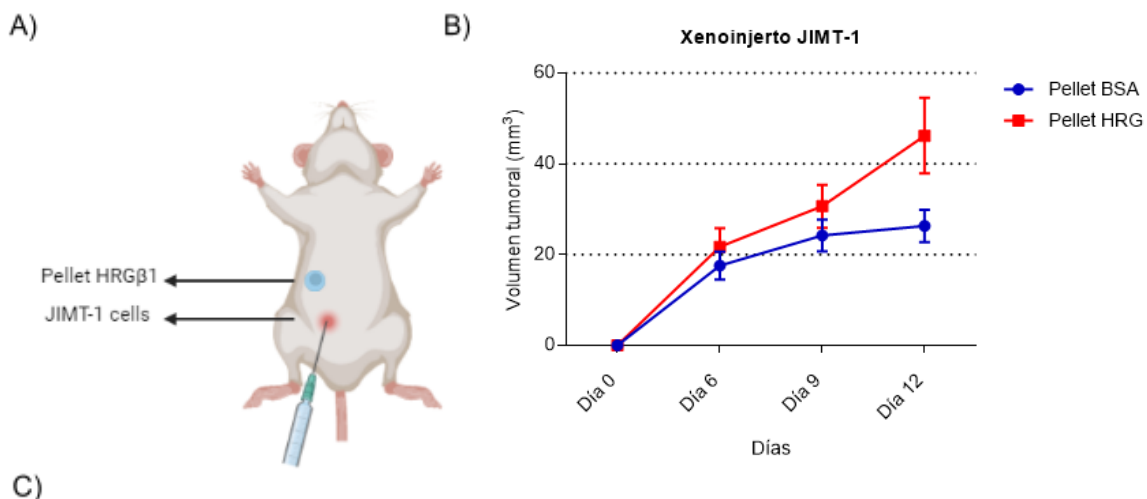
Tabla 4. **Correlación entre la expresión de MErbB-2 y NErbB-2.**

	NErbB-2-positivo		NErbB-2-negativo		Valor P
	n	%	n	%	
<b>MErbB-2 0</b>	235	51.42	222	48.58	
<b>MErbB-2 1+</b>	11	42.31	15	57.69	0.0015
<b>MErbB-2 2+</b>	5	22.73	17	77.27	
<b>MErbB-2 3+</b>	0	0.00	8	100.00	

#### 7.4 El bloqueo de la localización nuclear de ErbB-2 inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* en un modelo preclínico del CM HER2-positivo resistente a Trastuzumab

La línea celular JIMT-1 es una línea de CM humano ErbB-2-positivo, la cual fue establecida a partir de células de CM de una paciente que era clínicamente resistente a Tzm (Tanner, 2004). Esta línea es un modelo preclínico particularmente interesante dado que presenta varios mecanismos asociados con la resistencia a Tzm. En efecto, esta línea presenta una mutación activante del gen de PIK3CA y bajos niveles de PTEN, lo cual permite clasificarla, según criterios previamente establecidos (Berns, 2007) como una línea con activación de la vía de PI3K (Juntilla, 2009; O'Brien, 2010; Koninki, 2010). En el laboratorio se ha demostrado que las células JIMT-1 expresan constitutivamente ErbB-2 en el núcleo y que la HRG $\beta$ 1, ligando de los ErbBs, induce un aumento significativo de los niveles de ErbB-2 nuclear (Cordo Russo, 2015). Asimismo, se ha demostrado previamente que el bloqueo de la localización nuclear de ErbB-2 inhibe la proliferación en dicha línea celular (Cordo Russo, 2015).

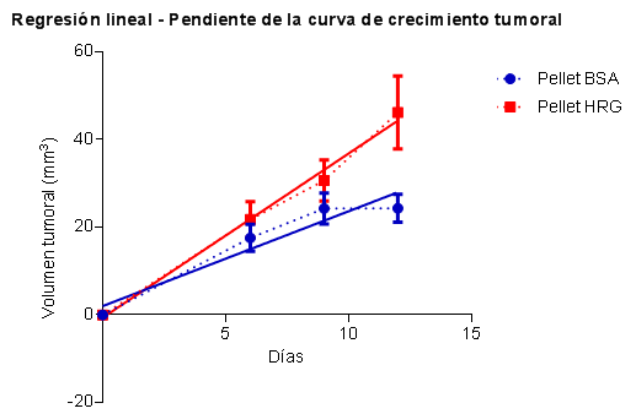
Las células JIMT-1 son capaces de desarrollar tumores xenógrafos en ratones nude (Tanner, 2004). Como se ha reportado previamente, el factor de crecimiento HRG $\beta$ 1 es capaz de inducir la activación de ErbB-2, su translocación nuclear y la proliferación celular del CM incluyendo a las JIMT-1 (Cordo Russo, 2015). Para establecer un modelo *in vivo* de crecimiento tumoral dependiente de HRG $\beta$ 1 de las células JIMT-1, se implantó un *pellet* de liberación lenta de HRG $\beta$ 1 en ratones y simultáneamente se inocularon las células JIMT-1 (Fig. 18 A). Como control, un grupo de animales fueron implantados con un *pellet* de BSA.



JIMT-1 xenoinjerto	Media de volumen tumoral (mm <sup>3</sup> ) $\pm$ SEM	Valor P
Pellet BSA	26.32 $\pm$ 3.56	P= 0.0211

Figura 18. **La HRGβ1 induce el crecimiento tumoral *in vivo* de los tumores inducidos por las JIMT-1.** A) Esquema de establecimiento de Xenotransplantes de JIMT-1. Las células JIMT-1 ( $3 \times 10^6$  células por tumor) se inyectaron de forma s.c. en el flanco de ratones hembra vírgenes NIH (S)-nude. De forma simultánea, se les implantó s.c. pellets de HRGβ1 (5 μg cada uno) o de BSA sola en el mismo flanco donde se inyectaron las células. B) Comparación de crecimiento tumoral en ratones implantados con *pellet* de BSA vs *pellet* de HRGβ1. Curvas de crecimiento tumoral. Los volúmenes tumorales fueron calculados como se describió en Materiales y Métodos. Cada punto representa el volumen tumoral medio ± SEM de n=14 (grupo *pellet* BSA) y n=9 (grupo *pellet* HRGβ1). C) Tabla de Crecimiento Tumoral. Los volúmenes tumorales fueron calculados al día 12 post-inyección de células. Los datos crudos de las mediciones de este experimento junto con su análisis estadístico se encuentran en el anexo 6.

En concordancia con los hallazgos previos que indican que la HRGβ1 activa la translocación nuclear de ErbB-2 y la proliferación celular (Cordo Russo, 2015), la presencia del pellet de HRGβ1 indujo un mayor crecimiento del xenotrasplante de las JIMT-1 en comparación con el pellet de BSA (Fig. 18 B y C). En efecto, los tumores de JIMT-1 inducidos en presencia del pellet de HRGβ1 presentaron una tasa de crecimiento mayor en comparación con la tasa de crecimiento de los tumores de JIMT-1 inducidos en presencia del pellet de BSA (Fig. 19) que además se evidencia a través del análisis de regresión lineal en donde se puede observar la pendiente de la curva de crecimiento de cada uno de los tratamientos (Fig. 19).



JIMT-1 xenoinjerto	Tasa de crecimiento media (mm <sup>3</sup> /día) ± SEM
Pellet BSA	2.28 ± 0.33
Pellet HRGβ1	3.75 ± 0.57 *

Figura 19. **Tasa de crecimiento de xenoinjertos de JIMT-1.** A través del análisis de regresión lineal se puede observar que los tumores inducidos en presencia del *pellet* de HRGβ1 presentan una pendiente mayor positiva

con relación a la pendiente que presentan los tumores inducidos en presencia del *pellet* de BSA, corroborando así, la acción del *pellet* de HRG $\beta$ 1 en cuanto al crecimiento tumoral. Las tasas de crecimiento tumoral fueron determinadas como las pendientes de las curvas de crecimiento. \*  $p=0.0169$  con respecto a JIMT-1 *pellet* BSA. Los datos crudos de las mediciones de este experimento junto con su análisis estadístico se encuentran en el anexo 7.

Posteriormente, se propuso investigar si el bloqueo de la localización nuclear de ErbB-2 es capaz de inhibir el crecimiento tumoral *in vivo* una vez que los tumores inducidos por la línea JIMT-1 en presencia de HRG $\beta$ 1 se han establecido. Para bloquear la localización nuclear de ErbB-2 se utilizó una estrategia de terapia génica que consiste en la inyección intratumoral con una mutante de ErbB-2 que carece de la señal de localización nuclear (hErbB-2 $\Delta$ NLS). Esta mutante hErbB-2 $\Delta$ NLS no sólo es incapaz de migrar al núcleo celular, sino que además actúa como inhibidor dominante negativo de la localización nuclear del ErbB-2 endógeno (Cordo Russo, 2015; Chervo, 2020).

Se realizó entonces un segundo experimento en que se establecieron los xenotransplantes de JIMT-1 en presencia de *pellets* de HRG $\beta$ 1. Al igual que en el experimento anterior, como control se inyectaron células JIMT-1 en un grupo de ratones portadores de *pellets* de BSA. En esta oportunidad se observó una tendencia a un mayor crecimiento de los tumores inducidos con *pellet* HRG $\beta$ 1 (datos mostrados en anexo 7 B). Una vez que los tumores con *pellet* de HRG $\beta$ 1 alcanzaron un tamaño de 50 mm<sup>3</sup>, los animales fueron divididos al azar en 2 grupos experimentales, y fueron tratados con inyecciones intratumorales del mutante hErbB-2 $\Delta$ NLS o del vector vacío pEGFP-N1 (como control) una vez por semana durante 5 semanas (Fig. 20).

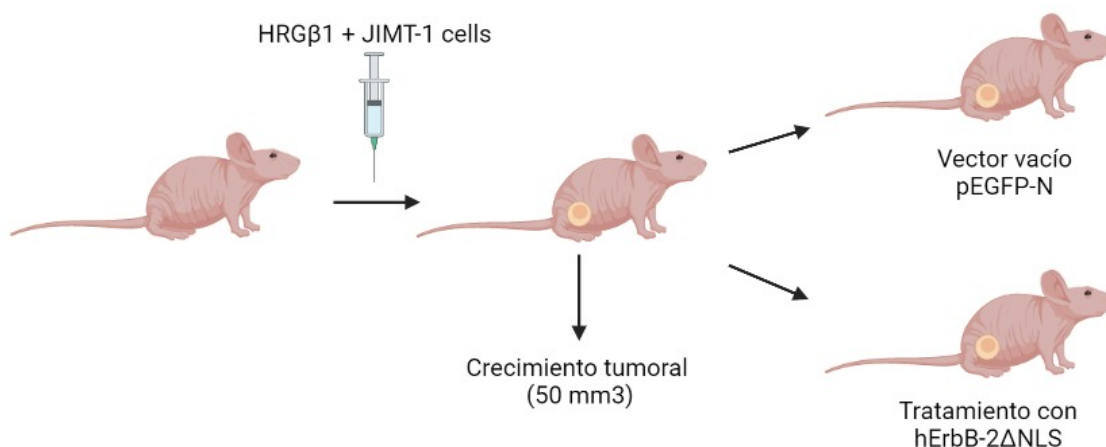
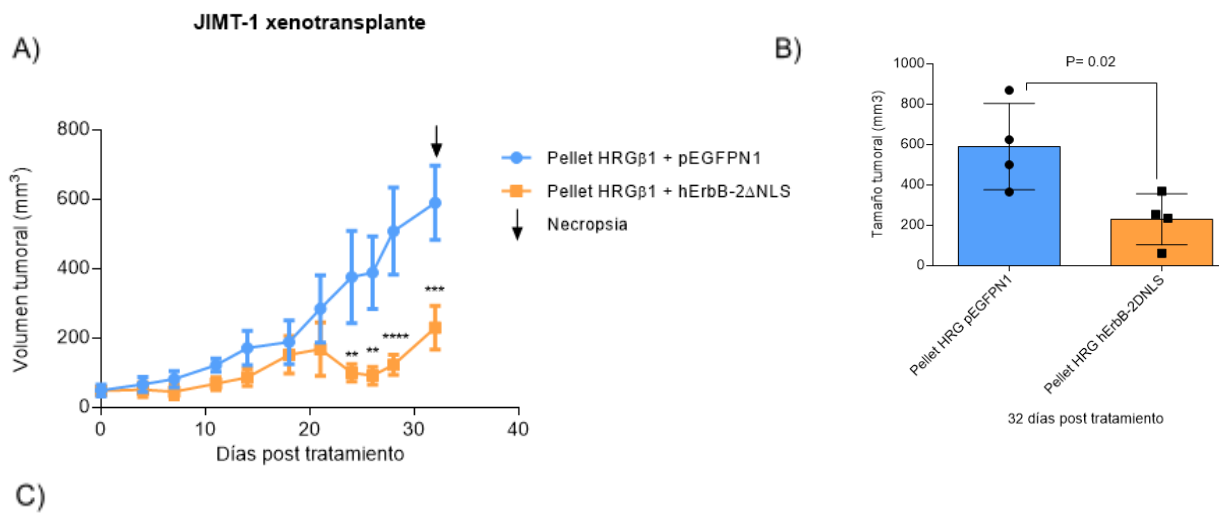


Figura 20. **Esquema del diseño experimental.** Imagen representativa donde se especifica el modelo utilizado para el experimento *in vivo*.

A través de los gráficos de la figura 21 A se pone en evidencia la reducción del volumen de los tumores en los ratones que se sometieron a tratamiento con el vector hErbB-2 $\Delta$ NLS. Esto indica una menor tasa proliferativa como consecuencia del bloqueo de la expresión nuclear de ErbB-2.

Notablemente, al día de la necropsia, el volumen y la tasa de crecimiento de los tumores inyectados con el hErbB-2 $\Delta$ NLS fueron significativamente menores en comparación a los tumores tratados con el vector control (Fig. 21 B y C). Finalmente, se observa un 60,94% de inhibición del crecimiento tumoral en los tumores tratados con hErbB-2 $\Delta$ NLS respecto a su control, el vector vacío (Fig. 21 C).



JIMT-1 xenoinjerto	Media de volumen tumoral (mm <sup>3</sup> ) $\pm$ SEM	Tasa media de crecimiento (mm <sup>3</sup> /día) $\pm$ SEM	% de inhibición del crecimiento
Pellet HRG $\beta$ 1 + pEGFPN1	590.1 $\pm$ 107.1	17.02 $\pm$ 2.33	60.94%
Pellet HRG $\beta$ 1 + hErbB-2 $\Delta$ NLS	230.5 $\pm$ 63.4*	4.34 $\pm$ 1.18 <sup>#</sup>	

Figura 21. Efecto del bloqueo de la localización nuclear de ErbB-2 sobre el crecimiento tumoral *in vivo*. A) Curva de crecimiento tumoral. Volumen de crecimiento tumoral en ratones inyectados con vector vacío (*pellet* HRG $\beta$ 1 pEGFPN1) o con hErbB-2 $\Delta$ NLS (*pellet* HRG $\beta$ 1 + hErbB-2 $\Delta$ NLS). Los volúmenes tumorales fueron calculados como se describió en Materiales y Métodos. Cada punto representa el volumen tumoral medio  $\pm$  SEM de 4 tumores. B) Comparación de los volúmenes medios tumorales al día de la necropsia (32 días post tratamiento). C) Tabla de *Crecimiento Tumoral*. Los volúmenes tumorales fueron calculados al día 32. Las tasas de crecimiento tumoral fueron determinadas como las pendientes de las curvas de crecimiento. \* p=0.02 y <sup>#</sup>p=0.0028 con respecto a JIMT-1 *pellet* HRG $\beta$ 1+ pEGFPN1. Los datos crudos de las mediciones de este experimento junto con su análisis estadístico se encuentran en el anexo 8.

A su vez, para corroborar que los efectos inhibitorios del crecimiento tumoral están asociados a la capacidad de la mutante hErbB-2 $\Delta$ NLS de inhibir la localización nuclear de ErbB-2, se realizaron tinciones de inmunofluorescencia para evaluar la expresión de ErbB-2 en cortes en parafina de tumores extraídos al final del experimento, y posteriormente se estudiaron por inmunofluorescencia y

microscopía confocal (Schillaci, 2012). Se observó que los tumores provenientes de animales inyectados con el hErbB-2 $\Delta$ NLS presentaron menores niveles de ErbB-2 nuclear que aquellos tumores de animales inyectados con el vector vacío (Fig. 22 A). El análisis cuantitativo de las imágenes de microscopía confocal indicó que los tumores tratados con hErbB-2 $\Delta$ NLS presentaron una disminución significativa del porcentaje de NErbB-2 en comparación con los tumores control (Fig. 22 B).

