

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



TESIS DOCTORAL

**Papel de la proteína S100-A11 derivada de fibroblastos
asociados a cáncer en la respuesta a terapias anti-HER2 en
cáncer de mama HER2 positivo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Melania Luque Marín

Directores

**Federico Rojo Todo
Juan Madoz Gúrpide**

Madrid

© Melania Luque Marín, 2024

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

Papel de la proteína S100-A11 derivada de fibroblastos asociados a cáncer en la respuesta a terapias anti-HER2 en cáncer de mama HER2 positivo

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Melania Luque Marín

DIRECTORES

Federico Rojo Todo
Juan Madoz Gúrpide



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Químicas

**Papel de la proteína S100-A11 derivada de fibroblastos
asociados a cáncer en la respuesta a terapias anti-HER2
en cáncer de mama HER2 positivo**

Memoria presentada por

Melania Luque Marín

Graduada en Bioquímica, para optar al grado de Doctora en Bioquímica,
Biología Molecular y Biomedicina

Directores

Dr. Federico Rojo Todo
Dr. Juan Madoz Gúrpide

Instituto de Investigación Sanitaria - Fundación Jiménez Díaz
Grupo de Anatomía Patológica, Área Cáncer

Madrid, 2024

La presente Tesis Doctoral fue realizada en el Laboratorio de Anatomía Patológica del Área Cáncer del Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz, y dirigida por los doctores Federico Rojo Todo y Juan Madoz Gúrpide.



El trabajo fue financiado con proyectos de la Acción Estratégica en Salud (PI18/00382 y PI21/00142) del Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y Fondo Europeo de Desarrollo Regional) y del Centro de Investigación Biomédica en Red Cáncer CIBERONC (CB16/12/00241).



A mi familia, fuente inagotable de apoyo.

A mí misma, por encontrar siempre la respuesta en la perseverancia y el compromiso.

Agradecimientos

Ha llegado el momento de poner fin a esta etapa. Creo que todavía no soy consciente de lo que esto implica o, más bien, que no quiero serlo. Es sorprendente cómo algo que durante siete años me ha angustiado tantos días y que –confieso– en ocasiones deseaba que terminara, ahora una parte de mí tema que se acabe. Porque concluir esta tesis no sólo significa finalizar un periodo académico especial, que marca gran parte de mi trayectoria profesional y conlleva una gran carga emocional, sino que también simboliza el final de mi etapa en Madrid. Una ciudad en la que he vivido, he aprendido, he corrido y he bailado; en la que me he perdido, me he encontrado y he trascendido; pero en la que, sobre todo, he sonreído y he querido. Porque lo más valioso que guardo de estos años sois todas las personas que habéis formado parte de este camino.

Inicialmente querría agradecer a mis directores de tesis por ofrecerme la oportunidad de formar parte de AP y de llevar a cabo este proyecto que, en mi opinión, es muy bonito. En primer lugar, gracias a mi director de tesis, Fredi, por haberme hecho crecer como “científica” y cultivar mi pensamiento crítico. Por darme la posibilidad de pensar y crear mis propias ideas, y de poder explorarlas. Aunque a veces no te convencieran del todo, siempre he sentido tu confianza en mi capacidad y en mi proceso de desarrollo y aprendizaje. Ahora he terminado de comprenderlo y espero haber cumplido con tus expectativas. Juan, fuiste el primero en entrevistarme y en abrirme las puertas de AP. Has sido un buen codirector de tesis y quisiera remarcar que no sólo por la parte profesional, sino también por tu lado cercano y empático. Gracias por todo ello y, sobre todo, por la enorme paciencia que has tenido con la Melani más guerrera de los inicios. Sandra Z., gracias por toda la ayuda que me has ofrecido desde que llegué al grupo. Siempre has sido y seguirás siendo un punto de engranaje en AP. Nere, gracias por mostrar una total disposición para ayudarme en todo lo que he necesitado, siempre acompañada de tu serenidad y amabilidad. Yamileth, quiero agradecerte no sólo lo que has aportado a este trabajo a nivel profesional, sino también la atención y comprensión que me has mostrado siempre; por intentar trasladarme esa calma que a menudo me faltaba. Natalia, gracias por lo que has aportado a este proyecto y al equipo. Por transmitir siempre tus ganas de contribuir, de aprender y de crecer profesionalmente. Gracias a todos los que formáis parte del laboratorio de molecular, por toda la ayuda que me habéis dado y porque siempre fuera con una sonrisa. Sois un gran equipo de profesionales. En especial, a Lorena: gracias por tu impecable trabajo. Ha sido un placer trabajar contigo (y es que nunca más me entregarán muestras con pósits de corazones). A Carol, por demostrarme siempre atención, cariño y buenas palabras. Gracias a todo el laboratorio de inmuno, en especial a Sandra P., por vuestra gran labor profesional y por haber hecho posible realizar una parte fundamental de este proyecto. Y a Chamizo, Cris, gracias por recordarnos siempre, a Marta y a mí, nuestra valía. Por tu entusiasmo y, sencillamente, por dejar tu huella.

Querría continuar estos agradecimientos con personas que han formado parte de mi etapa en la FJD de forma especialmente cercana. Juana, gracias por estar siempre dispuesta a tendernos una mano (y a unos chupitos de *Jäger*). Por instigarnos a valorar nuestro trabajo. Isma, gracias por enseñarme tanto sobre mí misma, por impulsarme y recordarme que el mayor “triumfo” que pude lograr en aquel entonces, hoy puedo llevarlo conmigo a todas partes.

Entre mis grandes amigos que forman la “familia FJD”, primero quiero agradecer a Blanca, porque fuiste uno de mis primeros y principales apoyos en Madrid. Gracias por demostrarme una amistad sincera, en la que sé que siempre puedo confiar. A Celia, por ser la bondad e inteligencia personificadas. Por hacer de nuestro viaje a la India una inolvidable experiencia, que guardo con mucho cariño. Jesús, porque he disfrutado y me he divertido tantísimo en ese despacho gracias a ti, que sólo puedo agradecer que hayas formado parte de este último tramo. Rober, gracias por todo lo que me has aportado siempre, pero especialmente durante estos últimos meses “pretesis”. Porque sin saber cómo, consigues siempre que me abstraiga de absolutamente todo.

Llega un punto de los agradecimientos que me resulta especialmente complicado, ya que me toca ahondar en el nodo de personas que me han acompañado día tras día durante todos estos años dentro (y también fuera) de la FJD. Y es que únicamente nosotros conocemos la esencia de lo que se creó en ese despacho alrededor de un café diario, algo que probablemente no se vuelva a vivir en esas cuatro paredes. Ruth, desde que llegaste nos has contagiado constantemente tu energía que, a mí en particular, me ha dado la vida en Madrid, de día y de noche. Gracias por ello y por demostrarme ser una muy buena amiga. Lara, gracias por traer siempre esa dosis –tan necesaria– de alboroto, drama y humor, mientras te ganabas un gran cariño por mi parte y por la de todos. Marta R., gracias por tenderme siempre una mano con la tesis y por aportarnos todo lo que eres, humildad y dulzura. Andrea, gracias por transmitirme tanta paz. Sólo sé resumirte en la palabra “bonita” y siento una gran suerte por tener tu amistad, que sé que continuaremos conservando estemos donde estemos. Ion, gracias por convertirte en mi primer apoyo en Madrid y aconsejarme y cuidarme, a tu manera, desde entonces. Por tantos momentos de diversión a tu lado que no olvidaré y que espero que nunca dejemos de encontrar un momento para revivirlos. Miriam, cuando nos conocimos ninguna de las dos imaginaba que nuestra relación sería la que terminamos descubriendo, y es que sé que en mi vida conoceré a muy pocas personas que me demuestren tanto como tú. Gracias por darme una amistad real y de calidad, con la que poder compartir todo. Gracias por tu apoyo incondicional en todos los ámbitos. Aunque siempre me digas lo mucho que aprendes de mí dentro y fuera del laboratorio, yo también he podido hacerlo contigo durante el proceso. Sé que siempre encontraremos la manera de seguir compartiendo y sumando a esta gran amistad. Te quiero y te valoro mucho.

Y, sin duda, llega la parte de todos los agradecimientos y, por qué no, de toda esta tesis, que más me ha costado escribir. Marta, ¿por dónde empiezo...? Una de las barcas ha llegado al otro lado. Han sido muchos años unidas por un fuerte vínculo, el cual quedó perfectamente plasmado detrás del “Pili y Mili” que nos asignó Juan, y que no ha hecho más que crecer. Gracias por ser mucho más que la mejor compañera de tesis que podía tener. Por esta amistad sincera y, por encima de todo, leal. Por comprender (casi) todos los rincones de mi psicología y saber utilizarlo para ayudarme en todos los contextos posibles. Por equilibrar mis decisiones e intentar que no me hunda en autoexigencia. Por orientarme cuando sólo veo negro y sacarme a flote. Por todo el tiempo y paciencia que, con tanto cariño, siempre me has dedicado. Por ser esa amiga que me quiere ver crecer. Por las innumerables vivencias, risas y conversaciones (no sólo en cultivos), que han hecho que este viaje sin duda mereciera la pena, aunque la barca tuviera fisuras. Porque, a pesar de la autodeterminación y valentía que yo pueda tener, sabes que siempre has sido para mí una figura muy valiosa en todos y cada uno de los trayectos en los que me has acompañado durante estos años. Pero, por suerte, nuestros caminos compartidos no acaban aquí: por ahora, nos queda un Camino de Santiago por recorrer juntas. Te quiero muchísimo.

Para cerrar el círculo de personas que han marcado esta etapa, querría mencionar a mis amigos de “Refrigerios”: gracias por cargar de brindis y buenos momentos tantísimos recuerdos que me llevo de Madrid. Por otro lado, no puedo olvidar a mis amigos de Barcelona. Gracias a vosotros los respiros de la tesis y escapadas a mi ciudad tenían otro color. A mis amigos del grupo “Resacón en Sant Feliu”, porque la historia y particularidad de cada uno de vosotros os hace geniales, y es que sólo sabéis sacarme (son)risas. Os adoro. A mis “Farmacólogos S.P.”, porque siempre merece la pena disfrutar del tiempo con vosotros. A Cris, David, Jeni, Andrés: gracias a cada uno de vosotros por formar parte de mi vida de una forma tan especial, aun en la distancia.

Finalmente, gracias a lo más importante de mi vida, mi familia. Porque todos, hasta el más pequeño, sois un modelo de los valores y de la fuerza interna que hoy agradezco tener, ya que sin ellos no haría ni viviría las cosas tal y como lo hago. A mi hermana, por haber sido mi máximo referente de trabajo y esfuerzo. Si algo he aprendido al hacer esta tesis, ha sido a echarle de menos. A mis padres, gracias por criarme desde la libertad, haciéndome sentir dueña de mis ideologías y decisiones, de todo lo que soy y tengo. Por permitirme diseñar mi propia trayectoria y volar, desde un nido al que siempre querré volver. A mi padre, por enseñarme el valor de la sencillez. De ti guardo la curiosidad, el perfeccionismo y la responsabilidad, pero, sobre todo, que lo último que siempre nos quedará es ser buena persona. A mi madre, gracias por creer en mí e impulsarme como nadie más puede hacerlo. Por tantas conversaciones y risas a oscuras en la cocina. Por estar conmigo los 365 días del año, estés donde estés. Por darme vida, cada día.

*Comprendí,
que florecer implica atravesar
cada una de las estaciones.*

*Que los capítulos terminan,
pero los recuerdos son para siempre.*

Índice

Abreviaturas	7
Resumen.....	15
Summary	19
Introducción	23
1. Cáncer de mama	25
1.1. Epidemiología del cáncer de mama	25
1.2. Clasificación histológica, grado histológico y estadiaje	26
1.3. Clasificación molecular del cáncer de mama	28
2. Cáncer de mama HER2+	30
2.1. Señalización celular mediada por el receptor HER2.....	31
2.2. Papel de HER2 como biomarcador en cáncer de mama	33
2.3. Tratamiento del cáncer de mama HER2+	34
2.3.1. Terapia dirigida anti-HER2: trastuzumab y pertuzumab	34
2.3.2. Mecanismos de acción de trastuzumab y pertuzumab	35
2.3.3. Quimioterapia	36
2.3.4. Otras terapias.....	37
2.4. Resistencia a la terapia anti-HER2	37
3. Fibroblastos asociados a cáncer (CAF)	39
3.1. Origen, señalización intracelular y heterogeneidad de los CAF	39
3.2. Papel en la patogénesis del cáncer.....	41
3.3. Secretoma derivado de los CAF	42
3.4. Papel en resistencia a la terapia anti-HER2	43
3.5. Relevancia clínica de los CAF	44
3.5.1. Valor pronóstico	44
3.5.2. CAF como diana terapéutica	45
4. Proteína S100-A11.....	45
4.1. Estructura y función de las proteínas S100	45
4.2. Papel en cáncer de mama y en resistencia a terapia	46
4.3. Receptor AGER	48
4.3.1. Papel de AGER y señalización intracelular en cáncer	49
4.3.2. Relevancia clínica e inhibición farmacológica de AGER en cáncer	49
Hipótesis y objetivos	51
Materiales y métodos.....	55
1. Cultivos celulares y reactivos	57
1.1. Líneas celulares	57
1.2. Reactivos.....	58

2. Ensayos celulares	59
2.1. Obtención de medio condicionado de CAF-200.....	59
2.2. Ensayos de proliferación celular.....	59
2.3. Ensayos de formación de esferoides	60
2.4. Ensayos de migración celular	60
3. Ensayos moleculares	61
3.1. Silenciamiento génico.....	61
3.2. Extracción de ARN	61
3.3. Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	62
3.4. PCR cuantitativa (qPCR).....	62
3.5. Extracción de proteína.....	62
3.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) e inmunotransferencia (<i>Western-blot</i>)	63
3.7. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).....	64
3.8. Análisis de expresión de proteínas por IHQ	64
4. Ensayo de proteómica basado en espectrometría de masas.....	66
4.1. Preparación de las muestras	66
4.2. Espectrometría de masas (LC-MS/MS) <i>label-free</i>	66
4.3. Identificación y cuantificación de proteínas.....	66
4.4. Análisis bioinformático	67
5. Muestras de pacientes de cáncer de mama HER2+	67
6. Análisis estadístico	68
Resultados	71
1. Caracterización del efecto de CAF-200 en la respuesta a la terapia basada en trastuzumab más pertuzumab más docetaxel (TPD) en líneas celulares de cáncer de mama HER2+	73
1.1. Determinación de la concentración de tratamiento de docetaxel en líneas HER2+	73
1.2. El medio condicionado de CAF-200 genera resistencia a la terapia TPD en líneas tumorales HER2+	74
1.3. El medio condicionado de CAF-200 induce resistencia al tratamiento con TPD en líneas tumorales HER2+ en un modelo de cultivo celular 3D.....	75
1.4. La capacidad migratoria de las células tumorales HER2+ aumenta en presencia del medio condicionado del fibroblasto CAF-200	77
1.5. El medio condicionado de CAF-200 modifica la fosforilación de proteínas implicadas en las vías de señalización MAPK/ERK y JAK/STAT3 en líneas celulares HER2+ en respuesta a la terapia TPD	79
2. Caracterización del secretoma del fibroblasto CAF-200 tras el tratamiento con TPD	81
2.1. Efecto celular y molecular de la terapia TPD en el fibroblasto CAF-200	81
2.1.1. El tratamiento con TPD no afecta a la proliferación de CAF-200	81

2.1.2. El fibroblasto CAF-200 incrementa su capacidad migratoria en respuesta a la terapia TPD.....	81
2.1.3. El tratamiento con TPD induce en CAF-200 la expresión y la fosforilación de proteínas implicadas en la activación de fibroblastos estromales.....	82
2.2. El estudio de la abundancia diferencial de proteínas en el secretoma del CAF-200 revela proteínas diferencialmente expresadas tras el tratamiento con TPD	84
2.3. El análisis de anotación funcional del secretoma de CAF-200 revela la modulación de vías oncogénicas.....	85
2.4. Las redes de asociación proteína-proteína identifican nodos de interacción entre proteínas secretadas por los fibroblastos CAF-200	88
2.5. Selección de proteínas en el secretoma de CAF-200 candidatas a la generación de resistencia a la terapia TPD	90
3. Valoración del papel de las proteínas candidatas en la generación de resistencia a TPD en líneas de cáncer de mama HER2+ y selección de S100-A11 como proteína de estudio.....	90
3.1. La adición exógena de las proteínas candidatas modula la proliferación celular de las líneas celulares de cáncer de mama HER2+ tratadas con TPD.....	90
3.2. Selección de la proteína S100-A11 para el estudio de su papel en la resistencia adquirida a TPD en cáncer de mama HER2+	100
3.3. La determinación de la concentración de S100-A11 en el medio condicionado de CAF-200 confirma una mayor secreción de la proteína tras el tratamiento con TPD de los fibroblastos.....	100
4. Estudio del papel de la proteína S100-A11 en la resistencia adquirida a la terapia TPD en líneas celulares de cáncer de mama HER2+	101
4.1. La adición exógena de S100-A11 incrementa la fosforilación de STAT3 en líneas tumorales HER2+	101
4.2. El silenciamiento génico de <i>S100A11</i> en CAF-200 modifica el efecto del medio condicionado derivado de los fibroblastos en la respuesta a TPD de las líneas tumorales HER2+	104
4.2.1. El silenciamiento génico de <i>S100A11</i> en CAF-200 disminuye la resistencia adquirida a la terapia TPD en líneas tumorales HER2+	105
4.2.2. El silenciamiento génico de <i>S100A11</i> de CAF-200 reduce la fosforilación de STAT3 en líneas tumorales HER2+	107
5. Reversión farmacológica de la resistencia adquirida a la terapia TPD en líneas celulares de cáncer de mama HER2+	109
5.1. La inhibición de STAT3 con stattic revierte la resistencia a la terapia TPD inducida por S100-A11 en líneas tumorales HER2+	109
5.2. El tratamiento con azeliragon, un inhibidor del receptor AGER, revierte la resistencia a la terapia TPD inducida por S100-A11 en líneas tumorales HER2+.....	113
5.3. El tratamiento con azeliragon modula la señalización intracelular desencadenada por S100-A11, disminuyendo la fosforilación de STAT3 en líneas tumorales HER2+	117

6. Significado clínico de la expresión de S100-A11 en los CAF y de p-STAT3 en células tumorales en la respuesta a la terapia anti-HER2 neoadyuvante en cáncer de mama precoz HER2+ humano	121
6.1. Características clínico-patológicas de la cohorte.....	121
6.2. Identificación de la expresión y distribución celular y subcelular de S100-A11 y de p-STAT3 en muestras de cáncer de mama precoz HER2+ humano.....	124
6.3. Definición de la sobreexpresión de S100-A11 en los CAF y de p-STAT3 en células tumorales	126
6.4. La sobreexpresión de S100-A11 en los CAF correlaciona con una alta expresión de p-STAT3 en las células tumorales en tumores de mama HER2+ de estadio precoz.....	128
6.5. Asociaciones clínico-patológicas de S100-A11 en los CAF y de p-STAT3 en células tumorales	131
6.6. La sobreexpresión de S100-A11 en los CAF correlaciona con la presencia de enfermedad residual tras el tratamiento neoadyuvante en tumores de mama HER2+ de estadio precoz	131
Discusión	139
1. Efecto del secretoma del fibroblasto CAF-200 en la respuesta a la terapia TPD en líneas celulares de cáncer de mama HER2+	141
2. Análisis del secretoma de CAF-200 e identificación de dianas potenciales a la generación de resistencia a TPD	145
3. Papel de la proteína S100-A11 en la adquisición de resistencia a la terapia anti-HER2 combinada con taxanos en cáncer de mama HER2+	149
3.1. Efecto celular de S100-A11 en la respuesta a la terapia TPD en líneas celulares de cáncer de mama HER2+	149
3.2. Mecanismo molecular asociado a la modulación de S100-A11 extracelular en el modelo de resistencia a TPD en líneas celulares de cáncer de mama HER2+.....	151
3.3. Reversión de la resistencia a la terapia TPD mediante la inhibición farmacológica del eje S100-A11/AGER	152
3.4. Significado clínico de la expresión de S100-A11 en los CAF en la respuesta a la terapia anti-HER2 neoadyuvante en tumores de mama HER2+ de estadio precoz.....	155
Conclusiones	161
Bibliografía	165
Anexos	197
Anexo I–Formulario de aprobación del Comité Ético	199
Anexo II–Listado de publicaciones.....	201

Abreviaturas

14-3-3ζ	Proteína 14-3-3 zeta
14-3-3ζr	14-3-3ζ recombinante
ADC	Conjugado anticuerpo-fármaco
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AGE	Productos de glicación avanzada
AGER	Receptor de productos de glicación avanzada
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AKT	Proteína cinasa B
AP-1	Proteína activadora 1
APO A-1	Apolipoproteína A-1
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNsi	ARN pequeño de interferencia
ASCO	American Society of Clinical Oncology
ATCC	American Type Culture Collection
AUC	Área bajo la curva
BCA	Ácido bicinconínico
<i>BRAF</i>	Gen de B-Raf
BSA	Albúmina sérica bovina
Ca ²⁺	Ión calcio
CAF	Fibroblasto asociado a cáncer
CAF-S1	Subpoblación S1 de CAF
CAP	College of American Pathologists
c-CBL	Proteína ubiquitina ligasa E3
CCL2	Ligando 2 de quimiocina con motivo C-C
CCL2r	CCL2 recombinante
CCL5	Ligando 5 de quimiocina con motivo C-C
Cdc-42	Proteína de control de la división celular 42
CDI	Carcinoma ductal infiltrante
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CLI	Carcinoma lobulillar infiltrante
CLIS	Carcinoma lobulillar <i>in situ</i>
CSC	<i>Cancer stem cell</i>
Ct	Umbral de ciclos
CXCL12	Ligando 12 de quimiocina con motivo CXC (SDF-1)
CXCR4	Receptor 4 de quimiocinas con motivo CXC
DAB	Diaminobencidina
DAMP	Patrón molecular asociado a daño
DMEM/F-12	Medio Eagle modificado por Dulbecco/Mezcla de nutrientes F-12 de Ham
DMEM-High Glucose	Medio Eagle modificado por Dulbecco-Glucosa elevada
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSMZ	Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH

DTT	Ditiotreitol
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor 1 del factor de crecimiento epidérmico humano
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
EMT	Transición epitelio-mesénquima
ER	Receptor de estrógenos
ER+/ER-	ER positivo/ER negativo
ErbB	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano
ErbB-2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
<i>ERBB2</i>	Gen del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
FAP	Proteína activadora de fibroblastos
FBS	Suero bovino fetal
FC	<i>Fold Change</i>
FDA	Food and Drug Administration
FDR	Tasa de descubrimientos falsos
FFPE	Fijado en formalina y embebido en parafina
FGF5	Factor de crecimiento de fibroblastos 5
FGFR2	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
FSP-1	Proteína específica de fibroblastos 1
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GCO	Global Cancer Observatory
GFP	Proteína verde fluorescente
GLI1	Proteína de dedo de zinc 1
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
HA	Hialuronano
HER	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano
HER1	Receptor 1 del factor de crecimiento epidérmico humano
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
HER2 Δ 16	Isoforma Δ 16 de HER2
HER2+	HER2 positivo
HER3	Receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano
HER4	Receptor 4 del factor de crecimiento epidérmico humano
HGF	Factor de crecimiento hepatocitario
Hh	Hedgehog (vía de señalización)
HIF	Factor inducible por hipoxia
HMGB1	Proteína del grupo 1 de alta movilidad
HMGB1r	HMGB1 recombinante
<i>HNRNPC</i>	Gen de ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas C1/C2
HR	Receptor hormonal
HRP	Peroxidasa de rábano
<i>H-score</i>	<i>Histo-score</i>

HSF1	Factor de crecimiento de choque térmico 1
HSP90	Proteína de shock térmico de 90 kDa
<i>HSP90AA1</i>	Gen de la proteína HSP90- α
HSP90- α	Proteína HSP90-alfa
HSP90- α r	HSP90- α recombinante
hTERT	Telomerasa transcriptasa inversa humana
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC10	Concentración inhibitoria del 10 %
IC20	Concentración inhibitoria del 20 %
IC50	Concentración inhibitoria media o del 50 %
IDIBAPS	Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer
Ig	Inmunoglobulina
IGFR1	Receptor del factor 1 de crecimiento similar a insulina
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleucina
IL-17A	Interleucina 17A
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
ILF2	Factor de unión al potenciador de interleucina 2
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma
JAK	Cinasa Jano
JNK	Cinasa C-Jun N-terminal
JQ1	Inhibidor de proteínas BET (bromodominio extra-terminal)
Ki-67	Antígeno Ki-67
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
LogFC	Logaritmo en base 2 de <i>Fold Change</i>
mAb	Anticuerpo monoclonal
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MC[CAF-200]	Medio condicionado derivado de células CAF-200
MEK	MAP cinasa cinasa
MPM	Mesotelioma pleural maligno
MSCV	<i>Murine stem cell virus</i>
mTOR	Diana de rapamicina en mamíferos
mTORC2	Complejo 2 de mTOR
NaCl	Cloruro de sodio
NAF	Fibroblasto asociado a tejido normal
NK	<i>Natural killer</i>
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B activadas
NOS	No especificado de otro modo (sin tipo especial)
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>p27</i>	Gen del inhibidor 1B de cinasa dependiente de ciclina CDKN1B
p38	Proteína cinasa activada por mitógenos p38
p95-HER2	Forma truncada p95 de HER2

p-proteína	Fosfo-proteína
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno 1
PAI-1r	PAI-1 recombinante
PAR2	Receptor 2 activado con proteasa
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pCR	Respuesta patológica completa
PD-1	Proteína de muerte celular programada 1
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGFR- α /PDGFR- β	Receptores alfa y beta de PDGF
PD-L1	Ligando de muerte programada 1
PDPN	Podoplanina
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
PI3KCA	Gen de PI3K
PKA	Proteína cinasa A
PPI	Interacción proteína-proteína
PR	Receptor de progesterona
PR+/PR-	PR positivo/PR negativo
<i>PRKACA</i>	Gen de la subunidad catalítica α de la proteína cinasa A
qPCR	PCR cuantitativa (PCR a tiempo real)
Rac1	Sustrato 1 de la toxina botulínica C3 relacionado con Ras
RIPA	Ensayo de radioinmunoprecipitación
ROC	Característica operativa del receptor
RPMI 1640	Medio Roswell Park Memorial Institute 1640
<i>S100A11</i>	Gen de S100-A11
S100-A11	Proteína S100 de unión a calcio A11
S100-A11r	S100-A11 recombinante
SAPK	Proteína cinasa activada por estrés
SBR	Scarf-Bloom-Richardson
SDF-1	Factor 1 derivado de células estromales (CXCL12)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SEAP	Sociedad Española de Anatomía Patológica
SEOM	Sociedad Española de Oncología Médica
Ser	Serina
<i>SERPINE-1</i>	Gen de PAI-1
SG	Supervivencia global
SiC	Silenciamiento génico control
<i>SiS100A11</i>	Silenciamiento génico de <i>S100A11</i>
SLE	Supervivencia libre de enfermedad
SLP	Supervivencia libre de progresión
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
sTIL	Linfocito infiltrante de tumor estromal
TEAD	Factor de transcripción con dominio TEA

T-DM1	Trastuzumab-emtansina
T-DXd	Trastuzumab-deruxtecán
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
Thr	Treonina
TKI	Inhibidor tirosina-cinasa
TLR-4	Receptor tipo Toll 4
TME	Microambiente tumoral
TN	Triple negativo
TNM	Tumor, nodo, metástasis
TPD	Trastuzumab más pertuzumab más docetaxel
<i>TPM1</i>	Gen de la cadena de tropomiosina alfa-1
Tris-HCl	Trisaminometano-ácido clorhídrico
Tyr	Tirosina
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
YAP	Proteína asociada a Yes
<i>YWHAZ</i>	Gen de 14-3-3 ζ
α -SMA	Alfa-actina de músculo liso
β -actina	Beta-actina

Resumen

El cáncer de mama es el tumor diagnosticado con mayor frecuencia a nivel mundial, además de ser una de las principales causas de mortalidad en la mujer. El cáncer de mama cuenta con distintos subtipos tumorales, entre los cuales el subtipo HER2 positivo (HER2+) representa alrededor de un 15-20 % de los casos diagnosticados. Estos tumores se caracterizan por una sobreexpresión del receptor HER2 y su manejo clínico se basa en el uso de terapia anti-HER2 dirigida. Los anticuerpos anti-HER2 trastuzumab y pertuzumab, en combinación con quimioterapia basada en taxanos, constituyen en esquema de neoadyuvancia el régimen de tratamiento estándar para los casos de estadio precoz, lo cual ha mejorado significativamente el resultado clínico y la supervivencia de las pacientes. Sin embargo, un 40-60 % de los casos no alcanza la respuesta patológica completa (pCR, por sus siglas en inglés) tras el tratamiento. Estas pacientes tienen una mayor probabilidad de recaída al cabo de meses o años desde la cirugía, la cual ocurre mayoritariamente en forma de metástasis a distancia, en cuyo caso las pacientes presentan muy pocas posibilidades de curación con las terapias actuales, por lo que prevenir esta situación resulta fundamental. Por ello, profundizar en la comprensión de los mecanismos moleculares que gobiernan la resistencia a la terapia anti-HER2, así como la identificación de estrategias terapéuticas que ayuden a revertirla, continúan siendo una prioridad clínica.

Los fibroblastos asociados a cáncer (CAF) constituyen la población más abundante de las células del estroma que componen el microambiente tumoral (TME, por sus siglas en inglés). Debido a su capacidad para secretar una amplia gama de factores, incluyendo citocinas y factores de crecimiento, los CAF son un componente clave que orquesta la composición del TME y las múltiples funciones celulares que influyen en el comportamiento del tumor. La creciente evidencia presta especial atención al secretoma derivado de los CAF, demostrando su papel en la promoción de aspectos relacionados con la patogénesis del cáncer de mama, tales como la proliferación y el crecimiento tumoral, la metástasis y la resistencia a terapia, incluyendo la resistencia a terapias anti-HER2. Sin embargo, se necesita profundizar en la investigación para esclarecer el papel de los CAF en el desarrollo y progresión del cáncer, incluyendo el cáncer de mama HER2+. Así, el objetivo de este trabajo fue la identificación de factores en el secretoma de los CAF relacionados con la generación de resistencia a la terapia anti-HER2, cuya modulación farmacológica permita revertir la resistencia y mejorar la eficacia de esta terapia. Además, se profundizó en el mecanismo molecular de resistencia asociado a los factores identificados, así como en su posible valor clínico como biomarcadores pronósticos y/o predictivos en el cáncer de mama precoz HER2+.

En este estudio se determinó el efecto del secretoma derivado de una línea de CAF, mediante ensayos *in vitro* con medio condicionado, en la generación de resistencia a la terapia con

trastuzumab y pertuzumab, en combinación con quimioterapia, en líneas celulares de cáncer de mama HER2+. Tras caracterizar a nivel celular y molecular este efecto en la inducción de resistencia a la terapia anti-HER2, se analizó el secretoma de estos CAF mediante técnicas de espectrometría de masas, con el objetivo de identificar proteínas candidatas con un posible papel en la generación de resistencia a la terapia anti-HER2. Las proteínas seleccionadas fueron: 14-3-3 ζ , CCL2, HMGB1, HSP90- α , PAI-1 y S100-A11, y los ensayos funcionales mediante su adición exógena en los cultivos celulares permitieron evaluar su papel en la generación de resistencia a la terapia combinada en las líneas tumorales HER2+. Los resultados de estos ensayos condujeron a la selección de S100-A11 como proteína de estudio derivada del secretoma de los CAF con un posible papel en la generación de resistencia a la terapia anti-HER2 combinada con quimioterapia. El tratamiento farmacológico dirigido a su receptor AGER, así como a STAT3, en combinación con la terapia anti-HER2, permitió revertir la resistencia a la terapia anti-HER2 inducida por la proteína S100-A11. El papel biológico de la proteína S100-A11 de los CAF en los tumores de mama HER2+ fue confirmado mediante un estudio retrospectivo en una cohorte de casos diagnosticados de cáncer de mama HER2+ de estadio precoz. En estos tumores, la sobreexpresión de S100-A11 en los CAF se asoció positivamente con la sobreexpresión de p-STAT3 en las células tumorales, y correlacionó además con la presencia de enfermedad residual tras el tratamiento con la terapia anti-HER2 en neoadyuvancia asociándose, por lo tanto, a un peor pronóstico de estas pacientes. Por otro lado, las peores tasas de pCR de los tumores que sobreexpresaban S100-A11 en los CAF sugirieron también su posible valor como factor predictivo de respuesta a la terapia anti-HER2 en el cáncer de mama precoz HER2+.

Summary

Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer globally and is a leading cause of death among women. It comprises various subtypes, including HER2-positive (HER2+) breast cancer, which accounts for approximately 15-20% of diagnosed cases. These tumours are identified by the overexpression of the human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2) and their clinical management is based on anti-HER2 targeted therapy. The combination of trastuzumab and pertuzumab anti-HER2 antibodies with taxane-based chemotherapy is the standard neoadjuvant treatment regimen for early-stage cases prior to surgery. This approach has significantly improved clinical outcomes and survival rates for these patients. However, up to 60% of patients do not achieve a pathological complete response (pCR) after treatment, increasing the likelihood of recurrence, often as distant metastasis, months or years after surgery. Currently, there are limited options for curing HER2+ metastatic breast cancer with available therapies, making prevention of this situation crucial. Therefore, understanding the molecular mechanisms underlying anti-HER2 therapy resistance and identifying therapeutic strategies to reverse resistance remain clinical priorities.

Cancer-associated fibroblasts (CAFs) are the most abundant population of stromal cells that constitute the tumour microenvironment (TME). CAFs are crucial in shaping the TME and influencing tumour behaviour due to their ability to secrete a wide range of factors, including cytokines and growth factors. Growing evidence pays special attention to the CAF-derived secretome, which has a role in the promotion of breast cancer pathogenesis-related aspects such as proliferation, tumour growth, metastasis, and drug resistance, including resistance to anti-HER2 therapy. However, further research is needed to fully understand the role of CAFs in tumour development and progression of cancer, including HER2+ breast cancer. Therefore, the aim of this work was to identify CAF secretome factors that are related to the generation of anti-HER2 resistant phenotypes. The goal was to pharmacologically modulate these factors to reverse treatment resistance and improve the efficacy of anti-HER2 therapies. Additionally, we assessed their clinical relevance as potential prognostic and/or predictive biomarkers in early HER2+ breast cancer using clinical samples.