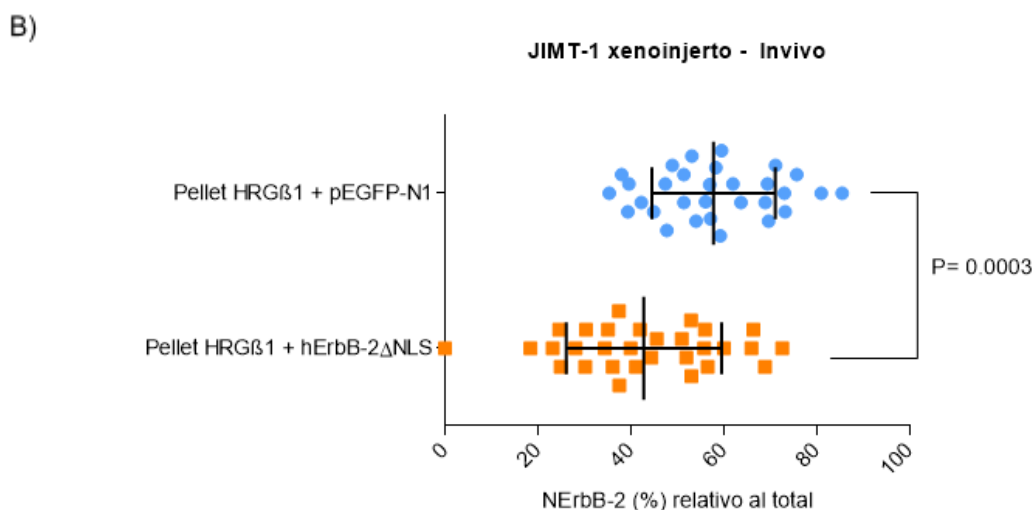
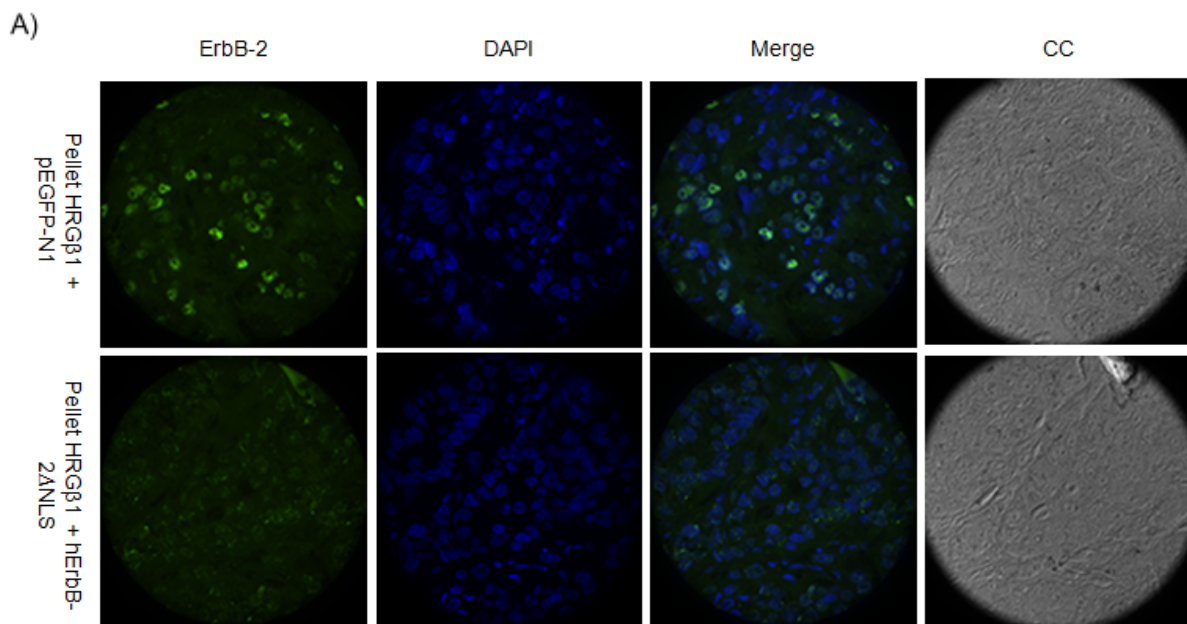


Figura 22. La inyección de la mutante hErbB-2 $\Delta$ NLS inhibe la localización nuclear de ErbB-2 en los tumores extraídos al final del experimento. A) Expresión de ErbB-2 a través de inmunofluorescencia y microscopía confocal. Los cortes de los tumores extraídos al final del experimento fueron teñidos para ErbB-2 utilizando el anticuerpo ErbB-2 C-18 seguido de incubación con un anticuerpo secundario anti-IgG Alexa Fluor 488 (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Se muestran imágenes representativas de tumores

Firma:



correspondientes a cada uno de los grupos en estudio. B) Cuantificación de la presencia nuclear de ErbB-2. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia de ErbB-2 nuclear y se representa como porcentaje con relación al ErbB-2 total en cada célula (media  $\pm$  DE, n=30 por grupo). Cada punto en el gráfico representa una célula cuantificada. Los datos crudos de las mediciones de este experimento junto con su análisis estadístico se encuentran en el anexo 9.

Si bien se reconoce que el experimento es de carácter preliminar y debe ser repetido utilizando un mayor número de animales, los presentes hallazgos son muy alentadores dado que indican la función clave del ErbB-2 nuclear como conductor principal del crecimiento tumoral en CM HER2-positivo resistente a Trastuzumab.

### **7.5 Retro-2.1 inhibe la localización nuclear de ErbB-2 en células de CM**

En el laboratorio se ha descubierto que el compuesto Retro-2 es capaz de inhibir la localización nuclear de ErbB-2 (Madera, 2022). Dado que se han generado derivados cíclicos de Retro-2 con mayor potencia (Retro-2.1) para inhibir el transporte retrógrado de toxinas, se decidió investigar si el enantiómero S de Retro-2.1 es además capaz de modular la localización nuclear del ErbB-2 a través la técnica de inmunofluorescencia y microscopía confocal en la línea celular JIMT-1, modelo de CM HER2-positivo resistente a Trastuzumab ya mencionado en esta tesis.

Como puede verse en la figura 23, las células JIMT-1 presentan de forma basal elevados niveles de ErbB-2 nuclear, observándose también, la presencia de ErbB-2 también en la membrana. El tratamiento con el enantiómero S de Retro-2.1 [(S)-R2.1], disminuye los niveles nucleares de ErbB-2 de manera significativa en las dosis de 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M (Fig. 23).

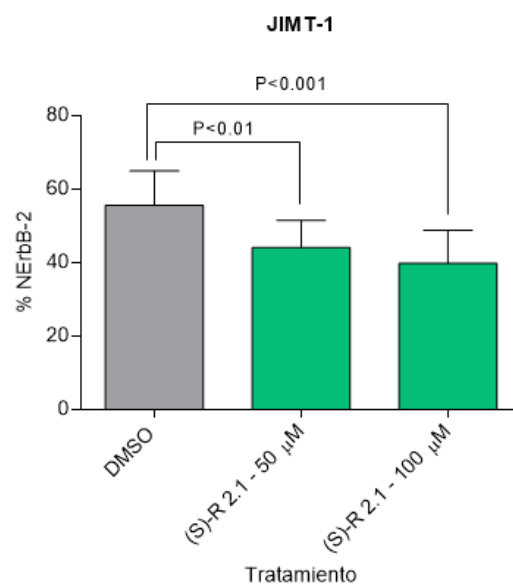
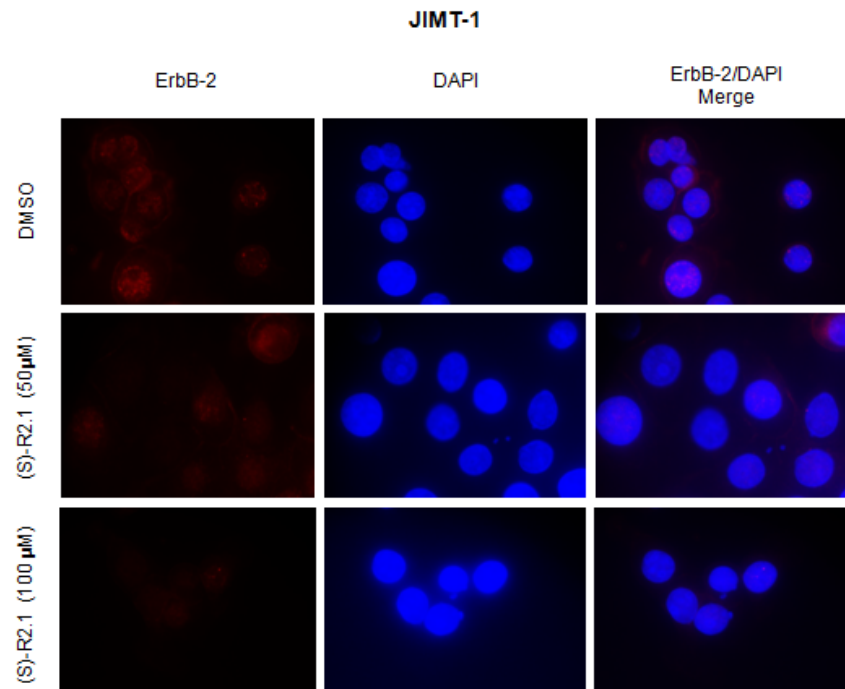


Figura 23. **El enantiómero S de Retro-2.1, inhibe los niveles nucleares en ErbB-2 de las JIMT-1.** Las células JIMT-1 fueron tratadas con (S)-R-2.1 (50 μM y 100 μM) o su vehículo (DMSO) por 24hs. ErbB-2 se localizó mediante IF y microscopía confocal usando el anticuerpo C-18 seguido de incubación con un anticuerpo secundario IgG-Alexa Fluor 546 (rojo). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Panel inferior: los niveles nucleares de ErbB-2 se cuantifican como se indica en la figura 22. Los datos crudos de la cuantificación pueden observarse en el anexo 10.



Estos hallazgos demuestran que la inhibición del transporte retrógrado por tratamiento con el enantiómero S de Retro-2.1, inhibe la localización de ErbB-2 en células de CM HER2-positivas.

## 7.6 El bloqueo de la localización nuclear de ErbB-2 con Retro-2.1 inhibe la proliferación celular en células de cáncer de mama

Con el objetivo de comprobar el efecto biológico que tiene la droga Retro-2.1 sobre líneas celulares de CM pertenecientes a distintos subtipos, se realizaron los ensayos de proliferación celular según lo descrito previamente (Madera, 2022). Como modelo de CM HER2-positivo, se seleccionó la línea JIMT-1 ya presentada en este trabajo de tesis. Dado que el ErbB-2 nuclear tiene un rol muy importante en el crecimiento de CMTN (Chervo, 2020), también se investigaron los efectos de Retro-2.1 en modelos de CMTN tales como, la línea celular murina 4T-1 y la línea celular humana MDA-231. En cada una de las líneas se comprobó el efecto de Retro-2.1, tanto el enantiómero S como R en distintas dosis.

Primero se evaluó este efecto en las células JIMT-1 (Fig. 24). Lo que se pudo observar es que (S)-Retro-2.1 inhibió significativamente la proliferación en su dosis de 100  $\mu\text{M}$ , mientras que (R)-Retro-2.1 no presentó efectos inhibitorios (Fig. 24 A). A su vez, el panel B muestra la comparación del porcentaje de la proliferación relativa al vehículo (DMSO, Fig. 24 B) y en él se puede observar que, en las dosis ensayadas, (S)-Retro-2.1 tiene un efecto inhibitorio mayor que (R)-Retro-2.1.

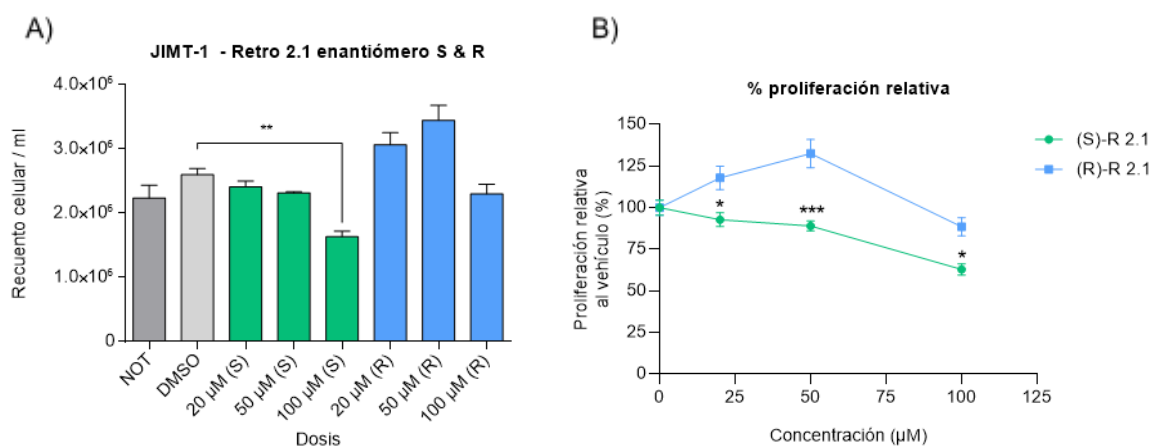


Figura 24. **Efectos de los enantiómeros de Retro-2.1 sobre la proliferación celular en células JIMT-1.** A) Recuento celular. La proliferación se ensaya mediante el recuento de células tratadas por 24h con los derivados cíclicos de R2, (S)-R2.1 y (R)-R2.1, a distintas concentraciones o con su vehículo (DMSO), como fue indicado anteriormente. El gráfico muestra la media  $\pm$  SEM de cada condición. B) Porcentaje de proliferación relativa. Los

datos muestran el porcentaje de proliferación celular luego del tratamiento con los distintos enantiómeros en relación con las células tratadas con vehículo. En el gráfico se muestra la media  $\pm$  SEM de cada condición. Los datos crudos de las mediciones de este experimento junto con su análisis estadístico se encuentran en el anexo 11.

El análisis de los efectos de Retro-2.1 en la línea murina de CMTN 4T1 indicó que tanto (S)-R2.1 como (R)-R2.1 presentaron efecto inhibitorio de la proliferación en sus dosis de 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M ya que, a través de la estadística, sus efectos son significativos (Figura 25 A). Por otra parte, en el panel B (Fig. 25 B) si se compara el efecto de (S)-R2.1 respecto del efecto de (R)-R2.1, el enantiómero S parecería ser más efectivo para inhibir la proliferación en su dosis de 100  $\mu$ M ya que en ese punto, ambas curvas se separan. Sin embargo, estos efectos no resultan significativos.

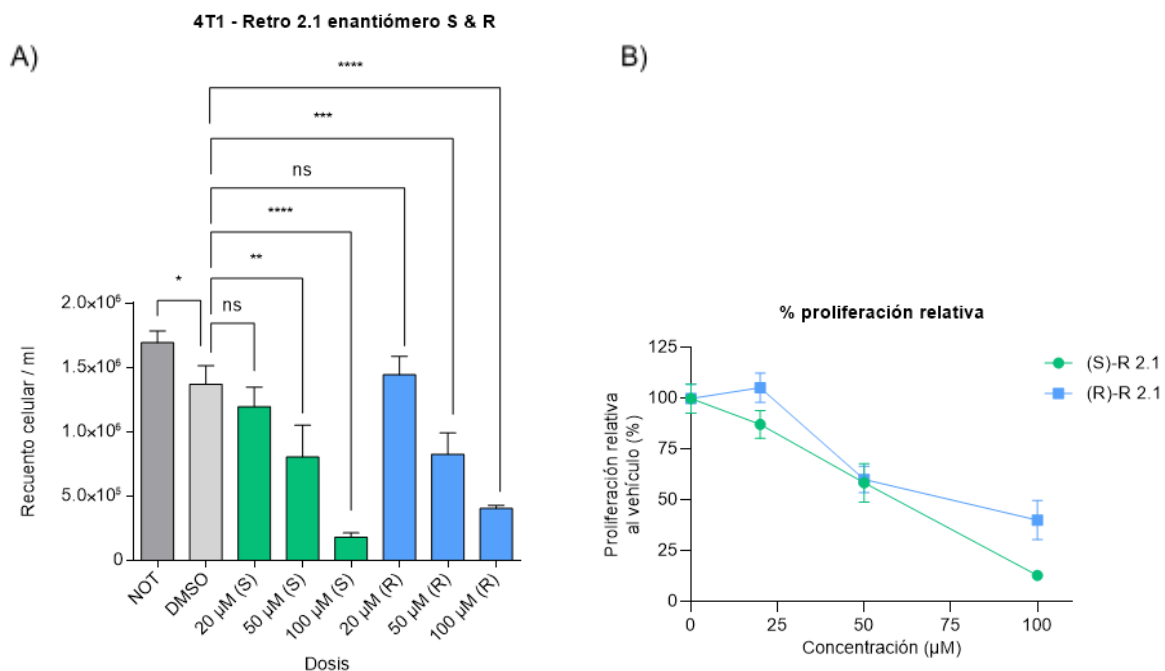


Figura 25. **Efectos de los enantiómeros de Retro-2.1 sobre la proliferación celular en células 4T1.** A) Recuento celular. La proliferación se ensaya mediante el recuento de células tratadas por 24h con los derivados cíclicos de R2, (S)-R2.1 y (R)-R2.1, a distintas concentraciones, o su vehículo (DMSO). El gráfico muestra la media  $\pm$  SEM de cada condición. B) Porcentaje de proliferación relativa. Los datos muestran el porcentaje de proliferación celular luego del tratamiento con los distintos enantiómeros en relación con las células tratadas con vehículo. Los datos crudos de las mediciones de este experimento junto con su análisis estadístico se encuentran en el anexo 12.

Asimismo, se evaluó la proliferación celular utilizando el ensayo de viabilidad denominado CellTiter-Glo (Promega) que se basa en la liberación de ATP como medida de la viabilidad celular. En este ensayo, la determinación de la luminiscencia liberada en cada pocillo indica cuánto ATP liberan

las células, lo cual es proporcional a la viabilidad de las células y puede ser utilizado como un indicador de la proliferación celular. Esta técnica se empleó para evaluar el efecto de (S)-Retro-2.1 sobre la proliferación celular en la línea humana de CMTN MDA-231.

En este ensayo pudimos observar una disminución significativa de la luminiscencia en las células tratadas sólo con la dosis 100  $\mu\text{M}$  de (S)-R2.1 respecto de las células tratadas con el vehículo DMSO (Fig. 26). Esto quiere decir que, al emitir menos luminiscencia, la proliferación de las células sometidas a altas concentraciones del enantiómero S de Retro-2.1 está siendo inhibida por el mismo.

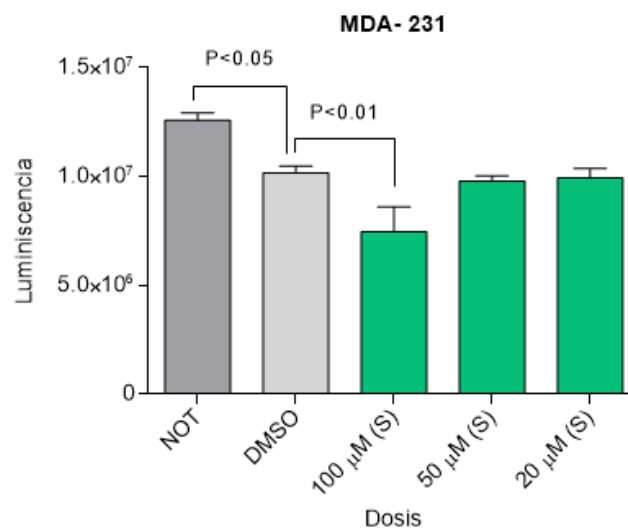


Figura 26. **Efecto de (S)-Retro-2.1 sobre la viabilidad celular en MDA-231.** Otro método para medir la inhibición de la proliferación celular es a través de la liberación de ATP en distintas dosis. El gráfico muestra la media  $\pm$  SEM de cada condición. Los datos crudos de las mediciones de este experimento junto con su análisis estadístico se encuentran en el anexo 13.

Este ensayo vuelve a corroborar la efectividad de (S)-Retro-2.1 ante la proliferación de células tumorales TN.

En resumen, estos ensayos de proliferación preliminares realizados en líneas de CM correspondientes a distintos subtipos indican que los derivados cíclicos de Retro-2.1 podrían inhibir la proliferación celular y que sería particularmente (S)-R2.1 el que presentaría mayores efectos inhibitorios de la proliferación.



## 8. Discusión

En el presente trabajo se exploró la función nuclear de ErbB-2 así como su rol en la proliferación y respuesta a terapias en CM HER2-positivo y TN. Hallazgos previos del laboratorio, demostraron que NErbB-2 posee un rol fundamental en el crecimiento del CM resistente a terapias anti-ErbB-2, como Ttzm, y, además, que el bloqueo de la localización nuclear de ErbB-2 constituirá una estrategia terapéutica novedosa de particular interés para el caso de los tumores resistentes, aunque también aplicable a CM MErbB-2-positivo sensibles a los agentes anti-ErbB-2 mencionados (Cordo Russo, 2015).

Uno de los resultados más interesantes fue la detección de la presencia de NErbB-2 en muestras de CM HER2-positivas provenientes de una cohorte de tumores primarios de distintos hospitales como el Hospital de la Universidad de la Frontera (Temuco, Chile), Hospital General de Agudos “Juan A. Fernández” (Buenos Aires, Argentina), Hospital Aeronáutico Central (Buenos Aires, Argentina) y el Instituto Henry Moore (Buenos Aires, Argentina). Observamos además que aquellas pacientes con CM HER2-positivo cuyos tumores expresan NErbB-2 exhibieron una sobrevida global (OS, overall survival), una sobrevida libre de enfermedad (DFS: disease free survival) y una sobrevida libre de metástasis a distancia (DMFS distant metastasis-free survival) significativamente menor que aquellas pacientes que carecen de NErbB-2, tomando en cuenta únicamente a aquellas pacientes que expresaban ErbB-2 con un puntaje de 3+.

Reportes previos identificaron el papel de NErbB-2 como biomarcador de mal pronóstico en pacientes con CM ErbB-2-positivo (Schillaci, 2012), sin embargo, las terapias actuales están dirigidas específicamente a la función de membrana de ErbB-2. En este trabajo se analizó el rol del NErbB-2 en tumores primarios de las pacientes que fueron tratadas con Ttzm ya que tratamientos como este son incapaces de bloquear la importación nuclear de ErbB-2 tanto en modelos sensibles como resistentes a la acción de dichos agentes (Cordo Russo, 2015). Dado que todas las pacientes de este estudio fueron tratadas con Trastuzumab, los presentes hallazgos indicarían además que NErbB-2 podría ser utilizado en la clínica como un biomarcador de falta/falla en la respuesta al tratamiento con Trastuzumab.

Por otra parte, antecedentes revelaron que las líneas celulares de CM HER2-positivo resistentes a Trastuzumab (JIMT-1, MDA-453) presentaron de forma constitutiva una expresión de ErbB-2 en el núcleo mayor al 50% (Cordo Russo, 2015). En cambio, los modelos sensibles expresaban de manera constitutiva entre un 15 y 20% de ErbB-2 nuclear (Cordo Russo, 2015). De manera consistente con lo observado en modelos experimentales, los presentes hallazgos en pacientes demostraron que la presencia nuclear de ErbB-2 posee un rol pronóstico y un rol en la respuesta a la terapia cuando los tumores expresan elevados niveles nucleares de ErbB-2 (puntaje de 3+, lo que es igual a una tinción fuerte en más de un 50% de las células tumorales).

Firma:



Una limitación de este trabajo es que la cohorte de pacientes HER2+ tratadas con Trastuzumab es de 105 pacientes. Se continuará incluyendo pacientes en el estudio a fin de aumentar el poder estadístico de estos hallazgos y poder realizar los análisis de Cox Univariados y Multivariados que permitan evaluar si NErbB-2 podría ser un biomarcador independiente de pronóstico y/o respuesta a Trastuzumab en pacientes con CM HER2+.

De acuerdo con el conocimiento del laboratorio, existen solo unos pocos trabajos que han explorado la relevancia clínica de la expresión nuclear de la molécula completa de ErbB-2 como un biomarcador pronóstico o de respuesta a la terapia en CM, y dichos estudios corresponden a pacientes de origen latinoamericano (Schillaci 2012; Cordo Russo 2015; Chervo 2020). Además, el estudio que evaluó la relevancia clínica de NErbB-2 con más pacientes contó con una cohorte de 273 casos (Schillaci 2012). A través de esta tesina, se comenzó a explorar el rol del ErbB-2 tanto en membrana como en núcleo en una segunda cohorte independiente de 555 pacientes que se encuentran en TMAs. Estas muestras, si bien evalúan spots conteniendo pequeñas porciones de los tumores, exponen algunas ventajas ya que permiten teñir una numerosa cantidad de especímenes que serían inmanejables o llevaría mucho tiempo teñir de no estar en TMAs y así, se pueden estudiar una gran cantidad de pacientes y obtener resultados estadísticos.

De los 555 casos analizados, casi el 40% presentaron NErbB-2, siendo éste un resultado similar al que se había observado previamente (Schillaci 2012). Además, se encontró una correlación inversa entre la expresión de NErbB-2 y de MErbB-2. Es interesante notar que se observó un importante porcentaje de NErbB-2 en pacientes MErbB-2 1+ y 2+. Hoy en día, los pacientes MErbB-2 1+ y los 2+ (sin amplificación por FISH) son considerados pacientes HER2-low.

Los tumores HER2-low constituyen un tipo de tumor que incluye cánceres de mama que pueden expresar o no receptores de hormonas y que varían en pronóstico y sensibilidad a los tratamientos sistémicos. Actualmente, las terapias disponibles dirigidas a HER2 no han demostrado resultados en los pacientes HER2-low. Por lo tanto, en la clínica, el CM HER2-low es tratado como HER2-negativo. En general, estos pacientes tienen opciones de tratamiento muy limitadas después de la progresión durante la terapia primaria y más comúnmente reciben quimioterapia como único tratamiento (Modi, 2022). Por consiguiente, esta nueva perspectiva será de mucho interés para futuras investigaciones asociadas a nivel terapéutico. De esta manera, si bien es necesario completar estos estudios y evaluar la relevancia clínica que presenta NErbB-2 sobre el pronóstico de las pacientes HER2-low, estos estudios son muy prometedores y abren camino hacia futuras investigaciones.

Resultados previos del laboratorio demostraron que la transfección de las células HER2-positivas, como lo son las JIMT-1, con la mutante hErbB-2 $\Delta$ NLS inhibieron la localización nuclear de ErbB-2 y el crecimiento *in vitro* de este tipo de CM (Cordo Russo, 2015). Los resultados de esta tesina profundizan dichos hallazgos y aportan una estrategia terapéutica innovadora basada en un protocolo de terapia génica con la mutante hErbB-2 $\Delta$ NLS. En efecto, se establecieron xenoinjertos utilizando

Firma:



las mismas células las cuales fueron tratadas con inyecciones intratumorales del mutante hErbB-2 $\Delta$ NLS o del vector vacío pEGFP-N1. De esta manera, hallazgos previos del laboratorio (Cordo Russo, 2015) y en conjunto con este experimento, mostraron que el crecimiento *in vivo* fue inhibido significativamente por el tratamiento con el hErbB-2 $\Delta$ NLS, indicando el rol clave del NErbB-2 como conductor del crecimiento tumoral. Además, se pudo poner en evidencia que cuando se inhibió la acción del ErbB-2 en el núcleo, las células tumorales dejaron de crecer. Dejando en evidencia el rol clave de la expresión de NErbB-2 para pronóstico en la clínica.

Por otra parte, experimentos *in vitro* como los ensayos de proliferación celular sostienen los resultados previos que el laboratorio ha investigado. Se observó previamente que la presencia de Retro-2 inhibe el transporte retrógrado en líneas que tienen altos niveles de ErbB-2 en el núcleo y, consecuentemente, se inhibe el crecimiento tumoral (Madera, 2022). Para terminar de verificar esto, se puso a prueba un derivado cíclico de Retro-2.1 y se halló como resultado que (S)-Retro-2.1 tiene efectos más potentes sobre la proliferación tumoral en comparación a su enantiómero R.

Una versión químicamente modificada del mismo fármaco sería más eficiente y podría ser utilizado en menores dosis para el tratamiento de CM. De hecho, es muy interesante la droga en cuestión ya que, si bien fue diseñada para inhibir el transporte retrógrado de las toxinas externas Shiga, podría utilizarse para otras terapias como en cáncer, planteándose entonces el reposicionamiento de Retro-2.1 como un agente anti-tumoral. De esta forma, esta tesis propone revisar viejas drogas para que sean aplicadas a nuevos tratamientos ya que se conocen los mecanismos moleculares de diversos fármacos y la seguridad en el uso de los mismos. A la vez, el uso particular de Retro-2.1 podría ser una alternativa incluso más económica en comparación a la investigación de nuevas terapias dirigidas a CM.

En resumen, el presente trabajo de tesis contribuye a demostrar la importancia biológica de la expresión nuclear de ErbB-2 en CM HER2-positivo, como biomarcador de pronóstico y/o de respuesta al tratamiento con Trastuzumab. Asimismo, los ensayos de crecimiento tumoral *in vivo* y de proliferación *in vitro* realizados en esta tesis de grado, demuestran claramente que la presencia de ErbB-2 en el núcleo, es un requisito absoluto para la proliferación de las células tumorales tanto ErbB-2+ como TNs. Estrategias terapéuticas tendientes a bloquear la localización nuclear de ErbB-2 resultan entonces de gran utilidad para el tratamiento del CM HER2+ resistente a las terapias actuales como así también para el tratamiento del CMTN.



## 9. Conclusión

### 9.1 Aportes del presente trabajo al conocimiento científico y la práctica clínica

Los hallazgos obtenidos hasta el momento indican el rol clave del ErbB-2 nuclear en el CM. En particular, se demostró que el NErbB-2 está involucrado en la resistencia a las terapias anti-ErbB-2 utilizadas en CM ErbB-2 positivo. En efecto, la labor del presente período identificó al NErbB-2 como un posible biomarcador de respuesta al tratamiento con Trastuzumab en pacientes con CM HER2-positivo.

Estudios *in vivo* permitieron identificar a la localización nuclear de ErbB-2 como un potencial blanco terapéutico en CM HER2-positivo, ya que el bloqueo de la localización de la proteína en cuestión inhibe el crecimiento tumoral. En conjunto, estos resultados desafían el paradigma del diseño de drogas dirigidas al ErbB-2 en el tratamiento de CM HER2-resistente ya que la misma se trata del bloqueo del ErbB-2 en el núcleo.

A su vez, experimentos preliminares realizados en este trabajo de investigación señalan la importancia del estudio de la droga Retro-2.1, en particular del enantiómero S, con relación sobre la proliferación celular, ya que el tratamiento con (S)-Retro-2.1, la disminuye. Se mostró que Retro-2.1 redujo significativamente la proliferación celular *in vitro* en líneas celulares de CMTN y HER2-positivo. Estos descubrimientos son muy alentadores ya que incitan a plantear el reposicionamiento de Retro-2.1 como herramienta terapéutica para distintos subtipos de CM.

De esta manera, esta y futuras investigaciones relacionadas al asunto en cuestión, tendrán un gran impacto a nivel socioeconómico, permitiendo que los escasos recursos de salud estén focalizados hacia terapias dirigidas con respuestas clínicas más favorables.



## 10. Bibliografía

- Austin C, Wen X, Gazzard L, Nelson C, Schelle RH and Scales SJ. (2005). *Oxidizing potential of endosomes and lysosomes limits intracellular cleavage of disulfide-based antibody-drug conjugates*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 17987-17992.
- Banegas M, Tao L, Altekruise S, Anderson W, John E, Clarke C, Gomez L. (2014). *Heterogeneity of breast cancer subtypes and survival among Hispanic women with invasive breast cancer in California*. Breast Cancer Res Treat 2014;144 (3): 625-34.
- Beguelin W, Diaz Flaque MC, Proietti CJ, Cayrol F, Rivas MA, Tkach M, Rosembliit C, Tocci JM, Charreau EH, Schillaci R, and Elizalde PV. (2010). *Progesterone receptor induces ErbB-2 nuclear translocation to promote breast cancer growth via a novel transcriptional effect: ErbB-2 function as a coactivator of Stat3*. Mol Cell Biol 30(23): 5456-72.
- Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K. (2007). *A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer*. Cancer Cell 2007, 12 (4):395-402.
- Bray F. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin, 2018; 68 (6): 394-424.
- Brouckaert O, Laenen A, Vanderhaegen J, Wildiers H, Leunen K, Amant F, Berteloot P, Smeets A, Paridaens R, Christiaens M R, Floris G, Moerman P, Van Limbergen E, Peeters S, Weltens C, Vergote I, Neven P. (2012). *Applying the 2011 St Gallen panel of prognostic markers on a large single hospital cohort of consecutively treated primary operable breast cancers*. Ann Oncol 2012, 23 (10): 2578-2584.
- Carnevale RP, Proietti CJ, Salatino M, Urtreger A, Peluffo G, Edwards DP. (2007) *Progesterone effects on breast cancer cell proliferation, proteases activation, and in vivo development of metastatic phenotype all depend on progesterone receptor capacity to activate cytoplasmic signaling pathways*. Mol Endocrinol, 21, 1335-1358.
- Carpenter G and Liao HJ. (2013). *Receptor tyrosine kinases in the nucleus*. Cold Spring HarbPerspectBiol 5, a008979.
- Chervo M, Cordo Russo R, Petrillo E, Izzo F, De Martino M, Bellora N, Cenciarini V, Santa María de la Parra L, Pereyra M, Güttlein L, Podhajcer O, Daniotti J, Dupont A, Barchuk S, Figurelli S, Lopez Della Vecchia D, Roa J, Guzmán P, Proietti C, Schillaci R and Elizalde P (2020). *Canonical ErbB-2 isoform and ErbB-2 variant c located in the nucleus drive triple negative breast cancer growth*. Oncogene 39 (39): 6245-6262.



Firma:



- Cordo Russo C, Chervo MF, Madera S, Charreau E & Elizalde VP. (2019). *Nuclear ErbB-2: a Novel Therapeutic Target in ErbB-2-Positive Breast Cancer?*. *Horm Cancer* 2019; 10 (2-3):64-70
- Cordo Russo R, Beguelin W, Diaz Flaque MC, Proietti CJ, Venturutti L, Galigniana NM, Tkach M, Guzman P, Roa JC, O'Brien N. (2015). *Targeting ErbB-2 nuclear localization and function inhibits breast cancer growth and overcomes trastuzumab resistance*. *Oncogene* 34 (26): 3413-3428.
- Curigliano G, Burstein HJ, Winer EP, Gnant M, Dubsy P, Loibl S, Colleoni M, Regan M, Piccart-Gebhart M, Senn MJ & Thurlimann B, on behalf of the Panel Members of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. (2017). *De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017*. *Ann Oncol* 28 (8): 1700-1712.
- Diaz Flaque MC, Galigniana, NM, Beguelin, W, Vicario R, Proietti CJ, Russo R, Rivas MA, Tkach M, Guzman P, Roa JC. (2013). *Progesterone receptor assembly of a transcriptional complex along with activator protein 1, signal transducer and activator of transcription 3 and ErbB-2 governs breast cancer growth and predicts response to endocrine therapy*. *Breast Cancer Res* 15 (6): R118.
- Diaz Flaque MC, Vicario R, Proietti CJ, Izzo F, Schillaci R and Elizalde PV. (2013). *Progesterone drives breast cancer growth by inducing p21(CIP1) expression through the assembly of a transcriptional complex among Stat3, progesterone receptor and ErbB-2*. *Steroids* 78 (6): 559-567.
- Elizalde PV, Cordo Russo R, Chervo M and Schillaci R (2016). *ErbB-2 nuclear function in breast cancer growth, metastasis and resistance to therapy*. " *Endocr Relat Cancer* 23 (12): T243-T257.
- Esparis-Ogando A, Diaz-Rodriguez E, Montero JC, Yuste L, Crespo P, and Pandiella A. (2002). *Erk5 participates in neuregulin signal transduction and is constitutively active in breast cancer cells overexpressing ErbB2*. *MolCell Biol* 22, 270-285.
- Ewen ME, Lamb J. (2004). *The activities of cyclin D1 that drive tumorigenesis*. *Trends Mol Med* 2004, 10(4): 158-62.
- Fedi P, Pierce JH, di Fiore P and Kraus MH. (1994). *Efficient coupling with phosphatidylinositol 3- kinase, but not phospholipase C gamma or GTPase-activating protein, distinguishes ErbB-3 signaling from that of other ErbB/EGFR family members*. *Molecular and cellular biology* 14, 492-500.

Firma:



- Gupta N, Pons V, Noel R, Buisson DA, Michau A, Johannes L. (2014). *(S)-NMethylidihydroquinazolinones are the active enantiomers of Retro-2 derived compounds against toxins*. ACS Med Chem Lett. 2014; 5:94–7.
- Graus-Porta D, Beerli R, Daly JM, and Hynes NE. (1997). *ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling*. EMBO J 16 (7): 1647-1655.
- Harris RC, Chung E and Coffey RJ. (2003). *EGF receptor ligands*. Experimental cell research, 284, 2-13.
- Hennigs A, Riedel F, Gondos A, Sinn P, Schirmacher P, Marmé F, Jäger D, Kauczor H, Stieber A, Lindell K, Debus J, Golatta M, Schütz F, Sohn C, Heil J, Schneeweiss A. (2016). *Prognosis of breast cancer molecular subtypes in routine clinical care: A large prospective cohort study*. BMC Cancer 16(1): 734.
- Howlader N, Altekruse S, Li C, Chen V, Clarke C, Ries L, Cronin K. (2014). *US Incidence of Breast Cancer Subtypes Defined by Joint Hormone Receptor and HER2 Status*. J Natl Cancer Inst 2014;106(5):dju055.
- Jager JM, Van Dijk P, Zoccali C and Dekker F. (2008). *The analysis of survival data: the Kaplan–Meier method*. Kidney Int. 2008, 74(5):560-5.
- Johannes L. and Popoff V. (2008). *Tracing the retrograde route in protein trafficking*. Cell 135, 1175-1187.
- Junttila TT, Akita RW, Parsons K, Fields C, Lewis Phillips GD, Friedman LS. (2009). *Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941*. Cancer Cell 2009, 15, 429-440.
- Koninki K, Barok M, Tanner M, Staff S, Pitkanen J, Hemmila PI. (2010). *Multiple molecular mechanisms underlying trastuzumab and lapatinib resistance in JIMT-1 breast cancer cells*. Cancer Lett 2010, 294(2):211-9.
- Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, Symmans WF, Gonzalez-Angulo AM, Hennessy B, Green M, (2008). *Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer*. J Clin Oncol, 26 (8): 1275-1281.
- London JW. (2020) *Effects of the COVID-19 Pandemic on Cancer-Related Patient Encounters*. JCO Clin Cancer Inform 2020, 4:657-665.