This study conducted in vitro assays using conditioned medium from CAFs, characterizing the cellular and molecular effects of the CAF secretome on the development of resistance to combined treatment with trastuzumab plus pertuzumab and chemotherapy in HER2+ breast cancer cell lines. A mass spectrometry-based analysis of CAF-derived secretome was performed to identify candidate proteins that may play a role in anti-HER2 therapy resistance. The proteins selected were 14-3-3 ζ , CCL2, HMGB1, HSP90- α , PAI-1, and S100-A11. Their contribution to the increased proliferation rate of resistant cells in HER2+ breast cancer cell lines was assayed,

leading to the selection of S100-A11 for further study into its mechanism of resistance acquisition. Combining anti-HER2 treatment with pharmacological inhibition of AGER (Advanced glycation end products receptor) and STAT3 reversed the anti-HER2 therapy resistance induced by exogenous S100-A11 in cell cultures. In a retrospective cohort study of patients with early HER2+ breast cancer, a positive association was found between S100-A11 overexpression in CAFs and p-STAT3 overexpression in tumour cells. S100-A11 overexpression in CAFs was also correlated with residual tumour burden after neoadjuvant anti-HER2 treatment, indicating its association with worse prognosis and suggesting its potential as a predictive biomarker for response to anti-HER2 therapy in early HER2+ breast cancer.

Introducción



1. Cáncer de mama

1.1. Epidemiología del cáncer de mama

Según estiman los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es, tras las enfermedades cardiovasculares, una de las principales causas de mortalidad en el mundo. La incidencia y mortalidad del cáncer aumentan rápidamente en países desarrollados, debido principalmente al incremento en la esperanza de vida y al estilo de vida [1]. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), miembro de la OMS, publica en el Observatorio Mundial del Cáncer (GCO) la base de datos GLOBOCAN, que proporciona estadísticas globales de cáncer y las estimaciones de incidencia y mortalidad para 36 tipos de cáncer en 185 países. Recientemente se publicó la base de datos GLOBOCAN 2020 con nuevas estimaciones sobre la carga del cáncer a nivel mundial, indicando que ésta ha aumentado a 19,3 millones de nuevos casos diagnosticados, con casi 10 millones de muertes producidas por cáncer. Además, se espera que la carga mundial del cáncer sea de 28,4 millones en el año 2040 [2]. En 2020 por primera vez el cáncer de mama superó al cáncer de pulmón como el cáncer diagnosticado más común, con un número estimado de 2,3 millones de casos nuevos (11,7 %), seguido por el cáncer de pulmón (11,4 %), el cáncer colorrectal (10,0 %) y el cáncer de próstata (7,3 %) [2]. De acuerdo con los datos de GLOBOCAN 2020, la incidencia del cáncer en España en 2020 fue de 282.421 casos diagnosticados. El cáncer colorrectal fue el cáncer diagnosticado más frecuente en España (14,7 %), seguido por el cáncer de próstata (12,3 %) y el cáncer de mama (12,1 %). El cáncer de pulmón sigue siendo la primera causa de muerte por cáncer (20,3 %) en España, seguido del cáncer colorrectal (10,6 %), el cáncer de páncreas (6,7 %) y el cáncer de mama (5,8 %) [2] (Figura 1).

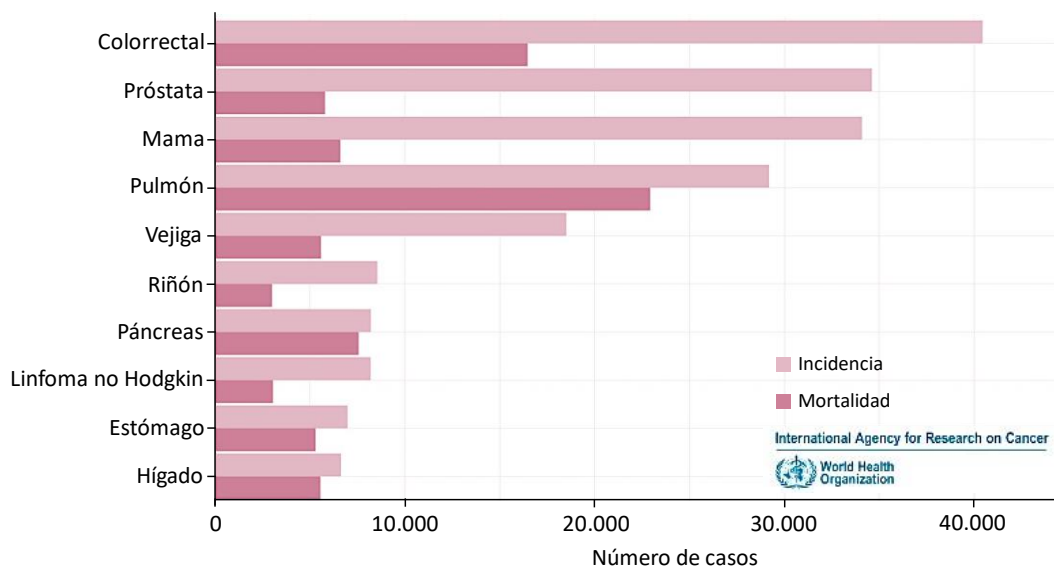


Figura 1. Incidencia y mortalidad estimada de los principales diez tipos de cáncer en España, en ambos sexos, en el año 2020. Adaptado del Observatorio Mundial del Cáncer de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC).

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en mujeres y es una de las principales causas de muerte en la mujer [3], presentando en 2020 una incidencia de 2.261.419 casos diagnosticados a nivel mundial y siendo responsable de un total de 684.996 muertes. En España es también la neoplasia más frecuente en mujeres, y se estima que la probabilidad de desarrollar cáncer de mama es del 8 % [4]. En el año 2020 fueron diagnosticados en España 34.088 casos de cáncer de mama, siendo un 28,7 % del total de neoplasias diagnosticadas en mujeres, y ocasionó un total de 6.606 muertes [2]. Aunque la incidencia del cáncer de mama ha sufrido un considerable aumento, las estrategias de detección precoz y los avances en el diagnóstico y la terapia han conseguido reducir la tasa de mortalidad y aumentar la supervivencia a los 5 años, siendo ésta superior al 80 % en estadios tempranos [4]. Sin embargo, la mortalidad global por cáncer de mama sigue siendo elevada, reduciendo la supervivencia hasta un 24 % en estadios avanzados [3].

1.2. Clasificación histológica, grado histológico y estadiaje

La variabilidad en las características morfológicas y moleculares de los carcinomas de mama influye en su comportamiento biológico y clínico, resultando fundamental la correcta identificación del subtipo. La clasificación de la OMS recoge los distintos subtipos en función de las características morfológicas del tumor [5].

La mayoría de los tumores de mama son adenocarcinomas, originándose en el epitelio de la glándula mamaria. Las células tumorales pueden originarse y quedar confinadas, dando lugar a carcinomas *in situ* o no invasivos, que pueden desarrollarse en los conductos galactóforos (carcinoma ductal *in situ* o CDIS) o en los lobulillos de la glándula mamaria (carcinoma lobulillar *in situ* o CLIS) [6]. Los tumores pueden propagarse al tejido mamario circundante, originando el carcinoma ductal infiltrante (CDI) o carcinoma lobulillar infiltrante (CLI) (Figura 2. A, B). El carcinoma ductal infiltrante o invasivo, también conocido como carcinoma infiltrante sin tipo especial (NOS, por sus siglas en inglés), es el subtipo más común de cáncer de mama y constituye cerca del 80 % de los tumores de mama infiltrantes [7].

Existen otros subtipos de carcinoma mamario infiltrante menos comunes, incluyendo los subtipos tubular, cribriforme, mucinoso, metaplásico, papilar, micropapilar, inflamatorio y neuroendocrino, entre otros [7].

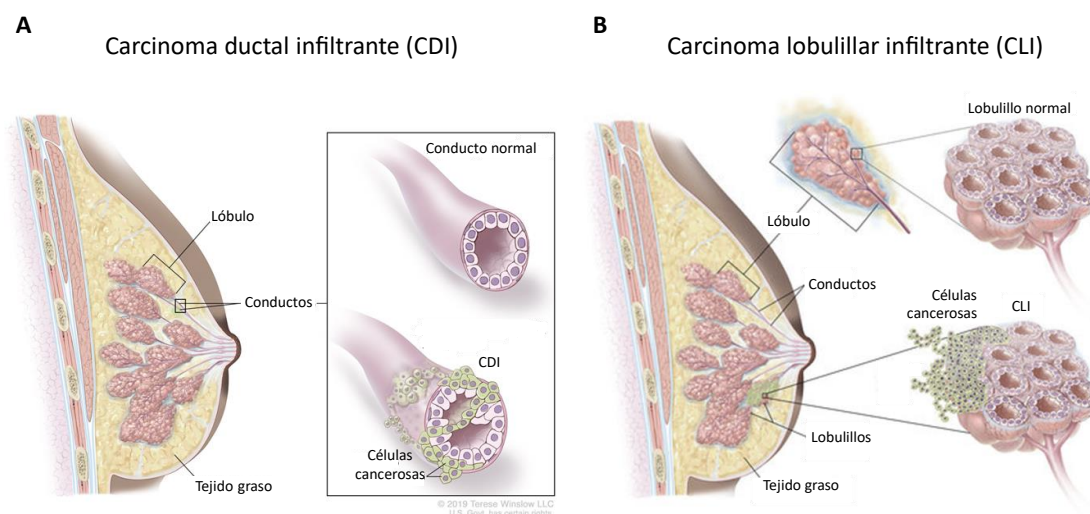


Figura 2. Adenocarcinoma de mama infiltrante en el tejido de la glándula mamaria. **A.** Carcinoma ductal infiltrante (CDI), también conocido como carcinoma infiltrante sin tipo especial (NOS). **B.** Carcinoma lobulillar infiltrante (CLI). Imagen adaptada del Instituto Nacional del Cáncer y utilizada con el permiso bajo Copyright © 2019 de Terese Winslow LLC, Medical Illustration. (<https://www.teresewinslow.com/>).

En el estudio de la patología mamaria es necesario determinar el grado histológico y el estadiaje de la enfermedad. En la actualidad, la determinación del grado histológico se realiza de acuerdo con la escala de Scarff-Bloom-Richardson, modificada posteriormente por Elston y Ellis [7],[8]. Esta escala muestra una importante reproducibilidad entre distintos observadores [10] y se basa en la cuantificación de tres aspectos de la diferenciación tumoral: 1) el porcentaje de formación

de estructuras tubulares en el tumor, 2) el grado de pleomorfismo o atipia en las células tumorales, 3) el número de mitosis presentes en 10 campos microscópicos.

El estadiaje del cáncer de mama, al igual que ocurre en otros tipos tumorales, es un factor pronóstico altamente significativo. Viene definido por la estadificación TNM, establecida por el American Joint Committee on Cancer (AJCC), y clasifica los tumores de mama en función del tamaño tumoral (T), la afectación ganglionar (N) y la presencia de metástasis a distancia (M) [11]. En base a la clasificación TNM, en cáncer de mama se distinguen cuatro estadios de la enfermedad. Los estadios I y II, en los que se considera enfermedad precoz o temprana; los estadios IIIA y IIIB, considerados como enfermedad localmente avanzada, y los estadios IIIC y IV, considerados como enfermedad avanzada o metastásica.

La clasificación morfológica del tumor, la determinación del grado histológico y la evaluación del estadiaje clínico son parámetros esenciales para proporcionar un diagnóstico y pronóstico iniciales del cáncer de mama. Sin embargo, estos factores tienen una capacidad limitada para predecir la respuesta al tratamiento y el riesgo de recurrencia de la enfermedad a largo plazo [12]. En las últimas décadas se ha incorporado en la práctica clínica la determinación de marcadores biológicos pronósticos (informan de la evolución de la enfermedad independientemente del tratamiento recibido) y/o predictivos (informan sobre la respuesta a un determinado tratamiento), los cuales permiten una mejor estimación del comportamiento de la enfermedad y selección del tratamiento. Así, los subtipos morfológicos pueden ser subdivididos o clasificados en función de sus firmas moleculares, basadas en perfiles de expresión génica o en la expresión de proteínas consideradas biomarcadores.

1.3. Clasificación molecular del cáncer de mama

Actualmente existen cuatro marcadores pronósticos y/o predictivos que se determinan mediante inmunohistoquímica (IHQ) en el tumor, en el momento del diagnóstico: el receptor de estrógenos (ER), el receptor de progesterona (PR) (conocidos como receptores hormonales, HR), el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y el marcador de proliferación celular Ki-67. En función de su expresión se distinguen cuatro subtipos moleculares principales, conocidos también como subtipos intrínsecos: Luminal A, Luminal B, HER2 positivo (HER2+) y *basal-like* [13,14], que inicialmente determinan el enfoque terapéutico. La continua evaluación de nuevas dianas moleculares hace que la clasificación del cáncer de mama evolucione y siga redefiniéndose. Así, posteriormente se han determinado e incluido nuevos subtipos, como el

subtipo de baja expresión en claudina (*claudin-low*) y el grupo de tumores de mama triple negativo (TN) [15,16].

Por otro lado, aunque la clasificación molecular basada en los patrones de expresión génica proporciona una mayor información predictiva del resultado clínico de los pacientes a largo plazo, no se ha implementado en la práctica clínica como un aspecto rutinario. Por este motivo, se estableció la correspondencia entre la designación clínica, basada en la determinación de los marcadores mencionados por IHQ, y la clasificación molecular, basada en análisis de expresión génica, observándose que no existe una correlación completa en un número significativo de casos (Figura 3) [17]. Según esta correlación, todos los subtipos intrínsecos podrían ser identificados como cáncer de mama HER2+ y, por el contrario, tumores con sobreexpresión de HER2 podrían ser clasificados erróneamente como tumores HER2 negativos (Figura 3).

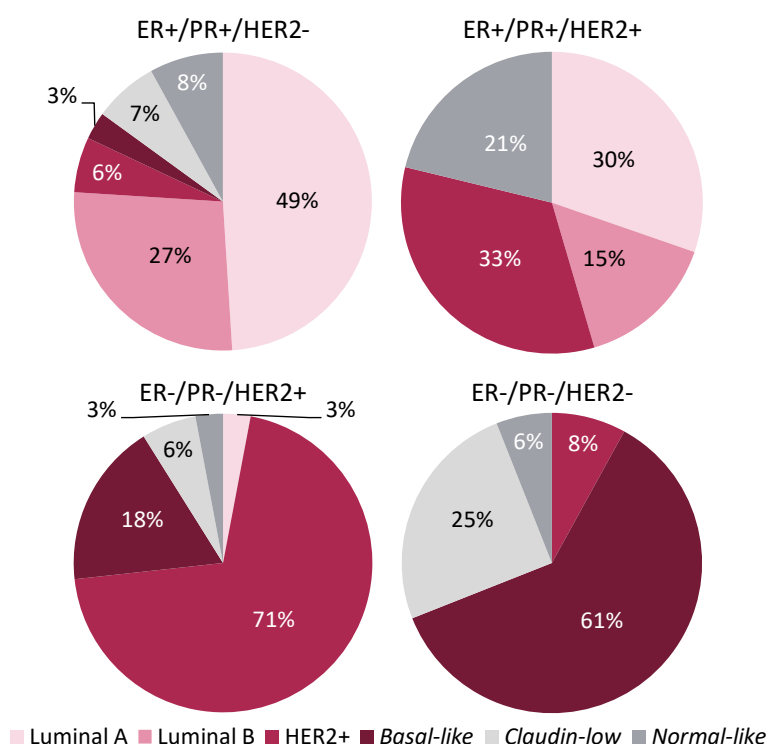


Figura 3. Correlación entre la clasificación inmunohistoquímica y la clasificación molecular de tumores de mama (Adaptado de Rivenbark A., et al. *Am J Pathol*, 2013).

La identificación de firmas de expresión génica, basadas en tecnologías de microarrays, y su asociación al resultado clínico de las pacientes ha permitido identificar tumores con distinto comportamiento clínico o respuesta a un tratamiento [18]. Esto ha conducido al desarrollo de plataformas o tests multigen, cuya implementación en la práctica clínica ha mejorado el diagnóstico, el pronóstico y la predicción de la respuesta terapéutica en las pacientes [19].

MammaPrint (Agendia), que determina la expresión de una firma de 70 genes, fue aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) en 2007, y ha demostrado ser un buen predictor de riesgo de recurrencia del tumor a distancia [20]. Prosigna (PAM50, NanoString Technologies), aprobado por la FDA en 2013, analiza la expresión de 50 genes predictivos en cáncer de mama, permitiendo la estratificación de los pacientes en tres categorías de riesgo (alto, bajo e intermedio) y su clasificación en función del subtipo intrínseco [21]. El test Oncotype DX (Genomic Health) se utiliza ampliamente como herramienta de apoyo en la clasificación de pacientes en estadios iniciales y para la selección del tratamiento [22,23].

Sin duda, la evolución en la identificación de biomarcadores pronósticos y predictivos en cáncer de mama ha mejorado la subclasificación molecular de los tumores y la selección de la terapia más adecuada. Sin embargo, conseguir llevar a cabo una terapia personalizada en cáncer de mama requerirá de un análisis más completo de las características de la enfermedad de cada paciente de manera individualizada, junto con la evaluación y la comprensión de la contribución de las alteraciones genéticas y epigenéticas específicas para cada caso.

2. Cáncer de mama HER2+

El receptor HER2, denominado también ErbB-2, es un receptor tirosina-cinasa de superficie celular. El mecanismo por el cual se produce la sobreexpresión de receptores HER2 en la membrana citoplasmática se asocia al incremento en el número de copias del gen codificante para HER2, o a una amplificación de la región cromosómica donde se localiza el mismo. Esta alteración en HER2 se detecta en un 15-20 % de los tumores de mama [24], otorgándoles autosuficiencia de señales de crecimiento y una activación constitutiva de vías de señalización que incrementan la capacidad proliferativa e invasiva de las células, y confiriendo a estas neoplasias una destacada agresividad [25].

HER2 es una proteína codificada por el gen *ERBB2* (*HER2/neu*), cuya localización se encuentra en el brazo largo del cromosoma 17 [26]. Es un receptor transmembrana de 185 kDa, con actividad tirosina-cinasa intrínseca, que pertenece a la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, *epidermal growth factor receptor*), conocida como familia de receptores HER o ErbB. Esta familia de receptores comprende cuatro integrantes: EGFR (o HER1), HER2, HER3 y HER4 [27]. La estructura de estos receptores consiste en una región N-terminal extracelular, con dominios de unión a ligandos, una región transmembrana, y una región C-terminal intracelular con actividad tirosina-cinasa, que permite la auto y

transfosforilación [28]. El dominio cinasa de HER3 carece de actividad enzimática, por lo que requiere de la heterodimerización para su transfosforilación [29].

2.1. Señalización celular mediada por el receptor HER2

La unión de ligandos específicos a los receptores de la familia HER produce un cambio conformacional en estos que posibilita su homo o heterodimerización y subsecuente activación [30]. Mientras que para EGFR, HER3 y HER4 se conocen numerosos ligandos [31], hasta el momento no se han identificado ligandos específicos de HER2. Sin embargo, HER2 es el compañero de heterodimerización de preferencia para el resto de los receptores de la familia, constituyendo heterodímeros con mayor estabilidad y con una señalización más potente que otras combinaciones sin HER2 [32]. El heterodímero HER2-HER3 es considerado el complejo más potente en cuanto a fuerza de interacción, fosforilación de residuos tirosina inducida por ligando y transducción de la señalización intracelular [33].

Tras la unión del ligando y la formación de los dímeros, se produce la transfosforilación del dominio tirosina-cinasa citoplasmático de los receptores y la subsecuente activación en cascada de distintas rutas de señalización [28]. La variedad de ligandos, la combinación de receptores y la amplia gama de proteínas efectoras implicadas en la transducción de las señales, inducen la activación cruzada de distintas vías, dando lugar a una diversidad significativa en la señalización y determinando, en última instancia, la respuesta celular y biológica. Tres de las principales vías de señalización desencadenadas *downstream* de HER2 son PI3K/AKT/mTOR, Ras/Raf/MEK/ERK y JAK/STAT (Figura 4).

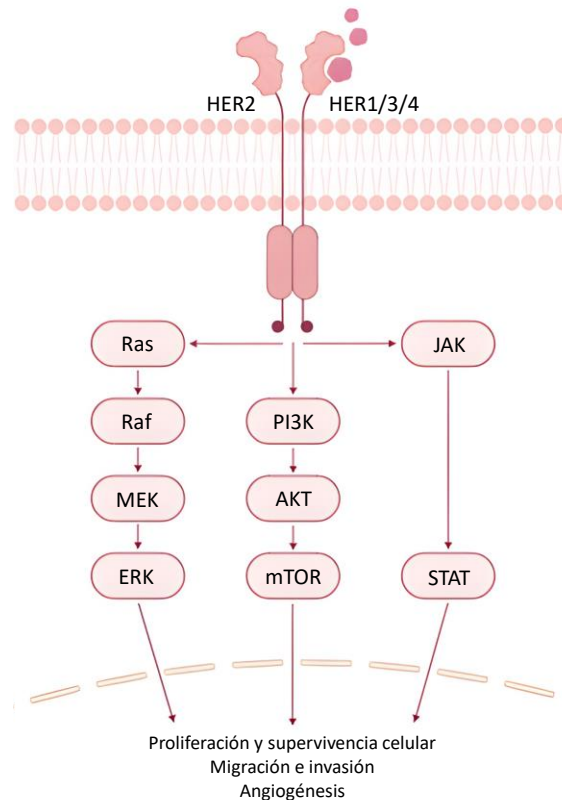


Figura 4. Vías de señalización intracelular mediadas por HER2. La homodimerización o heterodimerización de HER2 induce la activación del receptor, activando distintas cascadas de señalización downstream, como la vía de Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/AKT/mTOR y JAK/STAT. Creado con BioRender.com.

El complejo PI3K/AKT/mTOR constituye una vía de señalización con una función principal en actividades celulares esenciales, tales como el metabolismo energético, el crecimiento y la proliferación celular, la angiogénesis y la apoptosis [34]. Algunos receptores de membrana, incluyendo los receptores tirosina-cinasa, tras recibir una señal extracelular activan la cinasa PI3K, que recluta la proteína AKT como principal molécula efectora de esta vía. La proteína AKT activada (mediante su fosforilación por mTORC2) regula la actividad de diversos sustratos, como proteínas reguladoras de ciclo celular y de apoptosis, cinasas y factores de transcripción [34]. Por otro lado, la vía de Ras/Raf/MEK/ERK, también conocida como MAPK/ERK, es la más estudiada de las cascadas MAPK. La activación de receptores tirosina-cinasa por factores de crecimiento y moléculas de señalización extracelular conduce a la activación secuencial de las proteínas Ras, Raf, MEK y, finalmente, ERK. Las isoformas ERK1 y ERK2 (conocidas como ERK1/2 o p44/42) catalizan la fosforilación de múltiples dianas citoplasmáticas y nucleares, incluyendo factores de transcripción esenciales para la proliferación y diferenciación celular [35]. Las proteínas JAK y STAT forman un nodo de comunicación membrana-núcleo esencial en la función

celular, que puede ser activado por diversos factores de crecimiento y citocinas, incluyendo interleucinas e interferones. El factor de transcripción STAT3 es un miembro regulador central en esta cascada de señalización, cuya activación, dimerización y traslocación al núcleo induce la expresión de genes implicados en la regulación de procesos celulares como la proliferación, la apoptosis y respuestas inflamatorias [36].

La amplificación de HER2 causa un incremento en la activación de estas vías de señalización, alterando la regulación y ocasionando el estímulo de procesos como la proliferación celular, movilidad e invasión, apoptosis y angiogénesis [27] (Figura 4).

2.2. Papel de HER2 como biomarcador en cáncer de mama

En la década de 1980, se observó que la amplificación y/o la sobreexpresión de HER2 en pacientes con cáncer de mama confería mal pronóstico y una peor supervivencia global (SG), siendo un marcador pronóstico independiente asociado a menor supervivencia libre de enfermedad (SLE) en estadios tempranos [37]. Además de su importancia como factor pronóstico en cáncer de mama, constituye un marcador predictivo de respuesta a terapias anti-HER2 [38]. Uno de los retos para el uso de HER2 como factor pronóstico y predictivo en cáncer de mama ha sido establecer unos métodos de valoración con suficiente reproducibilidad y que permitan discriminar el estado del receptor de forma fiable. La determinación del estado de HER2 en cáncer de mama hoy en día es una herramienta ampliamente utilizada en la práctica clínica. La técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH, por sus siglas en inglés) se emplea para la detección de la amplificación del gen HER2, mientras la IHQ permite medir los niveles de la proteína HER2, siendo ésta última la técnica de elección para la rutina diaria. El estado de HER2 debe evaluarse en el componente tumoral y requiere una estandarización del protocolo de realización de la técnica y de la interpretación de los resultados, de acuerdo con la guía elaborada por la Sociedad Americana de Oncología Médica (ASCO) y el Colegio Americano de Patólogos (CAP), publicada en 2007 [39] y actualizada en 2013 [40]. En el año 2009, la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) y la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) publicó también la guía de recomendación para la determinación de HER2 [41]. La identificación adecuada del subtipo de cáncer de mama HER2+ en la práctica clínica mejoró significativamente el tratamiento de este subgrupo de pacientes, ya que la amplificación y/o sobreexpresión de HER2 están asociadas a un beneficio considerable de la terapia dirigida a HER2 en el cáncer de mama.

2.3. Tratamiento del cáncer de mama HER2+

Desde la década de los noventa hasta la actualidad se han desarrollado una variedad de terapias específicamente dirigidas contra HER2, cuya combinación con la quimioterapia se ha convertido en el régimen terapéutico actual para el cáncer de mama HER2+ en estadios tempranos y avanzados. Las terapias anti-HER2 actuales incluyen anticuerpos monoclonales humanizados, inhibidores tirosina-cinasa (TKIs, *Tirosine kinase inhibitors*) y conjugados anticuerpo-fármaco (ADCs, *Antibody-drug conjugates*).

2.3.1. Terapia dirigida anti-HER2: trastuzumab y pertuzumab

En el año 1995, Genentech desarrolló la primera terapia anti-HER2, trastuzumab (Herceptin), un anticuerpo monoclonal inmunoglobulina (Ig) G1 humanizado con capacidad de unión selectiva a HER2, que impide la formación de homodímeros HER2-HER2 y de heterodímeros de HER2 con otros miembros de la familia [42]. Este fármaco demostró tener un efecto anti-tumoral, inicialmente en líneas celulares y posteriormente en tumores con sobreexpresión de HER2.

En 1998 la FDA aprobó el tratamiento con trastuzumab en combinación con quimioterapia para pacientes con cáncer de mama HER2+ metastásico, siendo obligatoria la determinación del estado de HER2 como variable predictiva para la selección de la terapia anti-HER2. En pacientes con cáncer de mama HER2+ metastásico se ha demostrado que la adición de trastuzumab a la quimioterapia aportaba un beneficio significativo en el tiempo de progresión de la enfermedad, incrementando la supervivencia libre de progresión (SLP) respecto al grupo de pacientes que recibieron quimioterapia en monoterapia [43]. Posteriormente, la combinación de trastuzumab con quimioterapia en esquema de neoadyuvancia (previo a la cirugía) en pacientes con cáncer de mama HER2+ de estadio precoz demostró un incremento significativo en la respuesta patológica completa (pCR, por sus siglas en inglés) [44]. Estos hallazgos con trastuzumab fueron posteriormente apoyados por otros estudios (HERA, NSABP B-31, NCCTG N9831 y BCIRG-006), en los que se demostró una mejor SLE y SG en los pacientes que recibieron trastuzumab en combinación con quimioterapia [45–47]. Actualmente, trastuzumab forma parte de la terapia para el cáncer de mama HER2+ en estadios precoces y avanzados de la enfermedad. Sin embargo, su éxito inicial a nivel clínico se ha visto limitado por la generación de resistencia en las pacientes.

Los avances en la investigación básica y traslacional para generar nuevas opciones para la inhibición de HER2 y otros receptores de la familia HER han mejorado la evolución clínica de las pacientes con cáncer de mama HER2+. El anticuerpo monoclonal humanizado pertuzumab

(Perjeta, Genentech), cuya unión a HER2 impide la formación de heterodímeros de HER2, principalmente los dímeros HER2-HER3, es una de estas terapias anti-HER2 adicionales [48]. Su mecanismo de acción es complementario con el de trastuzumab, por lo que la combinación de trastuzumab con pertuzumab proporciona un bloqueo más potente de la señalización de HER2. En 2012 se describió el beneficio de la combinación de pertuzumab con trastuzumab respecto al tratamiento con trastuzumab en monoterapia en pacientes con cáncer de mama HER2+ que habían progresado durante la terapia con trastuzumab [49]. Posteriormente, distintos estudios evaluaron la eficacia de esta combinación de anticuerpos. El análisis del ensayo clínico CLEOPATRA reveló una mejor SLP y SG en pacientes con cáncer de mama HER2+ metastásico tratadas con pertuzumab, trastuzumab y quimioterapia, en comparación con los grupos que no incluyeron pertuzumab [50]. En base a estos resultados, en 2013 se aprobó el empleo de pertuzumab en combinación con trastuzumab y quimioterapia basada en taxanos en pacientes con enfermedad HER2+ metastásica y localmente avanzada, siendo el tratamiento de elección de primera línea para estas pacientes [50]. En 2021, los resultados del ensayo clínico PERUSE demostraron un perfil de seguridad y eficacia de la terapia con pertuzumab, trastuzumab y taxanos consistente con los resultados de CLEOPATRA [51]. Esta estrategia terapéutica también ha demostrado tener un beneficio clínico en pacientes con enfermedad precoz, administrado tanto en esquema de neoadyuvancia como de adyuvancia (después del tratamiento primario), tal y como se reportó, respectivamente, en los ensayos clínicos NeoSphere y APHINITY [52–54]. Actualmente esta combinación es, en régimen de neoadyuvancia, el tratamiento estándar para la mayoría de las pacientes con estadio precoz u operable.

2.3.2. Mecanismos de acción de trastuzumab y pertuzumab

Los mecanismos de acción de trastuzumab y pertuzumab se basan en la unión selectiva al receptor HER2. Específicamente, trastuzumab se une al dominio IV de la porción extracelular de HER2, lo que inhibe la dimerización del receptor independiente de ligando y la subsecuente activación de la señalización intracelular [55]. Sin embargo, el anticuerpo no es eficaz para bloquear la formación de heterodímeros de HER2 inducidos por ligando, entre los cuales destaca HER2-HER3 con una potente señalización oncogénica. Pertuzumab, por su parte, interacciona con el dominio II de la región extracelular de HER2, inhibiendo la señalización dependiente de ligando y bloqueando la heterodimerización de HER2 [48]. Como consecuencia, el doble bloqueo de HER2 basado en mecanismos complementarios ofrece una estrategia terapéutica sinérgica eficaz para el tratamiento de tumores HER2+.

El efecto antitumoral de la terapia anti-HER2 se debe principalmente al bloqueo de la activación de la señalización mediada por HER2, disminuyendo considerablemente las reacciones biológicas y celulares provocadas por estas vías de señalización [56]. Sin embargo, en la literatura se recogen diversos mecanismos asociados a la actividad antitumoral de trastuzumab [57]. Estos mecanismos incluyen, por ejemplo, la internalización y degradación de HER2, a través del reclutamiento de la proteína c-CBL con actividad ubiquitina-ligasa, que produce la ubiquitinación y posterior degradación del receptor [58]. Por otro lado, la interacción de trastuzumab con HER2 provoca el incremento de los niveles del gen *p27*, que codifica para un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina que produce el arresto de las células en fase G1 del ciclo celular [59]. Además, la eficacia de trastuzumab también puede depender de su capacidad para producir una respuesta inmune. Se ha demostrado que los anticuerpos anti-HER2 pueden promover la apoptosis celular a través de la inducción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) [60].

Respecto a los efectos moleculares y celulares provocados por pertuzumab, la literatura destaca principalmente el bloqueo de la señalización de proliferación y supervivencia celular mediada por HER2-HER3 [61].

2.3.3. Quimioterapia

En la terapia sistémica de las pacientes con cáncer de mama HER2+, incluyendo los estadios tempranos y avanzados, el régimen de tratamiento de preferencia se basa en la combinación de la terapia anti-HER2 con quimioterapia, tanto en esquemas de neoadyuvancia como de adyuvancia. Los taxanos son un tipo de quimioterápicos ampliamente utilizados en el tratamiento del cáncer de mama, constituyendo la primera línea de tratamiento para las pacientes HER2+ [50,62]. El mecanismo de acción de los taxanos se basa en su capacidad de unión a la tubulina, impidiendo el proceso normal de formación-despolimerización de los microtúbulos y conduciendo a la muerte celular [63]. Paclitaxel (Taxol, Bristol-Myers Squibb) y docetaxel (Taxotere, Rhone-Poulenc Rorer) son los principales taxanos empleados en la práctica clínica para el tratamiento del cáncer de mama HER2+. Paclitaxel fue identificado en la década de 1960 en la corteza del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*) y fue el primer compuesto con anillo de taxano que demostró tener actividad antitumoral [64]. Posteriormente se desarrolló docetaxel, un compuesto semisintético derivado de paclitaxel, con una estructura análoga y un mecanismo de acción similar [65].

También pueden formar parte del tratamiento sistémico de las pacientes HER2+ algunos agentes quimioterápicos del grupo de las antraciclinas, como la doxorubicina y la epirubicina [66], así como el carboplatino [67].

2.3.4. Otras terapias

Trastuzumab deruxtecán o T-DXd es un conjugado anticuerpo-fármaco en el que trastuzumab se encuentra unido mediante un enlace escindible enzimáticamente a deruxtecán, un inhibidor de la topoisomerasa I [68]. Recientemente, trastuzumab deruxtecán fue aprobado como segunda línea de tratamiento en enfermedad metastásica HER2+, según los resultados del EC DESTINY-Breast 03 [69], en los que se indicó su superioridad frente a Trastuzumab emtansina. Trastuzumab emtansina o T-DM1 es otro tipo de terapia anti-HER2 de tipo ADC que contiene trastuzumab unido de forma covalente a DM1, un inhibidor de la polimerización de tubulina [70]. El uso de T-DM1 está indicado para casos de enfermedad residual tras el tratamiento neoadyuvante de primera línea [71]. En tercera línea de tratamiento y sucesivas está indicado el uso de T-DM1, así como la combinación de trastuzumab y capecitabina con un TKI, como tucatinib [72].