Firma:



- Madera S, Chervo MF, Chiauzzi A, Pereyra, Venturutti L, Izzo F, Roldán Deamicis A, Guzman P, Dupont A, Roa, JC, Cenciarini M, Barchuk S, Figurelli S, Lopez Della Vecchia D, Levit C, Lebersztein G, Anfuso F, Castiglioni T, Cortese E, Ares S, Gil Deza E, Gercovich F, Proietti C, Schillaci R, Cordo Russo R & Elizalde P. (2020). *Nuclear PDCD4 Expression Defines a Subset of Luminal B-Like Breast Cancers with Good Prognosis*. *Hormones & cancer*, 11(5-6), 218–239.
- Madera S, Izzo F, Chervo MF, Dupont A, Chiauzzi V, Bruni S, Petrillo E, Merin S, De Martino M, Montero D, Levit C, Lebersztein G, Anfuso F, Roldán Deamicis A, Mercogliano MF, Proietti C, Schillaci R, Elizalde P y Cordo Russo, R. (2022). *Halting ErbB-2 Isoforms Retrograde Transport to the Nucleus as a New Theragnostic Approach for Triple Negative Breast Cancer*. *Cell Death Dis*; 13(5): 447.
- Manual técnico CellTiter-Glo 2.0 Assay, instrucciones para el uso de productos. (2018).
- Matos E, Loria DI, Zengarini N. (2008). *Atlas de Mortalidad por Cáncer en la Argentina. 1997-2001*.
- Maxmen A (2012). *The hard facts*. 24. *Nature* 485, S50-S51.
- Modi W, Jacot T, Yamashita J, Sohn M, Vidal E, Tokunaga J, Tsurutani NT, Ueno A, Prat YS, Chae KS, Lee N, Niikura YH, Park B, Xu X, Wang M, Gil-Gil W, Li JY, Pierga SA, Im HCF, Moore HS, Rugo R, Yerushalmi F, Zagouri A, Gombos SB, Kim Q, Liu T, Luo C, Saura P, Schmid T, Sun D, Gambhire L, Yung Y, Wang J, Singh P, Vitazka G, Meinhardt N, Harbeck, and D.A. Cameron. (2022). *Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer*. *N Engl J Med*. 2022, 387(1):9-20.
- Mulloy R, Salinas S, Philips A. and Hipskind RA. (2003). *Activation of cyclin D1 expression by the ERK5 cascade*. *Oncogene* 22, 5387-5398.
- Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, Klos KS, Li P, Monia BP, Nguyen NT. (2004). *PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients*. *Cancer Cell* 6, 117-127.
- O'Brien NA, Browne BC, Chow L, Wang Y, Ginther C, Arboleda J. (2010). *Activated phosphoinositide 3-kinase/AKT signaling confers resistance to trastuzumab but not lapatinib*. *Mol Cancer Ther* 2010, 9(6):1489-502.
- Pedersen K., Angelini PD, Laos S, Bach-Faig A, Cunningham MP, Ferrer-Ramon C, Luque-Garcia A, Garcia-Castillo J, Parra-Palau JL, Scaltriti M. (2009). *A naturally occurring HER2 carboxy-terminal fragment promotes mammary tumor growth and metastasis*. *MolCell Biol* 29, 3319-3331.

Firma:



- Pedersen NM, Madshus IH, Haslekas C, and Stang E. (2008). *Geldanamycin-induced down-regulation of ErbB2 from the plasma membrane is clathrin dependent but proteasomal activity independent*. Molecular cancer research: MCR 6, 491-500.
- Perez-Madriral D, Finegan KG, Páramo B, and Tournier C. (2012). *The extracellular-regulated protein kinase 5 (ERK5) promotes cell proliferation through the down-regulation of inhibitors of cyclin dependent protein kinases (CDKs)*. Cellular signalling 24, 2360-2368.
- Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kato JY, Bar-Sagi D, Roussel MF, Sherr CJ. (1993). *Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts*. Genes Dev 7:1559-1571.
- Rennstam K, Jonsson G, Tanner M, Bendahl PO, Staaf J, Kapanen AI. (2007). *Cytogenetic characterization and gene expression profiling of the trastuzumab-resistant breast cancer cell line JIMT-1*. Cancer Genet Cytogenet 2007, 15;172(2):95-106.
- Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, and Hortobagyi GN. (2009). *The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine*. Oncologist 14, 320-368.
- Sak MM, Breen K, Ronning SB, Pedersen NM, Bertelsen V, Stang E, and Madshus IH. (2012). *The oncoprotein ErbB3 is endocytosed in the absence of added ligand in a clathrin-dependent manner*. Carcinogénesis 33, 1031-1039.
- Salatino M, Schillaci R, Proietti CJ, Carnevale R, Frahm I, Molinolo AA, Iribarren A, Charreau EH, and Elizalde PV. (2004). *Inhibition of in vivo breast cancer growth by antisense oligodeoxynucleotides to type I insulin-like growth factor receptor mRNA involves inactivation of ErbBs, PI-3K/Akt and p42/p44 MAPK signaling pathways but not modulation of progesterone receptor activity*. Oncogene 23, 5161-5174.
- Schillaci R, Guzmán P, Cayrol F, Beguelin W, Díaz Flaqué MC, Proietti C, Pineda V, Palazzi J, Frahm I, Charreau E, Maronna E, Roa JC and Elizalde P. (2012). *Clinical relevance of ErbB-2/HER2 nuclear expression in breast cancer*. BMC Cancer 12, 74.
- Singh JC, Jhaveri K, Esteva FJ. (2014). *HER2-positive advanced breast cancer: optimizing patient outcomes and opportunities for drug development*. British Journal of Cancer volume 111, 1888–1898.
- Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, Borgen PI, Clark G, Edge SB, Hayes DF. (2002). *Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer*. JClinOncol 20, 3628-3636.

Firma:



- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A. (2001) *Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2*. Vol. 11: 783-792.
- Sung H, Ferlay J, Siegel R, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. (2021). *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA Cancer J Clin 71(3): 209-249.
- Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunakaran D, Lavi S, Ratzkin BJ, and Yarden Y. (1996). *A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor*. MolCell Biol 16, 5276-5287.
- Venturutti L, Romero LV, Urtreger AJ, Chervo MF, Cordo Russo RI, Mercogliano MF, Inurrigarro G, Pereyra MG, Proietti CJ, Izzo F. (2016). *Stat3 regulates ErbB-2 expression and co-opts ErbB-2 nuclear function to induce miR-21 expression, PDCD4 downregulation and breast cancer metastasis*. Oncogene 35, 2208-2222.
- Viniegra M, Paolino M, Arrossi S. (2010). *Cáncer de mama en Argentina: organización, cobertura y calidad de las acciones de prevención y control*. Informe final julio 2010: diagnóstico de situación del Programa Nacional y Programas Provinciales.
- Wang YN and Hung MC. (2012). *Nuclear functions and subcellular trafficking mechanisms of the epidermal growth factor receptor family*. Cell Biosci 2, 13.
- Wang YN, Lee HH, Lee HJ, Du Y, Yamaguchi H, and Hung MC. (2012). *Membrane-bound trafficking regulates nuclear transport of integral epidermal growth factor receptor (EGFR) and ErbB-2*. J Biol Chem 287, 16869-16879.
- Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG. (2013). *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. 2013; 31:3997-4013.
- Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG. (2018). *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 2018; 36(20):2105-2122.

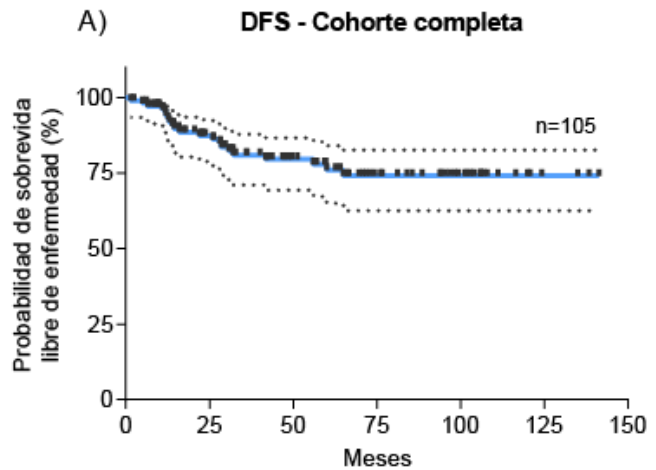


## 11. Anexo - Datos crudos y análisis estadístico

### Anexo 1. Resultado clínico de los pacientes con CM HER2-positivo en la cohorte.

Se muestra el DFS y el OS de la cohorte completa respectivamente.

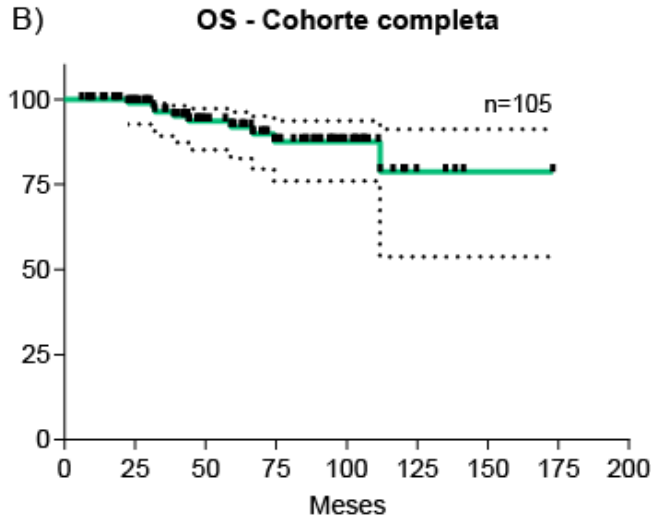
Meses	X	Percentage	+Error	-Error
0,000	100,000			
1,500	98,048		0,818	5,515
2,400	98,048			
5,000	98,086		1,432	5,523
6,200	98,086			
6,500	97,115		1,946	5,793
7,700	97,115			
8,500	97,115			
9,200	97,115			
9,700	97,115			
9,800	97,115			
10,000	97,115			
11,000	96,082		2,431	6,193
11,200	96,082			
11,930	96,026		2,876	6,577
12,000	95,970		3,279	6,916
12,600	92,914		3,648	7,221
13,000	91,859		3,990	7,498
14,000	90,802		4,308	7,751
14,100	90,802			
14,160	90,802			
14,400	90,802			
14,500	89,708		4,625	8,015
15,900	89,708			
16,000	88,601		4,928	8,266
17,400	88,601			
17,800	88,601			
20,600	88,601			
22,000	87,435		5,241	8,538
22,500	87,435			
22,900	87,435			
23,100	87,435			
23,800	87,435			
26,000	86,204		5,564	8,832
26,300	86,204			
28,000	84,954		5,877	9,110
28,400	84,954			
28,500	83,686		6,181	9,373
28,100	83,686			
29,800	83,686			
30,800	82,379		6,485	9,636
31,600	82,379			
32,000	82,379			
32,100	81,028		6,790	9,900
32,900	81,028			
36,000	81,028			
36,300	81,028			
40,100	81,028			
41,900	79,581		7,119	10,196
42,000	79,581			
42,400	79,581			
43,700	79,581			
46,900	79,581			
47,630	79,581			
48,700	79,581			
49,600	79,581			
51,300	79,581			
56,100	77,888		7,540	10,622
57,000	77,888			
59,400	77,888			
59,900	76,077		7,988	11,072
60,000	76,077			
64,000	76,077			
65,000	74,126		8,471	11,553
66,200	74,126			
66,700	74,126			
69,700	74,126			
70,900	74,126			
71,900	74,126			
73,000	74,126			
74,300	74,126			
76,100	74,126			
76,600	74,126			
81,200	74,126			
84,000	74,126			
85,800	74,126			
88,630	74,126			
93,900	74,126			
94,300	74,126			
95,600	74,126			
96,900	74,126			
98,300	74,126			
99,300	74,126			
101,200	74,126			
102,000	74,126			
103,000	74,126			
104,000	74,126			
105,800	74,126			
106,000	74,126			
106,200	74,126			
107,100	74,126			
108,000	74,126			
111,230	74,126			
116,500	74,126			
120,000	74,126			
120,800	74,126			
134,300	74,126			
135,000	74,126			
138,400	74,126			
141,400	74,126			



Number of rows	105
# of blank lines	0
# rows with impossible data	0
# censored subjects	84
# deaths/events	21
Median survival	Undefined

Firma:

Meses			
X	Percentage	+Error	-Error
0.000	100.000		
6.200	100.000		
8.200	100.000		
8.500	100.000		
9.800	100.000		
10.000	100.000		
13.500	100.000		
14.400	100.000		
17.500	100.000		
18.400	100.000		
19.700	100.000		
22.500	98.936	0.913	6.248
22.900	98.936		
23.600	98.936		
23.800	98.936		
24.900	98.936		
25.100	98.936		
25.600	98.936		
26.300	98.936		
28.400	98.936		
28.600	98.936		
29.100	98.936		
29.900	98.936		
30.400	98.936		
31.600	97.668	1.747	6.724
32.000	96.399	2.430	7.192
35.500	96.399		
36.000	96.399		
38.700	95.079	3.053	7.708
40.100	95.079		
41.900	95.079		
42.200	95.079		
42.300	95.079		
42.400	95.079		
43.300	95.079		
43.700	95.079		
43.900	93.593	3.706	8.390
44.300	93.593		
46.900	93.593		
47.630	93.593		
48.700	93.593		
49.600	93.593		
51.300	93.593		
57.800	93.593		
58.900	91.892	4.423	9.231
59.400	91.892		
59.500	91.892		
59.900	91.892		
60.100	91.892		
62.700	91.892		
63.200	91.892		
64.000	91.892		
66.200	91.892		
66.700	89.849	5.278	10.343
67.000	89.849		
69.700	89.849		
70.900	89.849		
71.900	89.849		
74.300	87.546	6.203	11.516
74.600	87.546		
76.100	87.546		
76.600	87.546		
81.200	87.546		
84.000	87.546		
85.600	87.546		
85.760	87.546		
88.300	87.546		
88.630	87.546		
90.330	87.546		
90.800	87.546		
93.900	87.546		
94.300	87.546		
95.000	87.546		
95.600	87.546		
96.900	87.546		
98.300	87.546		
99.300	87.546		
102.000	87.546		
102.900	87.546		
103.000	87.546		
104.000	87.546		
105.800	87.546		
106.000	87.546		
106.200	87.546		
107.600	87.546		
111.230	87.546		
111.860	78.791	12.452	24.999
116.500	78.791		
120.000	78.791		
120.800	78.791		
124.700	78.791		
135.000	78.791		
138.400	78.791		
141.400	78.791		
173.000	78.791		

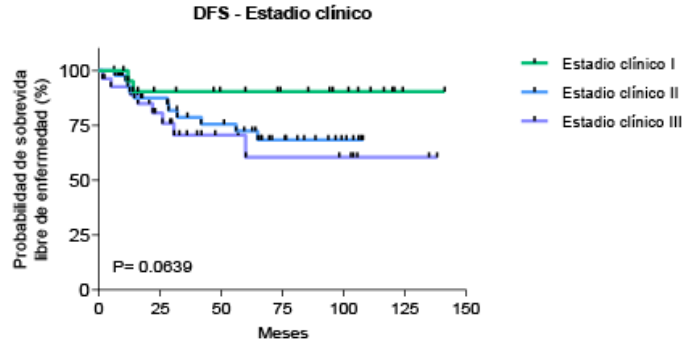


Number of rows	105
# of blank lines	0
# rows with impossible data	1
# censored subjects	95
# deaths/events	9
Median survival	Undefined

Firma:

Anexo 2. Resultado clínico de la cohorte de pacientes en función del estadio clínico.

Meses	Estadio clínico I	Estadio clínico II	Estadio clínico III
0.000	100.000	100.000	100.000
1.500			96.429
2.400			96.429
5.000			92.720
6.200		100.000	
6.500		97.826	
7.700		97.826	
8.500		97.826	
9.200		97.826	
9.700		97.826	
9.800		97.826	
10.000	100.000		
11.000		95.380	
11.200		95.380	
11.930		92.803	
12.000	95.238		
12.600		90.225	
13.000			89.011
14.000	90.476		
14.100			89.011
14.160		90.225	
14.500		87.571	
15.900			89.011
16.000	90.476		84.965
17.400		87.571	
17.800		87.571	
20.600			84.965
22.000			80.717
22.500	90.476		
22.900			80.717
23.100			80.717
26.000			75.969
28.000		84.746	
28.400		84.746	
28.500		81.824	
28.100			75.969
29.800			75.969
30.800			70.542
31.600	90.476		
32.000		81.824	
32.100		78.793	
32.900			70.542
36.000			70.542
36.300		78.793	
40.100			70.542
41.900		75.542	
42.000			70.542
46.900	90.476		
47.630			70.542
49.600	90.476		
51.300		75.542	
56.100		72.363	
57.000			70.542
59.400		72.363	
59.900	90.476		
60.000			60.465
62.700		72.363	
64.000		72.363	
65.000		68.333	
66.200		68.333	
66.700		68.333	
68.700		68.333	
70.900		68.333	
73.000	90.476		
74.300	90.476		
76.100		68.333	
76.600		68.333	
81.200		68.333	
84.000		68.333	
85.600	90.476		
88.630		68.333	
93.900		68.333	
94.300	90.476		
95.600	90.476		
96.900		68.333	
98.300			60.465
99.300		68.333	
101.200		68.333	
102.000	90.476		
103.000			60.465
104.000		68.333	60.465
105.800			60.465
106.000	90.476		
106.200		68.333	
107.100		68.333	
108.000		68.333	
111.230	90.476		
116.500	90.476		
120.000	90.476		
120.800	90.476		
124.300	90.476		
135.000			60.465
138.400			60.465
141.400	90.476		



Logrank test for trend (recommended)	
Chi square	3.434
df	1
P value	0.0639
P value summary	ns
Sig. trend?	No

	Estadio clínico I	Estadio clínico II	Estadio clínico III
Number of rows	105	105	105
# of blank lines	83	58	77
# rows with impossible data	0	0	0
# censored subjects	20	36	20
# deaths/events	2	11	8
Median survival	Undefined	Undefined	Undefined



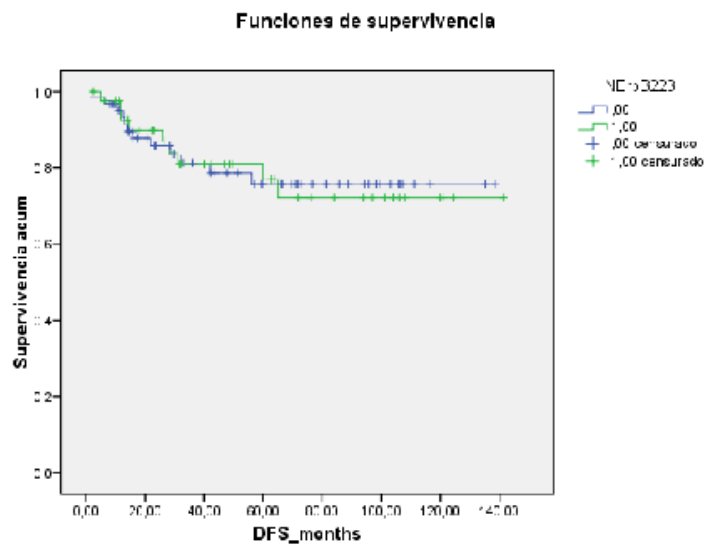
Firma:



**Anexo 3 A. Estudio de la relevancia clínica de ErbB-2 nuclear en CM HER2-positivo (datos no mostrados).**

Este análisis fue realizado considerando que los tumores NErbB-2 positivos, son aquellos que presentan una puntuación para NErbB-2 2+ y 3+. Se muestran los gráficos correspondientes a la asociación de NErbB-2 con: DFS, OS, LRFS, DMFS y BCSS.

**DFS Cohorte Completa - Análisis realizado con SPSS**



**Resumen del procesamiento de los casos**

NErbB223	Nº total	Nº de eventos	Censurado	
			Nº	Porcentaje
,00	62	12	50	80,6%
1,00	43	9	34	79,1%
Global	105	21	84	80,0%

**Comparaciones globales**

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,007	1	,934
Breslow (Generalized Wilcoxon)	,009	1	,924

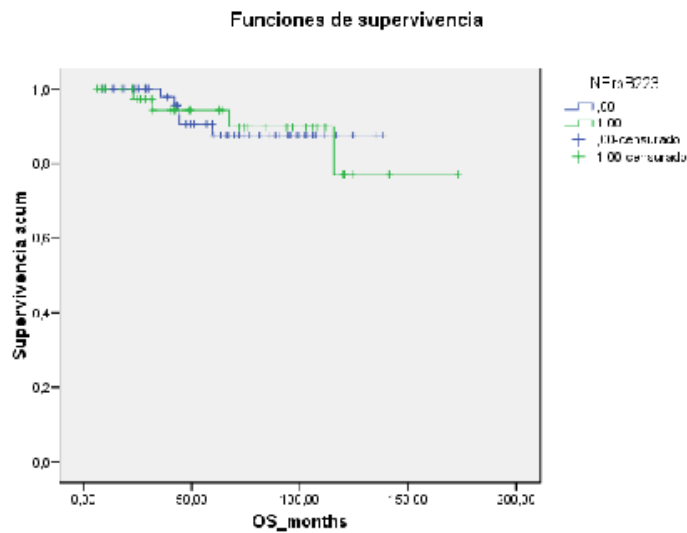
Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de NErbB223.

NErbB-223 es el nombre de la variable de la expresión de NErbB-2 en donde NErbB-2 positivos fueron aquellos con un puntaje de 2+ y 3+.

Firma:



OS Cohorte Completa - Análisis realizado con SPSS



**Resumen del procesamiento de los casos**

N ErbB223	Nº total	Nº de eventos	Censurado	
			Nº	Porcentaje
,00	62	5	57	91,9%
1,00	43	4	39	90,7%
Global	105	9	96	91,4%

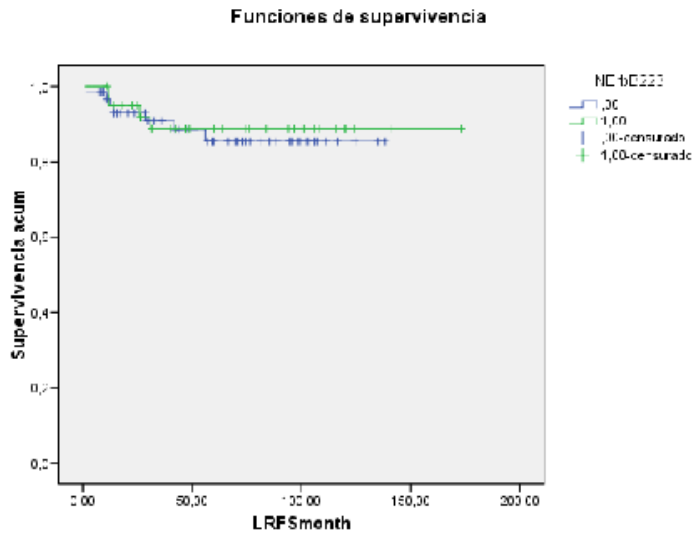
**Comparaciones globales**

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,000	1	,994
Breslow (Generalized Wilcoxon)	,007	1	,934

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de N ErbB223.

N ErbB-223 es el nombre de la variable de la expresión de N ErbB-2 en donde N ErbB-2 positivos fueron aquellos con un puntaje de 2+ y 3+.

LRFS Cohorte Completa - Análisis realizado con SPSS



**Resumen del procesamiento de los casos**

NErbB223	Nº total	Nº de eventos	Censurado	
			Nº	Porcentaje
,00	62	7	55	88,7%
1,00	43	4	39	90,7%
Global	105	11	94	89,5%

**Comparaciones globales**

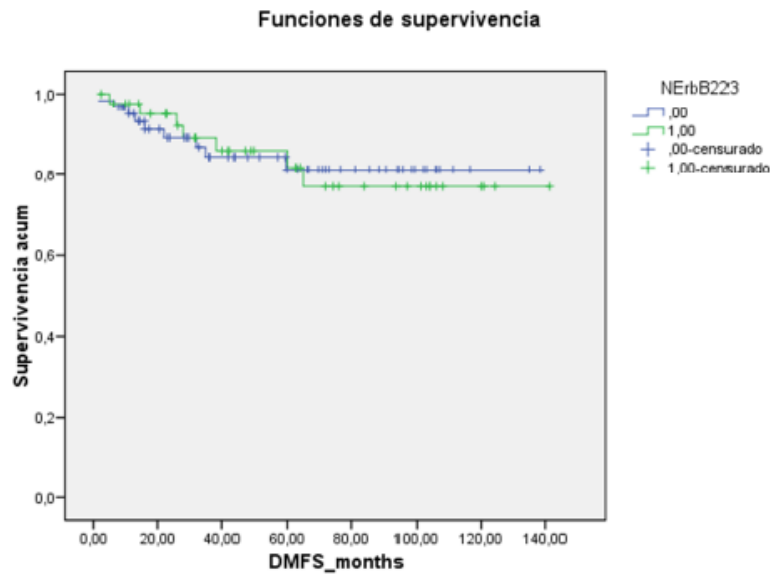
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,123	1	,726
Breslow (Generalized Wilcoxon)	,100	1	,752

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de NErbB223.

NErbB-223 es el nombre de la variable de la expresión de NErbB-2 en donde NErbB-2 positivos fueron aquellos con un puntaje de 2+ y 3+.

Firma: 

## DMFS Cohorte Completa - Análisis realizado con SPSS



**Comparaciones globales**

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,005	1	,943
Breslow (Generalized Wilcoxon)	,048	1	,826

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de NErbB223.

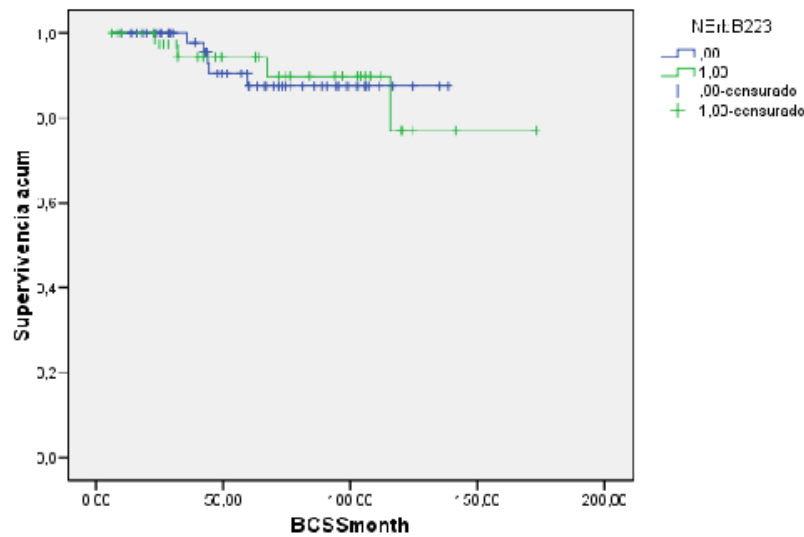
NErbB-223 es el nombre de la variable de la expresión de NErbB-2 en donde NErbB-2 positivos fueron aquellos con un puntaje de 2+ y 3+.

Firma:



BCSS Cohorte Completa - Análisis realizado con SPSS

**Funciones de supervivencia**



**Resumen del procesamiento de los casos**

NErbB223	Nº total	Nº de eventos	Censurado	
			Nº	Porcentaje
,00	62	5	57	91,9%
1,00	43	4	39	90,7%
Global	105	9	96	91,4%

**Comparaciones globales**

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,000	1	,994
Breslow (Generalized Wilcoxon)	,007	1	,934

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de NErB223.

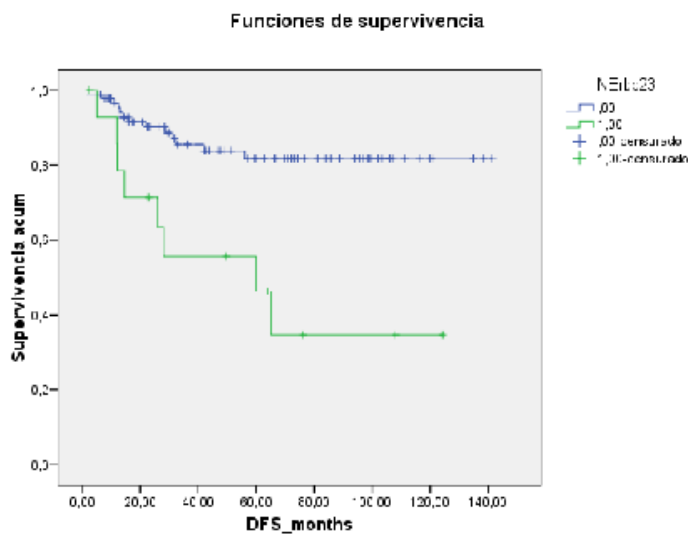
NErbB-223 es el nombre de la variable de la expresión de NErB-2 en donde NErB-2 positivos fueron aquellos con un puntaje de 2+ y 3+.



**Anexo 3 B. La expresión de NERbB-2 se asocia a un mal pronóstico clínico en pacientes con CM HER2-positivos.**

Este análisis fue realizado considerando que los tumores NERbB-2-positivos, son aquellos que presentan una puntuación para NERbB-2 3+. Se muestran los gráficos correspondientes a la asociación de NERbB-2 con: DFS, OS, LRFS, DMFS y BCSS. Estos gráficos corresponden al análisis realizado con SPSS con la finalidad de confirmar los resultados obtenidos con GraphPad Prism.

**DFS Cohorte Completa - Análisis realizado con SPSS**



**Resumen del procesamiento de los casos**

NERbb23	N° total	N° de eventos	Censurado	
			N°	Porcentaje
,00	90	13	77	85,6%
1,00	15	8	7	46,7%
Global	105	21	84	80,0%

**Comparaciones globales**

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	12,369	1	0,000436
Breslow (Generalized Wilcoxon)	10,072	1	0,001505

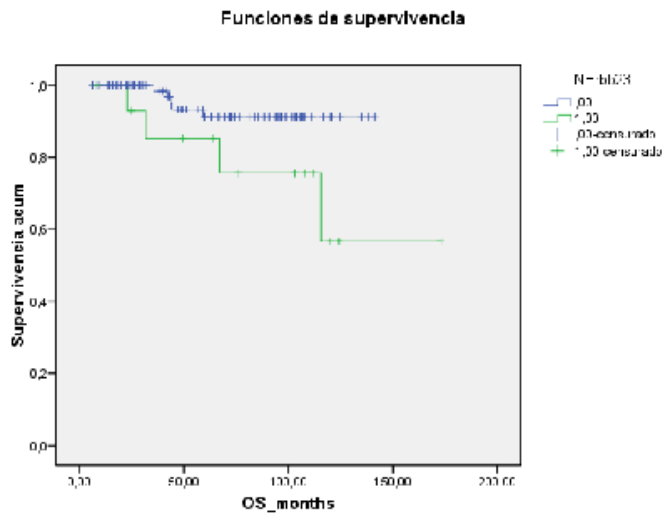
Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de NERbb23.

NERbB-23 es el nombre de la variable de la expresión de NERbB-2 en donde NERbB-2 positivos fueron aquellos con un puntaje de 3+.

Firma:



OS Cohorte Completa - Análisis realizado con SPSS



**Resumen del procesamiento de los casos**

NErbB23	N° total	N° de eventos	Censurado	
			N°	Porcentaje
,00	90	5	85	94,4%
1,00	15	4	11	73,3%
Global	105	9	96	91,4%

**Comparaciones globales**

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	3,984	1	0,04592
Breslow (Generalized Wilcoxon)	3,386	1	0,06575

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de NErbB23.

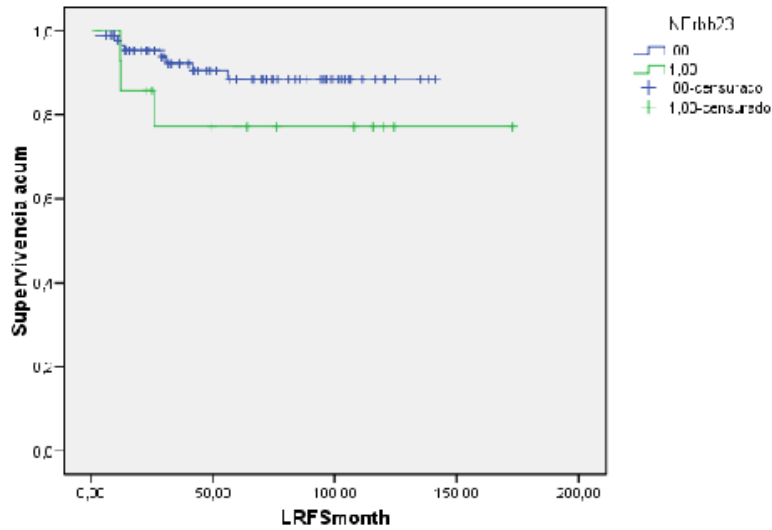
NErbB-23 es el nombre de la variable de la expresión de NErbB-2 en donde NErbB-2 positivos fueron aquellos con un puntaje de 3+.

Firma:



LRFS Cohorte Completa - Análisis realizado con SPSS

Funciones de supervivencia



Resumen del procesamiento de los casos

NErbB23	N° total	N° de eventos	Censurado	
			N°	Porcentaje
,00	90	8	82	91,1%
1,00	15	3	12	80,0%
Global	105	11	94	89,5%

Comparaciones globales

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1,655	1	,198
Breslow (Generalized Wilcoxon)	2,024	1	,155

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de NErbB23.

NErbB-23 es el nombre de la variable de la expresión de NErbB-2 en donde NErbB-2 positivos fueron aquellos con un puntaje de 3+.

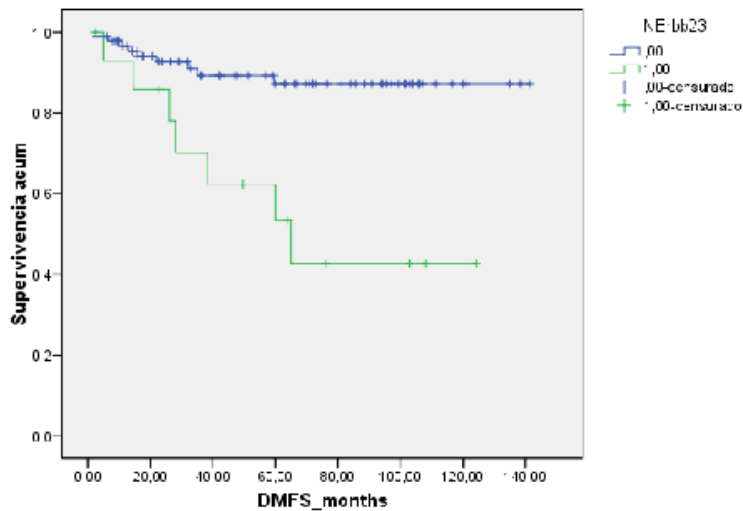


Firma:



## DMFS Cohorte Completa - Análisis realizado con SPSS

**Funciones de supervivencia**



**Resumen del procesamiento de los casos**

NErbB23	Nº total	Nº de eventos	Censurado	
			Nº	Porcentaje
,00	90	9	81	90,0%
1,00	15	7	8	53,3%
Global	105	16	89	84,8%

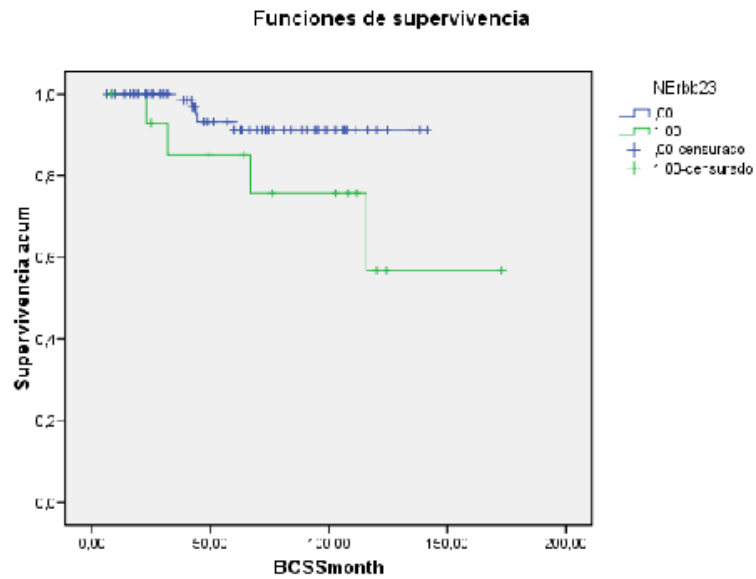
**Comparaciones globales**

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	11,508	1	0,00069
Breslow (Generalized Wilcoxon)	8,101	1	0,00443

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de NErbB23.