2.4. Resistencia a la terapia anti-HER2

La incorporación de la terapia anti-HER2 en la práctica clínica ha supuesto un importante avance en el tratamiento del cáncer de mama HER2+, un subtipo tumoral agresivo, mejorando la SLE y SG de las pacientes de estadio precoz. La administración sistémica del tratamiento en esquema de neoadyuvancia constituye una estrategia exitosa para permitir la cirugía en casos que eran inoperables en el momento del diagnóstico, así como la realización de un enfoque quirúrgico preservador de la mama, en lugar de la mastectomía [73]. Además, permite evaluar la eficacia antitumoral del tratamiento, en términos de pCR (ausencia de tumor invasivo en la mama y en ganglios tras el tratamiento neoadyuvante), en lugar de hacerlo mediante resultados de evidencia tardía como la supervivencia. Así, la presencia de enfermedad residual permite inferir en la eficacia del tratamiento a largo plazo, constituyendo una variable subrogada de la SLE. El tratamiento neoadyuvante basado en el tratamiento anti-HER2 ha mejorado sustancialmente las tasas de pCR en pacientes de estadio precoz [53,74]. Sin embargo, aproximadamente entre un 40 y 60 % de las pacientes no responden al tratamiento y no alcanzan la pCR. Estas pacientes con enfermedad residual tienen una mayor probabilidad de recaída, lo cual ocurre mayoritariamente en forma de metástasis (en órganos como hígado, pulmón o cerebro) y en cuyo caso las opciones terapéuticas actuales generalmente ofrecen muy pocas posibilidades de

curación. De esta manera, la superación de la resistencia al tratamiento anti-HER2 para conseguir evitar esta situación representa un desafío y un objetivo en el entorno clínico.

En términos de resistencia al tratamiento, se pueden distinguir dos tipos de resistencia: primaria y adquirida. El primer modelo viene definido por la presencia de alteraciones moleculares en el momento del diagnóstico de la enfermedad, que provocan que las células tumorales evadan el mecanismo de acción de la terapia. Según la hipótesis de la evolución ramificada y la heterogeneidad tumoral, los tumores monoclonales con resistencia primaria pueden progresar durante el tratamiento o en un tiempo corto tras el mismo (menos de 6 meses), dado que todas las células tumorales presentarían la alteración que les confiere resistencia. En cambio, los tumores policlonales podrán generar una respuesta parcial al tratamiento y una posterior recaída, ya que las células del tumor presentan heterogeneidad en cuanto a la presencia de las alteraciones moleculares que les confieren la tolerancia al tratamiento [75]. Por otro lado, la exposición continuada a la terapia de algunos tumores que inicialmente eran sensibles a ésta puede provocar la emergencia de clones tumorales con alteraciones moleculares adquiridas *de novo* que provoquen en el tumor la evasión del mecanismo de acción de la terapia (resistencia adquirida).

Durante los últimos años se han descrito distintos mecanismos moleculares implicados en la resistencia a trastuzumab, incluyendo la expresión de formas truncadas de HER2, como p95-HER2 o HER2 Δ 16 [76,77]; el incremento de la expresión o actividad de ligandos de la familia de receptores HER, especialmente de HER3 [78]; la activación constitutiva aberrante de vías de señalización mediadas por HER2, como las vías de PI3K/AKT/mTOR o MAPK/ERK [79,80]; la activación de vías de señalización alternativas, como el caso del receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGFR1) [81]; o mecanismos relacionados con el sistema inmune, como la sobreexpresión del ligando 1 de muerte programada (PD-L1) [82]. Aunque hay pocos estudios publicados sobre la resistencia a pertuzumab en monoterapia, se han propuesto algunos mecanismos moleculares, asociados a la formación de heterodímeros EGFR-HER3 [83]; la aparición de mutaciones activadoras [84]; o debidos a la regulación por microRNAs [85]. El estudio de la resistencia a la combinación de trastuzumab y pertuzumab es un área que, por el momento, está poco explorada. Recientemente, Irie y colaboradores propusieron la activación del heterodímero HER2-HER3 como mecanismo de resistencia a trastuzumab y pertuzumab [86]. Las mutaciones en PI3KCA también han demostrado contribuir en el desarrollo de resistencia al bloqueo dual anti-HER2 en modelos murinos [87].

La resistencia a la terapia continúa siendo un reto en el manejo clínico del cáncer de mama HER2+. El desarrollo de un tratamiento más efectivo para las pacientes que presentan resistencia requiere una mejor comprensión de los mecanismos de resistencia adquiridos, así como la identificación de los agentes moleculares que median estos fenotipos resistentes. La creciente evidencia indica la participación de los distintos componentes del microambiente tumoral en la fisiopatología del cáncer, respaldando su papel en la resistencia a la terapia. Particularmente, los fibroblastos asociados a cáncer han sido vinculados a la adquisición de resistencia a la terapia en cáncer de mama, por lo que su modulación farmacológica ha emergido como una estrategia clínicamente explotable para mejorar la eficacia terapéutica.

3. Fibroblastos asociados a cáncer (CAF)

Las células tumorales se desarrollan en un entorno tisular complejo. Hanahan y Weinberg, que describieron las características distintivas del cáncer en el año 2000, sugirieron por aquel entonces la idea de que muchas de las señales de crecimiento que sostienen la proliferación de las células tumorales se originan en las células estromales que componen la masa tumoral [88]. Esta premisa quedó encarnada en el concepto que hoy en día conocemos como microambiente tumoral (TME, *tumor microenvironment*), cuya contribución en múltiples aspectos condicionantes del comportamiento del tumor ha sido ampliamente constatada en la literatura [89,90]. Dentro del TME, el estroma tumoral está constituido por células inmunes e inflamatorias, células endoteliales, fibroblastos activados y matriz extracelular (ECM, *extracellular matrix*) [91]. Los fibroblastos que se encuentran asociados con las células cancerosas (denominados fibroblastos asociados a cáncer o CAF, por sus siglas en inglés) son uno de los componentes predominantes en el estroma tumoral. En la última década, la creciente evidencia ha reflejado la contribución de los CAF en una amplia gama de procesos implicados en la progresión del tumor [92,93].

3.1. Origen, señalización intracelular y heterogeneidad de los CAF

Los fibroblastos son células de tejido conectivo originarias de un linaje mesenquimal. Aunque en tejido normal se especula que se encuentran en un estado de quiescencia o reposo [91], pueden adquirir un fenotipo activado, cuyo fenómeno fue observado inicialmente en procesos de cierre o cicatrización de herida y, posteriormente, en inflamación aguda y crónica [94]. Los fibroblastos procedentes de cicatrización o de procesos fibróticos presentan una mayor actividad secretora y una mayor proliferación que los de tejido sano; este incremento en su actividad es lo que se conoce como activación de los fibroblastos [95]. La síntesis y secreción de componentes de la

ECM (remodelación de la ECM), la secreción de citocinas y quimiocinas, el reclutamiento de células inmunitarias y la modificación de la arquitectura tisular son algunas de sus principales funciones [96].

El cúmulo de células cancerosas representa una lesión en un tejido, lo cual origina una respuesta de reparación tisular dirigida, en este caso, hacia las células tumorales [97]. Sin embargo, en este sentido, los tumores son considerados “heridas que no sanan” [98]. Esta respuesta de reparación se conoce como reacción desmoplásica o fibrosis tumoral. En la década de 1980, la evidencia científica comenzó a manifestar que las células cancerosas podían reclutar fibroblastos activados del estroma, o CAF, similares a los fibroblastos del proceso de cicatrización [99]. Este reclutamiento se debe, en gran parte, a los factores de crecimiento y citocinas secretados por las células tumorales y el resto de las células que componen el TME.

Distintas vías de señalización constituyen en el TME una compleja red que modula la activación y el fenotipo maligno de los CAF, cuya regulación se da por distintos factores solubles, derivados tanto de las células tumorales como de estímulos del mismo estroma tumoral [100]. Por ejemplo, la señalización autocrina de TGF- β participa activamente en la generación y el mantenimiento de los CAF a través de la vía canónica de TGF- β [101]. Por otro lado, el TGF- β 1 derivado de células neoplásicas induce la transición de fibroblastos residentes en un tejido a CAF en distintos tipos tumorales, incluyendo tumores de mama [102]. La diferenciación de células mesenquimales hacia un fenotipo CAF mediada por TGF- β también puede darse a través de la activación de JAK/STAT3 [103]. La vía de Wnt tiene un papel directo en la activación, contractilidad y plasticidad fenotípica de los fibroblastos, cuya activación por β -catenina es clave en el estímulo de la proliferación y actividad secretora de los CAF [103]. Los CAF no sólo son una fuente de ligandos activadores de la vía de Hedgehog (Hh), sino que también responden a la señalización de Hh a través del factor de transcripción GLI1, cuya actividad en los CAF guarda una relación directa con su activación [100]. Los complejos YAP/TEAD de la ruta Hippo inducen la transformación de fibroblastos normales (NAF, por sus siglas en inglés) a CAF [104] y contribuyen a la remodelación de la ECM y la rigidez del estroma, estableciendo un *feedback loop* positivo que sostiene el fenotipo de fibroblasto activado [105]. La activación de otras múltiples señales y cascadas de señalización conocidas, como JAK/STAT, PI3K/AKT, MAPK, EGFR, NF- κ B, HIF, HSF1, ha sido reportada en la literatura por su contribución al mantenimiento del fenotipo activado de los CAF [100]. Además, la creciente evidencia señala también el papel de los microRNAs y las alteraciones epigenéticas como mecanismos emergentes en la regulación de la activación de los CAF [106].

Las acciones pleiotrópicas que ejercen los CAF sobre las células tumorales son muy dependientes del contexto tumoral, lo cual refleja su heterogeneidad y plasticidad [107]. Existen en la literatura una variedad de marcadores que permiten la identificación de CAF, siendo los más comunes la proteína específica de fibroblastos 1 (FSP-1), la proteína alfa-actina de musculo liso (α -SMA), la proteína activadora de fibroblastos (FAP), o los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa y beta (PDGFR- α y PDGFR- β , respectivamente) [90]. Sin embargo, no existe ningún marcador que defina exclusiva y completamente los CAF. La heterogeneidad en los patrones de expresión de algunos marcadores está asociada a las funciones únicas que pueden presentar dependiendo del contexto y tipo tumoral. Estos marcadores también pueden expresarse en otras células del TME, por lo que su uso para la identificación de CAF debe tener en cuenta otros aspectos como la morfología celular, la distribución y el contexto. Además, muchos fibroblastos funcionalmente activados puede que no expresen algunos de estos marcadores. La heterogeneidad de los CAF también depende del origen de las células precursoras, que pueden ser células madre mesenquimales, células endoteliales, fibroblastos en reposo, y células epiteliales, entre otras [108], dando lugar a una variedad de subtipos funcionales [109].

3.2. Papel en la patogénesis del cáncer

Los CAF son un componente dinámico del TME que orchestra la interacción entre el estroma y las células tumorales, a través de la producción y secreción de múltiples factores, incluyendo citocinas, factores de crecimiento y proteínas de la ECM. Mediante la comunicación paracrina y la remodelación de la ECM, su contribución en la carcinogénesis y en el desarrollo de la enfermedad es crucial [110].

La amplia gama de cascadas de señalización que participan en la reprogramación y activación de los CAF afecta también al perfil de proteínas que secretan y a su comunicación con las células del tumor, regulando en última instancia aspectos como la tumorigénesis, la invasión, la metástasis, la angiogénesis, la respuesta inmune y la resistencia a fármacos [91]. Sin embargo, el papel específico de los CAF en estos procesos y los mecanismos moleculares subyacentes no se conocen en profundidad.

Distintos factores secretados por los CAF contribuyen al papel pro-tumorigénico de los fibroblastos. Entre ellos, los factores de crecimiento TGF- β y HGF derivados de CAF destacan por modular positivamente el crecimiento y el potencial oncogénico de los tejidos epiteliales adyacentes [111]. Su papel, junto con VEGF y PDGF, también ha sido reportado en la promoción de la transición epitelio-mesénquima (EMT) en células tumorales [103]. Las interleucinas IL-6 e

IL-8 secretadas por los CAF sostienen la proliferación de células madre tumorales (CSC, *cancer stem cells*), constituyendo un mecanismo de resistencia a fármacos [112]. En cáncer de mama, CXCL12 (SDF-1) derivada de los CAF estimula el crecimiento tumoral, la angiogénesis y el potencial metastásico de las células neoplásicas [113].

3.3. Secretoma derivado de los CAF

Se denomina secretoma al conjunto de proteínas secretadas por una célula al espacio extracelular [114]. Dado su papel clave en la comunicación intercelular, el estudio del secretoma ha ganado especial relevancia en la investigación en cáncer, permitiendo la identificación de dianas con potencial terapéutico [115]. Los CAF realizan el condicionamiento de las células tumorales y de otras células del TME produciendo múltiples factores, incluyendo citocinas y factores de crecimiento, por lo que la identificación de las proteínas que secretan resulta crucial para inferir los mecanismos que subyacen a la variedad de funciones que los CAF regulan en el TME durante la progresión tumoral. Sin embargo, la composición y dinámica del secretoma de los CAF durante las distintas etapas del desarrollo tumoral no se conoce en detalle. De igual manera, tampoco se ha caracterizado su evolución durante el transcurso del tratamiento y la generación de resistencia a fármacos. Aun así, la literatura sugiere que los agentes quimioterápicos, las terapias dirigidas y la radioterapia tienen un impacto en los CAF [116–118], modulando el espectro de proteínas que secretan [119,120]. Por ejemplo, determinados agentes quimioterápicos producen en el CAF un aumento en la producción de citocinas (vía activación de rutas como JAK/STAT, Wnt y NF- κ B) que promueven la quimiorresistencia en el tumor [119,121] una mayor secreción de interleucinas como IL-17A e IL-11 producida por su tratamiento con derivados de cisplatino promueve en las células tumorales resistencia a este fármaco a través de mecanismos de expansión de CSCs [122] y de la activación de STAT3 [123]; también, el tratamiento de los CAF de cáncer colorrectal con cetuximab induce una mayor secreción de EGF, el cual produce la desensibilización de las células tumorales al tratamiento anti-EGFR [118].

Pese a la necesidad de un conocimiento más extenso y preciso de la composición y el papel del secretoma, el avance en las técnicas de análisis ha hecho que su estudio sea cada vez más factible. En este sentido, el uso de la espectrometría de masas sigue siendo prevalente debido sobre todo a la mejora del método de muestreo y cuantificación libre de marcaje o *label-free*, que permite la obtención de datos de manera rápida y precisa, con un coste relativamente bajo [124].

3.4. Papel en resistencia a la terapia anti-HER2

La influencia de los CAF en el resultado clínico de los pacientes con cáncer se debe en gran medida a su función en la resistencia a fármacos. Dada la complejidad de su biología y de sus interacciones con las células del microambiente tumoral, diversos mecanismos han sido descritos para explicar su contribución a la generación de fenotipos resistentes [125]. Por ejemplo, la resistencia a cisplatino inducida por los CAF es una de las más reportadas en la literatura, siendo asociada a distintos mecanismos, como la secreción de IL-8 y de determinados microRNAs [126,127]. La resistencia a quimioterápicos como gemcitabina y paclitaxel también ha sido descrita en la literatura a través de su acción paracrina o de su interacción directa con las células epiteliales [128,129]. Su acción paracrina ha demostrado inducir resistencia también a terapias dirigidas, como es el caso de la secreción de neuregulina 1 y de HGF, implicadas en la resistencia al tratamiento antiandrogénico y a TKIs, respectivamente [130,131].

En cáncer de mama, numerosos estudios sugieren el papel de los CAF en la resistencia a terapias endocrinas, quimioterapia y terapias dirigidas [132,133]. Aunque los mecanismos asociados a la adquisición de resistencia a terapias dirigidas en cáncer de mama HER2+ continúan sin ser esclarecidos, distintos estudios han constatado la contribución de los CAF en la resistencia a trastuzumab y otras terapias anti-HER2. El grupo de Mao y colaboradores demostraron que la IL-6 producida por los CAF inducía la expansión del nicho de CSC en líneas celulares HER2+, dando lugar a fenotipos resistentes a trastuzumab [134]. La respuesta ADCC mediada por trastuzumab en las células tumorales puede ser antagonizada por la función inmunomoduladora de los CAF, según describieron Nguyen y colaboradores [135]. El grupo de Fernández-Nogueira y colaboradores describió el papel de FGF5 secretado por los CAF en la adquisición de resistencia a lapatinib y trastuzumab a través de la activación de FGFR2 y la transactivación de HER2. Además, los resultados en cohortes de pacientes HER2+ mostraron una correlación positiva de los niveles de FGF5 con un peor pronóstico, sugiriendo su potencial como marcador predictivo de resistencia a terapias anti-HER2 [136]. El papel de los factores de crecimiento de fibroblastos en la adquisición de fenotipos resistentes a la combinación de lapatinib con trastuzumab fue también descrita por Hanker y colaboradores en modelos murinos de xenoinjerto en cáncer de mama HER2+ [137]. A partir de muestras clínicas de tumores HER2+ tratados con trastuzumab en adyuvancia, el grupo de Sonnenblick determinó la correlación entre la presencia de un estroma reactivo y la resistencia a trastuzumab [138].

En conjunto, la literatura ofrece diversos trabajos que revelan la contribución de los CAF en la generación de resistencia, indicando además su papel en la resistencia a trastuzumab. Sin

embargo, hasta el momento no hay estudios publicados que analicen la contribución de los CAF en la resistencia al tratamiento basado en la combinación de trastuzumab y pertuzumab con taxanos, que constituye la estrategia terapéutica de elección para las pacientes HER2+.

3.5. Relevancia clínica de los CAF

La evidencia acumulada sugiere que el estroma también contiene información pronóstica independiente, por lo que la caracterización de la compleja naturaleza de los CAF y de sus interacciones dentro del TME contiene un valor clínico significativo [139]. Las firmas definidas por los perfiles de expresión de los CAF pueden proveer de marcadores que ayuden a mejorar el diagnóstico y la estratificación de los pacientes, así como la adaptación o personalización del tratamiento y el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas.

3.5.1. Valor pronóstico

A pesar de la falta de especificidad de los marcadores utilizados comúnmente para la identificación de los CAF, numerosos estudios han investigado su valor pronóstico en distintos tipos de cáncer [140]. Las técnicas de proteómica y de secuenciación masiva han facilitado la identificación y validación de biomarcadores para distintas subpoblaciones de CAF a nivel transcripcional y de proteína. En este aspecto, serán necesarios futuros estudios en muestras clínicas para dilucidar las funciones específicas de las subpoblaciones (definidas por perfiles de expresión) y definir su valor pronóstico [140].

En cáncer de mama, los CAF han demostrado un papel activo en la progresión de la enfermedad, representando hasta el 80 % del estroma tumoral como resultado de un extenso proceso desmoplásico [141]. Este escenario ha conducido a los investigadores a determinar el valor pronóstico y predictivo de diversos marcadores de CAF, con posible utilidad en el diagnóstico precoz del cáncer de mama [142]. Por ejemplo, la expresión en el estroma de determinados tipos de colágeno o de fibras con determinadas características han sido sugeridos como marcadores de diferenciación entre tumores de mama malignos y benignos [143] y asociadas al riesgo de recurrencia en CDIS [144]. Otros marcadores de progresión y riesgo de recurrencia en pacientes con CDIS son la pérdida de la expresión de caveolina-1 y un perfil de expresión PDGFR- α bajo/PDGFR- β alto en los CAF [145,146]. Por otro lado, la expresión en los CAF de marcadores como el factor tisular, la trombina, PAR2 y FAP han sido asociados al riesgo de transición de CDIS a enfermedad invasiva [147,148].

3.5.2. CAF como diana terapéutica

En conjunto, la evidencia científica más reciente revela la importancia de modular la actividad de los CAF en los tumores de pacientes, recurriendo por tanto a la intervención sobre dianas expresadas en los mismos. Sin embargo, la heterogeneidad de los CAF y su participación en múltiples mecanismos tumorales complica este objetivo y obliga a seguir investigando para precisar el fenotipo y fisiología de estas células, con el objetivo de identificar nuevos marcadores de utilidad clínica [149]. En este sentido, las distintas estrategias terapéuticas pueden estar dirigidas directamente a los CAF, a marcadores específicos como FAP [150], así como a moléculas presentes en el TME implicadas en su activación, como TFG- β [151]. La modulación de la reprogramación de los CAF con inhibidores de JAK ha demostrado inhibir su función protumorigénica en modelos preclínicos de cáncer de páncreas [152]. En pacientes de adenocarcinoma pancreático se ha evaluado la eficacia de la inhibición del eje CXCL12-CXCR4 y de la depleción de hialuronano (HA) en los CAF, en combinación con inmunoterapia [153,154].

En cáncer de mama, en tumores ricos en HA se ha observado que la depleción *in vitro* de HA mejora el acceso de las células NK (*natural killer*) y la respuesta ADCC mediada por trastuzumab y cetuximab, mejorando la sensibilidad a estas terapias [155]. En modelos animales de cáncer de mama metastásico, la reducción de la producción de HA y el bloqueo de la señalización de TFG- β en los CAF mediante un inhibidor de angiotensina ha demostrado potenciar el efecto de agentes quimioterápicos [156]. Por otro lado, la actividad terapéutica de una variante de IL-2 dirigida contra FAP fue evaluada en un ensayo clínico de fase I (ClinicalTrials.gov; Identificador: NCT02627274) en combinación con trastuzumab y cetuximab. Además, según reflejaron los resultados del ensayo clínico de fase I EDALINE, la inhibición de la vía de Hh sensibiliza los tumores al tratamiento con docetaxel, cuyo abordaje terapéutico podría mejorar la supervivencia en pacientes de cáncer de mama TN [157].

4. Proteína S100-A11

4.1. Estructura y función de las proteínas S100

Las proteínas S100 constituyen una familia de proteínas multigénica, caracterizadas por un bajo peso molecular (9-14 kDa) y por la presencia de dominios de unión a calcio. En humanos se han identificado al menos 21 miembros, con una elevada homología estructural [158]. Su estructura presenta dos motivos mano EF con afinidad por iones de calcio (Ca^{2+}), cuya unión produce un cambio conformacional que expone sitios de unión a proteínas diana [159]. Su estructura preferente es de naturaleza homodimérica; sin embargo, se han hallado algunos heterodímeros

u oligómeros funcionales [160,161]. Aunque se expresan en un amplio espectro de tejidos y tipos celulares en vertebrados, su patrón de expresión y distribución subcelular es específica para cada proteína [162].

Las proteínas S100 atienden a una gran diversidad funcional [163]. A nivel intracelular actúan como sensores de calcio, traduciendo la fluctuación de los niveles de los iones Ca^{2+} en respuestas celulares [164]. A través de su unión a múltiples proteínas diana (enzimas, factores de transcripción, subunidades de citoesqueleto, ácidos nucleicos) regulan numerosas funciones celulares, como la proliferación, la diferenciación, la apoptosis, el metabolismo energético, la inflamación y la homeostasis de calcio [165]. Por otro lado, algunas proteínas S100 son secretadas y actúan como efectoras de la comunicación autocrina y paracrina en células diana a través de la activación de receptores de superficie de membrana [166]. Como efectoras de la señalización extracelular, participan en la regulación de la proliferación y diferenciación celular, migración e inflamación. Además, pueden actuar como alarminas o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), regulando la patogénesis de enfermedades inflamatorias y de procesos tumorigénicos [166].

S100-A11, también conocida como S100C o calgizarina, es uno de los miembros de la familia de proteínas de unión a calcio. Al igual que el resto de las proteínas S100, su expresión es ubicua, hallándose en tejidos como placenta, pulmón, riñón y corazón [167–169]. La dinámica distribución de S100-A11 a nivel celular hace que pueda localizarse, en función del tipo celular y tejido, tanto en el núcleo como en citoplasma; además, es una de las proteínas S100 secretadas que presentan una función extracelular [169]. Su papel a nivel intracelular y extracelular depende del tipo celular y de las condiciones fisiopatológicas específicas [170].

4.2. Papel en cáncer de mama y en resistencia a terapia

La desregulación de la expresión de las proteínas S100 es una característica común en diversos tipos de cáncer. Esta desregulación normalmente consiste en su sobreexpresión y se encuentra vinculada a la promoción del crecimiento tumoral y de la metástasis, así como a la respuesta a terapias [158,171]. Aunque se precisan análisis más exhaustivos en muestras de pacientes, hasta el momento los estudios comparativos han permitido distinguir tendencias en la firma de proteínas S100, detectando perfiles de expresión distintivos en cada tipo tumoral [162]. Posiblemente, el patrón de expresión conjunto de algunos (o todos) los miembros de familia S100 pueda tener un mayor valor pronóstico que el estudio de la expresión de cada proteína de manera individual. En tumores de mama, la evidencia ha constatado la desregulación de algunas

proteínas S100, sugiriendo su contribución en la progresión tumoral y su potencial como biomarcadores en la enfermedad [168,172]. Por ejemplo, la sobreexpresión en células tumorales de algunos miembros de la familia, como S100-A4, S100-A7, S100-A8, S100-A9, S100-A11 y S100P, ha sido asociada con un peor pronóstico en las pacientes [172,173].

La sobreexpresión en particular de S100-A11 ha sido observada en distintos tumores, incluyendo los de mama, indicando un papel favorecedor del crecimiento de las células neoplásicas [168,174]. Aunque S100-A11 generalmente es considerada un factor oncogénico, la literatura sugiere que su nivel de expresión y las vías de señalización en las que participa la proteína contribuyen a las distintas funciones que presenta en diferentes tumores [169]. Inicialmente, el análisis de la expresión de la proteína S100-A11 en tumores de mama humanos fue llevado a cabo por Kondo y colaboradores, en cuyo trabajo observaron la regulación a la baja de S100-A11 en los tumores analizados [175]. Por el contrario, los estudios posteriores y hasta la actualidad indican la sobreexpresión de S100-A11 en los tumores de mama (probablemente esta controversia sea debida al reducido tamaño muestral del estudio inicial) [168,172]. La correlación entre los niveles elevados de ARNm de S100-A11 y una menor SG en pacientes ha sugerido su contribución en la progresión del cáncer de mama, además de su papel como marcador pronóstico [176,177]. Por otro lado, en casos clínicos de CDI, el patrón de expresión de S100-A11 en distintos subtipos intrínsecos analizados mostró ser independiente de variables clínico-patológicas como el estado de HR, la edad, el tamaño tumoral o el grado histológico [176]. La expresión diferencial de S100-A11 hallada en los tumores de mama sugiere su posible utilidad clínica como diana o biomarcador en la enfermedad. No obstante, sería necesario ampliar los estudios *in vitro* y los análisis en cohortes de pacientes para esclarecer las funciones específicas de la proteína y su contribución en el desarrollo de la enfermedad.

Dentro de su contribución en la progresión tumoral, el papel de las proteínas S100 en la resistencia a distintos agentes quimioterápicos ha sido señalado en la literatura científica en distintos tipos de cáncer, incluyendo tumores de colon, de páncreas, de ovario y de mama [169,171]. En concreto, algunos trabajos con líneas celulares de cáncer gástrico y de pulmón han sugerido una función promotora de la proteína S100-A11 en la generación de resistencia a agentes quimioterápicos como cisplatino y 5-fluorouracilo [178,179]. Además, estudios sobre la función de S100-A11 en el TME en un panel de distintos tipos tumorales han asociado su expresión con la infiltración de células inmunes del TME y con la inducción de resistencia a fármacos como JQ1 y sorafenib [180], así como a radioterapia [181].

La evidencia creciente refleja que las proteínas S100 participan en la regulación de la respuesta de las células tumorales a la terapia, sugiriendo su papel como dianas con potencial terapéutico [171]. De este modo, la modulación farmacológica de los miembros de la familia S100, en combinación con la quimioterapia y la terapia dirigida en un determinado tipo tumoral pueden proporcionar una estrategia prometedora para revertir la resistencia a múltiples fármacos. Además de su posible potencial como dianas terapéuticas, la literatura también sugiere su potencial como biomarcadores predictivos de respuesta a terapia [171]. No obstante, se necesitan más estudios preclínicos y clínicos para identificar y confirmar las aplicaciones clínicas de las proteínas S100 en el tratamiento de tumores resistentes.

4.3. Receptor AGER

El receptor para productos finales de glicación avanzada (AGER) es el principal receptor identificado para las proteínas de la familia S100, incluyendo la proteína S100-A11. Además de productos finales de glicación avanzada (AGEs), AGER interactúa con otros ligandos, incluyendo las proteínas de la familia S100, fibrillas de lámina β , y la proteína de caja 1 del grupo de alta movilidad (HMGB1) [182]. Participa en respuestas de daño y estrés celular, de inmunidad innata y en programas de inflamación crónica, por lo que está involucrado en el desarrollo de diversos estados patológicos, tales como diabetes, enfermedades cardiovasculares, enfermedades inflamatorias producidas por patógenos, enfermedades neurodegenerativas (como la enfermedad de Alzheimer) y cáncer [183,184].

AGER es un receptor de superficie celular que pertenece a la superfamilia de las Ig. Se trata de una proteína transmembrana de aproximadamente 45 kDa [182], con una región extracelular formada por tres dominios Ig (V, C1 y C2), en la que el tándem V y C1 forman una unidad integral (VC1) independiente de C2 [185]. A esta región le sigue un único tramo transmembrana y un dominio citoplasmático, que transduce la señal intracelular [186]. Aunque el mecanismo de activación del receptor no se conoce en detalle, uno de los modelos propuestos sugiere que su estado basal (habitualmente formando homodímeros) transiciona a un estado de oligomerización tras la unión del ligando [187]. La evidencia describe la activación de múltiples vías de señalización tras la unión de ligandos a AGER [188], como MAPK (incluyendo ERK, p38 y JNK), la vía de PI3K/AKT, y vías que involucran GTPasas como Rac1 o Cdc42. Además, la señalización de AGER conduce a la activación de factores de transcripción, destacando las proteínas STAT3, NF- κ B y AP-1 [188,189].

El gen que codifica para AGER se localiza en la región 3 del complejo mayor de histocompatibilidad, situada en el cromosoma 6, y presenta una alta homología entre las distintas especies de mamíferos [190]. Aunque en humanos se han identificado distintas variantes de *splicing* e isoformas del receptor, la proteína canónica es la forma predominante tanto *in vitro* como *in vivo* [191]. Mientras que su expresión es elevada en el sistema nervioso central durante su desarrollo, en adultos se expresa en niveles bajos en la mayoría de órganos, exceptuando el pulmón, donde abunda su expresión [192].

4.3.1. Papel de AGER y señalización intracelular en cáncer

La creciente evidencia indica la implicación de AGER en la progresión y el desarrollo tumoral [188]. La activación del receptor sostiene un estado inflamatorio y la formación de un microambiente tumoral protumorigénico, favoreciendo la proliferación y supervivencia de las células tumorales [193]. La interacción de AGER con las proteínas de la familia S100 activa distintos mecanismos de señalización intracelular específicos, en función de la naturaleza de la proteína y de su unión al receptor, así como de las proteínas adaptadoras reclutadas y del tipo celular [192]. En cáncer, su interacción con proteínas S100 desencadena principalmente la activación de las vías JAK/STAT3, PI3K/AKT/mTOR y MAPK/ERK [194]. La contribución de S100-A11 en la activación de STAT3 vía AGER ha sido descrito en la progresión tumoral en mesotelioma pleural maligno (MPM) [195]. Además, la activación de STAT3 vía AGER por otras proteínas de la familia S100 han sido reportadas en varios tipos tumorales, como carcinoma hepatocelular [196]. Por otro lado, la activación de AGER por la unión de distintas proteínas S100, incluyendo S100-A11, también desencadena la señalización mediada por ERK en MPM y tumores colorrectales [195,197]. La activación de AKT mediada por proteínas S100 y AGER también ha sido sugerida en cáncer; por ejemplo, el papel del eje S100B/AGER/AKT en la regulación positiva del crecimiento tumoral ha sido indicado en modelos celulares de glioblastoma [198].

4.3.2. Relevancia clínica e inhibición farmacológica de AGER en cáncer

El incremento de la expresión de AGER y su asociación con un peor pronóstico se ha descrito en diversos tipos de cáncer, incluyendo cáncer gástrico y cáncer colorrectal [197,199,200]. Su sobreexpresión en tumores de mama ha sido constatada en diversos trabajos [199,201,202], siendo asociada la inducción de metástasis en el subtipo TN [203,204]. Recientemente, en estos tumores se ha sugerido la correlación entre la expresión de AGER con un peor pronóstico [205], señalando además su papel en la modulación del TME, asociado a la progresión y el desarrollo de la enfermedad [201,204].

Dado que la expresión del receptor y la señalización mediada por el mismo constituye un nodo relevante en el TME y en la progresión del cáncer, en la última década el papel de AGER como biomarcador y diana terapéutica ha emergido en el área del cáncer [201,204,206]. Entre los compuestos que han sido desarrollados para su bloqueo, azeliragon (TTP488, Pfizer) es una molécula pequeña que actúa como antagonista del receptor [207]. Aunque no se conoce con exactitud su mecanismo de acción específico, su unión a la porción extracelular del receptor bloquea la interacción con el ligando e impide la transducción de la señalización intracelular. En el contexto de la enfermedad de Alzheimer, los estudios preclínicos y en humanos han demostrado un perfil de seguridad elevado [208]. Recientemente, el tratamiento con azeliragon en un modelo de xenoinjerto murino de cáncer de mama TN ha demostrado un potente efecto antimetastásico [209]. Además, la evaluación de azeliragon y otros sintéticos análogos en modelos celulares de cáncer de mama TN han demostrado su efecto inhibitor de la proliferación y la viabilidad celular [210]. Actualmente, se está evaluando en un ensayo clínico de fase I la seguridad de azeliragon en combinación con la terapia concurrente basada en radioterapia y temozolomida, en pacientes diagnosticados con glioblastoma [211]. Otro ensayo clínico de fase II, actualmente en curso, está evaluando la eficacia de azeliragon en combinación con radioterapia en metástasis cerebral asociada a distintos tipos de cáncer [211].

Hipótesis y objetivos



A pesar de la eficacia clínica demostrada del tratamiento neoadyuvante basado en la combinación de anticuerpos anti-HER2 con taxanos en las pacientes con cáncer de mama precoz HER2+, un 40-60 % de los casos no consigue alcanzar la pCR, presentando enfermedad residual postratamiento. Estas pacientes tienen una mayor probabilidad de recaída al cabo de meses o años después de la cirugía, mayoritariamente en forma de metástasis a distancia. Por este motivo, es fundamental mejorar la eficacia del tratamiento en estadios tempranos, por lo que la identificación de las pacientes con menor respuesta a las terapias anti-HER2 y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que mejoren la tasa de pCR tras el tratamiento resulta primordial. La contribución del microambiente tumoral en múltiples aspectos condicionantes del comportamiento tumoral y de su respuesta a la terapia ha sido ampliamente constatada en la literatura. Particularmente, el secretoma de los CAF tiene un papel clave en la biología del tumor y en la adquisición de resistencia a terapias en cáncer de mama, por lo que la modulación terapéutica de los CAF presenta una potencial utilidad clínica en el tratamiento de tumores resistentes.