NErbB-23 es el nombre de la variable de la expresión de NErbB-2 en donde NErbB-2 positivos fueron aquellos con un puntaje de 3+.

BCSS Cohorte Completa - Análisis realizado con SPSS



**Resumen del procesamiento de los casos**

NErbB23	Nº total	Nº de eventos	Censurado	
			Nº	Porcentaje
,00	90	5	85	94,4%
1,00	15	4	11	73,3%
Global	105	9	96	91,4%

**Comparaciones globales**

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	3,984	1	,046
Breslow (Generalized Wilcoxon)	3,386	1	,066

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de NErbB23.

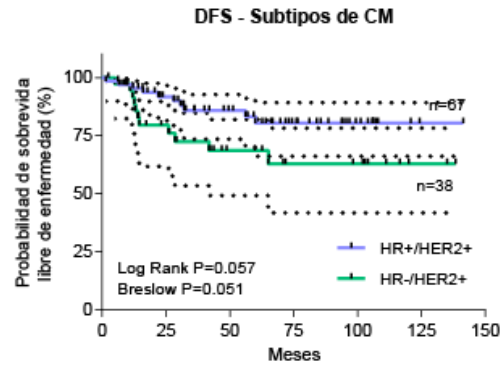
NErbB-23 es el nombre de la variable de la expresión de NErbB-2 en donde NErbB-2 positivos fueron aquellos con un puntaje de 3+.

Firma:

### Anexo 4. Resultado clínico en pacientes con subtipo de CM RH+/HER2+ y HR-/HER2+.

Se muestra el DFS y el OS de la cohorte completa respectivamente.

Meses X	HR-/HER2+			HR+/HER2+		
	Porcentaje	+Error	-Error	Porcentaje	+Error	-Error
0.000	100.000			100.000		
1.500	98.507	1.281	8.633			
2.400				100.000		
5.000				97.297	2.318	14.374
6.200	96.992					
6.500	96.992	2.247	8.490			
7.700	96.992					
8.500	96.992					
9.200	96.992					
9.700	96.992					
9.800				97.297		
10.000	96.992					
11.000				94.517	4.083	14.713
11.200				94.517		
11.930				91.564	5.640	15.520
12.000	95.348	3.130	9.101			
12.600				88.610	6.964	16.213
13.000				85.656	8.119	16.789
14.000				82.703	9.142	17.258
14.100	95.348					
14.150				82.703		
14.400				82.703		
14.500				79.522	10.175	17.820
15.900	95.348					
16.000	93.645	3.927	9.733			
17.400				79.522		
17.800	93.645					
20.600	93.645					
22.000	91.845	4.690	10.396			
22.500	91.845					
22.900	91.845					
23.100				79.522		
23.800	91.845					
26.000				76.054	11.242	18.450
26.300				76.054		
28.000	89.931	5.439	11.076			
28.400	89.931					
28.500				72.442	12.275	19.004
29.100				72.442		
29.800	89.931					
30.800	87.933	6.162	11.725			
31.600	87.933					
32.000	87.933					
32.100	85.839	6.871	12.351			
32.900	85.839					
36.000	85.839					
36.300	85.839					
40.100	85.839					
41.900				68.629	13.285	19.483
42.000	85.839					
42.400				68.629		
43.700				68.629		
46.900				68.629		
47.630	85.839					
48.700				68.629		
49.600	85.839					
51.300	85.839					
56.100	83.238	7.803	13.375			
57.000	83.238					
59.400	83.238					
59.999				66.429		
60.000	80.463	8.738	14.329			
62.700	80.463			66.429		
64.000	80.463					
65.000				62.910	15.287	21.157
66.200	80.463					
66.700	80.463					
69.700	80.463					
70.900				62.910		
71.900	80.463			62.910		
73.000	80.463					
74.300	80.463					
76.100	80.463					
76.500	80.463					
81.200	80.463					
84.000	80.463					
85.600	80.463					
88.630	80.463					
93.900	80.463					
94.300	80.463					
95.600	80.463					
96.900	80.463					
98.300				62.910		
99.300	80.463					
101.200	80.463					
102.000				62.910		
103.000				62.910		
104.000	80.463			62.910		
105.800	80.463					
106.000	80.463					
106.200	80.463					
107.100	80.463					
108.000	80.463					
111.230				62.910		
116.500				62.910		
120.000				62.910		
120.800	80.463					
124.300	80.463					
135.000				62.910		
138.400				62.910		
141.400	80.463					



	HR+/HER2+	HR-/HER2+
Number of rows	105	105
# of blank lines	38	67
# rows with impossible data	0	0
# censored subjects	57	27
# deaths/events	10	11
Median survival	Undefined	Undefined

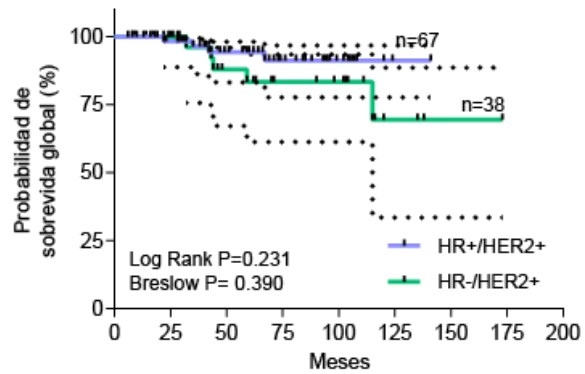
Gehan-Breslow-Wilcoxon test	
Chi square	3.815
df	1
P value	0.0508
P value summary	ns
Are the survival curves sig different?	No

Log-rank (Mantel-Cox) test	
Chi square	3.630
df	1
P value	0.0567
P value summary	ns
Are the survival curves sig different?	No

Firma:

**OS - Subtipos de CM**

Meses X	HR+/HER2+			HR-/HER2+		
	Percentage	+Error	-Error	Percentage	+Error	-Error
0.000	100.000			100.000		
6.000	100.000					
8.000				100.000		
9.000				100.000		
10.000	100.000					
13.000	100.000					
14.000				100.000		
16.000	100.000					
17.000				100.000		
18.000	100.000					
19.000	100.000					
22.000	96.333	1.430	9.581	100.000		
23.000	96.333					
24.000				100.000		
25.000				100.000		
26.000				100.000		
28.000	98.333			100.000		
29.000	96.333			100.000		
30.000	96.333					
31.000	96.333					
32.000	96.333			96.154	3.295	20.459
35.000	96.367	2.717	10.197			
38.000	96.367					
40.000	96.367					
41.000	96.367					
42.000	94.272	3.856	11.089	96.154		
43.000	94.272			92.147	5.831	20.068
44.000				87.959	7.999	20.855
46.000				87.959		
47.000	94.272					
48.000				87.959		
49.000	94.272					
51.000	94.272					
57.000	94.272					
59.000	94.272			83.329	10.101	22.033
60.000	94.272					
62.000	94.272			83.329		
63.000				83.329		
64.000	94.272					
66.000	94.272					
67.000	91.231	5.491	13.559			
69.000	91.231					
70.000				83.329		
71.000	91.231			83.329		
73.000	91.231					
74.000	91.231					
76.000	91.231					
81.000	91.231					
84.000	91.231					
85.000	91.231					
88.000	91.231					
90.000				83.329		
93.000	91.231					
94.000	91.231					
95.000	91.231					
96.000	91.231					
98.000				83.329		
99.000	91.231					
102.000	91.231			83.329		
103.000				83.329		
104.000	91.231			83.329		
105.000	91.231					
106.000	91.231					
107.000	91.231					
108.000	91.231					
111.000				83.329		
115.000				69.441	19.110	35.949
116.000				69.441		
120.000	91.231			69.441		
124.000	91.231					
135.000				69.441		
138.000				69.441		
141.000	91.231					
173.000				69.441		



	HR+/HER2+	HR-/HER2+
Number of rows	105	105
# of blank lines	38	67
# rows with impossible data	0	0
# censored subjects	63	33
# deaths/events	4	5
Median survival	Undefined	Undefined

Gehan-Breslow-Wilcoxon test	
Chi square	0.7385
df	1
P value	0.3901
P value summary	ns
Are the survival curves sig different?	No

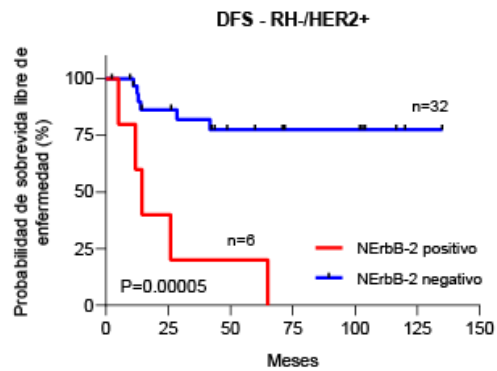
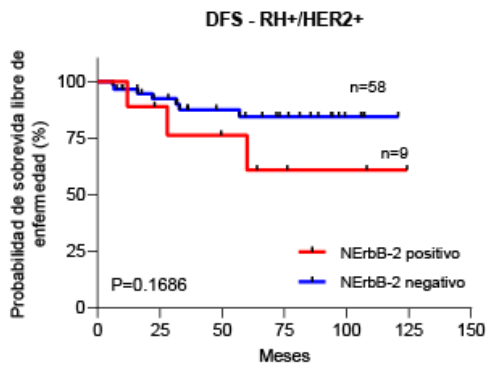
Log-rank (Mantel-Cox) test	
Chi square	1.435
df	1
P value	0.2310
P value summary	ns
Are the survival curves sig different?	No

Firma:



**Anexo 5. La expresión de NErbB-2 se asocia a un mal pronóstico clínico en pacientes con CM HR-/HER2-positivos.**

Análisis realizado por GraphPad Prism.



	NErbB-2 positivo	NErbB-2 negativo
Number of rows	67	67
# of blank lines	58	9
# rows with impossible data	0	0
# censored subjects	6	51
# deaths/events	3	7
Median survival	Undefined	Undefined

	NErbB-2 positivo	NErbB-2 negativo
Number of rows	38	38
# of blank lines	32	6
# rows with impossible data	0	0
# censored subjects	1	26
# deaths/events	5	6
Median survival	14.5	Undefined

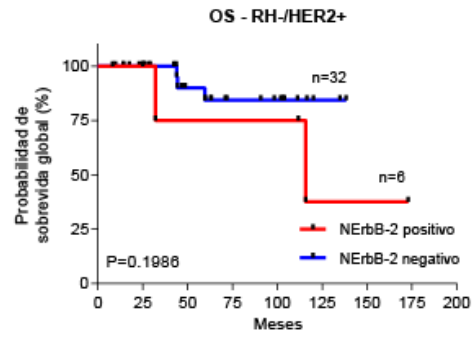
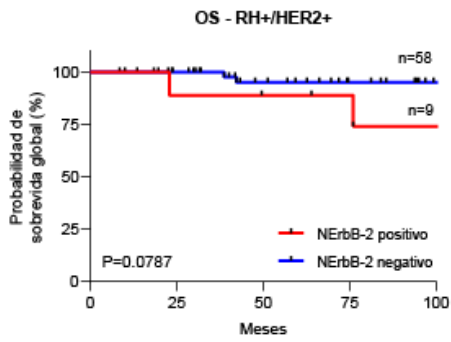
Log-rank (Mantel-Cox) test	
Chi square	1.896
df	1
P value	0.1686
P value summary	ns
Are the survival curves sig different?	No

Log-rank (Mantel-Cox) test	
Chi square	16.32
df	1
P value	<0.0001
P value summary	****
Are the survival curves sig different?	Yes

Nota: El análisis fue confirmado con SPSS. En el caso del grupo, DFS - RH-/HER2+, dicho programa arrojó un P value exacto de 0.00005 que es el que se puso en la figura.

*[Handwritten signature]*

Firma:



	NERbB-2 positivo	NERbB-2 negativo
Number of rows	67	67
# of blank lines	58	9
# rows with impossible data	0	0
# censored subjects	7	58
# deaths/events	2	2
Median survival	Undefined	Undefined

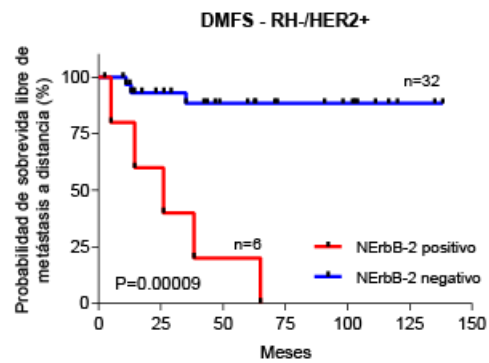
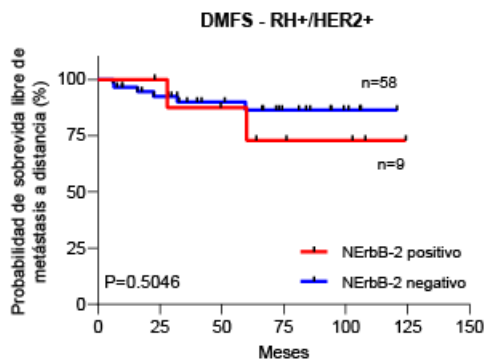
	NERbB-2 positivo	NERbB-2 negativo
Number of rows	38	38
# of blank lines	32	6
# rows with impossible data	0	0
# censored subjects	4	29
# deaths/events	2	3
Median survival	115.8	Undefined

Log-rank (Mantel-Cox) test	
Chi square	3.092
df	1
P value	0.0787
P value summary	ns
Are the survival curves sig different?	No

Log-rank (Mantel-Cox) test	
Chi square	1.652
df	1
P value	0.1986
P value summary	ns
Are the survival curves sig different?	No

*[Handwritten signature]*

Firma:



	NErbB-2 positivo	NErbB-2 negativo
Number of rows	67	67
# of blank lines	58	9
# rows with impossible data	0	0
# censored subjects	7	52
# deaths/events	2	6
Median survival	Undefined	Undefined

	NErbB-2 positivo	NErbB-2 negativo
Number of rows	38	38
# of blank lines	32	6
# rows with impossible data	0	0
# censored subjects	1	29
# deaths/events	5	3
Median survival	26	Undefined

Log-rank (Mantel-Cox) test	
Chi square	0.4452
df	1
P value	0.5046
P value summary	ns
Are the survival curves sig different?	No

Log-rank (Mantel-Cox) test	
Chi square	21.01
df	1
P value	<0.0001
P value summary	****
Are the survival curves sig different?	Yes

Nota: El análisis fue confirmado con SPSS. En el caso del grupo, DMFS - RH-/HER2+, dicho programa arrojó un P value exacto de 0.00009 que es el que se puso en la figura.

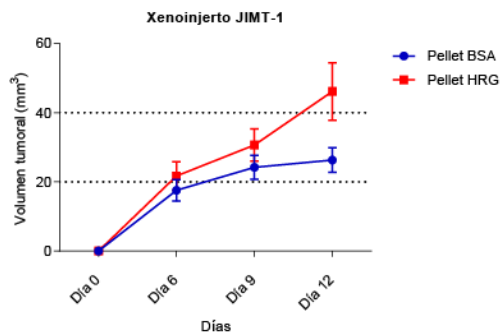
Firma:



## Anexo 6. La HRGβ1 induce el crecimiento tumoral *in vivo* de los tumores inducidos por las JIMT-1.

Tabla de volúmenes tumorales (mm<sup>3</sup>) correspondientes a los ratones de los distintos grupos según el día post-inyección de las células tumorales.

Días	X	Pellet BSA														Pellet HRG									
		A:Y1	A:Y2	A:Y3	A:Y4	A:Y5	A:Y6	A:Y7	A:Y8	A:Y9	A:Y10	A:Y11	A:Y12	A:Y13	A:Y14	B:Y1	B:Y2	B:Y3	B:Y4	B:Y5	B:Y6	B:Y7	B:Y8	B:Y9	B:Y10
Día 0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Día 6	6	8.84	3.27	38.29	35.42	25.46	18.91	11.83	19.02	8.02	34.36	6.79	17.05	10.86	7.80	35.48	16.35	12.56	13.26	3.06	25.78	31.24	7.54	42.20	11.24
Día 9	9	9.42	24.10	43.04	38.65	22.53	37.25	44.80	16.58	12.20	35.10	14.05	21.85	12.52	7.32	46.25	16.42	28.24	25.51	3.28	49.24	38.19	12.55	43.57	15.88
Día 12	12	17.55	18.12	46.41	42.92	29.48	30.59	24.88	11.62	23.95	32.08	15.37	31.04	15.96	8.47	47.53	19.49	36.63	29.56	3.18	91.45	59.29	20.35	76.21	34.90



Compare each cell mean with the other cell mean in that row				
Number of families	1			
Number of comparisons per family	4			
Alpha	0.05			
Bonferroni's multiple comparisons test	Predicted (LS) mean diff.	95.00% CI of diff.	Below threshold?	Summary
Pellet BSA - Pellet HRG				
Día 0	0.000	-14.13 to 14.13	No	ns
Día 6	-4.172	-18.30 to 9.954	No	ns
Día 9	-6.406	-20.53 to 7.721	No	ns
Día 12	-19.86	-33.99 to -5.736	Yes	**

Unpaired t test	
P value	0.0211
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.493, df=21

Nota: Se hace notar que en el grupo de los animales implantados con el *pellet* HRGβ1 e inyectados con las células tumorales, en el ratón número 5, el tumor no prendió bien, razón por la cual fue descartado.

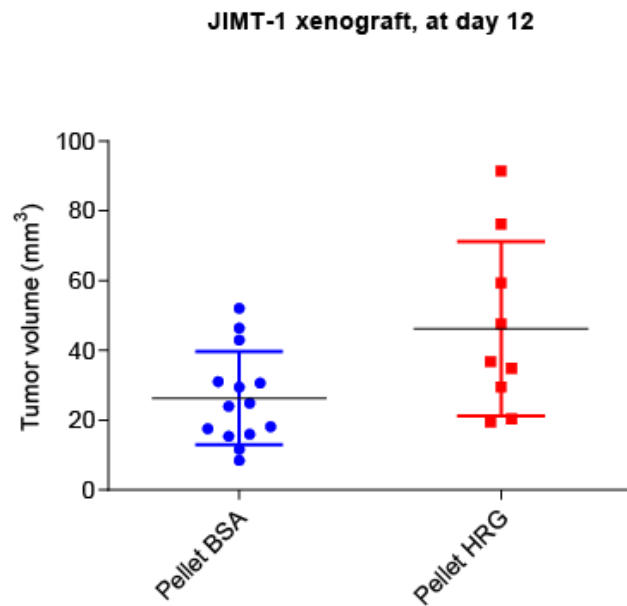


Firma:



Comparación de los volúmenes tumorales, de los animales correspondientes de los distintos grupos, al día 12.