Nuestra hipótesis es que la modulación farmacológica del microambiente, particularmente de los CAF, constituye una estrategia terapéutica que permite mejorar la eficacia de la terapia anti-HER2 en el cáncer de mama precoz HER2+, incrementando la tasa de pCR de los tumores de mama HER2+ en estadio precoz tratados en neoadyuvancia con terapia anti-HER2.

En este proyecto, se plantearon los siguientes objetivos globales:

1. Determinar el papel del secretoma de los CAF en la resistencia a la terapia basada en la combinación de trastuzumab y pertuzumab con quimioterapia en el cáncer de mama HER2+.
2. Definir una estrategia terapéutica basada en la modulación del microambiente tumoral, particularmente de factores identificados en el secretoma de los CAF, que permita revertir la resistencia del tumor y mejorar la eficacia de la terapia anti-HER2.

A partir de los objetivos globales anteriormente expuestos, se establecieron los siguientes subobjetivos:

1. Caracterización *in vitro* del efecto del secretoma de los CAF en la respuesta al tratamiento con trastuzumab más pertuzumab más docetaxel en cáncer de mama HER2+.

2. Identificación mediante análisis proteómico de proteínas en el secretoma de los CAF relacionadas con la generación de resistencia a la terapia con trastuzumab más pertuzumab más docetaxel.
3. Caracterización celular y molecular, y validación funcional *in vitro* de las proteínas del secretoma de los CAF relacionadas con la generación de resistencia a la terapia con trastuzumab más pertuzumab más docetaxel.
4. Demostración clínica del papel de las proteínas del secretoma de los CAF relacionadas con la generación de resistencia a las terapias anti-HER2 en pacientes con cáncer de mama precoz HER2+.

Materiales y métodos



1. Cultivos celulares y reactivos

1.1. Líneas celulares

Para la realización de los experimentos *in vitro* de este trabajo se emplearon tres líneas celulares: dos líneas celulares de carcinoma de mama HER2+, BT-474 y EFM-192A, y una línea celular de fibroblastos asociados a cáncer, CAF-200.

La línea celular BT-474 (HTB-20) (ER+, PR+, HER2+), originaria de un carcinoma ductal invasivo de mama de estadio precoz, fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC). Se cultivó en medio de cultivo DMEM/F-12 (Sigma-Aldrich), suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS, *fetal bovine serum*) termoinactivado (Gibco), 2 mmol/L de L-glutamina (GlutaMAX, Gibco), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Gibco).

La línea celular EFM-192A (ACC-258) (ER+, PR+, HER2+), establecida a partir del derrame pleural de un adenocarcinoma de mama metastásico, fue obtenida de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH (DSMZ). Se cultivó en medio RPMI 1640 (Gibco), suplementado con 20 % de FBS termoinactivado, 2 mmol/L de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina.

La línea de fibroblastos CAF-200 fue cedida amablemente por el laboratorio de la Dra. Paloma Bragado (IDIBAPS, Barcelona). El proceso de obtención de esta línea celular se encuentra detallado en Fernández-Nogueira et al, 2020 [136]. Brevemente, se realizó la digestión de piezas de tejido de carcinoma de mama HER2+ y se expandió el cultivo, a partir del cual se aislaron los fibroblastos mediante tripsinización diferencial. Posteriormente, los fibroblastos fueron inmortalizados y marcados mediante un vector retroviral pMIG (MSCV-IRES-GFP) que expresa el gen de la subunidad catalítica de la telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT) y de la proteína verde fluorescente (GFP, *green fluorescence protein*). Además, se realizó una caracterización mediante el análisis de la expresión de las proteínas α -SMA y FAP [136]. Esta línea celular se cultivó en medio DMEM-high glucose (Sigma Aldrich), suplementado con 10 % de FBS termoinactivado, 2 mmol/L de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina.

Todo el trabajo con cultivos celulares se realizó en cabinas de bioseguridad clase II. Las líneas celulares se cultivaron en monocapa adherente en frascos y se mantuvieron en un incubador de CO₂ a 37 °C y 5 % de CO₂. En todos los casos el medio de cultivo se renovó cada tres días y se realizaron pases antes de alcanzar el 80 % de confluencia en los cultivos. Tanto para los

subcultivos como para la siembra de experimentos, las células se disociaron mediante el uso de tripsina/EDTA 0,25 % (Gibco), se centrifugaron a 0,4 x g durante 2 min y posteriormente se resuspendieron en medio de cultivo. Los recuentos celulares para la siembra de los experimentos se realizaron mediante la tinción con azul de tripano (Biorad) y el equipo Automated Cell Counter TC20 (Biorad).

Rutinariamente, las líneas se examinaron mediante qPCR para detectar su posible contaminación por *Mycoplasma*. Además, para la autenticación de las líneas tumorales BT-474 y EFM-192A, se analizaron sus perfiles mutacionales. Ambos procedimientos se describieron previamente en nuestro grupo [212].

1.2. Reactivos

Los anticuerpos trastuzumab (Herceptin, Genentech Inc.) y pertuzumab (Perjeta, Genentech Inc.) fueron cedidos por el servicio de farmacia del Hospital Fundación Jiménez Díaz. Ambos anticuerpos, disueltos en solución de cloruro de sodio al 0,9 % a una concentración de 21 mg/ml y de 30 mg/ml, respectivamente, se alicuotaron y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Las concentraciones empleadas para el tratamiento con trastuzumab y pertuzumab fueron 15 µg/ml y 20 µg/ml, respectivamente. La selección de las concentraciones de trastuzumab y pertuzumab se realizó de acuerdo con la experiencia previa de nuestro grupo, basada en la literatura científica. Ambas concentraciones son equivalentes a las detectadas en plasma en las pacientes tratadas con estos fármacos en ensayos clínicos [213,214], y en modelos preclínicos [215,216].

Docetaxel y stattic fueron adquiridos en Selleckchem, y azeliragon (TTP488) en MedChemExpress. Los tres compuestos fueron adquiridos como stocks diluidos en dimetilsulfóxido (DMSO) con una concentración de 10 mM. La concentración de trabajo de estos tratamientos se seleccionó en función de las curvas de proliferación o curvas dosis-respuesta obtenidas tras la exposición de las líneas tumorales a concentraciones crecientes de cada agente. A partir de las curvas dosis-respuesta se realizó un análisis de regresión no lineal y ajuste a un modelo de cuatro parámetros con el software GraphPad Prism 8.0.1 y se calculó el valor de IC50 (concentración de fármaco necesaria para inhibir la respuesta al 50 % de su valor máximo). A continuación, se determinaron los valores correspondientes de IC20 o IC10, según el ensayo. En el caso del tratamiento con docetaxel de la línea CAF-200 se empleó la concentración de trabajo determinada para la línea tumoral BT-474.

Las proteínas recombinantes humanas de CCL2, HSP90- α y S100-A11 se obtuvieron de Bio-Techne R&D Systems. Las proteínas 14-3-3 ζ y PAI-1 recombinantes se adquirieron en Origene, y HMGB1 en Novus Biologicals. Las proteínas recombinantes de CCL2, S100-A11, PAI-1 y HMGB1 se reconstituyeron a una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril con 0,1 % de albúmina sérica bovina (BSA). Las proteínas recombinantes de HSP90- α y 14-3-3 ζ se adquirieron en concentración stock de 2,6 mg/ml. Todas las proteínas recombinantes se alicuotaron y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

2. Ensayos celulares

2.1. Obtención de medio condicionado de CAF-200

El medio condicionado es un medio de cultivo que ha sido empleado para crecer células y del que, por tanto, se ha consumido una fracción de sus nutrientes, al tiempo que se ha enriquecido con las secreciones de dichas células. Para la obtención de medio condicionado de fibroblastos CAF-200 se sembraron los fibroblastos en frascos de 175 cm^2 a una confluencia del 50 %. Tras 24 h de incubación para permitir la adherencia de las células, se trataron las células con la combinación de trastuzumab (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$), pertuzumab (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y docetaxel (0,5 nM) durante 72 h. Se recogió el medio de cultivo, se centrifugó a $0,4 \times g$ durante 2 min, se filtró mediante un filtro con tamaño de poro de 0,22 μm (Millex[®]-GP, Merck Millipore), se alicuotó y finalmente se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. En el momento de emplearlo en los ensayos, este medio condicionado se diluyó en medio completo (2:1), DMEM/F-12 o RPMI, en función de la línea celular.

2.2. Ensayos de proliferación celular

Los ensayos de proliferación en las líneas celulares se realizaron en placas tratadas de 6 pocillos, con un volumen total de 2 ml por pocillo, llevando a cabo todas las condiciones experimentales por duplicado. Se sembraron las líneas BT-474 ($3,5 \times 10^5$ células por pocillo), EFM-192A ($2,5 \times 10^5$ células por pocillo) y CAF-200 (entre $1,5 \times 10^5$ y 2×10^5 células por pocillo, según la duración del ensayo) y, tras 24 h de incubación a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, se cambió el medio de todos los pocillos y se añadieron los tratamientos correspondientes. En los ensayos a 5 días el medio de cultivo y los tratamientos se reemplazaron tras 72 h, a excepción del docetaxel, que no se volvió a añadir debido a su alta citotoxicidad. Finalizado el tratamiento, se realizó el recuento de células tiñéndolas con azul de tripano (Biorad) y contándolas con el equipo Automated Cell Counter TC20 (Biorad). Se realizaron dos recuentos de cada pocillo y se tomó el promedio.

En el caso de los tratamientos con docetaxel, stattic, azeliragon, o proteínas recombinantes, los stocks fueron diluidos en medio de cultivo o PBS. Para los reactivos que requerían preparación en DMSO como vehículo (docetaxel, stattic y azeliragon), también se añadió este disolvente en todos los pocillos con el fin de igualar su concentración y evitar sesgos sobre el crecimiento celular.

2.3. Ensayos de formación de esferoides

Los ensayos para valorar la capacidad de formación de esferoides de las líneas tumorales se llevaron a cabo en placas de 6 pocillos con superficie de adherencia ultrabaja (Corning). Se sembraron 1×10^4 células de la línea BT-474 y 5×10^3 células de EFM-192A, en medio de cultivo o en medio condicionado, con o sin el tratamiento con trastuzumab, pertuzumab y docetaxel, según correspondiera. Tras 5 días de incubación a 37 °C, se realizó la observación y el recuento de esferoides mediante un microscopio invertido Leica DMI3000 B, y se tomaron imágenes representativas (5x) mediante una cámara Leica FLEXACAM C1 acoplada (Leica Microsystems).

2.4. Ensayos de migración celular

Los ensayos de migración se realizaron en placas *transwell* de 24 pocillos con insertos de membrana de policarbonato permeable, con un poro de 8 μm de diámetro (Corning). Las líneas celulares se mantuvieron en medio de cultivo libre de FBS durante las 24 h previas a la siembra. En cada inserto se sembraron 2×10^3 células de BT-474, 1×10^3 células de EFM-192A, o 2×10^3 células de CAF-200, en 150 μl del medio de cultivo correspondiente libre de FBS, con o sin el tratamiento con trastuzumab, pertuzumab y docetaxel. En la cámara inferior del pocillo se añadieron 500 μl del correspondiente medio completo. Tras 24 h de incubación a 37 °C, se retiró el medio de cultivo y se lavó con PBS la cámara superior del pocillo, y con ayuda de un bastoncillo de algodón se retiraron cuidadosamente las células de la parte superior del inserto. Posteriormente, las células que habían migrado a la parte inferior de la membrana se tiñeron con cristal violeta al 1 % en etanol durante 10 min, se eliminó el exceso de tinción con PBS y se secaron los insertos a temperatura ambiente. Las células se contaron en un microscopio invertido Leica DMI3000 B, valorando 10 campos aleatorios (20x) para cada inserto, y se tomaron imágenes representativas (5x y 10x) mediante una cámara Leica FLEXACAM C1 acoplada (Leica Microsystems).

3. Ensayos moleculares

3.1. Silenciamiento génico

Para silenciar transitoriamente el gen *S100A11* en la línea CAF-200 se utilizó un ARNsi prediseñado (Silencer Select siRNA *S100A11* human, de Thermo Fisher Scientific, s12431) y un ARNsi control (Silencer Negative Control nº.1, de Thermo Fisher Scientific, AM4635). Como agente de transfección se utilizó lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific). Se sembraron 2×10^5 células por pocillo en placas de 6 pocillos y transcurridas 24 h se sustituyó el medio de cultivo por medio sin antibióticos con un 13 % de FBS. A continuación, las células se transfectaron con 50 nM de ARNsi y 5 μ g de lipofectamina, diluidos en Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Gibco). Tras 72 h, se paró la transfección retirando el medio de los pocillos y realizando un lavado con PBS. Posteriormente se tripsinizaron las células, se centrifugaron y se separó una fracción del pellet para la extracción de ARN. El resto de células del pellet se sembraron de nuevo para su crecimiento en frascos y, transcurridos un total de 10 días tras el silenciamiento, en el momento de la recolección del medio condicionado, se realizó de nuevo su tripsinización, centrifugación y posterior extracción de ARN para repetir la determinación del nivel de expresión génica de *S100A11*.

3.2. Extracción de ARN

Para la purificación de ARN a partir de cultivos celulares se utilizó el kit RNeasy (QIAGEN), basado en un sistema de columnas con membranas de sílica que permiten la unión selectiva del ácido nucleico. La extracción se realizó a partir de $1-2 \times 10^6$ células en cultivo, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se inició el proceso añadiendo 350 μ l de tampón RLT por pocillo, suplementado con un 1 % de β -mercaptoetanol. Con un rascador se completó la lisis celular y el levantamiento de las células, y a continuación se recolectó el lisado y se añadieron 350 μ l de etanol 70 %. Las muestras se transfirieron a columnas RNeasy Mini Spin y tras su centrifugación a 8000 x g se realizó un lavado con tampón RW1. Se incluyó una etapa de digestión con ADNasas durante 30 min a 25 °C. Tras sucesivos lavados con los tampones RW1 y RPE, se centrifugaron las columnas durante 1 min a 16000 x g para completar el secado de la membrana. Finalmente, se añadió en las columnas agua libre de ARNasas atemperada a 56 °C y mediante su centrifugación durante 1 min a 16000 x g se eluyeron los ARN. La concentración se determinó en NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific), procurando valores de $A_{260}/A_{280} \geq 2$ y de $A_{260}/A_{230} \geq 1,8$. Las muestras extraídas se almacenaron a -80 °C.

3.3. Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Para realizar la retrotranscripción de los ARN extraídos a ADNc se empleó el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Para cada muestra se prepararon 1000 ng de ADNc en un volumen de 20 μ l. La síntesis de ADNc se llevó a cabo en un termociclador Veriti de 96 pocillos (Applied Biosystems), realizando un paso de hibridación durante 10 min a 25 °C, un paso de retrotranscripción a 37 °C durante 120 min y una etapa de inactivación enzimática durante 5 min a 85 °C. Finalmente, las muestras de ADNc se almacenaron a -20 °C.

3.4. PCR cuantitativa (qPCR)

La cuantificación del gen *S100A11* mediante qPCR se llevó a cabo amplificando 50 ng de ADNc, mediante un sistema de sondas Taqman prediseñadas específicas para *S100A11* (Hs01055944_g1) y *GAPDH* (Hs02758991_g1) (Applied Biosystems). La reacción se llevó a cabo en la plataforma 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), con condiciones idénticas para todas las amplificaciones: 1) etapa de 10 min a 95 °C; 2) 40 ciclos, compuestos por dos pasos: desnaturalización de 15 s a 95 °C seguida de hibridación y extensión durante 1 min a 60 °C. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y los valores de umbral de ciclos (Ct, *cycle threshold*) se adquirieron con el software 7500 Fast Real-Time PCR System v1.5.1 (Applied Biosystems). La expresión relativa del gen *S100A11* se calculó de acuerdo con el método delta-delta Ct [217], empleando como referencia los niveles de expresión del gen *GAPDH*.

3.5. Extracción de proteína

La extracción de proteína a partir de cultivos celulares se llevó a cabo a partir de 1×10^6 células por pocillo, cultivadas en placas de 6 pocillos. Se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS y, manteniendo la placa en frío, se añadieron a cada pocillo 150 μ l de tampón de lisis RIPA (Tris-HCL 25 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 0,5mM pH 8.0, NP-40 1 %), suplementado con inhibidores de fosfatasa PhosSTOP Easy Pack (Roche) e inhibidores de proteasas Complete ULTRA Tablets mini (Roche). Tras una incubación de 10 min a 4 °C, se completó la lisis celular con un rascador y se recogieron los lisados en tubos de microcentrífuga que, a continuación, se sonicaron con un procesador de ultrasonidos UP50H (Hielscher Ultrasonics). Las muestras se centrifugaron durante 10 min a 13000 x g y a 4 °C, y los sobrenadantes se transfirieron a nuevos tubos y se almacenaron a -20 °C. Todo el proceso se realizó en hielo y en un tiempo inferior a 35 min, para asegurar la integridad de las formas fosforiladas en los extractos. La cuantificación de proteína se realizó mediante el método colorimétrico del ácido bicinónico o BCA [218], utilizando el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific). La cuantificación se realizó

en placas de 96 pocillos, por duplicado, con dos diluciones de cada muestra y una recta patrón de BSA, midiendo la absorbancia a 562 nm en un lector de microplacas Sunrise (TECAN).

3.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) e inmunotransferencia (*Western-blot*)

Las muestras de proteína se prepararon en tampón de carga 4x Laemmli (Bio-Rad) y se calentaron a 95 °C durante 10 min. A continuación, se cargaron 20 µg de proteína para cada muestra en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 10 % y se sometieron a un campo eléctrico constante de 140 V durante 90 min en tampón Tris/Glicina/SDS pH 8,3 (Bio-Rad). Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante electrotransferencia, utilizando el sistema miniprotean II (Bio-Rad) con un voltaje constante de 130 V durante 90 min, en frío y en condiciones húmedas, en tampón Tris/Glicina pH 8,3 con 20 % de metanol. Las membranas fueron incubadas con una solución de bloqueo de 5 % de BSA o leche, diluido en PBS, durante 1 h a temperatura ambiente y bajo agitación. A continuación, las membranas se incubaron durante 16 h a 4 °C, con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 1) diluido en PBS al 2,5 % de BSA o leche. Se repitieron los lavados de las membranas y se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con enzima peroxidasa de rábano (HRP), de cabra anti-IgG de conejo o de cabra anti-IgG de ratón (Thermo Fisher Scientific), en función del anticuerpo primario. Los anticuerpos secundarios se diluyeron (1:5000) en una solución de PBS al 2,5 % de BSA o leche y se incubaron durante 1 h bajo agitación a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se eliminó el exceso de anticuerpo mediante el lavado de las membranas y se incubaron durante 2 min con el sustrato Immobilon Crescendo Western HRP (Millipore). Las señales se visualizaron mediante el equipo Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences) y con el software ImageJ se realizó la densitometría de las bandas para la valoración semicuantitativa de las proteínas analizadas [219].

Anticuerpo	Especie	Casa comercial	Referencia	Dilución
AKT	Conejo	Cell Signaling	#4685	1:1000
Fibronectina	Conejo	Abcam	#ab2413	1:1000
p44/42 MAPK (ERK1/2)	Conejo	Cell Signaling	#4695	1:1000
P-AKT (Ser473)	Conejo	Cell Signaling	#4060	1:1000
P-AKT (Thr308)	Conejo	Cell Signaling	#4056	1:1000
P-p44/42 MAPK (ERK1/2)	Conejo	Cell Signaling	#4370	1:1000
P-STAT3 (Tyr705)	Conejo	Cell Signaling	#9145	1:1000
Snail	Conejo	Cell Signaling	#3879	1:500
STAT3	Conejo	Cell Signaling	#30835	1:1000
α -SMA	Conejo	Cell Signaling	#19245	1:1000
β -actina	Ratón	Sigma-Aldrich	#A5441	1:5000

Tabla 1. Listado de anticuerpos primarios monoclonales utilizados para la inmunodetección por western blot.

3.7. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)

La detección de S100-A11 en el medio condicionado de los fibroblastos CAF-200 se realizó mediante ELISA. Para ello se empleó el kit RayBio Human S100A11 ELISA (RayBiotech), basado en un sistema de ELISA de tipo sándwich colorimétrico. Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, la placa de 96 pocillos se incubó bajo agitación con 100 μ l de cada muestra por pocillo, por duplicado. A continuación, los pocillos se incubaron con 100 μ l del anticuerpo de detección biotilado, posteriormente con solución de estreptavidina-HRP y, finalmente, con el sustrato TMB en oscuridad. La reacción se detuvo con la adición de la solución de parada del kit y la concentración de S100-A11 en cada muestra se determinó midiendo la absorbancia a 450 nm e interpolando los registros en una curva estándar.

3.8. Análisis de expresión de proteínas por IHQ

La expresión de proteínas por IHQ se determinó en secciones de 2 μ m fijadas en formol y embebidas en parafina (FFPE, *formalin-fixed paraffin-embedded*) colocadas en portaobjetos tratados FLEX IHC Microscope Slides (Dako, Agilent Technologies). Tras estufar los portaobjetos durante 1 h a 56 °C, se realizó la desparafinización y la recuperación antigénica de las muestras mediante la solución EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH en el equipo PT Link (Dako,

Agilent Technologies), con una rampa de temperatura hasta alcanzar los 95 °C durante 20 min. Tras el lavado con tampón EnVision FLEX Wash Buffer se realizó una etapa de bloqueo de 30 min con la solución Protein Block Serum-Free (Dako, Agilent Technologies). La inmunotinción se realizó en el equipo AutoStainer Link 48, empleando el kit Dako EnVision+ Dual Link System-HRP (DAB+) (Dako, Agilent Technologies). Tras la inactivación de la actividad de la peroxidasa endógena con la solución EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, se realizó la incubación durante 20 min con el anticuerpo primario diluido en EnVision FLEX Antibody Diluent (Tabla 2).

Anticuerpo	Especie	Casa comercial	Referencia	Dilución
S100-A11	Conejo	Abcam	Ab180593	1:10000
P-STAT3 (Tyr705)	Conejo	Cell Signaling	#9145	1:200

Tabla 2. Anticuerpos primarios monoclonales empleados para la técnica de IHQ.

La detección y visualización de la reacción antígeno-anticuerpo se realizó mediante la incubación con la solución EnVision FLEX/HRP durante 20 min y posteriormente con el cromógeno EnVision FLEX DAB+ durante 10 min, aplicando finalmente una contratinción con hematoxilina EnVision FLEX Hematoxylin durante 5 min. Las secciones teñidas fueron cubiertas en el montador automático CoverStainer (Dako, Agilent Technologies). Como controles positivos se utilizaron muestras FFPE con expresión conocida de las proteínas analizadas (secciones de adenocarcinoma de colon para S100-A11 y de amígdala para p-STAT3), y como controles negativos se emplearon secciones incubadas con anticuerpo secundario sin anticuerpo primario.

Las tinciones fueron valoradas por un patólogo especializado en patología mamaria. Dado que hasta el momento no existen criterios definidos para la valoración de la expresión de S100-A11 y de p-STAT3, se estableció un algoritmo basado en la determinación del porcentaje de células con expresión de la molécula analizada, y de la intensidad de la tinción, categorizándola en baja (1), media (2) o alta (3). Se valoró la tinción de S100-A11 y de p-STAT3 en las muestras tumorales, calculando para cada caso una puntuación semicuantitativa o *Histo-score* (*H-score*), comprendida en un rango de 0 a 300, siguiendo la fórmula: $H\text{-score} = (\% \text{ intensidad baja}) \times 1 + (\% \text{ intensidad media}) \times 2 + (\% \text{ intensidad alta}) \times 3$.

4. Ensayo de proteómica basado en espectrometría de masas

4.1. Preparación de las muestras

Inicialmente se prepararon, en triplicado, muestras de medio condicionado de fibroblastos CAF-200 sin y con el tratamiento con trastuzumab, pertuzumab y docetaxel, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (apartado 2.1. de esta sección). Se añadió una etapa de privación de FBS durante 24 h y se recogieron las muestras de medio condicionado. Tras la centrifugación y filtración de los sobrenadantes con un filtro de 0,22 μm , se concentraron 20 ml de cada muestra mediante concentradores de centrifuga Vivaspin 20 Centrifugal Concentrators 10K (Sartorius) e inmediatamente se entregaron en frío en la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid (España).

Los extractos proteicos se resuspendieron en urea 8 M y, de acuerdo a su cuantificación por Bradford [220], se tomaron 200 μg de cada extracto y se redujeron con DTT 25 mM durante 30 min a 56 °C. Las muestras se alquilaron con iodoacetamida 50 mM durante 20 min en oscuridad y se digirieron enzimáticamente con 1/50 (p/p) de tripsina recombinante (Roche Molecular Biochemicals) en bicarbonato amónico 50 mM (pH 8,5) durante 16 h a 37 °C. Los péptidos se recogieron y se lavaron en Bicarbonato amónico 50 mM, se acidificaron y se secaron por centrifugación a vacío (SpeedVac Savant). Finalmente, las muestras se reconstituyeron en tampón de carga (2 % acetonitrilo, 0,1 % ácido fórmico), se cuantificaron en el fluorímetro Qubit (Thermo Fisher Scientific) y posteriormente se conservaron a -20 °C hasta su análisis.

4.2. Espectrometría de masas (LC-MS/MS) *label-free*

El análisis del contenido en péptidos se realizó a partir de 2 μg de cada extracto mediante nano-cromatografía líquida EASY-nLC 1000 acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución Q-Exactive HF (Thermo Fisher Scientific). Los péptidos fueron concentrados *on-line* por cromatografía de fase reversa utilizando una precolumna Acclaim PepMAP 10 y separados en una columna analítica de fase reversa C18 Picofrit (Thermo Fisher Scientific) con punta integrada para spray, operando a un flujo de 250 nl/min. Los datos MS/MS se recogieron en modo de adquisición dependiente de información (DDA).

4.3. Identificación y cuantificación de proteínas

Los espectros MS/MS adquiridos se analizaron utilizando el motor de búsqueda MASCOT v2.6 a través del software Proteome Discoverer 2.2 (Thermo Fisher Scientific). Las identificaciones se realizaron mediante búsquedas sobre la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot versión 2019_05

(<https://www.uniprot.org>, consultada el 1 de junio de 2019), con restricción taxonómica a *Homo Sapiens* (20416 secuencias). Para determinar la abundancia de los péptidos y proteínas identificados, se realizó un experimento *label-free* basado en la intensidad de la señal del péptido precursor. El análisis diferencial de las abundancias de las proteínas entre las distintas condiciones se determinó mediante un ensayo de ANOVA implementado en Proteome Discoverer. Aquellas proteínas identificadas con $-1,2 \geq \text{LogFC} \geq 1,2$, coeficiente de variación entre réplicas $< 30\%$, q -valor $< 0,05$ y alta confianza (FDR $< 1\%$) se consideraron diferencialmente expresadas entre los dos grupos [221]. Los datos de espectrometría de masas de este trabajo fueron depositados en el ProteomeXchange Consortium, a través del repositorio PRIDE, con el identificador PXD025556.

4.4. Análisis bioinformático

Para apoyar la interpretación de los datos proteómicos se utilizó la herramienta de análisis de sobrerrepresentación de rutas Reactome v.84 [222], utilizando el método de análisis PADOG. Para el análisis de interacciones proteína-proteína (PPI) se recurrió a la herramienta STRING (v11.5) [223], que proporciona datos de interacción física y funcional, utilizando un nivel de confianza $> 0,4$.

5. Muestras de pacientes de cáncer de mama HER2+

Se realizó un análisis retrospectivo unicéntrico de 77 casos de cáncer de mama HER2+, con seguimiento medio de 4,58 años, cedidos por el Biobanco de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid, de acuerdo con la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre. El uso de las muestras de pacientes fue aprobado por Comité Ético de Investigación de la Fundación Jiménez Díaz (Madrid) (Anexo I–Formulario de aprobación del Comité Ético). En todos los casos se dispuso de muestras FFPE representativas del componente tumoral infiltrante y del componente estromal, procedentes de biopsias diagnósticas de casos de estadio precoz, previas al tratamiento neoadyuvante basado en la combinación de trastuzumab más pertuzumab más taxano. Se recogió la información clínico-patológica de todos los casos. El estadiaje de los casos se realizó según la clasificación TNM, de acuerdo con lo establecido por el AJCC [11] y el grado histológico se definió según la escala SBR modificada por Elston [9]. La expresión de ER, PR y HER2 se determinó mediante IHQ y la amplificación de HER2 se confirmó mediante FISH, siguiendo los criterios establecidos por la guía ASCO-CAP [40]. Para la valoración de la respuesta patológica en el tumor se empleó el sistema

de Miller y Payne (Tabla 3), modificado para la evaluación de la respuesta en los ganglios linfáticos (respuesta axilar) (Tabla 4) [224].

Grado	Descripción
G1	Mínimos cambios celulares, sin reducción significativa de la celularidad infiltrante
G2	Reducción discreta de la celularidad tumoral infiltrante, de menos del 30 % de la masa tumoral
G3	Reducción marcada de la celularidad tumoral infiltrante, de entre el 30 % y el 90 % de la masa tumoral
G4	Disminución de más del 90 % de la masa tumoral, con persistencia de focos microscópicos de carcinoma infiltrante
G5	Ausencia de células tumorales infiltrantes. Puede existir presencia de carcinoma <i>in situ</i>

Tabla 3. Grados de respuesta patológica tumoral según el sistema de clasificación de Miller y Payne.

Grado	Descripción
A	Ganglios linfáticos negativos, sin cambios post-terapia
B	Ganglios linfáticos positivos, sin cambios post-terapia
C	Ganglios linfáticos positivos, con evidencia de respuesta parcial a la terapia
D	Ganglios linfáticos negativos, con cambios post-terapia

Tabla 4. Grados de respuesta patológica axilar según el sistema de clasificación de Miller y Payne modificado.

En base a esta clasificación se obtienen tres grupos de respuesta: 1) respuesta patológica completa (pCR) cuando no existe evidencia de la enfermedad ni en mama ni en axila, correspondiente a grado de respuesta tumoral G5 y respuesta axilar A o D; 2) respuesta parcial, existiendo una respuesta completa en la mama y tumor residual en axila (G5-C), tumor residual en la mama (G2, G3 y G4) y respuesta completa en axila (D), o bien detección de tumor residual en mama (G2, G3 y G4) y en axila (B y C); 3) no respuesta patológica, cuando se detecta tumor residual en mama y axila, correspondiente (G1-B).

6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los experimentos *in vitro* se realizó con el software GraphPad Prism 8.0.1. Para comparar las diferentes condiciones experimentales se empleó la prueba t de *Student* para muestras pareadas. Los resultados se presentan como el promedio y la desviación estándar

de tres réplicas experimentales independientes ($n=3$), a menos que se indique otro número de réplicas en la correspondiente figura.

El estudio estadístico de las muestras de pacientes se realizó con el software SPSS 25.0. La definición del punto de corte óptimo para la expresión de S100-A11 y de p-STAT3 determinada por IHQ se realizó mediante el análisis de la curva Característica Operativa del Receptor, conocida como curva ROC, basado en la identificación de la presencia de tumor residual postratamiento neoadyuvante. Para determinar la relación entre dos variables categóricas se empleó la prueba de Chi-cuadrado (χ^2). El grado de asociación entre S100-A11 y p-STAT3 como variables continuas con escala de medida numérica (*H-score*) se analizó mediante la prueba de correlación de rangos de Spearman (prueba no paramétrica Rho de Spearman). La correlación entre S100-A11 y p-STAT3 como variables discontinua y continua, respectivamente, se analizó calculando la prueba estadística no paramétrica U de Mann-Whitney.

Las curvas de supervivencia se estimaron mediante el método de Kaplan-Meier y las diferencias entre las tasas de supervivencia entre grupos se evaluaron calculando la prueba no paramétrica de Log-Rank. La SLE se evaluó desde la fecha de la cirugía hasta la fecha de la aparición de cualquier signo de recaída y la SG desde la fecha de la cirugía hasta la fecha de muerte por cualquier causa, o hasta la última fecha en la que la paciente fue evaluada en el centro médico. En este contexto, los datos de pacientes de las cuales no se tuvo la información completa sobre el tiempo de ocurrencia del evento se consideraron como datos censurados.

Todas las pruebas estadísticas empleadas fueron de 2 colas y las diferencias entre grupos se consideraron estadísticamente significativas con p -valor $< 0,05$ (*), p -valor $< 0,01$ (**) y p -valor $< 0,001$ (***)).

Resultados



1. Caracterización del efecto de CAF-200 en la respuesta a la terapia basada en trastuzumab más pertuzumab más docetaxel (TPD) en líneas celulares de cáncer de mama HER2+

Se caracterizó el papel de los fibroblastos CAF-200 en la adquisición de resistencia al tratamiento anti-HER2 en las células tumorales valorando el efecto del medio condicionado derivado de CAF-200 en líneas celulares de cáncer de mama HER2+, tratadas con la terapia basada en la combinación de trastuzumab más pertuzumab más docetaxel (TPD). Se estimó su papel en la generación de resistencia mediante ensayos de proliferación celular, así como en la adquisición de características relacionadas con la resistencia y la regulación de vías de señalización intracelular.

1.1. Determinación de la concentración de tratamiento de docetaxel en líneas HER2+

Docetaxel es un agente quimioterápico perteneciente a la familia de los taxanos, cuya actividad citotóxica se debe a la alteración de la dinámica de los microtúbulos, afectando así a las funciones del citoesqueleto y a la mitosis durante la división celular. Para establecer las condiciones de tratamiento se estudió la sensibilidad a docetaxel de las líneas tumorales BT-474 y EFM-192A, mediante su exposición durante 72 horas a concentraciones crecientes del mismo, seleccionadas de acuerdo con la literatura [225,226] y comprendidas en un rango entre 0,5 nM y 100 μ M.

Los resultados de proliferación celular mostraron que ambas líneas presentan sensibilidad al tratamiento con docetaxel. La línea BT-474 mostró una mayor sensibilidad respecto a la línea EFM-192A, especialmente a partir de concentraciones intermedias de tratamiento (Figura 5. A, B).