Pellet BSA	Pellet HRG
17.55	47.53
18.12	19.49
46.41	36.83
42.92	29.56
29.48	<del>9.18</del>
30.59	91.45
24.88	59.29
11.62	20.36
23.95	76.21
52.08	34.90
15.37	
31.04	
15.96	
8.47	



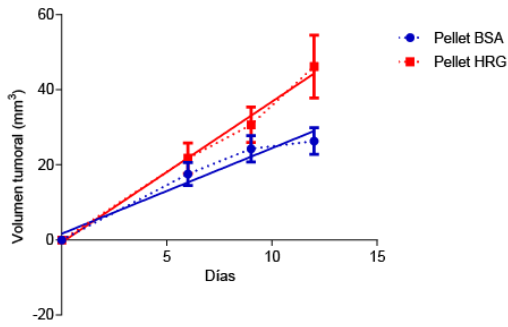
	Pellet BSA	Pellet HRG
Number of values	14	9
Minimum	8.470	19.49
25% Percentile	15.81	24.96
Median	24.42	36.83
75% Percentile	34.01	67.75
Maximum	52.08	91.45
Mean	26.32	46.18
Std. Deviation	13.32	24.99
Std. Error of Mean	3.560	8.329
Lower 95% CI of mean	18.63	26.97
Upper 95% CI of mean	34.01	65.39
Sum	368.4	415.6

Firma:

### Anexo 7 A. Tasa de crecimiento de xenoinjertos de JIMT-1.

X	Pellet BSA														Pellet HRG									
	A'Y1	A'Y2	A'Y3	A'Y4	A'Y5	A'Y6	A'Y7	A'Y8	A'Y9	A'Y10	A'Y11	A'Y12	A'Y13	A'Y14	B'Y1	B'Y2	B'Y3	B'Y4	B'Y5	B'Y6	B'Y7	B'Y8	B'Y9	B'Y10
Day 0 18/03/2020	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Day 6 24/03/2020	6	8.94	3.27	39.29	38.42	29.46	18.91	11.83	19.02	9.02	36.35	6.79	17.95	10.86	7.80	35.48	16.35	12.56	13.35	25.75	31.54	7.54	42.00	11.24
Day 9 27/03/2020	9	9.42	24.10	43.04	38.65	22.53	37.25	44.80	16.58	12.20	35.10	14.05	21.85	12.52	7.32	46.25	16.42	28.24	25.51	49.24	38.19	12.55	43.57	15.88
Day 12 30/03/2020	12	17.55	18.12	46.41	42.52	29.48	30.59	24.88	11.62	23.95	52.08	15.27	31.04	15.95	8.47	47.53	19.49	35.83	29.55	44.44	91.45	59.29	20.35	76.21

Regresión lineal - Pendiente de la curva de crecimiento tumoral

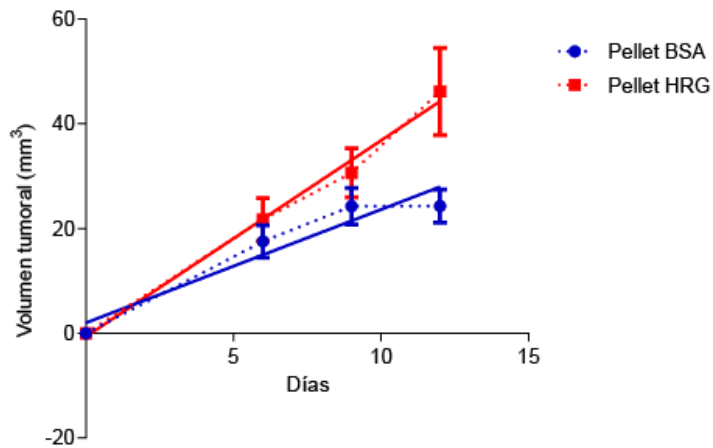


	Pellet BSA	Pellet HRG
<b>Best-fit values</b>		
Slope	2.280	3.747
Y-intercept	1.643	-0.6523
X-intercept	-0.7206	0.1741
1/slope	0.4386	0.2669
<b>Std. Error</b>		
Slope	0.3321	0.5721
Y-intercept	2.682	4.621
<b>95% Confidence Intervals</b>		
Slope	1.614 to 2.946	2.585 to 4.910
Y-intercept	-3.735 to 7.021	-10.04 to 8.739
X-intercept	-4.160 to 1.326	-3.208 to 2.156
<b>Goodness of Fit</b>		
R squared	0.4661	0.5579
Sy.x	11.03	15.23
<b>Is slope significantly non-zero?</b>		
F	47.14	42.90
DFn, DFd	1, 54	1, 34
P value	<0.0001	<0.0001
Deviation from zero?	Significant	Significant

Firma:

Análisis estadístico de la comparación de las pendientes entre los grupos *pellet* BSA y *pellet* HRGβ1.

Regresión lineal - Pendiente de la curva de crecimiento tumoral



pellet BSA			Pellet HRG		
Mean	SEM	N	Mean	SEM	N
2.165	0.325	14	3.747	0.572	9

Table Analyzed	Data 5
Column B	Pellet HRG
vs.	vs.
Column A	pellet BSA
Unpaired t test	
P value	0.0169
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.595, df=21
How big is the difference?	
Mean of column A	2.165
Mean of column B	3.747
Difference between means (B - A) ± SEM	1.582 ± 0.6097
95% confidence interval	0.3141 to 2.850
R squared (eta squared)	0.2428
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	1.994, 8, 13
P value	0.2583
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
Data analyzed	
Sample size, column A	14
Sample size, column B	9

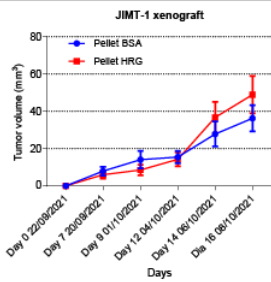
Firma:



**Anexo 7 B. La HRGβ1 induce el crecimiento tumoral *in vivo* de los tumores inducidos por las JIMT-1 (datos no mostrados).**

Datos crudos correspondientes al segundo experimento realizado. El grupo *pellet* BSA presenta un n=5, el grupo *pellet* HRGβ1 un n=8, dado que en ambos grupos hay dos tumores que no prendieron.

Days	PELLET BSA										PELLET HRG									
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	Y10	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	Y10
Day 0 22/09/2021	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Day 7 20/09/2021	7	2.40	16.49	0.00	5.89	7.08	7.84	0.00			0.00	16.38	2.91	5.64	12.72	2.01	0.80	8.07	0.00	0.00
Day 9 01/10/2021	9	4.94	31.99	0.00	6.45	11.04	14.03	0.00			0.00	11.44	0.99	19.93	13.68	4.04	1.46	16.88	0.00	0.00
Day 12 04/10/2021	12	6.39	26.19	0.00	16.70	11.96	14.12	0.00			0.00	21.45	4.50	12.06	19.07	19.65	5.76	31.86	0.00	0.00
Day 14 06/10/2021	14	12.63	47.22	0.00	17.53	21.69	40.13	0.00			0.00	70.77	37.93	58.98	36.26	33.63	10.11	46.39	0.00	0.00
Dia 16 08/10/2021	16	15.03	58.87	0.00	36.07	31.85	39.65	0.00			3.60	84.87	34.64	60.34	48.67	76.38	18.51	64.83	0.00	0.00

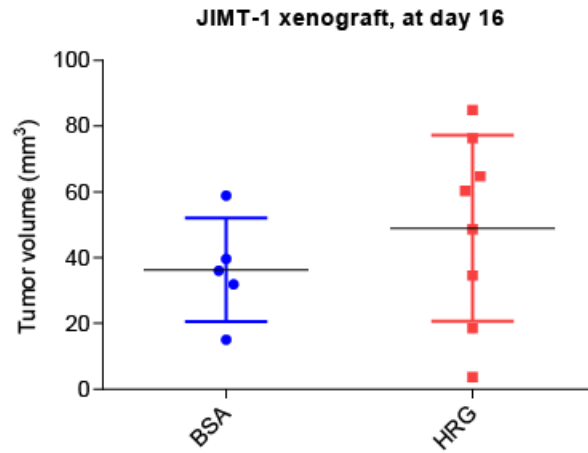


Compare each cell mean with the other cell mean in that row.									
Number of families	1								
Number of comparisons per family	6								
Alpha	0.05								
Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary					
Pellet BSA - Pellet HRG									
Day 0 22/09/2021	0.0	-22.23 to 22.23	No	ns					
Day 7 20/09/2021	1.874	-20.36 to 24.11	No	ns					
Day 9 01/10/2021	5.538	-16.70 to 27.77	No	ns					
Day 12 04/10/2021	1.176	-21.06 to 23.41	No	ns					
Day 14 06/10/2021	-8.899	-31.13 to 13.33	No	ns					
Dia 16 08/10/2021	-12.69	-34.92 to 9.547	No	ns					
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	t	DF	
Pellet BSA - Pellet HRG									
Day 0 22/09/2021	0.0	0.0	0.0	8.173	5	8	0.0	66	
Day 7 20/09/2021	7.940	6.066	1.874	8.173	5	8	0.2292	66	
Day 9 01/10/2021	14.09	8.553	5.538	8.173	5	8	0.6775	66	
Day 12 04/10/2021	15.47	14.30	1.176	8.173	5	8	0.1438	66	
Day 14 06/10/2021	27.86	36.76	-8.899	8.173	5	8	1.089	66	
Dia 16 08/10/2021	36.29	48.98	-12.69	8.173	5	8	1.552	66	

Firma:

Comparación de los volúmenes tumorales, de los animales correspondientes de los distintos grupos, al día 16.

BSA	HRG
15.03	3.60
58.87	84.87
<u>0.00</u>	34.64
36.07	60.34
31.85	48.67
39.65	76.38
<u>0.00</u>	18.51
	64.83
	<u>0.00</u>
	<u>0.00</u>

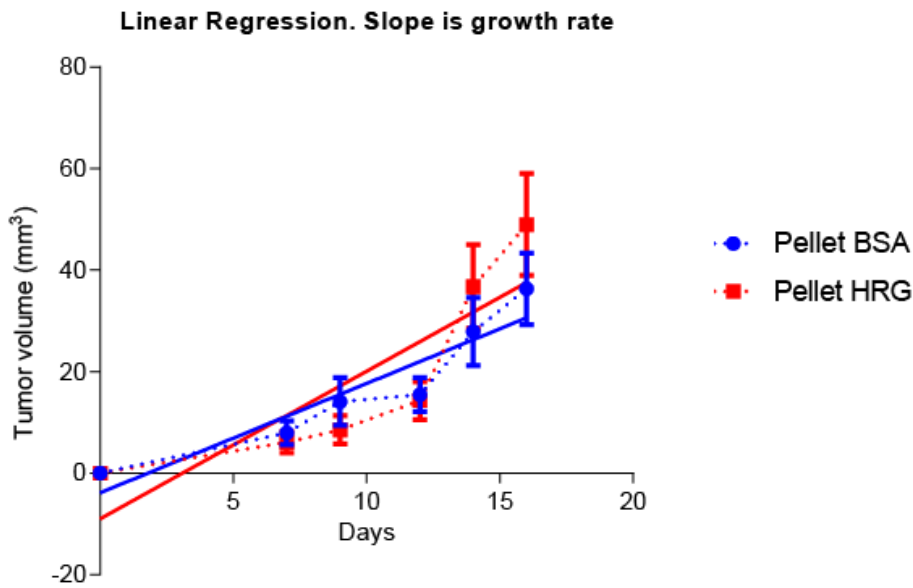


	BSA	HRG
Number of values	5	8
Minimum	15.03	3.600
25% Percentile	23.44	22.54
Median	36.07	54.51
75% Percentile	49.26	73.49
Maximum	58.87	84.87
Mean	36.29	48.98
Std. Deviation	15.76	28.32
Std. Error of Mean	7.046	10.01
Lower 95% CI of mean	16.73	25.31
Upper 95% CI of mean	55.86	72.65
Sum	181.5	391.8

Unpaired t test	
P value	0.3833
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.9081 df=11

Firma:

Comparación de las pendientes entre los grupos *pellet* BSA y *pellet* HRGβ1.



	Pellet BSA	Pellet HRG
Best-fit values		
Slope	2.154 ± 0.3715	2.909 ± 0.4914
Y intercept when X=0.0	-3.879 ± 4.086	-9.013 ± 5.406
X-intercept when Y=0.0	1.801	3.098
1/slope	0.4643	0.3437
95% Confidence Intervals		
Slope	1.393 to 2.915	1.919 to 3.899
Y-intercept when X=0.0	-12.25 to 4.489	-19.90 to 1.878
X-intercept when Y=0.0	-3.062 to 4.422	-0.9252 to 5.400
Goodness of Fit		
R square	0.5456	0.4324
Sy.x	10.68	17.87
Is slope significantly non-zero?		
F	33.62	35.04
DFn, DFd	1.000, 28.00	1.000, 46.00
P value	< 0.0001	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant	Significant
Data		
Number of X values	6	6
Maximum number of Y replicates	5	8
Total number of values	30	48
Number of missing values	30	12
Equation	Y = 2.154*X - 3.879	Y = 2.909*X - 9.013

Firma:

**Anexo 8. Efecto del bloqueo de la localización nuclear de ErbB-2 sobre el crecimiento tumoral *in vivo*.**

		pellet HRG pEGFPN1				pellet HRG hErbB-2DNLS			
		Y1	Y2	Y3	Y4	Y1	Y2	Y3	Y4
Day 0 First inj 08-10-2021	0	84.90	60.30	48.70	3.60	76.40	64.80	34.60	18.50
12/10/2021	4	81.78	81.74	100.09	4.07	96.68	78.54	18.91	11.34
15/10/2021 2da inj	7	98.47	95.83	121.26	13.40	88.60	75.80	9.13	8.40
19/10/2021	11	162.87	110.60	142.50	73.17	59.43	108.37	21.11	86.98
22/10/21 3ra inj	14	280.73	151.22	207.87	46.48	145.48	110.16	34.06	58.94
26/10/2021	18	363.47	159.73	170.26	62.23	283.60	177.18	24.10	124.02
29/10/21 4ta inj	21	557.45	228.24	254.07	99.84	371.84	187.77	12.95	99.48
01/11/2021	24	761.90	330.61	239.78	172.36	96.32	144.58	32.77	127.29
03/11/2021	26	695.50	353.09	252.75	254.81	76.71	100.32	34.13	157.02
5/11/21 5ta inj	28	869.64	463.52	292.99	408.06	136.96	126.87	44.29	185.09
09/11/2021	32	869.44	624.80	365.46	500.83	369.87	254.26	62.35	235.59

**JIMT-1 xenotransplante**

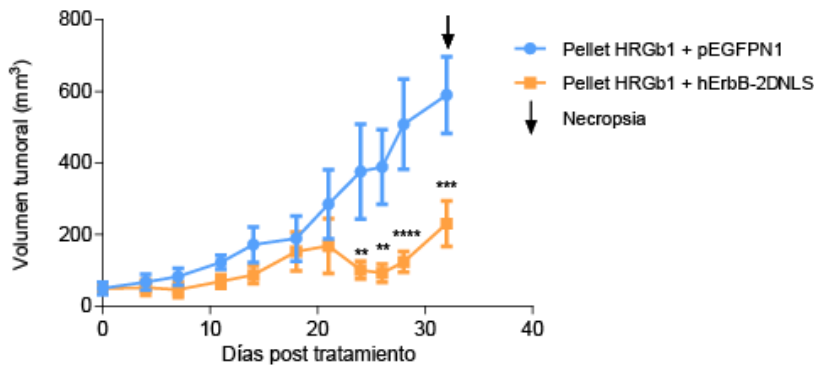
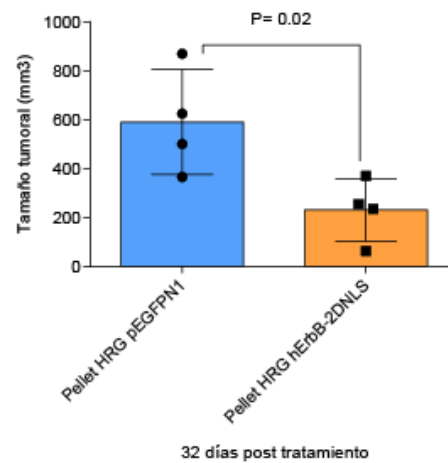


Table Analyzed	P value
Column B	Pellet HRG hErbB-2DNLS
vs.	vs.
Column A	Pellet HRG pEGFPN1
Unpaired t test	
P value	0.0277
P value summary	*
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.889 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	590.1 ± 107.1 N=4
Mean ± SEM of column B	230.5 ± 63.44 N=4
Difference between means	-359.6 ± 124.5
95% confidence interval	-664.2 to -55.01
R square	0.5817
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	2.851, 3, 3
P value	0.4125
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No



Firma:



Multiple t test

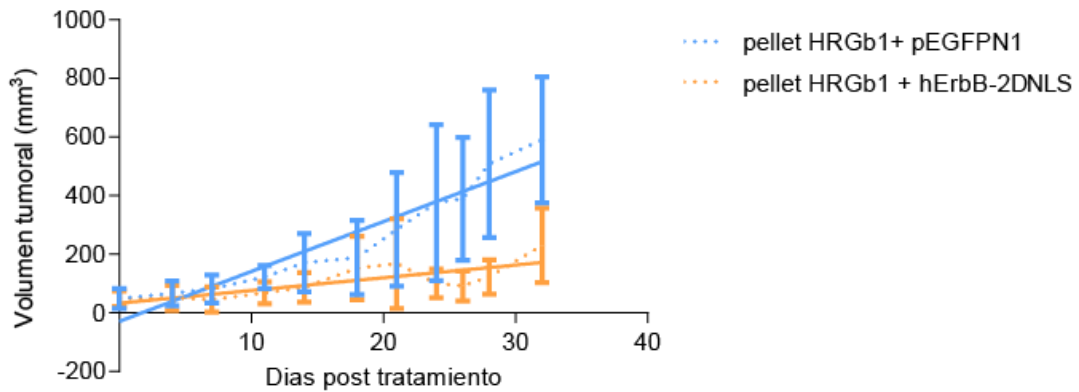
Compare each cell mean with the other cell mean in that row.								
Number of families	1							
Number of comparisons per family	11							
Alpha	0.05							
Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary				
pellet HRG pEGFPN1 - pellet HRG hErbB-2DNLS								
Day 0 First inj 08-10-2021	0.8000	-218.6 to 220.2	No	ns				
12/10/2021	15.55	-203.9 to 235.0	No	ns				
15/10/2021 2da inj	36.76	-182.7 to 256.2	No	ns				
19/10/2021	53.31	-166.1 to 272.7	No	ns				
22/10/21 3ra inj	84.42	-135.0 to 303.8	No	ns				
26/10/2021	36.70	-182.7 to 256.1	No	ns				
29/10/21 4ta inj	116.9	-102.5 to 336.3	No	ns				
01/11/2021	275.9	56.49 to 495.4	Yes	**				
03/11/2021	297.0	77.56 to 516.4	Yes	**				
5/11/21 5ta inj	385.3	165.8 to 604.7	Yes	****				
09/11/2021	359.6	140.2 to 579.0	Yes	***				
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	t	DF
pellet HRG pEGFPN1 - pellet HRG hErbB-2DNLS								
Day 0 First inj 08-10-2021	49.38	48.58	0.8000	72.06	4	4	0.01110	33
12/10/2021	66.92	51.37	15.55	72.06	4	4	0.2158	33
15/10/2021 2da inj	82.24	45.48	36.76	72.06	4	4	0.5101	33
19/10/2021	122.3	68.97	53.31	72.06	4	4	0.7398	33
22/10/21 3ra inj	171.6	87.16	84.42	72.06	4	4	1.171	33
26/10/2021	188.9	152.2	36.70	72.06	4	4	0.5093	33
29/10/21 4ta inj	284.9	168.0	116.9	72.06	4	4	1.622	33
01/11/2021	376.2	100.2	275.9	72.06	4	4	3.829	33
03/11/2021	389.0	92.05	297.0	72.06	4	4	4.122	33
5/11/21 5ta inj	508.6	123.3	385.3	72.06	4	4	5.346	33
09/11/2021	590.1	230.5	359.6	72.06	4	4	4.991	33



Firma:



**Regresión lineal - Pendiente de la curva de crecimiento tumoral**

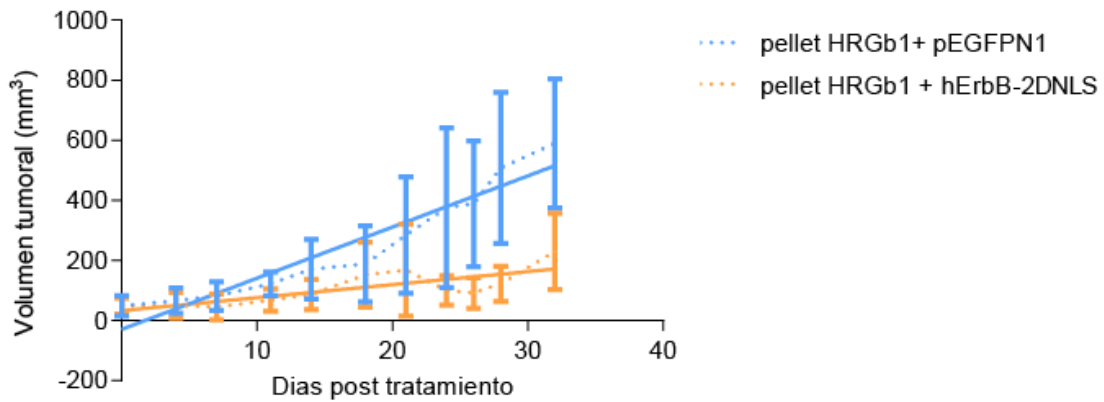


	pellet HRG pEGFPN1	pellet HRG hErbB-2DNLS
Best-fit values		
Slope	17.02 ± 2.327	4.342 ± 1.180
Y-intercept when X=0.0	-28.90 ± 45.51	33.15 ± 23.08
X-intercept when Y=0.0	1.698	-7.635
1/slope	0.05877	0.2303
95% Confidence Intervals		
Slope	12.32 to 21.71	1.959 to 6.725
Y-intercept when X=0.0	-120.8 to 62.97	-13.45 to 79.75
X-intercept when Y=0.0	-4.900 to 5.802	-38.47 to 2.117
Goodness of Fit		
R square	0.5601	0.2437
Sy.x	154.0	78.14
Is slope significantly non-zero?		
F	53.48	13.53
DFn, DFd	1.000, 42.00	1.000, 42.00
P value	< 0.0001	0.0007
Deviation from zero?	Significant	Significant
Data		
Number of X values	11	11
Maximum number of Y replicates	4	4
Total number of values	44	44
Number of missing values	0	0
Equation	Y = 17.02*X - 28.90	Y = 4.342*X + 33.15

Firma:



**Regresión lineal - Pendiente de la curva de crecimiento tumoral**



pellet HRG pEGFPN1			pellet HRG hErbB-2DNLS		
Mean	SEM	N	Mean	SEM	N
17.02	2.33	4	4.34	1.18	4

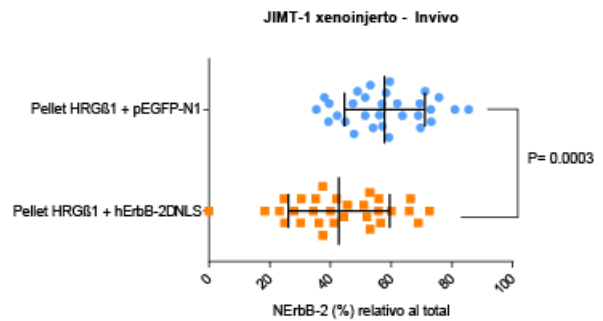
Table Analyzed	Data 13
Column B	pellet HRG hErbB-2DNLS
vs.	vs.
Column A	pellet HRG pEGFPN1
Unpaired t test	
P value	0.0028
P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=4.855 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	17.02 ± 2.330 N=4
Mean ± SEM of column B	4.340 ± 1.180 N=4
Difference between means	-12.68 ± 2.612
95% confidence interval	-19.07 to -6.289
R square	0.7971
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	3.899, 3, 3
P value	0.2932
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No

Firma:

**Anexo 9. La inyección de la mutante hErbB-2ΔNLS inhibe la localización nuclear de ErbB-2 en los tumores extraídos al final del experimento.**

En la tabla de la izquierda se muestran los valores de cuantificación del % NErbB-2 en las células correspondientes a los cortes de los tumores extraídos al final del experimento, de cada uno de los grupos, según se indica.

Pellet HRGβ1 + hErbB-2ΔNLS	Pellet HRGβ1 + pEGFP-N1
65.962900	73.023060
28.114350	48.891090
44.399310	63.699760
39.997420	56.956610
41.991110	73.211620
66.378110	61.962320
68.870900	35.375080
51.968740	47.740490
45.558010	56.096330
37.537600	38.030470
30.203830	47.426730
30.359400	39.595590
35.165080	57.135060
37.487600	51.410030
34.406590	51.394630
60.052860	54.039020
55.811280	59.264660
56.502070	42.266110
23.168110	75.715810
36.130270	69.430500
0.035514	80.947780
52.970810	59.535480
55.960620	71.141670
72.600910	68.906330
53.040280	85.494650
50.946610	58.301120
41.157780	53.129550
24.918490	39.369770
24.640840	44.900750
18.410830	69.658490



Unpaired t test	
P value	0.0003
P value summary	***
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.846 df=58

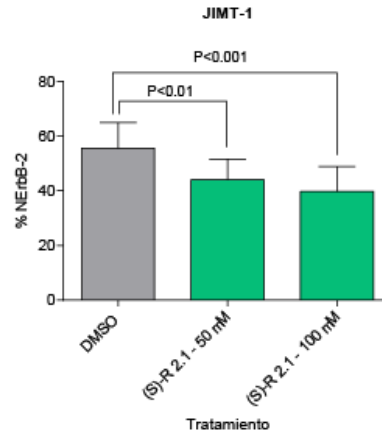
	Pellet HRGβ1 + hErbB-2ΔNLS	Pellet HRGβ1 + pEGFP-N1
Number of values	30	30
Minimum	0.03551	35.38
25% Percentile	30.32	47.66
Median	41.57	57.05
75% Percentile	55.85	69.49
Maximum	72.60	85.49
Mean	42.82	57.80
Std. Deviation	16.70	13.27
Std. Error of Mean	3.048	2.424
Lower 95% CI of mean	36.59	52.84
Upper 95% CI of mean	49.06	62.76
Sum	1285	1734

Firma:

**Anexo 10. El enantiómero S de Retro-2.1, inhibe los niveles nucleares en ErbB-2 de las JIMT-1.**

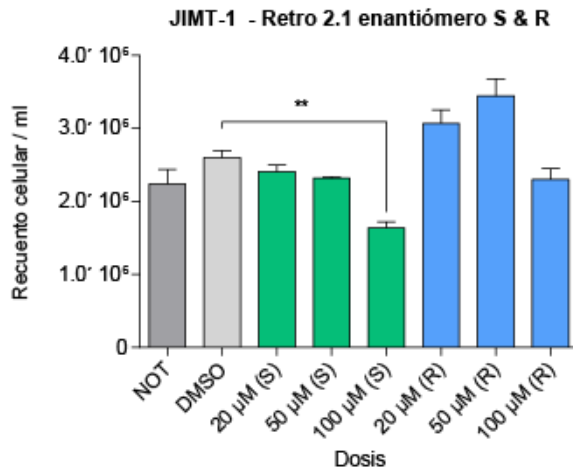
En la tabla de la izquierda se muestran los valores de cuantificación del % NErbB-2 en las células JIMT-1, tratadas según se indica.

DMSO	(S)-R 2.1 - 50 nM	(S)-R 2.1 - 100 nM
45.73	35.39	40.12
70.30	48.10	44.38
60.80	32.45	55.12
50.91	57.03	53.58
72.52	40.14	30.93
45.13	35.25	35.44
50.79	43.86	40.81
54.28	51.61	39.98
53.20	51.41	31.62
52.96	42.16	40.69
	44.90	25.85
	46.80	



Number of families	1							
Number of comparisons per family	2							
Alpha	0.05							
Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary				
DMSO vs. (S)-R 2.1 - 50 nM	11.57	3.035 to 20.11	Yes	**				
DMSO vs. (S)-R 2.1 - 100 nM	15.80	7.087 to 24.51	Yes	***				
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
DMSO vs. (S)-R 2.1 - 50 nM	55.66	44.09	11.57	3.678	10	12	3.146	30
DMSO vs. (S)-R 2.1 - 100 nM	55.66	39.87	15.80	3.753	10	11	4.209	30

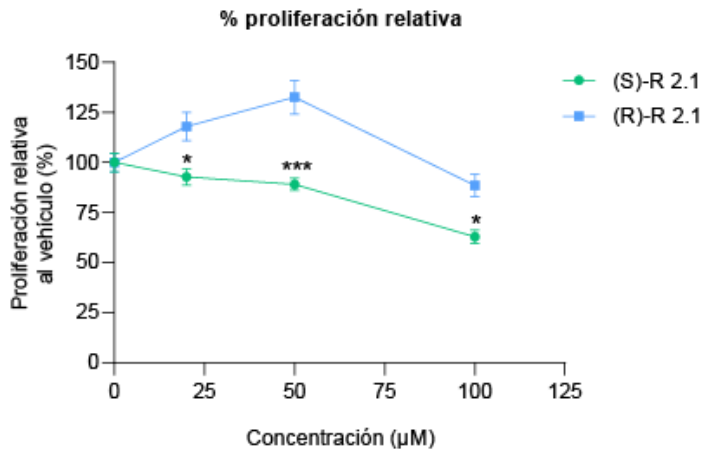
Anexo 11. Efectos de los enantiómeros de Retro-2.1 sobre la proliferación celular en células JIMT-1.



Number of families	1							
Number of comparisons per family	7							
Alpha	0.05							
Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary				
DMSO vs. NOT	362500	-198921 to 923921	No	ns				
DMSO vs. 20 μM (S)	186667	-419737 to 793070	No	ns				
DMSO vs. 50 μM (S)	283333	-323070 to 889737	No	ns				
DMSO vs. 100 μM (S)	963333	356930 to 1.570e+006	Yes	**				
DMSO vs. 20 μM (R)	-466667	-1.073e+006 to 139737	No	ns				
DMSO vs. 50 μM (R)	-846667	-1.453e+006 to -240263	Yes	**				
DMSO vs. 100 μM (R)	296667	-309737 to 903070	No	ns				

Firma: 

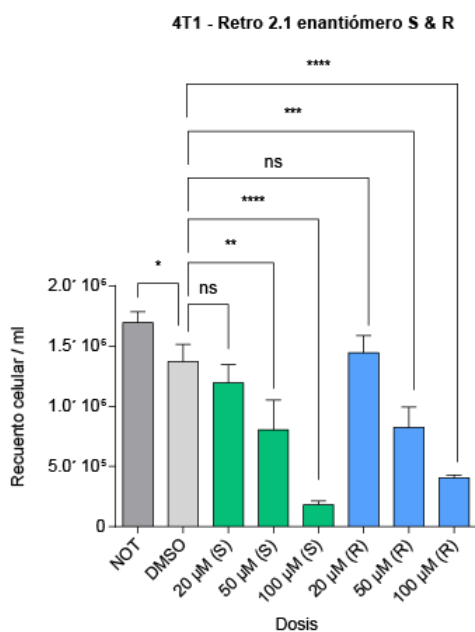
	Concentración (µM)	(S)-R 2.1			(R)-R 2.1		
		Mean	SEM	N	Mean	SEM	N
0	0.0	100.0	4.6	4	100.0	4.6	4
20 µM	20.0	92.8	4.1	3	117.9	7.0	3
50 µM	50.0	89.1	2.9	3	132.6	8.5	3
100 µM	100.0	62.9	3.3	3	88.6	5.5	3



Compare each cell mean with the other cell mean in that row.						
	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Number of families	1					
Number of comparisons per family	4					
Alpha	0.05					
<b>Sidak's multiple comparisons test</b>						
(S)-R 2.1 - (R)-R 2.1						
0	0.0	-18.63 to 18.63	No	ns	> 0.9999	
20 µM	-25.10	-46.61 to -3.589	Yes	*	0.0186	
50 µM	-43.50	-65.01 to -21.99	Yes	***	0.0001	
100 µM	-25.70	-47.21 to -4.189	Yes	*	0.0157	

Firma:

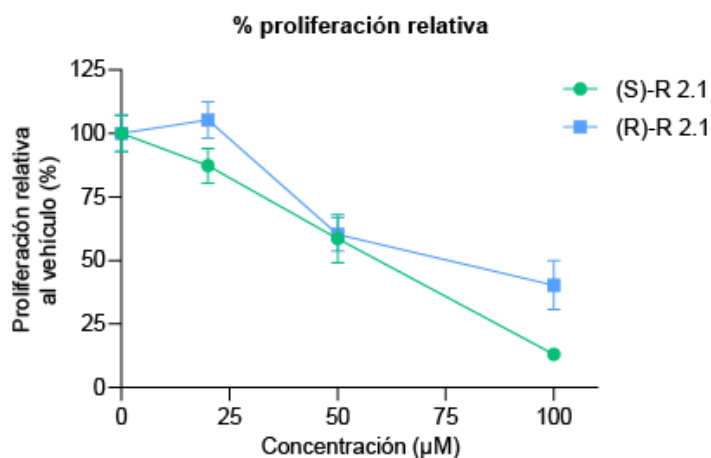
Anexo 12. Efectos de los enantiómeros de Retro 2.1 sobre la proliferación celular en células 4T1.



Number of families	1						
Number of comparisons per family	7						
Alpha	0.05						
Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary			
DMSO vs. NOT	-323333	-644076 to -2591	Yes	*			
DMSO vs. 20 µM (S)	173333	-147409 to 494076	No	ns			
DMSO vs. 50 µM (S)	566500	207899 to 925101	Yes	**			
DMSO vs. 100 µM (S)	1.190e+006	869258 to 1.511e+006	Yes	****			
DMSO vs. 20 µM (R)	-73333	-394076 to 247409	No	ns			
DMSO vs. 50 µM (R)	544333	223591 to 865076	Yes	***			
DMSO vs. 100 µM (R)	965333	644591 to 1.286e+006	Yes	****			

Firma:

	Concentración (µM)	(S)-R 2.1			(R)-R 2.1		
		Mean	SEM	N	Mean	SEM	N
0	0	100.00	7.10	3	100.00	7.10	3
20 µM	20	87.30	6.80	3	105.40	7.20	3
50 µM	50	58.60	9.50	2	60.30	6.50	3
100 µM	100	13.10	1.30	3	40.30	9.60	3

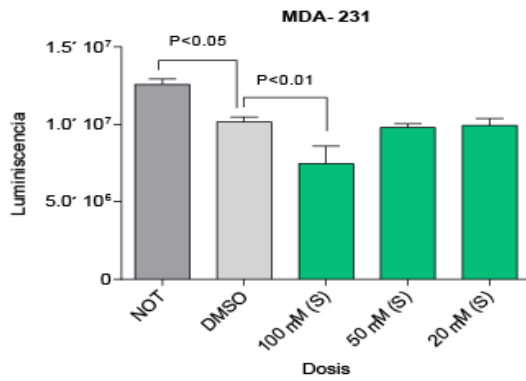


Compare each cell mean with the other cell mean in that row.						
	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
(S)-R 2.1 - (R)-R 2.1						
0	0.0	-27.90 to 27.90	No	ns	> 0.9999	
20 µM	-18.10	-46.00 to 9.795	No	ns	0.3037	
50 µM	-1.700	-32.69 to 29.49	No	ns	0.9998	
100 µM	-27.20	-55.10 to 0.6955	No	ns	0.0575	



Firma: 

Anexo 13. Efecto de (S)-Retro-2.1 sobre la viabilidad celular en MDA-231.




Number of families	1							
Number of comparisons per family	4							
Alpha	0.05							
Dunnnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary				
DMSO vs. NOT	-2.411e+006	-4.606e+006 to -216423	Yes	*				
DMSO vs. 100 nM (S)	2.700e+006	614118 to 4.785e+006	Yes	**				
DMSO vs. 50 nM (S)	369939	-1.634e+006 to 2.374e+006	No	ns				
DMSO vs. 20 nM (S)	223431	-1.717e+006 to 2.163e+006	No	ns				

Firma:



Firma del tutor:



Aclaración: Dra. Rosalia Cordo Russo