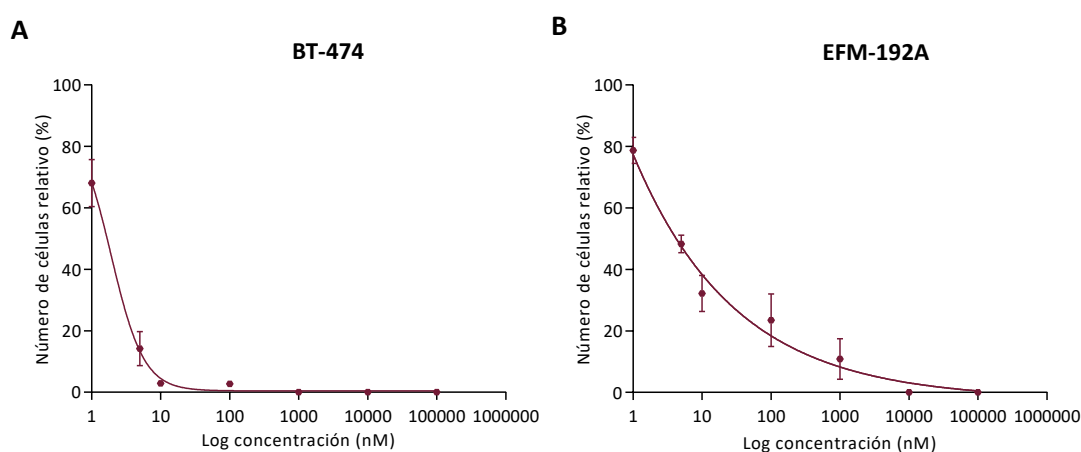


Figura 5. A, B. Efecto del tratamiento con docetaxel en concentraciones crecientes durante 72 horas en la proliferación celular de BT-474 y EFM-192A, respectivamente. Se ensayaron

concentraciones de docetaxel comprendidas en un rango de 0,5 nM a 100 μ M, representadas en escala logarítmica en el eje de abscisas. La línea continua representa la curva del modelo de ajuste no lineal. Las barras de error representan el valor calculado de la desviación estándar ($n=3$).

A partir de estos resultados se calculó el valor de IC50 de docetaxel para cada línea celular. De acuerdo con lo descrito en la literatura [225,226], el valor de IC50 para la línea BT-474 fue inferior al de la línea EFM-192A (1,9 nM y 4,6 nM, respectivamente). Para evaluar el efecto del CAF en la respuesta a la terapia anti-HER2 se decidió trabajar con una concentración de docetaxel inferior al valor de IC50. Se calculó el valor de IC20, siendo de 0,48 nM para BT-474 y de 1,2 nM para EFM-192A, por lo que se establecieron para los ensayos las concentraciones de 0,5 nM y 1 nM, respectivamente.

1.2. El medio condicionado de CAF-200 genera resistencia a la terapia TPD en líneas tumorales HER2+

Para examinar el papel del fibroblasto CAF-200 en la resistencia adquirida al tratamiento con TPD en las líneas tumorales de cáncer de mama HER2+, se realizaron ensayos de proliferación celular con las líneas BT-474 y EFM-192A. Se evaluó el efecto de la terapia TPD durante 5 días, en ausencia o en presencia de medio condicionado de la línea CAF-200 (Figura 6. A, B).

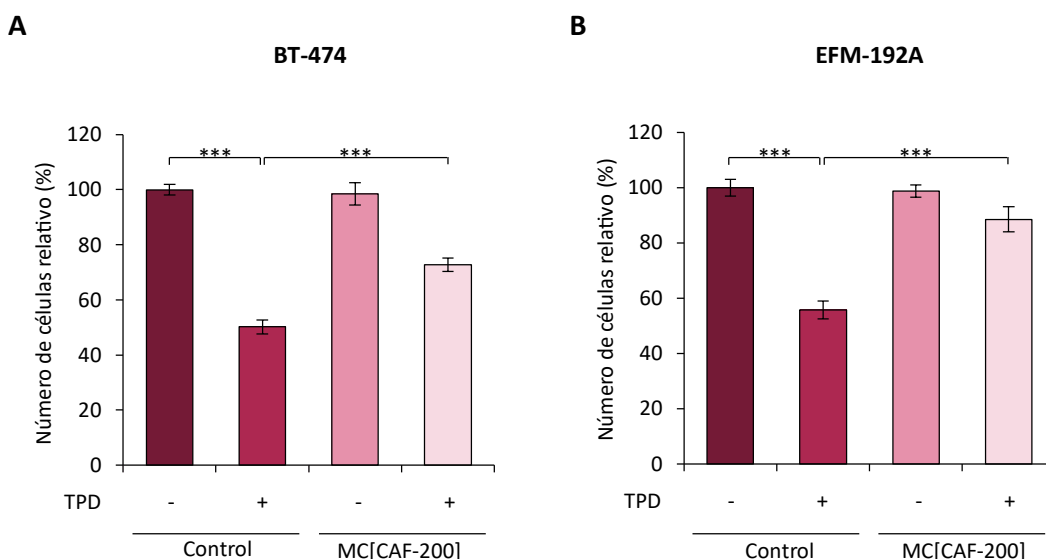


Figura 6. A, B. Efecto del medio condicionado de CAF-200 durante 5 días en la proliferación celular de BT-474 y EFM-192A, respectivamente, en ausencia y presencia de la terapia TPD (trastuzumab 15 μ g/ml; pertuzumab 20 μ g/ml; docetaxel 0,5 y 1 nM, respectivamente). MC[CAF-

200]: medio condicionado de CAF-200. (***) : p -valor $< 0,001$. Las barras de error representan el valor calculado de la desviación estándar ($n=6$).

Se observó inicialmente que el tratamiento con TPD producía una reducción en la proliferación en ambas líneas celulares (50,3 % vs 100,0 %, p -valor $< 0,001$, en BT-474; 55,8 % vs 100,0 %, p -valor $< 0,001$, en EFM-192A). Por otro lado, el medio condicionado por sí mismo no afectó a la proliferación de las líneas HER2+. Sin embargo, este medio derivado de los fibroblastos redujo el efecto antiproliferativo de la terapia, de manera que las células tumorales incrementaron de forma significativa la tasa de proliferación a pesar del tratamiento farmacológico (72,8 % vs 50,3 %, p -valor $< 0,001$, en BT-474; 88,5 % vs 55,8 %, p -valor $< 0,001$, en EFM-192A) cuando se incubaron con el secretoma de CAF-200 (Figura 6. A, B). Estos resultados sugieren que CAF-200 puede inducir resistencia a la terapia TPD, a través de factores solubles secretados al espacio extracelular.

1.3. El medio condicionado de CAF-200 induce resistencia al tratamiento con TPD en líneas tumorales HER2+ en un modelo de cultivo celular 3D

El cultivo de células en esferoides 3D constituye un modelo con unas condiciones estructurales que mimetizan el entorno tumoral *in vivo* de una manera más representativa, por lo que suponen una herramienta prometedora ampliamente utilizada en la investigación del cáncer. La generación de un gradiente en el suministro de oxígeno, nutrientes, factores de crecimiento y citocinas, así como la heterogeneidad en la difusión de los fármacos en el cultivo, otorgan a este modelo una mayor complejidad, justificando su relevancia en estudios de sensibilidad a terapia con células cancerosas [227].

Se estudió el efecto del medio condicionado de CAF-200 en la respuesta a la terapia TPD de las líneas tumorales BT-474 y EFM-192A cultivadas en un modelo de esferoides. Ambas líneas crecieron formando estructuras esféricas cuando se cultivaron en condiciones de independencia de anclaje (Figura 7. A-D). Aunque se distinguieron esferoides de distintos tamaños, para el recuento del número de esferoides únicamente se consideraron aquellos con diámetro igual o superior a 100 μm , en base a la literatura [228].

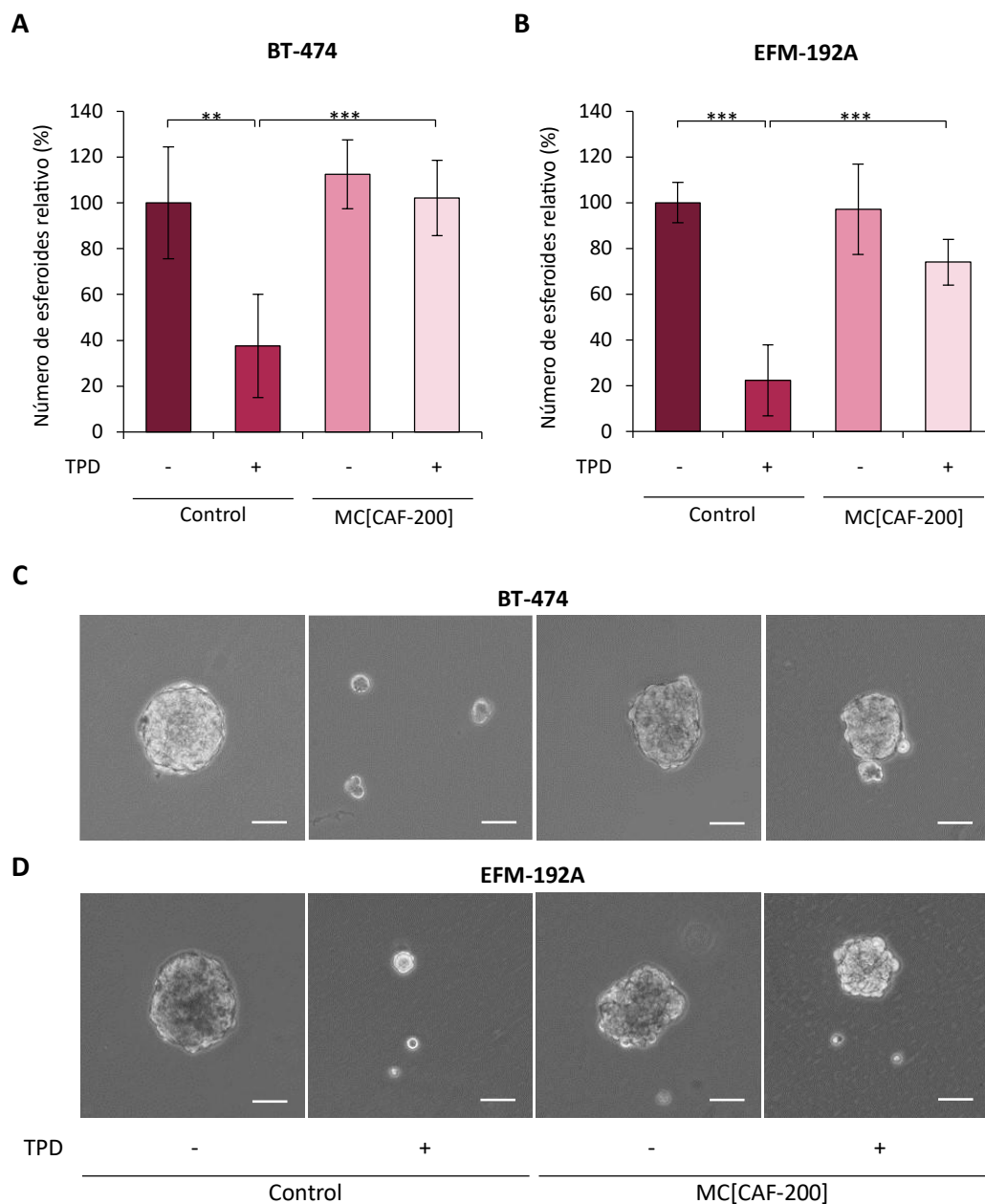


Figura 7. A, B. Efecto del medio condicionado de CAF-200 en la capacidad de formación de esferoides de BT-474 y EFM-192A, respectivamente, durante 5 días, en ausencia y presencia de la terapia TPD (trastuzumab 15 $\mu\text{g/ml}$; pertuzumab 20 $\mu\text{g/ml}$; docetaxel 0,5 y 1 nM, respectivamente). MC[CAF-200]: medio condicionado de CAF-200. (**): p -valor < 0,01; (***): p -valor < 0,001. Las barras de error representan el valor calculado de la desviación estándar ($n=4$). **C, D.** Imágenes representativas de los esferoides tumorales obtenidos con células BT-474 y EFM-192A, respectivamente, en las condiciones experimentales mencionadas (10x). Escala: 100 μm .

La terapia TPD causó un cambio marcado en la capacidad de formación de esferoides de las líneas tumorales, observándose una disminución en el número de esferoides respecto al control (37,5

% vs 100,0 %, p -valor < 0,01, en BT-474; 22,3 % vs 100,0 %, p -valor < 0,001, en EFM-192A) (Figura 7. A, B). En el cultivo con el medio condicionado, en ausencia de la terapia, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de esferoides en comparación con el cultivo en la condición control. No obstante, la disminución en la capacidad de formación de esferoides producida por la terapia fue aminorada en presencia del medio condicionado de los fibroblastos en las dos líneas tumorales (102,0 % vs 37,5 %, p -valor < 0,001, en BT-474; 74,0 % vs 22,3 %, p -valor < 0,001, en EFM-192A), indicando un papel protector del secretoma del fibroblasto CAF-200 frente a la terapia, relacionado con la inducción de un fenotipo resistente en un modelo de cultivo 3D.

1.4. La capacidad migratoria de las células tumorales HER2+ aumenta en presencia del medio condicionado del fibroblasto CAF-200

Dentro del estroma tumoral, los CAF se han descrito como uno de los principales contribuyentes a los procesos de invasión y metástasis tumoral, especialmente a través de la secreción de diversos factores que pueden estimular la migración de las células tumorales en distintos tipos tumorales, incluyendo los tumores de mama [110,229]. Se realizaron ensayos de migración en *transwell* con las líneas BT-474 y EFM-192A, evaluando el papel del medio condicionado de CAF-200 en la respuesta de ambas líneas al tratamiento con TPD durante 24 h (Figura 8. A-D).

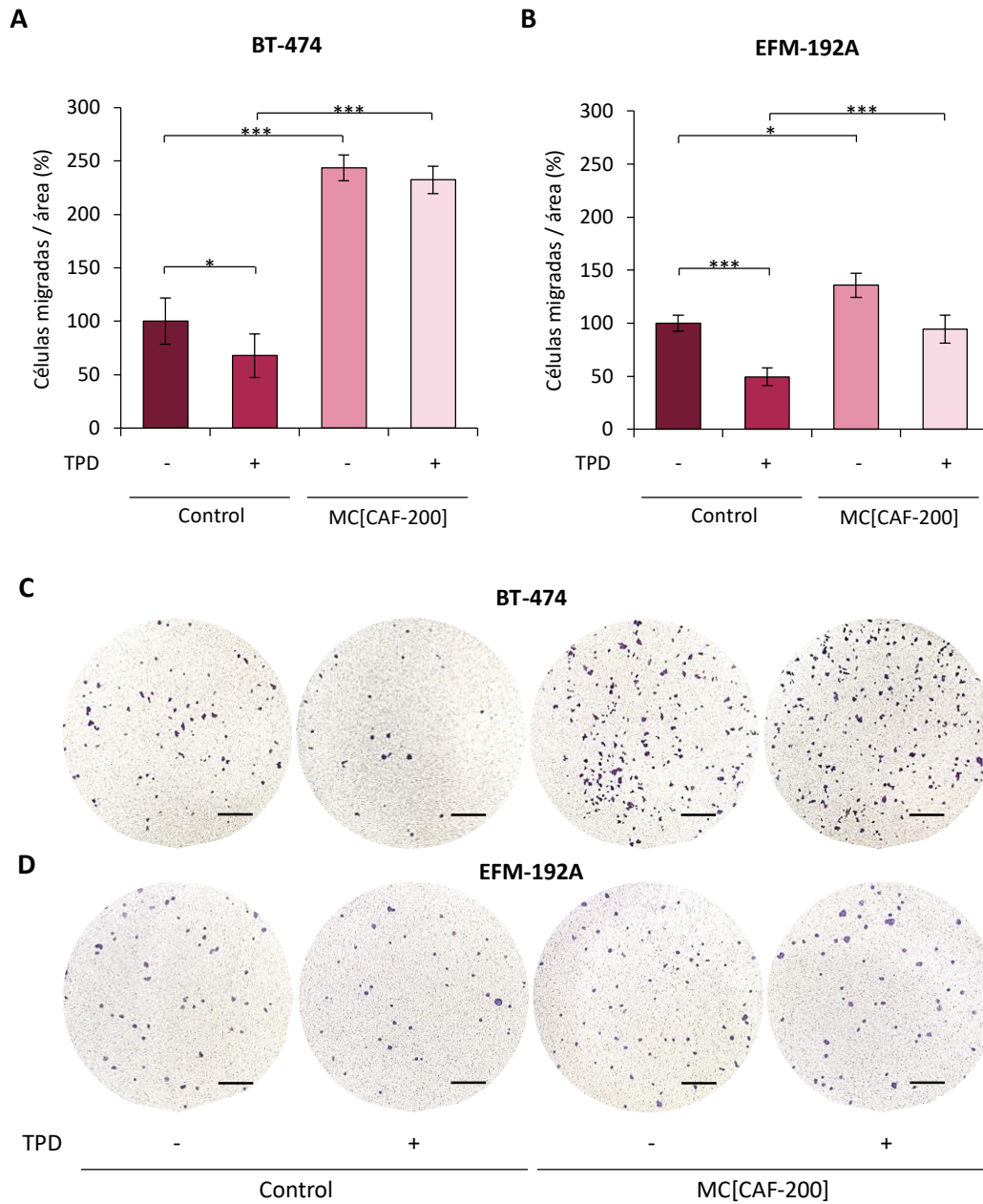


Figura 8. A, B. Efecto del medio condicionado de CAF-200 en la capacidad migratoria de BT-474 y EFM-192A, respectivamente, durante 24 horas, en ausencia y presencia de la terapia TPD (trastuzumab 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$; pertuzumab 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$; docetaxel 0,5 y 1 nM, respectivamente). MC[CAF-200]: medio condicionado de CAF-200. (*): p -valor < 0,05; (**): p -valor < 0,001. Las barras de error representan el valor calculado de la desviación estándar ($n=4$). **C, D.** Imágenes representativas de células migradas BT-474 y EFM-192A respectivamente, en las condiciones experimentales mencionadas (5x). Se realizó el recuento de diez campos aleatorios (20x). Escala: 100 μm .

En primer lugar, se observó una disminución en el porcentaje de células migradas tras el tratamiento farmacológico con TPD (67,7 % vs 100,0 %, p -valor < 0,05, en BT-474; 49,5 % vs 100,0 %, p -valor < 0,001, en EFM-192A) (Figura 8. A, B). Por otro lado, se observó un incremento significativo de la migración de las líneas cuando se incubaron con el medio condicionado de CAF-200 (243,6 % vs 100,0 %, p -valor < 0,001, en BT-484; 135,7 % vs 100,0 %, p -valor < 0,05, en EFM-192A). Cabe destacar que esta respuesta, producida por las señales contenidas en el secretoma de CAF-200, apenas varió bajo el tratamiento con TPD en el caso de la línea BT-474 (232,3 %, p -valor < 0,001) (Figura 8. A), y mantuvo una tasa de migración similar a la del control sin tratamiento, en el caso de EFM-192A (94,2 %, p -valor < 0,001) (Figura 8. B).

1.5. El medio condicionado de CAF-200 modifica la fosforilación de proteínas implicadas en las vías de señalización MAPK/ERK y JAK/STAT3 en líneas celulares HER2+ en respuesta a la terapia TPD

La adquisición de resistencia a trastuzumab inducida por los CAF ha sido previamente relacionada con alteraciones en las rutas de señalización MAPK/ERK, PI3K/AKT/mTOR y JAK/STAT3 [134,230]. No obstante, el efecto de los CAF en la respuesta de líneas celulares de cáncer de mama HER2+ a la terapia combinada con trastuzumab, pertuzumab y docetaxel, no ha sido descrito todavía.

Para valorar posibles diferencias en la activación de estas rutas en respuesta al tratamiento con TPD tras la adición del medio condicionado, se realizaron ensayos *western blot* para las proteínas p-STAT3 (Tyr705), STAT3, p-AKT (Ser473), p-AKT (Thr308), AKT, p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) y ERK1/2, empleando como control de carga la proteína β -actina (Figura 9. A, B).

Inicialmente destacó un incremento en los niveles de fosforilación de STAT3 tras la adición de medio condicionado de CAF-200 en las líneas BT-474 y EFM-192A (3,55 vs 1,00 en BT-474; 2,43 vs 1,00 en EFM-192A) (Figura 9. A, B). Además, el incremento en p-STAT3 producido por el medio condicionado se mantuvo aún en presencia de la adición de la terapia TPD (3,67 vs 3,55 en BT-474; 2,31 vs 2,43 en EFM-192A). Cabe mencionar que la alta intensidad de la señal producida en las condiciones experimentales con medio condicionado de CAF-200, no permitió evaluar el efecto de TPD en las células incubadas en condiciones control (Figura 9. A, B).

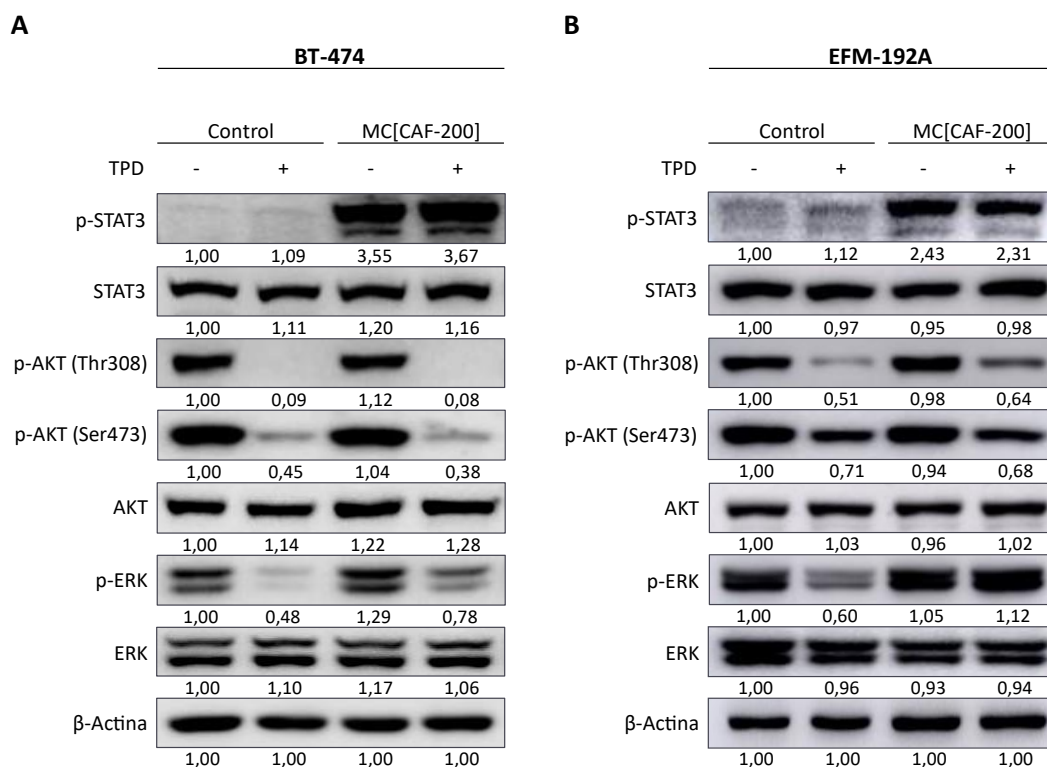


Figura 9. A, B. Análisis por western blot en BT-474 y EFM-192A, respectivamente, de las formas fosforiladas y totales de las proteínas STAT3, AKT y ERK. Se evaluó el efecto del medio condicionado de CAF-200, durante 6 horas, en ausencia y presencia de la terapia TPD (trastuzumab 15 μ g/ml; pertuzumab 20 μ g/ml; docetaxel 0,5 y 1 nM, respectivamente). MC[CAF-200]: medio condicionado de CAF-200. Los niveles de abundancia relativa de la regulación positiva o negativa de las proteínas se determinaron mediante el análisis densitométrico de las imágenes, normalizándolos con el control de carga β -actina y con el respectivo control sin tratamiento. Se muestran imágenes representativas para $n=3$.

El tratamiento con TPD resultó en una disminución de la fosforilación de los residuos Ser473 y Thr308 en las dos líneas celulares estudiadas. Sin embargo, tras la adición del medio condicionado de CAF-200 no se observaron modificaciones destacables en los niveles de fosforilación de AKT (Figura 9. A, B). En contraste, la adición del medio condicionado de CAF-200 a las células tumorales tratadas con TPD causó un incremento de la fosforilación de ERK respecto a la observada en las células tratadas con TPD en condiciones control (0,78 vs 0,48 en BT-474; 1,12 vs 0,60 en EFM-192A).

Los datos reflejaron un efecto del medio condicionado de CAF-200 en las líneas BT-474 y EFM-192A, incrementando la fosforilación de proteínas implicadas en las vías JAK/STAT3 y MAPK/ERK

en presencia del tratamiento con TPD, sugiriendo la posible implicación de estas rutas de señalización en la resistencia a la terapia TPD mediada por el fibroblasto CAF-200.

2. Caracterización del secretoma del fibroblasto CAF-200 tras el tratamiento con TPD

2.1. Efecto celular y molecular de la terapia TPD en el fibroblasto CAF-200

De manera previa al análisis del contenido del secretoma de CAF-200, se estudió la respuesta del fibroblasto a la terapia TPD, valorando su efecto en la proliferación y migración celular de los fibroblastos, así como alteraciones en algunos nodos de señalización intracelular.

2.1.1. El tratamiento con TPD no afecta a la proliferación de CAF-200

Se analizó la proliferación celular de los fibroblastos tras la exposición a TPD durante 24, 72 horas y 5 días, sin observar una variación en ninguno de los casos (Figura 10).

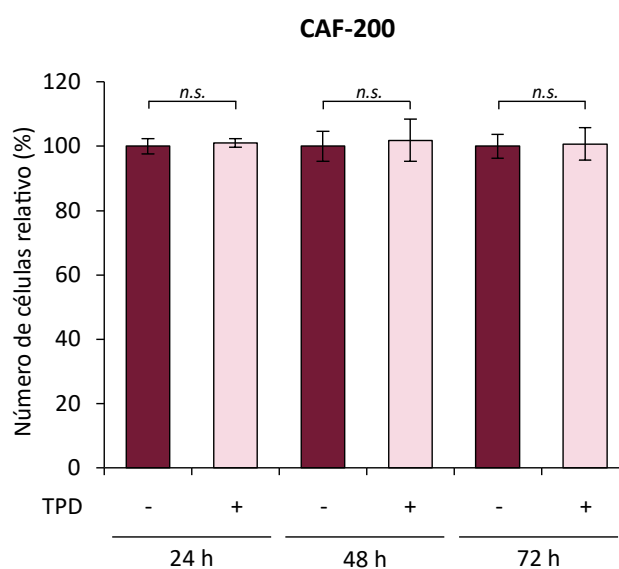


Figura 10. Efecto del tratamiento con TPD (trastuzumab 15 μ g/ml; pertuzumab 20 μ g/ml; docetaxel 0,5 nM) en la proliferación celular de los fibroblastos CAF-200, durante 24 horas, 72 horas y 5 días. (n.s.): no significativo. Las barras de error representan el valor calculado de la desviación estándar (n=3).

2.1.2. El fibroblasto CAF-200 incrementa su capacidad migratoria en respuesta a la terapia TPD

Los CAF pueden mostrar una mayor capacidad migratoria e invasiva en comparación con los fibroblastos de tejido normal [91]. La literatura sugiere que los agentes quimioterápicos pueden

impulsar en los fibroblastos estromales rasgos propios de un fenotipo activado y estimular su migración [120,231], por lo que se evaluó si el tratamiento con la terapia TPD podría modular esta capacidad en la línea CAF-200 (Figura 11. A, B). Los resultados reflejaron que los fibroblastos expuestos durante 24 horas a la terapia presentaban una mayor tasa de migración (145,0 % vs 100,0 %, p -valor < 0,01).

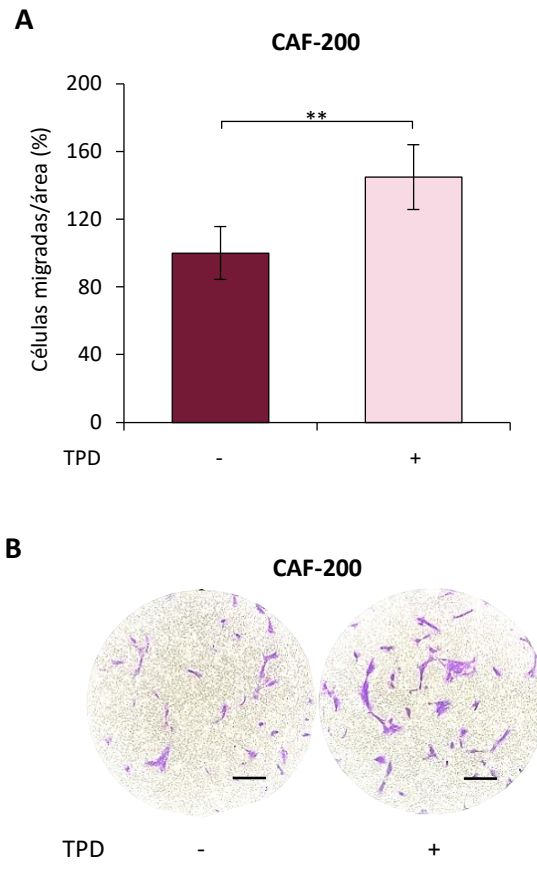


Figura 11. A. Efecto del tratamiento con TPD (trastuzumab 15 $\mu\text{g/ml}$; pertuzumab 20 $\mu\text{g/ml}$; docetaxel 0,5 nM) en la capacidad migratoria del fibroblasto CAF-200, durante 24 horas. (**): p -valor < 0,01. Las barras de error representan el valor calculado de la desviación estándar ($n=4$). **B.** Imágenes representativas de células CAF-200 migradas, en las condiciones experimentales mencionadas (10x). Se realizó el recuento de 10 campos aleatorios (20x). Escala: 100 μm .

2.1.3. El tratamiento con TPD induce en CAF-200 la expresión y la fosforilación de proteínas implicadas en la activación de fibroblastos estromales

La activación de múltiples cascadas de señalización en los CAF, incluyendo las vías JAK/STAT3, PI3K/AKT y MAPK/ERK, guarda una relación directa con su modulación fenotípica y su comportamiento en el microambiente tumoral [103].

Se analizó la expresión y el estado de fosforilación de las proteínas STAT3, AKT y ERK en CAF-200 tras el tratamiento con la terapia TPD. Destacó un incremento en p-ERK en el fibroblasto en la condición de tratamiento con TPD (1,49 vs 1,00) (Figura 12. A). Se detectó también un incremento moderado en la fosforilación de STAT3 (1,25 vs 1,00) y en el residuo Ser473 de AKT (1,26 vs 1,00).

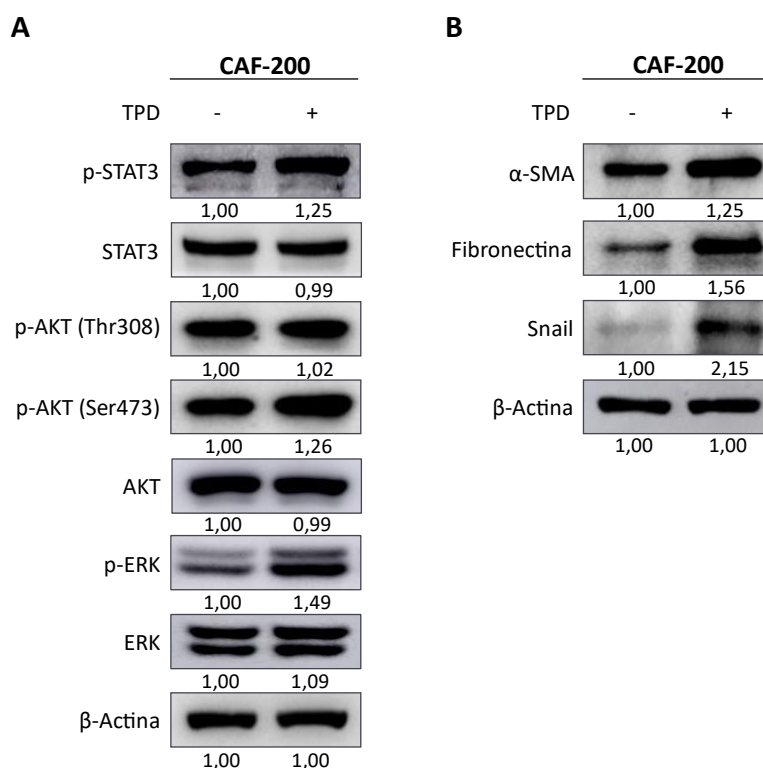


Figura 12. A. Análisis por western blot en CAF-200 de las formas fosforiladas y totales de las proteínas STAT3, AKT y ERK, en ausencia y presencia del tratamiento TPD (trastuzumab 15 μ g/ml; pertuzumab 20 μ g/ml; docetaxel 0,5 nM), durante 6 horas. **B.** Análisis por western blot en CAF-200 de las proteínas α -SMA, fibronectina y Snail, en las condiciones indicadas. Los niveles de abundancia relativa de la regulación positiva o negativa de las proteínas se determinaron mediante el análisis densitométrico de las imágenes, normalizándolos con el control de carga β -actina y con el respectivo control sin tratamiento. Se muestran imágenes representativas para $n=3$.

Adicionalmente, se analizaron por western blot α -SMA y fibronectina, descritas como marcadores de activación en los CAF [232,233], así como Snail, cuya expresión en fibroblastos estromales ha sido relacionada con la activación e inducción de fenotipos promotores de quimioresistencia [100,234,235]. En este caso, se observó que la expresión de Snail se duplicó tras el tratamiento con TPD (2,15 vs 1,00) y, aunque de forma menos acusada, también se

observó cierto incremento en la expresión de fibronectina (1,56 vs 1,00) y α -SMA (1,25 vs 1,00) (Figura 12. B).

2.2. El estudio de la abundancia diferencial de proteínas en el secretoma del CAF-200 revela proteínas diferencialmente expresadas tras el tratamiento con TPD

Con el objetivo de identificar proteínas secretadas por el fibroblasto con un posible papel en la generación de resistencia a la terapia anti-HER2 se realizó, mediante espectrometría de masas, un análisis de la abundancia diferencial de proteínas en el secretoma de CAF-200 tras el tratamiento basado en la combinación de trastuzumab, pertuzumab y docetaxel. El estudio, abordado mediante una estrategia LC-MS/MS *label-free*, resultó en la identificación de 1420 proteínas diferencialmente expresadas, de las cuales 1352 se pudieron cuantificar. Del total de proteínas cuantificadas, 283 mostraron un q -valor $< 0,05$, de las cuales 145 presentaron un coeficiente de variación inferior al 30 %. De estas, 96 proteínas estaban sobreexpresadas en el secretoma de CAF-200 tratado en comparación con el no tratado, mientras que 49 estaban reguladas a la baja.

Finalmente, de las 96 proteínas sobreexpresadas se seleccionaron 20 (Tabla 5), de acuerdo con parámetros como la tasa de cambio en la expresión o *Fold Change* (FC), además de otros criterios de robustez analítica como el valor de Mascot, el número de péptidos y de péptidos únicos, y la abundancia acumulada. El punto de corte establecido para la tasa de cambio fue de $\text{LogFC} \geq 1,2$.

ID Proteína	Nombre gen	Nombre proteína	LogFC
P02647	<i>APOA1</i>	Apolipoproteína A-I	5,51
P05121	<i>SERPINE1</i>	Inhibidor del activador del plasminógeno -1	2,91
P31949	<i>S100A11</i>	Proteína S100-A11	2,78
P13500	<i>CCL2</i>	Ligando 2 de quimiocina (motivo C-C)	2,68
Q10567	<i>AP1B1</i>	Subunidad beta-1 del complejo AP-1	2,43
Q9Y2I2	<i>NTNG1</i>	Netrina-G1	2,21
Q5T7C4	<i>HMGB1</i>	Proteína de alta movilidad del grupo B1	2,20
Q8NI22	<i>MCFD2</i>	Proteína de deficiencia de factor de coagulación múltiple 2	2,18
P10599	<i>TXN</i>	Tiorredoxina	2,11
Q15293	<i>RCN1</i>	Reticulocalbina -1	2,02
P17612	<i>PRKACA</i>	Subunidad catalítica alfa de la Proteína quinasa A	1,85
P61916	<i>NPC2</i>	Proteína secretora del epidídimo E1	1,83
B4DY08	<i>HNRNPC</i>	Ribonucleoproteínas Heterogéneas nucleares C1/C2	1,81
Q9Y376	<i>CAB39</i>	Proteína de unión a calcio 39	1,69
P09960	<i>LTA4H</i>	Leucotrieno A4 hidrolasa	1,63
Q96AG4	<i>LRRC59</i>	Proteína con repeticiones ricas en Leucina 59	1,50
H0YL52	<i>TPM1</i>	Cadena alfa 1 de la tropomiosina (fragmento)	1,45
P63104	<i>YWHAZ</i>	Proteína 14-3-3 zeta	1,40
B4DY09	<i>ILF2</i>	Factor de unión potenciador de interleucina 2	1,32
P07900	<i>HSP90AA1</i>	Proteína de shock térmico HSP 90-alfa	1,28

Tabla 5. Listado de 20 proteínas diferencialmente expresadas en el secretoma de CAF-200 tras el tratamiento con TPD, identificadas mediante LC-MS/MS label-free. LogFC: Logaritmo en base 2 de Fold Change. Para cada proteína se muestra el código ID de UniProt, el nombre del gen, el nombre de la proteína y el valor de LogFC.

2.3. El análisis de anotación funcional del secretoma de CAF-200 revela la modulación de vías oncogénicas

Obtener una interpretación funcional global a partir de conjuntos de datos proteómicos es posible gracias a herramientas bioinformáticas. Los análisis de anotación funcional permiten identificar conjuntos específicos de genes y respuestas moleculares que se activan en una determinada condición experimental o tras un determinado tratamiento. Estos conjuntos

pueden representar procesos biológicos, vías de señalización, o conjuntos de genes obtenidos experimentalmente, disponibles en bases de datos como Reactome [236].

A partir de las proteínas diferencialmente expresadas en el secretoma de CAF-200 se realizó un análisis de enriquecimiento de rutas mediante la herramienta y base de datos Reactome, lo que permitió visualizar procesos celulares y posibles vías o reacciones activadas en las células tumorales como consecuencia del efecto de las proteínas presentes en el secretoma del fibroblasto (Figura 13).

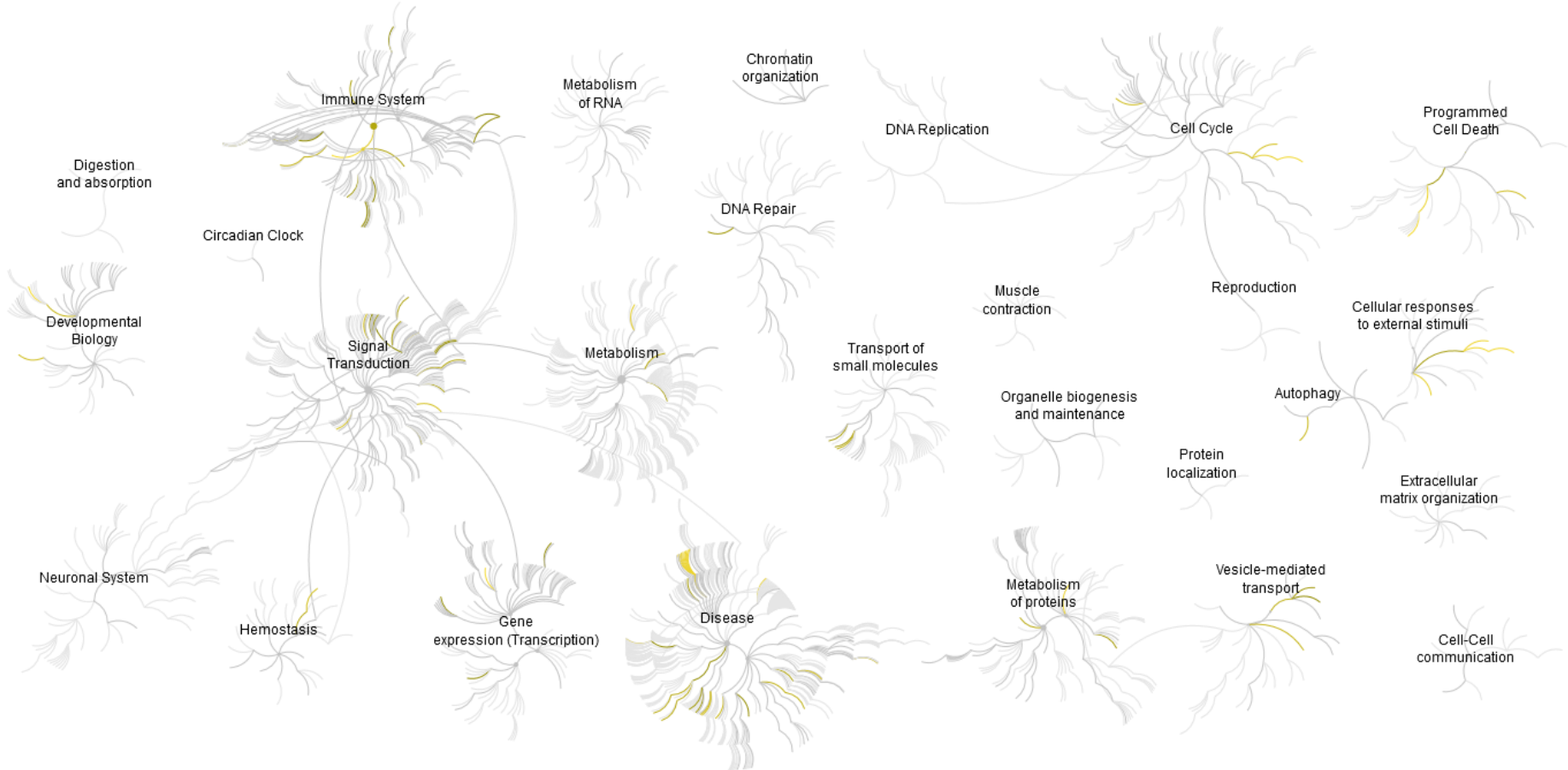


Figura 13. Visualización general de los resultados del análisis de vías de Reactome. Las vías están organizadas en una jerarquía, donde el centro de cada nodo circular representa la raíz de una categoría de nivel superior. Cada paso hacia fuera de un nodo representa el siguiente nivel inferior en la jerarquía de vías. El código de colores denota la sobrerrepresentación de esa reacción: amarillo significa sobrerrepresentación, mientras que gris claro significa que las vías no están significativamente sobrerrepresentadas.

Se identificaron procesos relacionados con la modulación de la fosforilación y activación de vías de señalización, implicadas en proliferación y supervivencia celular, invasión y metabolismo (Ras/Raf/MAPK, PI3K/AKT y p53), así como con la regulación de procesos de inflamación y respuesta inmune (Tabla 6). Además, destacó el enriquecimiento en reacciones de resistencia de mutantes de *ERBB2* a distintas terapias dirigidas, incluyendo trastuzumab y lapatinib.

Identificador vía	Nombre vía	N.º proteínas identificadas	p-valor
R-HSA-6798695	Degranulación de neutrófilos	7	8,05E-07
R-HSA-111447	Activación de BAD y traslocación a la mitocondria	2	8,36E-04
R-HSA-75035	Inactivación del complejo ciclina B:Cdk1 mediada por Chk1/Chk2 (Cds1)	3	0,001
R-HSA-5628897	Regulación de genes de metabolismo por TP53	3	0,001
R-HSA-9665233	Resistencia a trastuzumab de mutantes ERBB2 KD	1	0,006
R-HSA-9665251	Resistencia a lapatinib de mutantes ERBB KD	1	0,006
R-HSA-9665246	Resistencia a neratinib de mutantes ERBB2 KD	1	0,006
R-HSA-69473	Punto de control de daño al DNA G2/M	3	0,007
R-HSA-8957275	Fosforilación de proteínas post-traducción	2	0,007
R-HSA-3371497	Ciclo de chaperona HSP90 para receptores de hormonas esteroideas	2	0,007

Tabla 6. Listado de vías encontradas en el análisis con Reactome, mostrando el nombre y el respectivo identificador, las proteínas del estudio identificadas en cada vía, y el p-valor. Por razones de espacio, sólo se muestran 10 vías representativas.

2.4. Las redes de asociación proteína-proteína identifican nodos de interacción entre proteínas secretadas por los fibroblastos CAF-200

El estudio de interacciones proteína-proteína (PPI) proporcionado por la base de datos STRING permite la identificación y predicción de asociaciones entre proteínas a nivel físico y funcional [223]. Se obtuvieron redes de interacción funcional a partir de las proteínas diferencialmente expresadas en el secretoma CAF-200 y, finalmente, el estudio se centró en las asociaciones entre las proteínas mostradas previamente en la Tabla 5 (Figura 14). Disponer de una visión global de estas asociaciones podría ser útil a la hora de especular sobre la relevancia de una proteína dentro del conjunto analizado y sobre su posible papel dentro de algún nodo destacado.

Uno de los nodos de interacción resultó de la asociación entre *YWHAZ* (proteína 14-3-3ζ), *HSP90AA1* (proteína HSP90-α) y *PRKACA*. La interacción entre las proteínas 14-3-3ζ y HSP90, y de otros miembros de ambas familias, ha sido indicada en la literatura [237], siendo demostrada

su co-inmunoprecipitación en fibroblastos de ratón [238]. *PRKACA* es una subunidad catalítica de PKA y tiene actividad cinasa sobre gran número de sustratos, entre ellos 14-3-3 ζ , regulando su unión a otras proteínas [239]. La presencia de HSP90 en inmunoprecipitados de subunidades catalíticas de PKA ha sugerido la posible función de la chaperona HSP90 en la regulación de la actividad de PKA [240].

Otras agrupaciones de proteínas mostradas fueron aquellas codificadas por *TPM1*, *HNRNPC* e *ILF2*; *CCL2*, *SERPINE1* (proteína PAI-1) y *APOA1* (Figura 14). Por ejemplo, las proteínas *CCL2* y *PAI-1* junto con otras citocinas inflamatorias han sido reportadas como parte de secretomas proinflamatorios en modelos de inflamación y estrés celular [241,242].

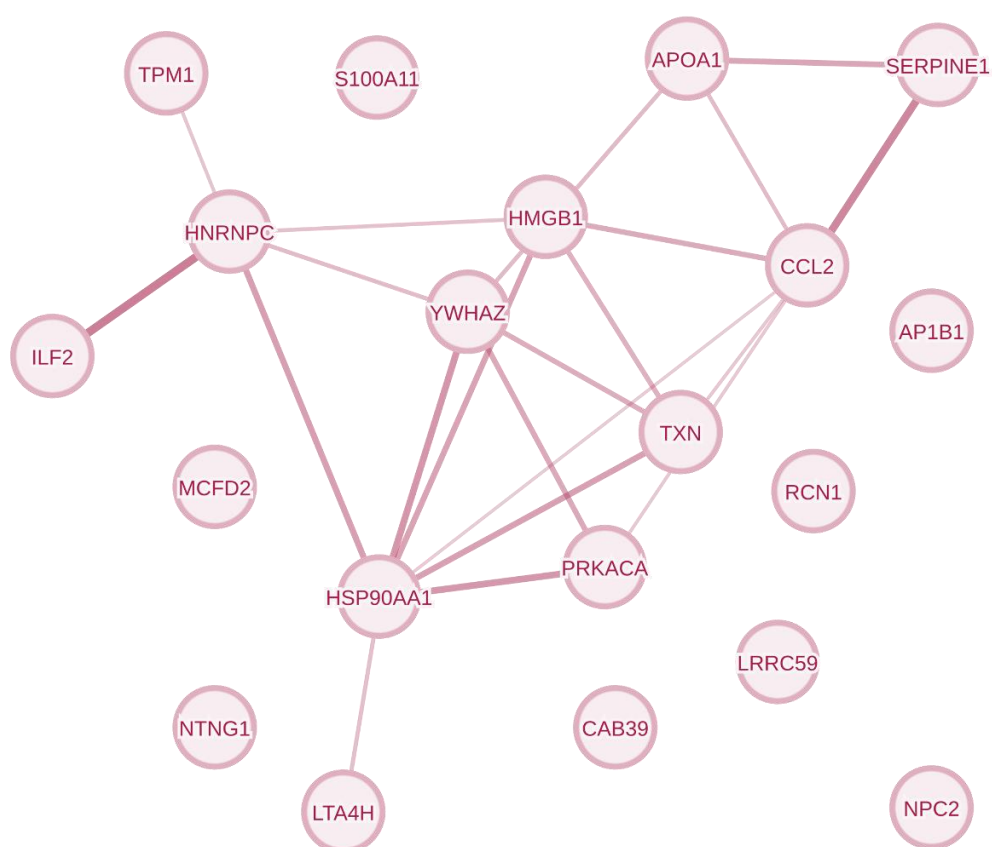


Figura 14. Agrupaciones de proteínas obtenidas tras el análisis mediante la base de datos STRING a partir de las 20 proteínas diferencialmente expresadas en el secretoma de CAF-200, utilizando un nivel de confianza moderado (0,4). Se muestra el nombre del gen que codifica para cada proteína.

Cabe mencionar que las PPI resaltadas en las agrupaciones mostradas en la Figura 14 se corresponden con un nivel de confianza seleccionado de 0,4. Sin embargo, existen otras PPI de distintas categorías que se revelan bajo criterios estadísticos menos estrictos.

2.5. Selección de proteínas en el secretoma de CAF-200 candidatas a la generación de resistencia a la terapia TPD

El listado de proteínas que los fibroblastos CAF-200 secretaron de forma más abundante, como consecuencia del tratamiento con TPD, se redujo a un número manejable de proteínas para poder valorarlas funcionalmente. Para llevar a cabo esta selección de candidatos se recurrió al estudio bibliográfico, revisando para cada proteína: la literatura científica sobre su papel en aspectos relacionados con la patogénesis y el desarrollo del cáncer y, particularmente, del cáncer de mama y el subtipo HER2+; las funciones celulares y biológicas conocidas, valorando su posible papel como molécula de señalización extracelular, particularmente en un contexto de microambiente tumoral; mecanismos de acción y receptores/proteínas de unión descritos; la disponibilidad de inhibidores (o de anticuerpos neutralizantes) para su modulación farmacológica, de ELISAS para su medición analítica en sobrenadantes de líneas celulares, y de anticuerpos para el análisis de su expresión por IHQ; la literatura descrita sobre su papel en la generación de resistencia a terapias en cáncer y, particularmente, en tumores de mama. En última instancia, se seleccionaron seis proteínas: 14-3-3 ζ , CCL2, HMGB1, HSP90- α , PAI-1 y S100-A11. Estas proteínas constituyeron el núcleo de moléculas candidatas a generar resistencia a TPD en las líneas celulares de cáncer de mama HER2+.

3. Valoración del papel de las proteínas candidatas en la generación de resistencia a TPD en líneas de cáncer de mama HER2+ y selección de S100-A11 como proteína de estudio

Se evaluó la contribución individual de las seis proteínas candidatas en la generación de resistencia a la terapia TPD mediante ensayos de proliferación celular durante 5 días con las líneas BT-474 y EFM-192A. Las células se expusieron al tratamiento con TPD y a concentraciones crecientes de una de las siguientes proteínas 14-3-3 ζ , CCL2, HMGB1, HSP90- α , PAI-1, S100-A11 recombinantes, comprendidas en un rango entre 1 y 40 ng/ml.

3.1. La adición exógena de las proteínas candidatas modula la proliferación celular de las líneas celulares de cáncer de mama HER2+ tratadas con TPD

La adición de la proteína 14-3-3 ζ recombinante (14-3-3 ζ r) en la línea BT-474 tratada con TPD indujo un aumento en la proliferación celular, especialmente con la concentración de 20 ng/ml, con la que se obtuvo el mayor incremento en la proliferación, siendo estadísticamente significativo (63,4 % vs 52,1 %, p -valor < 0,05) (Figura 15. A). En la línea EFM-192A tratada con TPD se observó un incremento lineal en la proliferación tras la adición de concentraciones crecientes de la proteína recombinante 14-3-3 ζ . En este caso, todos los incrementos en la tasa

proliferativa fueron estadísticamente significativos, destacando el mayor efecto obtenido con 40 ng/ml de 14-3-3ζr (69,8 % vs 52,5 %, p -valor < 0,001) (Figura 15. B).

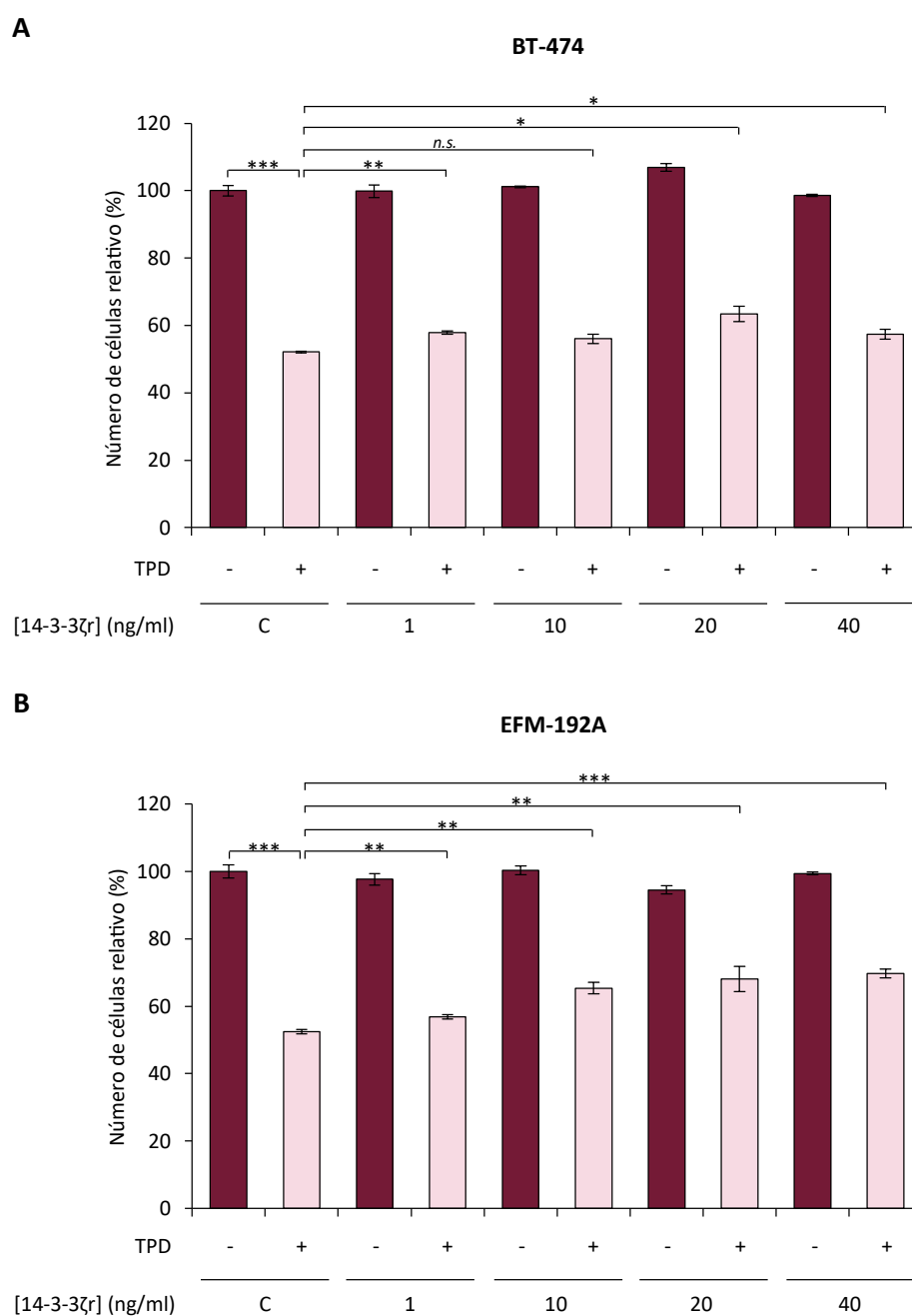


Figura 15. A, B. Efecto de la adición exógena de la proteína 14-3-3ζ recombinante, en un rango de concentraciones entre 1 y 40 ng/ml, en la proliferación celular de BT-474 y EFM-192A, respectivamente, durante 5 días, en ausencia y presencia de la terapia TPD (trastuzumab 15 μg/ml; pertuzumab 20 μg/ml; docetaxel 0,5 y 1 nM, respectivamente). C: control sin proteína recombinante. 14-3-3ζr: proteína 14-3-3ζ recombinante. (*): p -valor < 0,05; (**): p -valor < 0,01;

*(***): p-valor < 0,001; (n.s.): no significativo. Las barras de error representan el valor calculado de la desviación estándar (n=6).*

Todas las concentraciones de proteína CCL2 recombinante (CCL2r) que fueron incluidas en el ensayo resultaron en un incremento de la proliferación de las dos líneas tumorales tratadas con TPD, siendo estadísticamente significativo en todos los casos (Figura 16. A, B). El mayor incremento se observó con la adición de 20 ng/ml de CCL2r (66,8 % vs 50,5 %, *p*-valor < 0,001, en BT-474; 72,9 % vs 53,8 %, *p*-valor < 0,001, en EFM-192A).

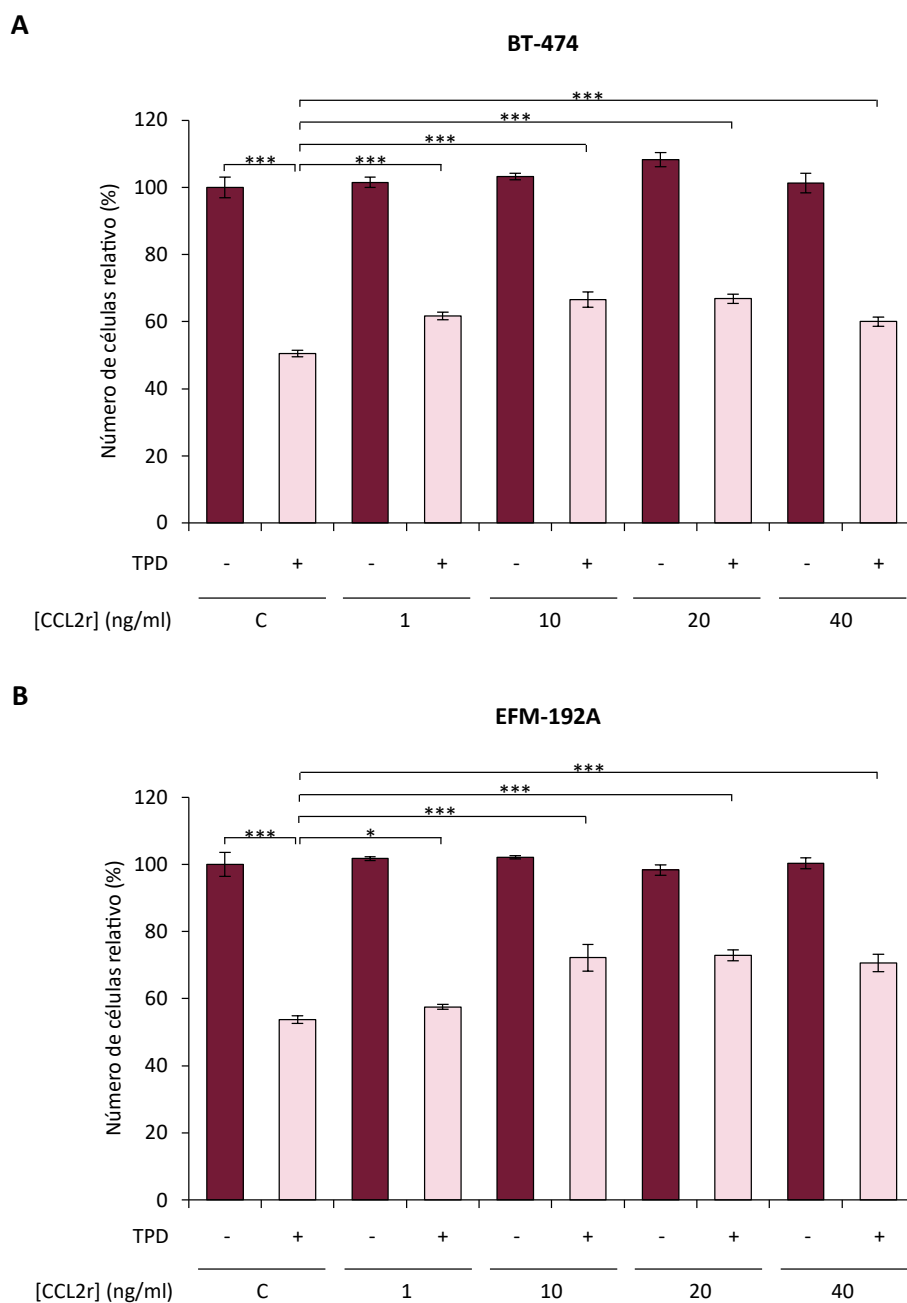


Figura 16. A, B. Efecto de la adición exógena de la proteína CCL2 recombinante, en un rango de concentraciones entre 1 y 40 ng/ml, en la proliferación celular de BT-474 y EFM-192A, respectivamente, durante 5 días, en ausencia y presencia de la terapia TPD (trastuzumab 15 $\mu\text{g/ml}$; pertuzumab 20 $\mu\text{g/ml}$; docetaxel 0,5 y 1 nM, respectivamente). C: control sin proteína recombinante. CCL2r: proteína CCL2 recombinante. (*): p-valor < 0,05; (**): p-valor < 0,001. Las barras de error representan el valor calculado de la desviación estándar (n=6).

En los ensayos de proliferación con la adición exógena de HMGB1 recombinante (HMGB1r) se observó en BT-474 un incremento en la tasa de proliferación con la adición de 10 ng/ml de

HMGB1r en presencia de la terapia TPD (60,4 % vs 50,8 %, p -valor < 0,01) (Figura 17. A). La proliferación de las células EFM-192A tratadas con TPD incrementó de forma estadísticamente significativa con una concentración de HMGB1r de 20 ng/ml (63,1 % vs 52,5 %, p -valor < 0,05) y 40 ng/ml (63,9 % vs 52,5 %, p -valor < 0,01) (Figura 17. B).

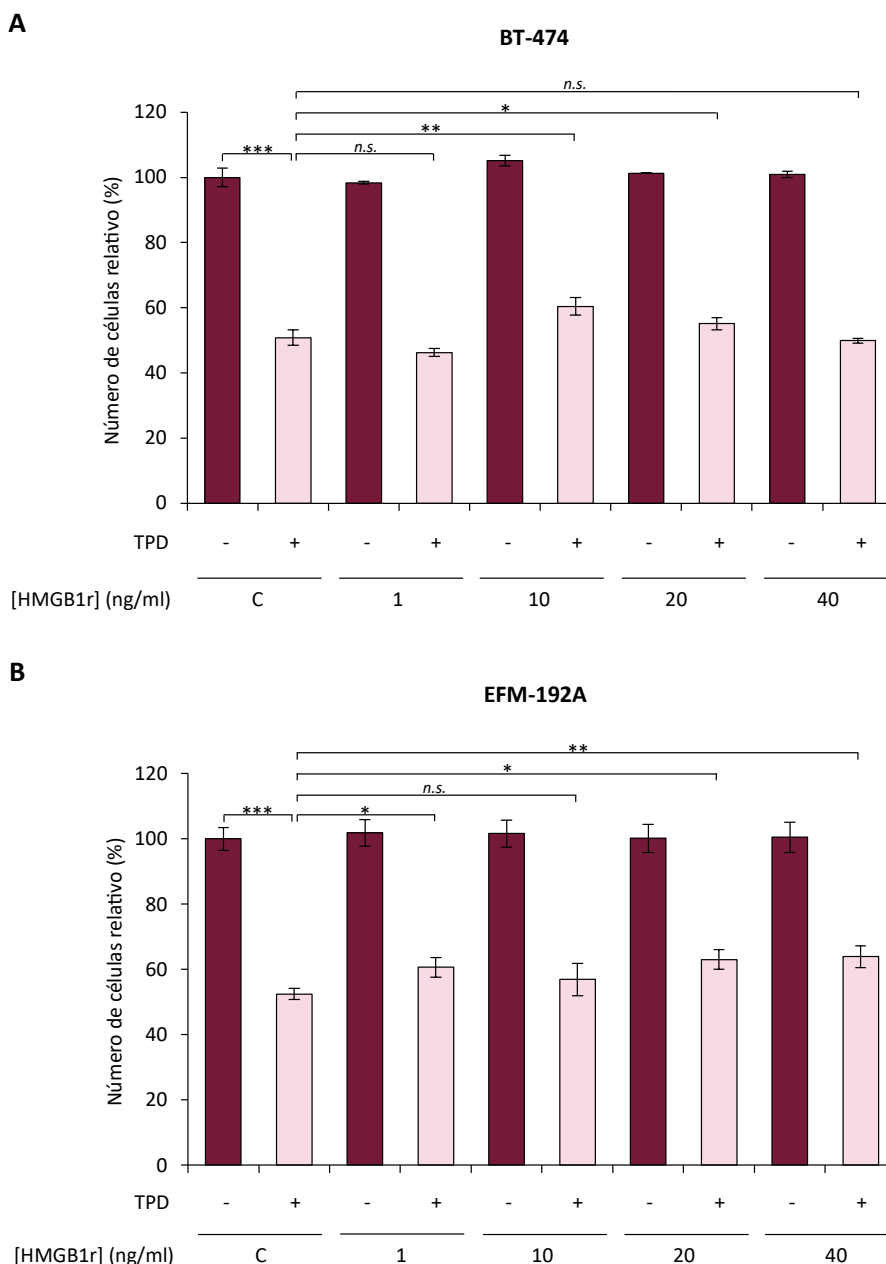


Figura 17. A, B. Efecto de la adición exógena de la proteína HMGB1 recombinante, en un rango de concentraciones entre 1 y 40 ng/ml, en la proliferación celular de BT-474 y EFM-192A, respectivamente, durante 5 días, en ausencia y presencia de la terapia TPD (trastuzumab 15 μ g/ml; pertuzumab 20 μ g/ml; docetaxel 0,5 y 1 nM, respectivamente). C: control sin proteína recombinante. HMGB1r: proteína HMGB1 recombinante. (*): p -valor < 0,05; (**): p -valor < 0,01;

(***): p -valor $< 0,001$; (n.s.): no significativo. Las barras de error representan el valor calculado de la desviación estándar ($n=6$).

La adición de HSP90- α recombinante (HSP90- α r) resultó en una disminución moderada de la proliferación celular de BT-474 tratada con TPD, siendo la concentración de 1 ng/ml con la que se observó un mayor efecto de disminución (45,1 % vs 50,8 %, p -valor $< 0,01$) (Figura 18. A). En contraste, la línea EFM-192A tratada con TPD mostró un aumento de la proliferación estadísticamente significativo tras la adición exógena de HSP90- α r entre 10 y 40 ng/ml, siendo el último el más notable (69,4 % vs 53,2 %, p -valor $< 0,05$) (Figura 18. B).

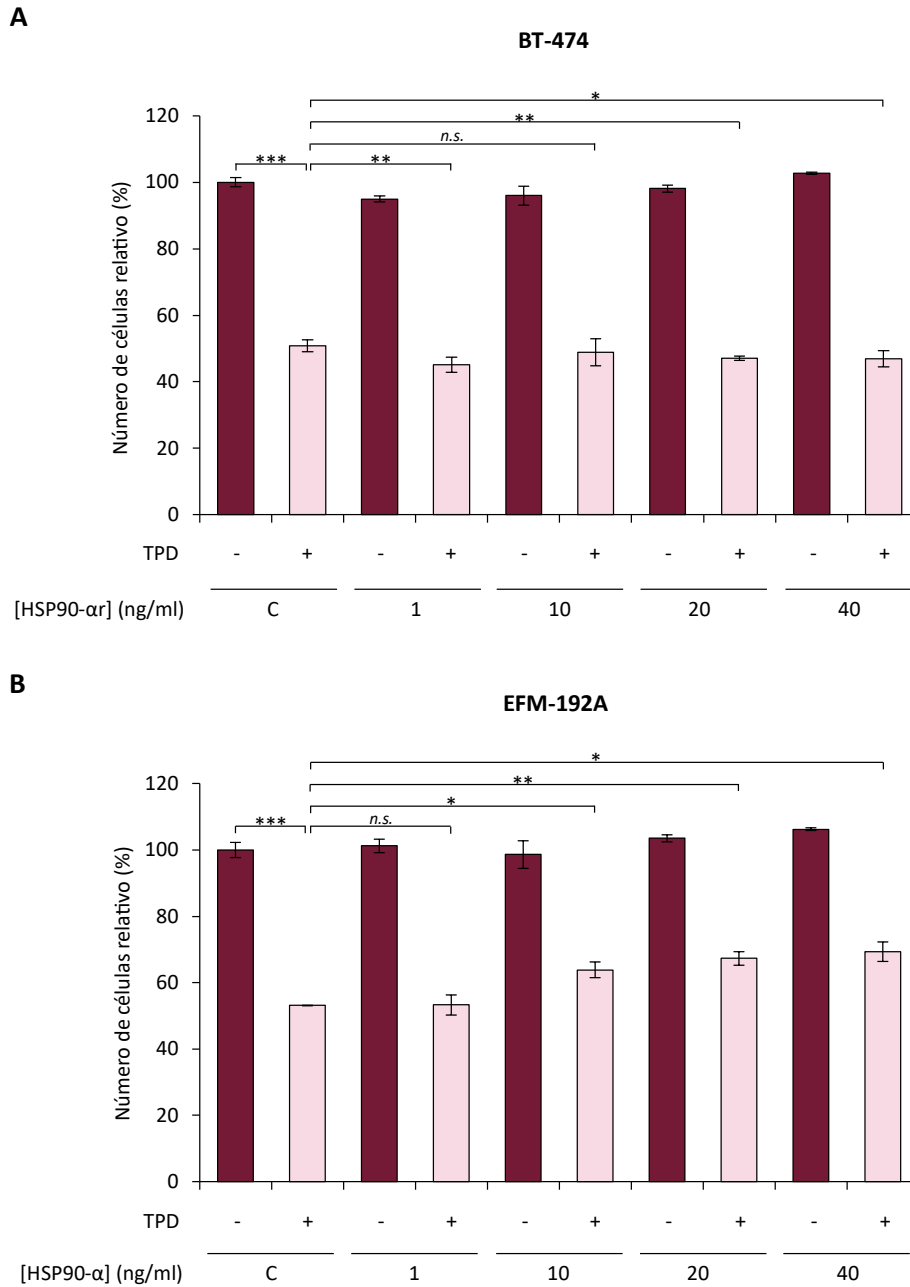


Figura 18. A, B. Efecto de la adición exógena de la proteína HSP90- α recombinante, en un rango de concentraciones entre 1 y 40 ng/ml, en la proliferación celular de BT-474 y EFM-192A, respectivamente, durante 5 días, en ausencia y presencia de la terapia TPD (trastuzumab 15 μ g/ml; pertuzumab 20 μ g/ml; docetaxel 0,5 y 1 nM, respectivamente). C: control sin proteína recombinante. HSP90- α r: proteína HSP90- α recombinante. (*): p-valor < 0,05; (**): p-valor < 0,01; (***) : p-valor < 0,001; (n.s.): no significativo. Las barras de error representan el valor calculado de la desviación estándar (n=6).

Aunque la adición exógena de la proteína PAI-1 recombinante (PAI-1r) no reveló cambios destacables en la proliferación de BT-474 tratada con TPD, cabe mencionar un aumento moderado en la proliferación tras la adición de 20 ng/ml de PAI-1r (55,4 % vs 48,0 %, p -valor < 0,05) (Figura 19. A). La exposición de EFM-192A a esta misma concentración de PAI-1r indujo un incremento en la proliferación estadísticamente significativo en presencia de la terapia (58,2 % vs 51,0 %, p -valor < 0,01) (Figura 19. B).

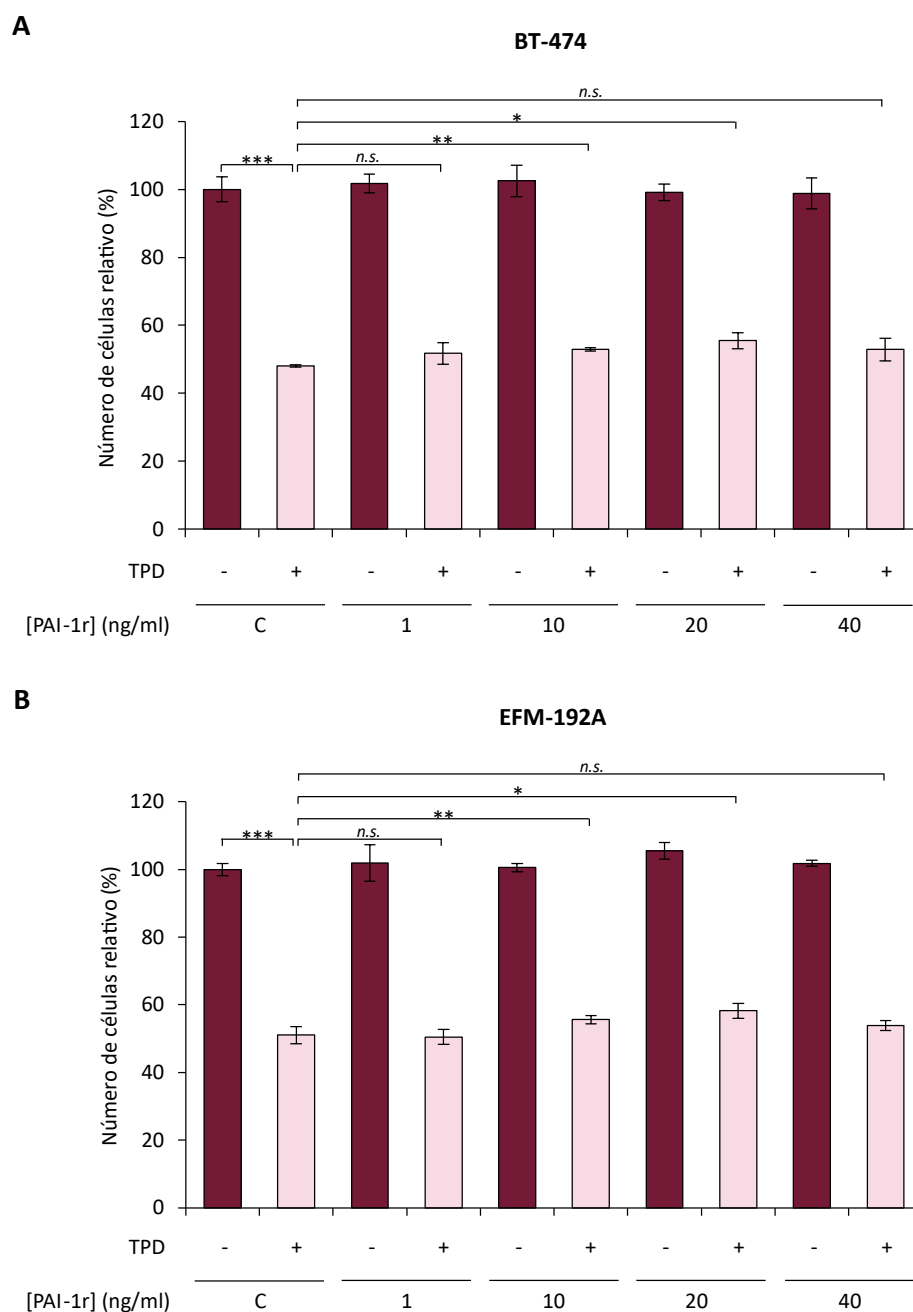


Figura 19. A, B. Efecto de la adición exógena de la proteína PAI-1 recombinante, en un rango de concentraciones entre 1 y 40 ng/ml, en la proliferación celular de BT-474 y EFM-192A,

respectivamente, durante 5 días, en ausencia y presencia de la terapia TPD (trastuzumab 15 $\mu\text{g/ml}$; pertuzumab 20 $\mu\text{g/ml}$; docetaxel 0,5 y 1 nM, respectivamente). C: control sin proteína recombinante. PAI-1r: proteína PAI-1 recombinante. (*): $p\text{-valor} < 0,05$; (**): $p\text{-valor} < 0,01$; (***) : $p\text{-valor} < 0,001$; (n.s.): no significativo. Las barras de error representan el valor calculado de la desviación estándar ($n=6$).

Por último, en presencia de la terapia TPD, la exposición de las dos líneas tumorales a las distintas concentraciones de S100-A11 recombinante (S100-A11r) resultó en un aumento de la proliferación celular, siendo estadísticamente significativo en todos los casos. En BT-474 se alcanzó el máximo efecto con la adición de 20 ng/ml de S100-A11r (66,4 % vs 49,5 %, $p\text{-valor} < 0,001$) (Figura 20. A). La línea EFM-192A mostró una respuesta similar, obteniéndose el mayor incremento en la proliferación con la concentración de 20 ng/ml (74,7 % vs 53,1 %, $p\text{-valor} < 0,001$) (Figura 20. B).

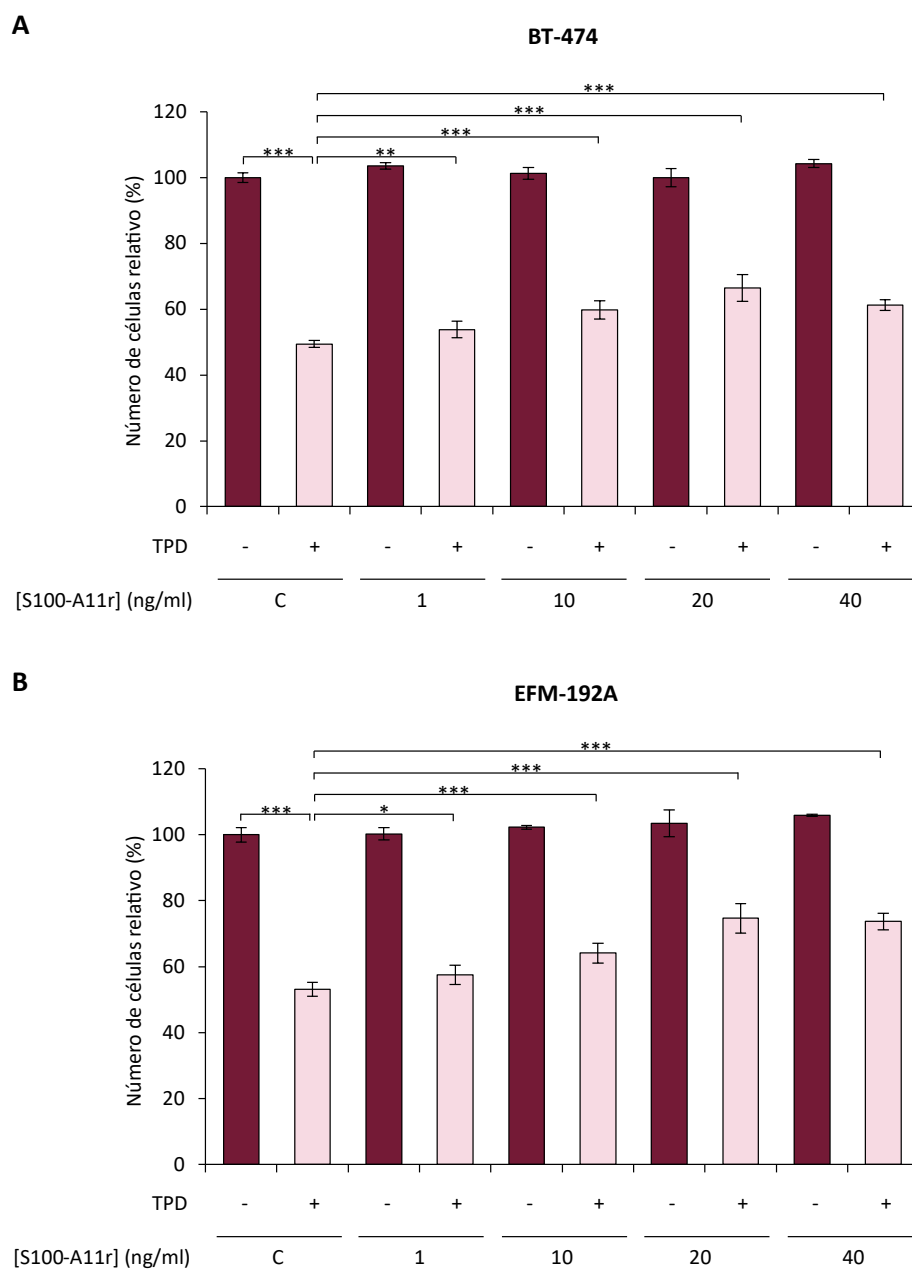


Figura 20. A, B. Efecto de la adición exógena de la proteína S100-A11 recombinante, en un rango de concentraciones entre 1 y 40 ng/ml, en la proliferación celular de BT-474 y EFM-192A, respectivamente, durante 5 días, en ausencia y presencia de la terapia TPD (trastuzumab 15 μ g/ml; pertuzumab 20 μ g/ml; docetaxel 0,5 y 1 nM, respectivamente). C: control sin proteína recombinante. S100-A11r: proteína S100-A11 recombinante. (*): p-valor < 0,05; (**): p-valor < 0,01; (***): p-valor < 0,001. Las barras de error representan el valor calculado de la desviación estándar (n=6).

En términos generales, la adición exógena de la mayoría de las proteínas candidatas dio lugar, al menos en una línea tumoral, a un incremento en la proliferación celular, comprendido entre un 10 y un 20 %, en presencia del tratamiento con TPD.

Con algunas proteínas, como HSP90- α , fue apreciable la diferencia en la respuesta obtenida entre las dos líneas celulares empleadas. En contraste, en el caso de otras proteínas, como CCL2 y S100-A11, destacó cierta homogeneidad en la respuesta de las dos líneas tumorales, observándose un incremento en la proliferación estadísticamente significativo con todas las concentraciones de proteína recombinante ensayadas. Con estas dos proteínas candidatas, además, se obtuvieron los valores más altos, y con mayor significancia estadística, en cuanto a incremento en la tasa de proliferación en presencia de terapia TPD, siendo en algunos casos de cerca de un 20 %.

3.2. Selección de la proteína S100-A11 para el estudio de su papel en la resistencia adquirida a TPD en cáncer de mama HER2+

Dado que los valores más altos en la tasa de proliferación de las dos líneas estudiadas en presencia de la terapia fueron obtenidos con la proteína S100-A11, se decidió seleccionar este candidato. S100-A11 pertenece a una familia de proteínas que está emergiendo como un grupo de marcadores potencialmente relevantes en distintos tipos de tumor, debido a su función en la regulación de diversos procesos celulares que resultan clave para la progresión tumoral, incluyendo su papel en el TME [169,243]. Su participación en la modulación de la respuesta a terapias hace que algunos trabajos señalen el potencial de esta familia de proteínas como factores predictivos de respuesta a terapia y como dianas para el desarrollo de estrategias terapéuticas [171,195,211]. Sin embargo, existe una falta de conocimiento acerca de los mecanismos moleculares que regulan sus funciones en cáncer y, específicamente, su papel extracelular en el microambiente tumoral. Los datos de proliferación y el reto científico condujeron a la decisión de explorar el papel de S100-A11 en nuestro modelo de resistencia a la terapia TPD en las líneas celulares de cáncer de mama HER2+.

3.3. La determinación de la concentración de S100-A11 en el medio condicionado de CAF-200 confirma una mayor secreción de la proteína tras el tratamiento con TPD de los fibroblastos

El análisis por espectrometría de masas del medio condicionado del fibroblasto CAF-200 ofreció una determinación semicuantitativa de la abundancia de cada proteína secretada. Una vez seleccionada S100-A11 como proteína de estudio, se determinó su concentración en el medio

del fibroblasto mediante ELISA, a partir de alícuotas de los mismos extractos utilizados en la espectrometría de masas. El resultado confirmó una abundancia relativa de más del triple en el caso del sobrenadante derivado de CAF-200 tratado con TPD (aunque la diferencia no fue tan acusada como en la determinación original por LC-MS/MS, probablemente debido a la degradación de las muestras por la congelación/descongelación y el tiempo transcurrido), con una concentración de 1853 pg/ml frente a 570 pg/ml en el sobrenadante control, derivado de fibroblastos sin tratamiento (p -valor $< 0,001$) (Figura 21).

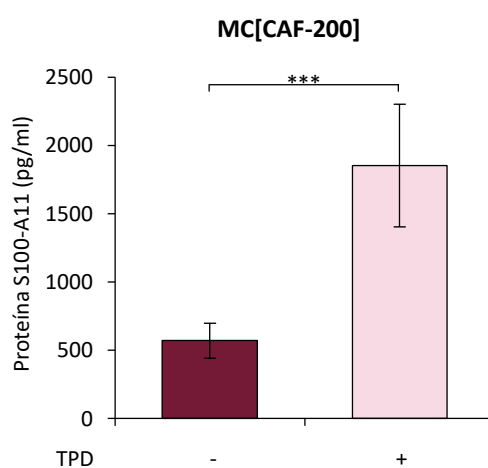


Figura 21. Validación de los niveles de proteína S100-A11 en pg/ml en el medio condicionado derivado de CAF-200 tras el tratamiento con TPD (trastuzumab 15 μ g/ml; pertuzumab 20 μ g/ml; docetaxel 0,5 nM), determinados mediante ELISA. MC[CAF-200]: medio condicionado de CAF-200. (***) p -valor $< 0,001$. Las barras de error representan el valor calculado de la desviación estándar ($n=3$).

4. Estudio del papel de la proteína S100-A11 en la resistencia adquirida a la terapia TPD en líneas celulares de cáncer de mama HER2+

4.1. La adición exógena de S100-A11 incrementa la fosforilación de STAT3 en líneas tumorales HER2+

En base al efecto observado previamente en la proliferación de las líneas tumorales HER2+ tras la adición exógena de S100-A11 recombinante (S100-A11r) (Figura 20. A, B), se analizaron por *western blot* sus niveles de expresión y fosforilación de STAT3, ERK y AKT, en respuesta a la terapia TPD y a concentraciones crecientes de la proteína S100-A11r (Figura 22. A, B). Inicialmente, destacó el incremento en la fosforilación de STAT3 tras la exposición a concentraciones crecientes

de S100-A11r, en ausencia y presencia del tratamiento con TPD, en las dos líneas tumorales. La adición de S100-A11r 20 ng/ml causó en BT-474 un incremento de p-STAT3 de más del triple, incluso en presencia del tratamiento (3,48 vs 1,26) (Figura 22. A). El efecto del TPD en EFM-192 indujo una disminución en p-STAT3 (0,18 vs 1,00) que fue revertida con la adición de S100-A11 exógena 20 ng/ml, alcanzando niveles por encima del control (1,79 vs 0,18) (Figura 22. B).

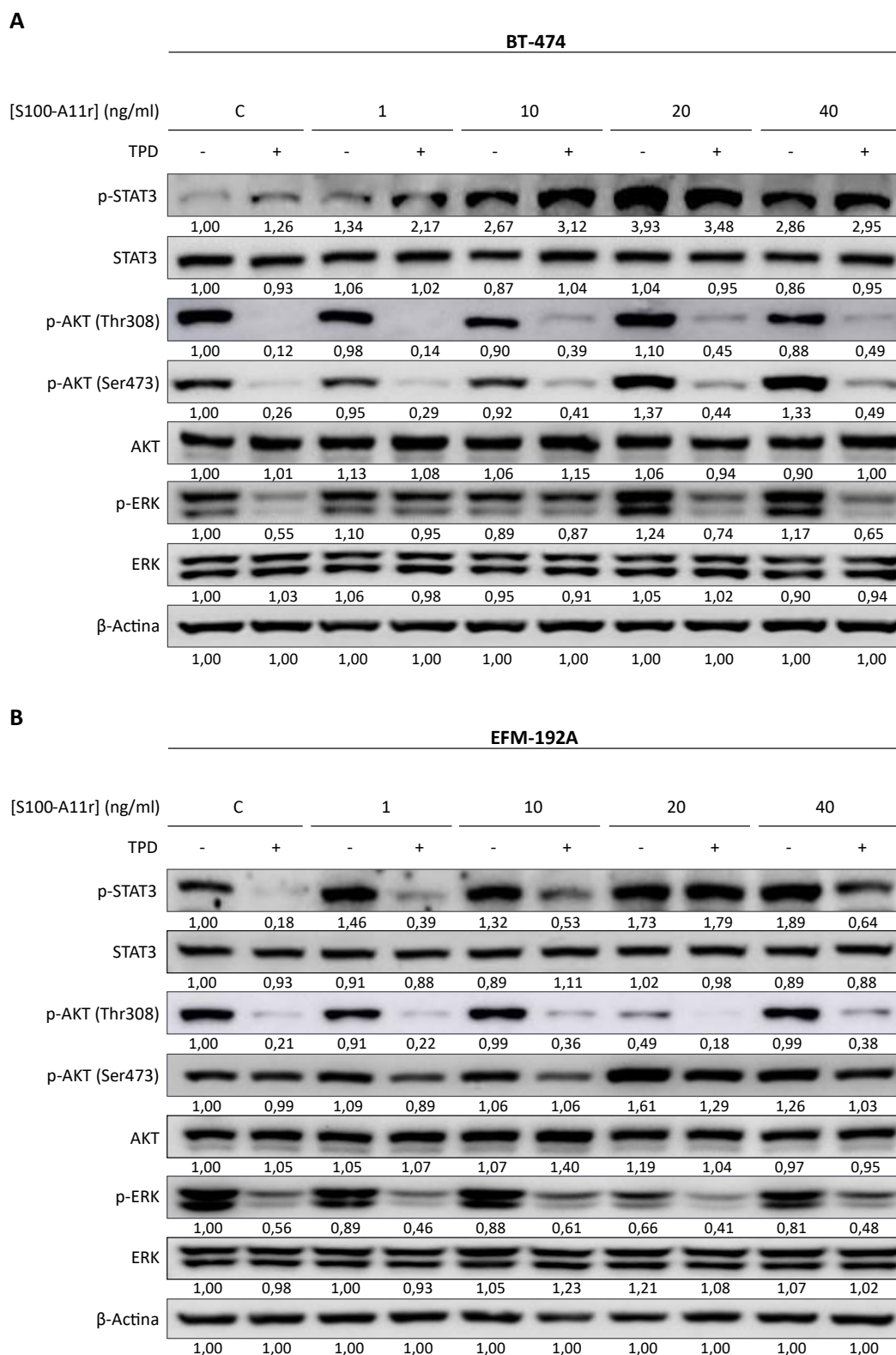


Figura 22. A, B. Análisis por western blot en BT-474 y EFM-192A, respectivamente, de las formas fosforiladas y totales de las proteínas STAT3, AKT y ERK. Se analizó el efecto de la adición exógena de S100-A11 recombinante en un rango de concentraciones entre 1 y 40 ng/ml, durante 6 horas, en ausencia y presencia del tratamiento con TPD (trastuzumab 15 μ g/ml; pertuzumab 20 μ g/ml;

docetaxel 0,5 y 1 nM, respectivamente). C: control sin proteína recombinante. S100-A11r: proteína S100-A11 recombinante. Los niveles de abundancia relativa de la regulación positiva o negativa de las proteínas se determinaron mediante el análisis densitométrico de las imágenes, normalizándolos con el control de carga β -actina y con el respectivo control sin tratamiento. Se muestran imágenes representativas para $n=3$.

Se observó la modulación en la fosforilación de AKT en algunas de las condiciones experimentales ensayadas. La adición de S100-A11r entre 10 y 40 ng/ml indujo en BT-474 un incremento moderado de p-AKT (Thr308) en presencia de la terapia TPD (0,49 vs 0,12 en el caso de 40 ng/ml); sin embargo, continuó predominando el efecto del tratamiento con TPD en la desfosforilación de AKT en este residuo (Figura 22. A). Por el contrario, con la concentración de 20 ng/ml de S100-A11r se observó la disminución de la fosforilación del residuo Thr308 de AKT en EFM-192A respecto al control sin tratamiento (0,49 vs 1,00) (Figura 22. B). La fosforilación de Ser473 de AKT aumentó en las dos líneas con S100-A11r 20 ng/ml. En el caso de EFM-192A se mantuvo un incremento aún en presencia de TPD (1,29 vs 0,99) (Figura 22. B).

La disminución en p-ERK producida por efecto del tratamiento con TPD se revirtió en BT-474 con la adición de S100-A11r 1 ng/ml (0,95 vs 0,55) (Figura 22. A). El efecto de S100-A11r en EFM-192A se asoció a una menor fosforilación de ERK, destacando la disminución más acentuada con 20 ng/ml en la condición control sin TPD (0,66 vs 1,00) (Figura 22. B).

4.2. El silenciamiento génico de *S100A11* en CAF-200 modifica el efecto del medio condicionado derivado de los fibroblastos en la respuesta a TPD de las líneas tumorales HER2+

Tras los resultados observados por efecto de la adición exógena de S100-A11 en las líneas tumorales HER2+, se abordó una estrategia de pérdida de función de la proteína de estudio. Para ello, se realizó el silenciamiento del gen *S100A11* en CAF-200, generando posteriormente medio condicionado con niveles reducidos de proteína S100-A11. Se evaluó el efecto de este medio condicionado derivado de fibroblastos con silenciamiento de *S100A11* en la respuesta a TPD, en comparación con el medio condicionado derivado de fibroblastos control, a nivel celular y molecular, en las líneas tumorales BT-474 y EFM-192A.

Inicialmente se evaluó la eficiencia del silenciamiento génico mediante qPCR y ELISA (Figura 23. A, B). El análisis por qPCR demostró que 72 horas después del silenciamiento los fibroblastos CAF-200 presentaban una disminución significativa en los niveles de ARNm de S100-A11 (2,9 % vs 100 %, p -valor < 0,001). El análisis tras 10 días desde el silenciamiento evidenció que la

disminución del ARNm se mantenía, aunque en menor grado (52,7 % vs 100 %, p -valor < 0,001) (Figura 23. A).

La determinación por ELISA reveló también una reducción de los niveles de proteína S100-A11 en el medio condicionado derivado del fibroblasto con silenciamiento, confirmando una menor secreción de la proteína en este medio. La disminución detectada fue de aproximadamente la mitad, pasadas 72 horas tras el silenciamiento (54,5 % vs 100 %, p -valor < 0,001) y 10 días después (47,9 % vs 100 %, p -valor < 0,001) (Figura 23. B).

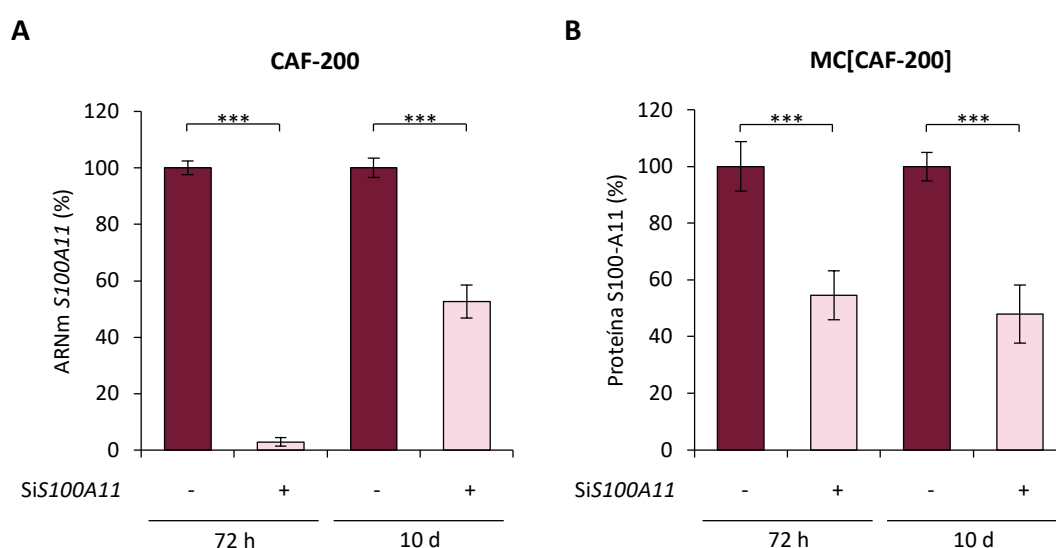


Figura 23. A. Niveles relativos de ARNm de S100A11 determinados mediante qPCR en 72 horas y 10 días posteriores al silenciamiento génico de S100A11 en fibroblastos CAF-200. **B.** Niveles relativos de proteína S100-A11 en el medio condicionado de CAF-200, determinados mediante ELISA, en las condiciones indicadas. MC[CAF-200]: medio condicionado de CAF-200. SiS100A11: silenciamiento génico de S100A11. (***) p -valor < 0,001. Las barras de error representan el valor calculado de la desviación estándar ($n=4$).

4.2.1. El silenciamiento génico de S100A11 en CAF-200 disminuye la resistencia adquirida a la terapia TPD en líneas tumorales HER2+

El efecto del medio condicionado de CAF-200 en la generación de resistencia a la terapia TPD que había sido previamente observado en las líneas tumorales HER2+ se vio reducido cuando las células fueron expuestas al medio condicionado de CAF-200 con silenciamiento de S100A11, observándose una disminución en la proliferación estadísticamente significativa en ambas líneas (62,0 % vs 77,5 %, p -valor < 0,01, en BT-484; 62,1 % vs 83,5 %, p -valor < 0,001, en EFM-192A) (Figura 24. A, B). Este resultado confirmó que la proteína S100-A11 secretada por CAF-200

contribuye en parte a la adquisición de resistencia a la terapia TPD generada con el medio condicionado del fibroblasto.

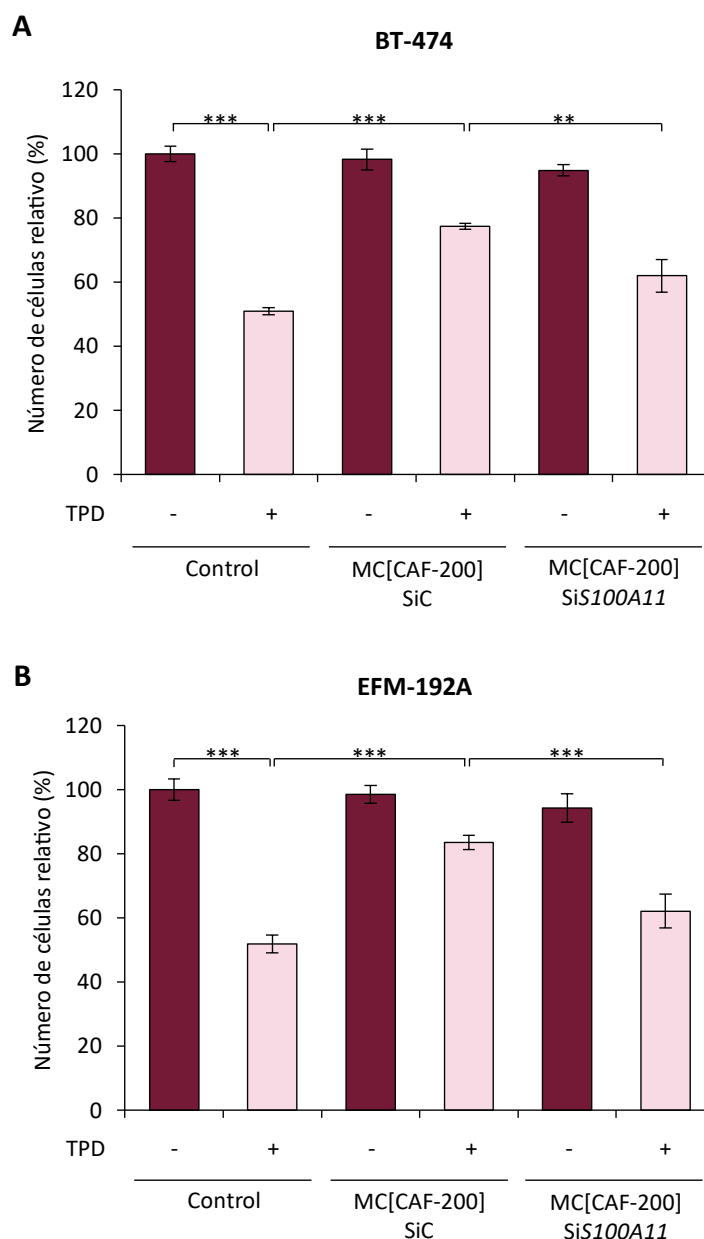


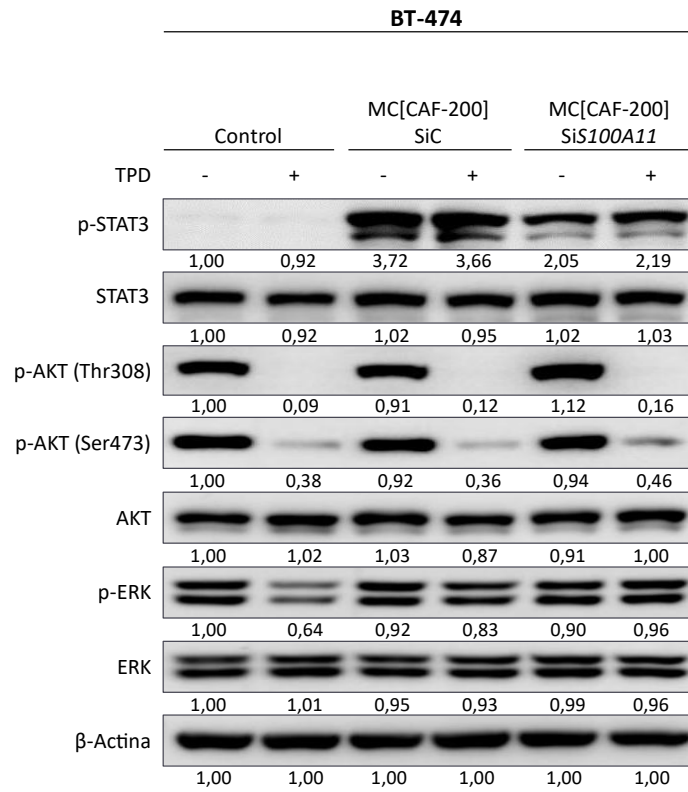
Figura 24. A, B. Efecto del medio condicionado de CAF-200 obtenido tras el silenciamiento génico de S100A11 en fibroblastos CAF-200, en la proliferación de BT-474 y EFM-192A, respectivamente, durante 5 días, en ausencia y presencia de la terapia con TPD (trastuzumab 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$; pertuzumab 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$; docetaxel 0,5 y 1 nM, respectivamente). MC[CAF-200]: medio condicionado de CAF-200. SiC: silenciamiento control. SiS100A11: silenciamiento génico de S100A11. (**): p -valor < 0,01; (***) : p -valor < 0,001. Las barras de error representan el valor calculado de la desviación estándar ($n=4$).

4.2.2. El silenciamiento génico de *S100A11* de CAF-200 reduce la fosforilación de STAT3 en líneas tumorales HER2+

Para ahondar en mecanismos moleculares de resistencia asociados específicamente a *S100A11*, dentro del secretoma de CAF-200, se empleó el medio condicionado de CAF-200 tras su silenciamiento génico y se analizó su efecto en la fosforilación de STAT3, AKT y ERK en las líneas tumorales BT-474 y EFM-192A.

De acuerdo con los resultados mostrados previamente (Figura 9), se observó de nuevo un incremento en p-STAT3 y p-ERK tras la adición de medio condicionado sin silenciamiento génico, en presencia de la terapia TPD (Figura 25. A, B). Sin embargo, el silenciamiento de *S100A11* en CAF-200 resultó en la modulación del efecto del medio condicionado en la fosforilación de STAT3, reduciendo parcialmente los niveles incluso en presencia de TPD (2,19 vs 3,66 en BT-474; 1,36 vs 2,39 en EFM-192A (Figura 25. A, B). No se observaron modificaciones destacables en los niveles de p-ERK y p-AKT cuando se comparó el efecto del medio condicionado derivado de CAF-200 silenciado frente al efecto del fibroblasto control.

A



B

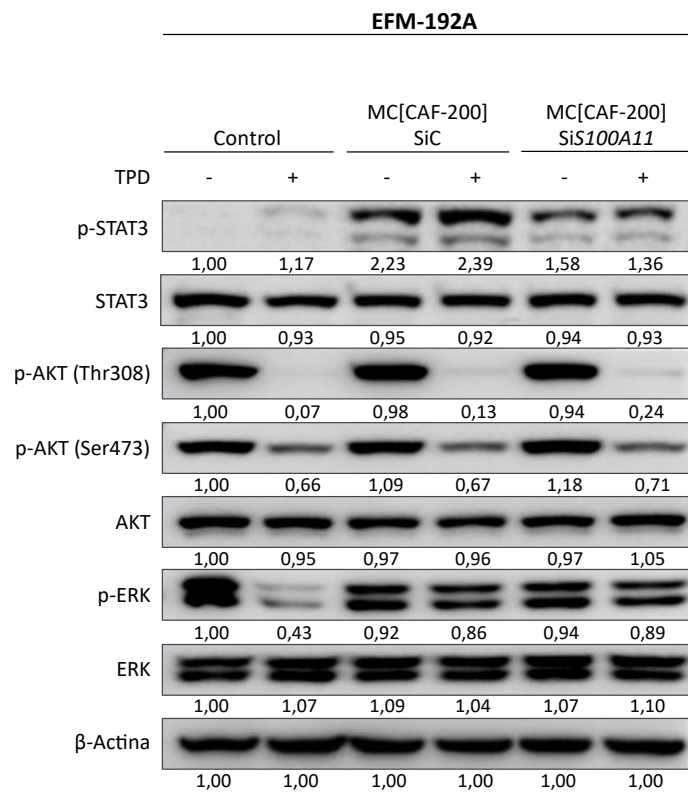


Figura 25. A, B. Análisis por western blot en BT-474 y EFM-192A, respectivamente, de las formas fosforiladas y totales de las proteínas STAT3, AKT y ERK. Se analizó el efecto del medio

condicionado de CAF-200 obtenido tras el silenciamiento génico de S100A11 en el fibroblasto, durante 6 horas, en ausencia y presencia de la terapia TPD (trastuzumab 15 µg/ml; pertuzumab 20 µg/ml; docetaxel 0,5 y 1 nM, respectivamente). MC[CAF-200]: medio condicionado de CAF-200. SiC: silenciamiento control. SiS100A11: silenciamiento génico de S100A11. Los niveles de abundancia relativa de la regulación positiva o negativa de las proteínas se determinaron mediante el análisis densitométrico de las imágenes, normalizándolos con el control de carga β-actina y con el respectivo control sin tratamiento. Se muestran imágenes representativas para n=3.

Estos resultados, de acuerdo con los hallazgos obtenidos previamente con la adición de proteína S100-A11 recombinante (Figura 22. A, B), apuntaron a la fosforilación de STAT3 como uno de los eventos de señalización desencadenados por S100-A11, sugiriendo la activación de la vía de señalización de STAT3 como posible mecanismo asociado a la resistencia generada por la proteína S100-A11.

5. Reversión farmacológica de la resistencia adquirida a la terapia TPD en líneas celulares de cáncer de mama HER2+

Dado que la hipótesis de este trabajo se iba focalizando en el eje S100-A11/STAT3, se empleó un compuesto inhibidor de STAT3 para analizar su implicación en el mecanismo molecular asociado a la proteína S100-A11, evaluando la capacidad del inhibidor para revertir la resistencia a TPD inducida por S100-A11 en las líneas tumorales. Además, para inferir el papel de AGER como receptor de S100-A11 en el modelo de resistencia generado, se valoró también la función de un antagonista del receptor, azeliragon, en la reversión de la resistencia a la terapia TPD.

5.1. La inhibición de STAT3 con stattic revierte la resistencia a la terapia TPD inducida por S100-A11 en líneas tumorales HER2+

Uno de los compuestos descritos en la literatura para la inhibición de la actividad de STAT3 es stattic. Se trata de una molécula pequeña que inhibe de forma selectiva la fosforilación de STAT3, bloqueando su activación y traslocación al núcleo. Su uso ha sido extendido a líneas celulares y modelos animales [244], incluyendo modelos experimentales de cáncer de mama [245,246]. Según la información recogida en The Human Protein Atlas, las líneas BT-474 y EFM-192A presentan un nivel de expresión medio de STAT3, en comparación con los niveles de un panel de 62 líneas celulares de cáncer de mama determinados en esta base de datos (<https://www.proteinatlas.org/>). Se comprobó el efecto de stattic en BT-474 y EFM-192A,

analizando por *western blot* el estado de fosforilación de STAT3 tras el tratamiento durante 6 horas con concentraciones del inhibidor seleccionadas en base a la literatura [246,247].

El análisis por *western blot* mostró la reducción de p-STAT3 tras el tratamiento con stattic en las líneas de cáncer de mama HER2+, observándose el mayor efecto con la concentración de 20 μM (0,22 vs 1,00 en BT-474; 0,29 vs 1,00 en EFM-192A) (Figura 26. A, B).

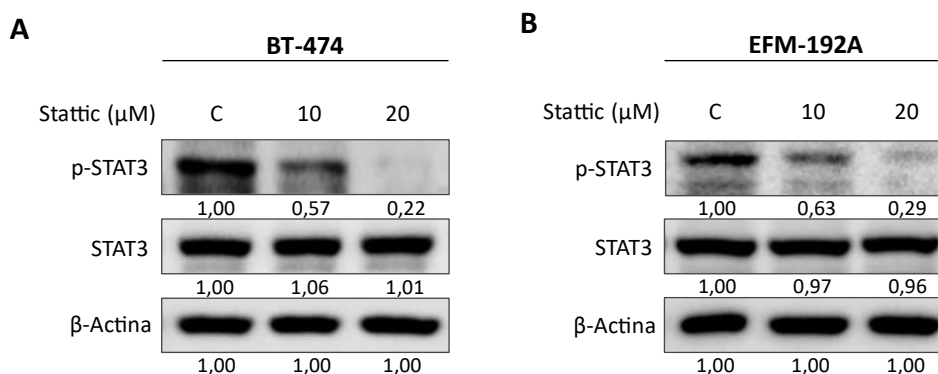


Figura 26. A, B. Análisis por *western blot* en BT-474 y EFM-192A, respectivamente, de p-STAT3 y STAT3 tras el tratamiento con stattic 10 y 20 μM , durante 6 horas. C: control sin tratamiento. Los niveles de abundancia relativa de las proteínas se determinaron mediante el análisis densitométrico de las imágenes, normalizándolos con el control de carga β -actina y con el respectivo control sin tratamiento. Se muestran imágenes representativas para $n=2$.

Posteriormente, las curvas de proliferación celular en respuesta a concentraciones crecientes de stattic demostraron un efecto inhibitor en las dos líneas celulares, siendo BT-474 la que manifestó una mayor sensibilidad en comparación con EFM-192A (Figura 27. A, B). Tras el análisis de regresión no lineal de las curvas de proliferación se determinó el valor de IC50 de BT-474 (1,95 μM) y EFM-192A (5,59 μM).

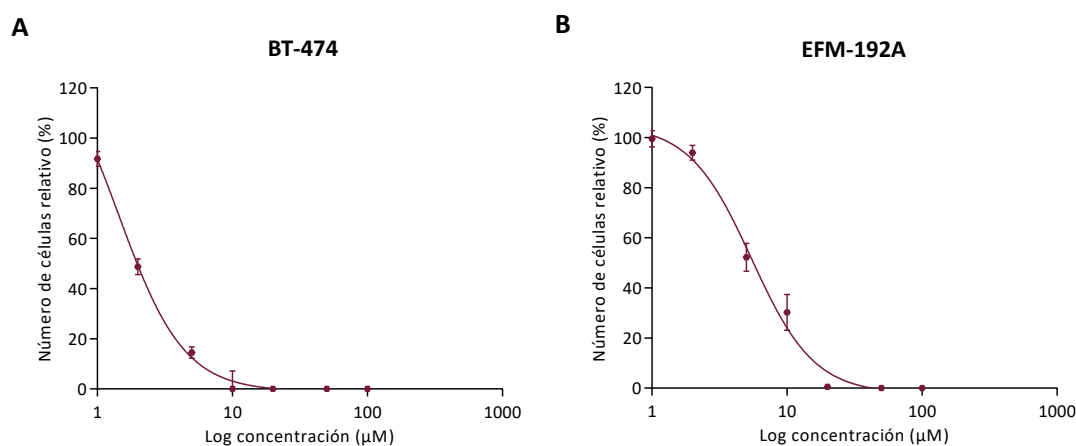


Figura 27. A, B. Efecto del tratamiento con stattic en concentraciones crecientes durante 5 días en la proliferación celular de BT-474 y EFM-192A, respectivamente. Se ensayaron concentraciones de stattic comprendidas en un rango de 1 a 100 μM , representadas en escala logarítmica en el eje de abscisas. La línea continua representa la curva del modelo de ajuste no lineal. Las barras de error representan el valor calculado de la desviación estándar ($n=3$).

Para trabajar con una concentración que ofreciera el mínimo efecto en la proliferación basal de las líneas celulares se seleccionó una concentración equivalente al valor de IC10, siendo de 0,92 μM en BT-474 y 2,05 μM en EFM-192A. Se empleó, respectivamente, 1 μM y 2 μM .

Se evaluó el efecto de stattic en la resistencia a la terapia TPD generada por el medio condicionado de CAF-200 y por la proteína exógena S100-A11r. Los ensayos de proliferación se llevaron a cabo en ausencia y presencia de la terapia TPD durante 5 días (Figura 28. A, B). Las células tumorales incubadas con el medio condicionado de CAF-200 disminuyeron la proliferación celular de manera significativa tras la adición de stattic (66,8 % vs 99,2 %, p -valor < 0,001, en BT-474; 79,7 % vs 101,3 %, p -valor < 0,01, en EFM-192A). La proliferación se redujo también en presencia del medio condicionado y de la terapia TPD tras la adición del inhibidor (50,1 % vs 74,3 %, p -valor < 0,001, en BT-474; 60,5 % vs 86,9 %, p -valor < 0,001, en EFM-192A) (Figura 28. A, B).

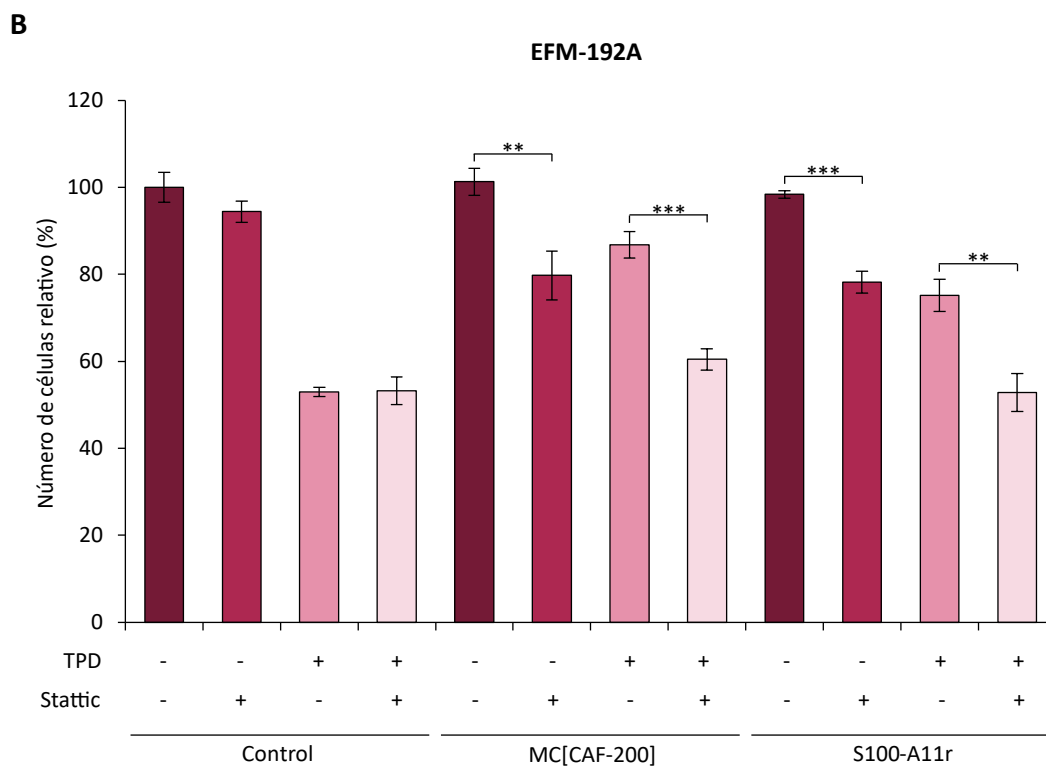
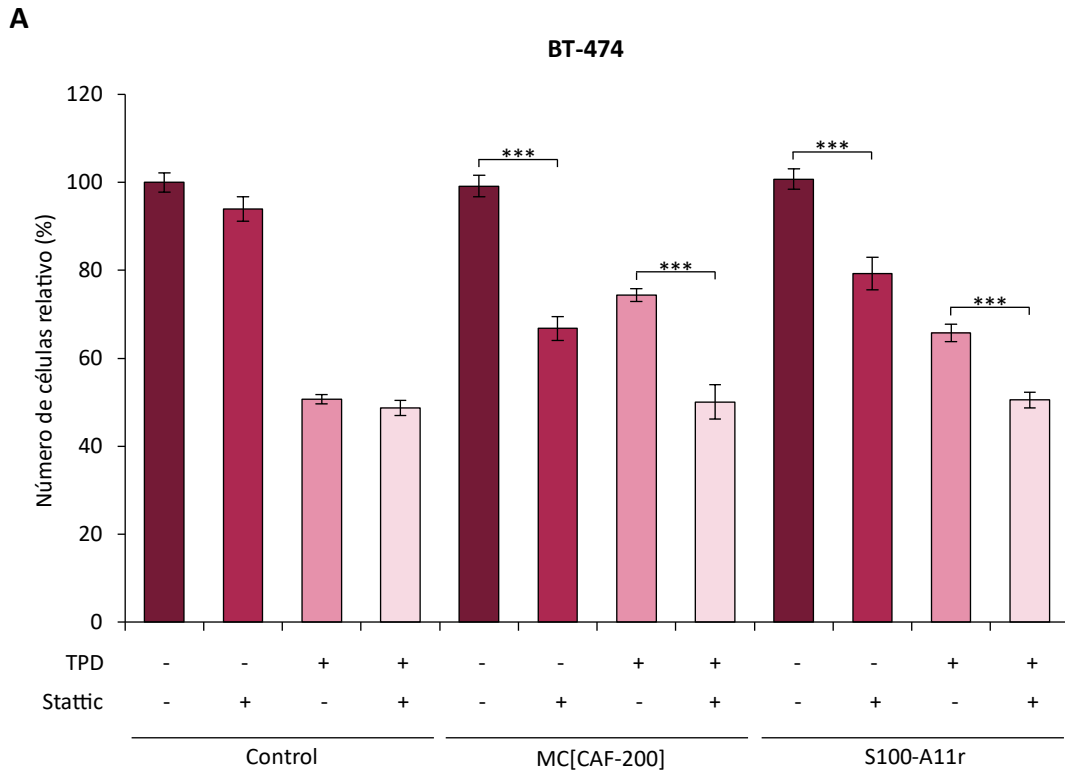


Figura 28. A, B. Efecto del tratamiento con stattic 1 y 2 μ M en la proliferación celular de BT-474 y EFM-192A, respectivamente, en presencia de medio condicionado de CAF-200 o de S100-A11 exógena 20 ng/ml, durante 5 días, en ausencia y presencia de la terapia TPD (trastuzumab 15

$\mu\text{g/ml}$; pertuzumab 20 $\mu\text{g/ml}$; docetaxel 0,5 y 1 nM, respectivamente). MC[CAF-200]: medio condicionado de CAF-200. S100-A11r: proteína S100-A11 recombinante. (**): p -valor < 0,01; (***): p -valor < 0,001. Las barras de error representan el valor calculado de la desviación estándar ($n=4$).

El análisis de la proliferación en condiciones de cultivo con S100-A11r demostró una disminución significativa tras la adición de stattic (79,2 % vs 100,7 %, p -valor < 0,001, en BT-474; 78,2 % vs 98,4 %, p -valor < 0,001, en EFM-192A), observándose incluso en presencia del tratamiento con TPD (50,5 % vs 65,8 %, p -valor < 0,001, en BT-474; 52,8 % vs 75,2 %, p -valor < 0,01, en EFM-192A) (Figura 28. A, B).

Dado que la inhibición farmacológica de STAT3 demostró reducir la resistencia a la terapia TPD generada por la proteína S100-A11 exógena (también por el medio condicionado), los datos indicaron la contribución de STAT3 en el mecanismo de resistencia generado por S100-A11 en las líneas de cáncer de mama HER2+.

5.2. El tratamiento con azeliragon, un inhibidor del receptor AGER, revierte la resistencia a la terapia TPD inducida por S100-A11 en líneas tumorales HER2+

Azeliragon (TTP488) es un antagonista del receptor AGER, cuyo mecanismo de acción se basa en el bloqueo de la unión de ligandos y de la consecuente activación y transducción de señal. Actualmente se está evaluando su uso en combinación con otras terapias en ensayos clínicos en glioblastoma y en pacientes con metástasis cerebral [211]. Diversos trabajos lo han empleado en modelos celulares, demostrando inhibir la función de la proteína S100-A11 secretada por macrófagos [248], así como la proliferación celular y metástasis en modelos celulares y animales de cáncer de mama TN [209,210].

Para valorar el papel de AGER en el mecanismo asociado a S100-A11 en nuestro modelo de resistencia a TPD, inicialmente se confirmó por *western blot* la expresión de AGER en BT-474 y EFM-192A, utilizando como control positivo las líneas celulares Jurkat y MCF-7, con niveles de expresión del receptor conocidos (<https://www.proteinatlas.org/>). En todos los lisados se detectó una banda correspondiente al peso molecular esperado del receptor, de 45 kDa. Por lo tanto, ambas líneas celulares mostraron ser positivas para la expresión de AGER (Figura 29).

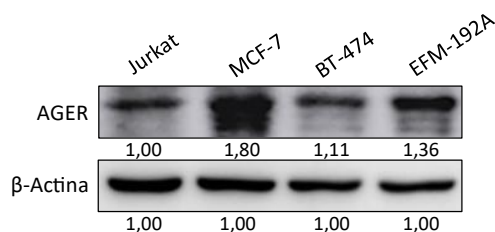


Figura 29. Análisis por western blot de AGER en lisados de BT-474 y EFM-192, utilizando como controles positivos lisados de células Jurkat y MCF-7. Los niveles de abundancia relativa de las proteínas se determinaron mediante el análisis densitométrico de las imágenes, normalizándolos con el control de carga β -actina y respecto a los niveles de Jurkat. Se muestran imágenes representativas para $n=2$.

Para determinar la IC₁₀ de azeliragon en cada línea tumoral, se obtuvieron curvas de proliferación en respuesta al fármaco en un rango de concentraciones entre 1 y 100 μ M, seleccionado en base a la literatura [210,248]. Las dos líneas mostraron sensibilidad al fármaco y, aunque la respuesta fue similar con las concentraciones más bajas, EFM-192A mostró una mayor sensibilidad a partir de concentraciones intermedias (Figura 30. A, B). El valor de IC₅₀ obtenido fue de 5,35 μ M en BT-474 y de 2,48 μ M en EFM-192A. Los valores de IC₁₀ calculados para BT-474 y EFM-192A fueron, respectivamente, de 1,15 μ M y 0,94 μ M, seleccionando 1 μ M como concentración de trabajo para ambas líneas celulares.

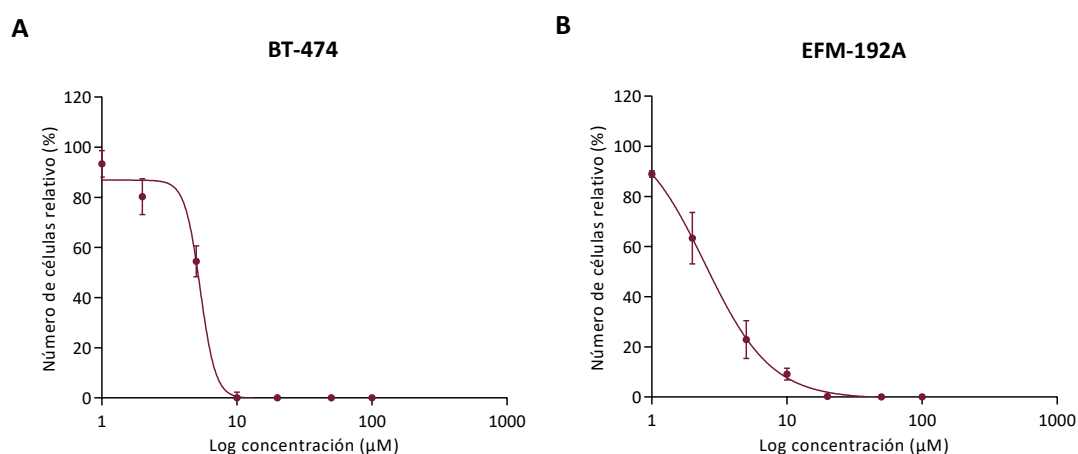


Figura 30. A, B. Efecto del tratamiento con azeliragon en concentraciones crecientes durante 5 días en la proliferación celular de BT-474 y EFM-192A, respectivamente. Se ensayaron concentraciones de azeliragon comprendidas en un rango de 1 a 100 μ M, representadas en escala logarítmica en el eje de abscisas. La línea continua representa la curva del modelo de

ajuste no lineal. Las barras de error representan el valor calculado de la desviación estándar (n=3).

En los ensayos de proliferación con BT-474 y EFM-192A, en condiciones basales y en presencia de TPD no se observaron cambios en la proliferación de las líneas tumorales tras el tratamiento con azeliragon. Sin embargo, sí se hallaron diferencias cuando se añadió azeliragon a las células incubadas en medio condicionado de CAF-200, ocasionando una reducción estadísticamente significativa en su proliferación (75,0 % vs 98,8 %, p -valor < 0,001, en BT-474; 76,6 % vs 101,0 %, p -valor < 0,001, en EFM-192A) (Figura 31. A, B). Este efecto producido por el fármaco fue observado también en presencia de la terapia TPD (55,0 % vs 71,7 %, p -valor < 0,001, en BT-474; 59,9 % vs 90,1 %, p -valor < 0,001, en EFM-192A) (Figura 31. A, B).

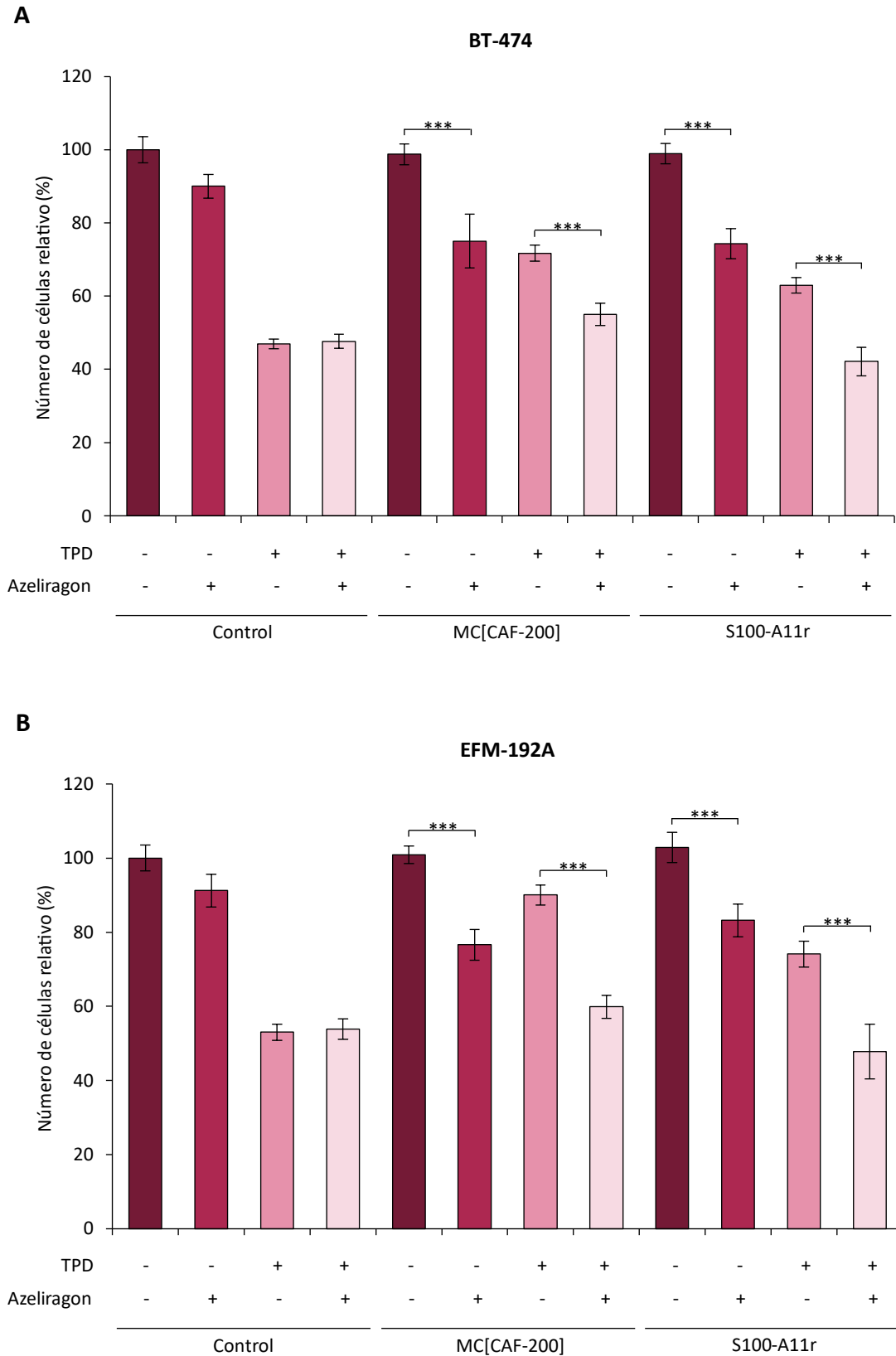


Figura 31. A, B. Efecto del tratamiento con azeliragon 1 μ M en la proliferación celular de BT-474 y EFM-192A, respectivamente, en presencia de medio condicionado de CAF-200 o de S100-A11 exógena 20 ng/ml, durante 5 días, en ausencia y presencia de la terapia TPD (trastuzumab 15

$\mu\text{g/ml}$; pertuzumab 20 $\mu\text{g/ml}$; docetaxel 0,5 y 1 nM, respectivamente). MC[CAF-200]: medio condicionado de CAF-200. S100-A11r: proteína S100-A11 recombinante. (***) : p -valor < 0,001. Las barras de error representan el valor calculado de la desviación estándar ($n=4$).

Finalmente, el tratamiento con azeliragon demostró reducir la proliferación de las células cuando se cultivaron con la proteína S100-A11r (74,3 % vs 98,9 %, p -valor < 0,001, en BT-474; 83,2 % vs 102,9 %, p -valor < 0,001, en EFM-192A) (Figura 31. A, B). La adición del fármaco tuvo también este efecto en presencia de TPD, disminuyendo de manera estadísticamente significativa la resistencia a la terapia TPD inducida por S100-A11r (42,1 % vs 63,0 %, p -valor < 0,001, en BT-474; 47,8 % vs 74,1 %, p -valor < 0,001, en EFM-192A) (Figura 31. A, B).

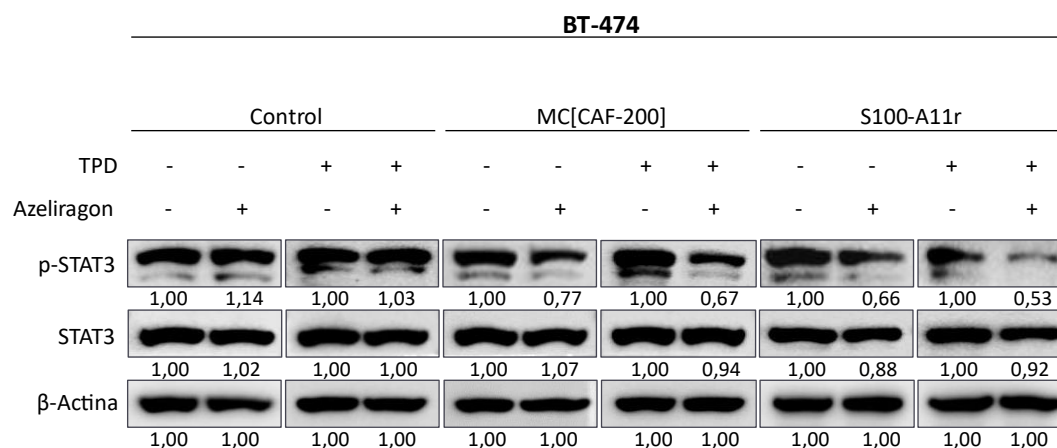
Estos resultados indicaron un papel clave de AGER en el mecanismo molecular asociado a la resistencia inducida por S100-A11 extracelular en BT-474 y EFM-192A, ya que su inhibición farmacológica reduce la resistencia generada por la proteína. Los datos también reflejaron la contribución de AGER en el mecanismo asociado a la resistencia generada por el secretoma de CAF-200 en las líneas HER2+ estudiadas.

5.3. El tratamiento con azeliragon modula la señalización intracelular desencadenada por S100-A11, disminuyendo la fosforilación de STAT3 en líneas tumorales HER2+

Dado el presunto papel de AGER como receptor de S100-A11 en el modelo de resistencia a TPD y la regulación de p-STAT3 como uno de los eventos de señalización intracelular del mecanismo molecular asociado a la proteína S100-A11, se analizó el efecto de la inhibición de AGER en la modulación de la fosforilación de STAT3 en las líneas tumorales. Se analizaron los niveles de p-STAT3 de BT-474 y EFM-192A en respuesta al tratamiento con azeliragon, incubadas con medio condicionado de CAF-200 o con S100-A11r, en ausencia y presencia de la terapia TPD (Figura 32. A, B). Para este ensayo se empleó una concentración de azeliragon de 20 μM , mayor en un orden de magnitud respecto a la concentración empleada en los ensayos de proliferación.

Inicialmente, se observó el efecto de azeliragon en p-STAT3 en las células cultivadas en medio condicionado de CAF-200 y tratadas con TPD, disminuyendo su fosforilación (0,67 vs 1,00 en BT-474; 0,66 vs 1,00 en EFM-192A) (Figura 32. A, B). En condiciones de cultivo con S100-A11r, ambas líneas tratadas con TPD demostraron también una reducción en la fosforilación de STAT3 (0,53 vs 1,00 en BT-474; 0,62 vs 1,00 en EFM-192A) (Figura 32. A, B). Las células cultivadas en condiciones basales no mostraron regulación de p-STAT3 tras el tratamiento con azeliragon.

A



B

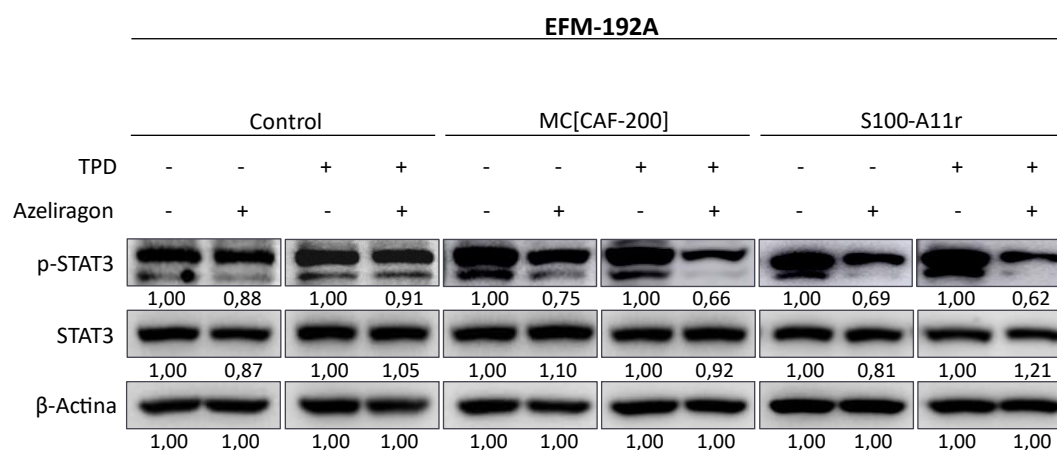


Figura 32. A, B. Análisis por western blot en BT-474 y EFM-192A, respectivamente, de p-STAT3 y STAT3. Se analizó el efecto del tratamiento con azeliragon 20 μ M, durante 6 horas, en las células incubadas con medio condicionado de CAF-200 o S100-A11 exógena 20 ng/ml, en ausencia y presencia de la terapia TPD (trastuzumab 15 μ g/ml; pertuzumab 20 μ g/ml; docetaxel 0,5 y 1 nM, respectivamente). MC[CAF-200]: medio condicionado de CAF-200. S100-A11r: proteína S100-A11 recombinante. Los niveles de abundancia relativa de la regulación positiva o negativa de las proteínas se determinaron mediante el análisis densitométrico de las imágenes, normalizándolos con el control de carga β -actina y con el respectivo control sin tratamiento. Se muestran imágenes representativas para n=3.

La disminución de p-STAT3 observada tras el bloqueo de AGER en presencia de S100-A11 exógena evidenció la participación de AGER en la transmisión de la señalización mediada por S100-A11 en las líneas de cáncer de mama HER2+. Por otro lado, la disminución de p-STAT3 por efecto del tratamiento se detectó en células incubadas con S100-A11 y no en condiciones

basales, sugiriendo de nuevo la regulación positiva de p-STAT3 producida por la S100-A11 exógena. Estos hallazgos fueron también observados con el medio condicionado de CAF-200, sugiriendo por lo tanto el eje AGER/p-STAT3 como uno de los posibles mecanismos de resistencia asociados al secretoma del fibroblasto CAF-200.

Dado que los datos acotaron la hipótesis de trabajo en el eje S100-A11/AGER/p-STAT3, se analizó si el bloqueo de S100-A11/AGER con azeliragon podía modular también la señalización intracelular mediada por ERK o AKT. En contraste con lo observado previamente respecto a p-STAT3, el tratamiento con azeliragon no resultó en la modulación negativa de ERK o AKT en las células incubadas con S100-A11r o medio condicionado de CAF-200 (Figura 33. A, B), a excepción de una disminución de p-ERK observada específicamente en la línea BT-474 incubada con S100-A11 y sin terapia TPD (0,73 vs 1,00).

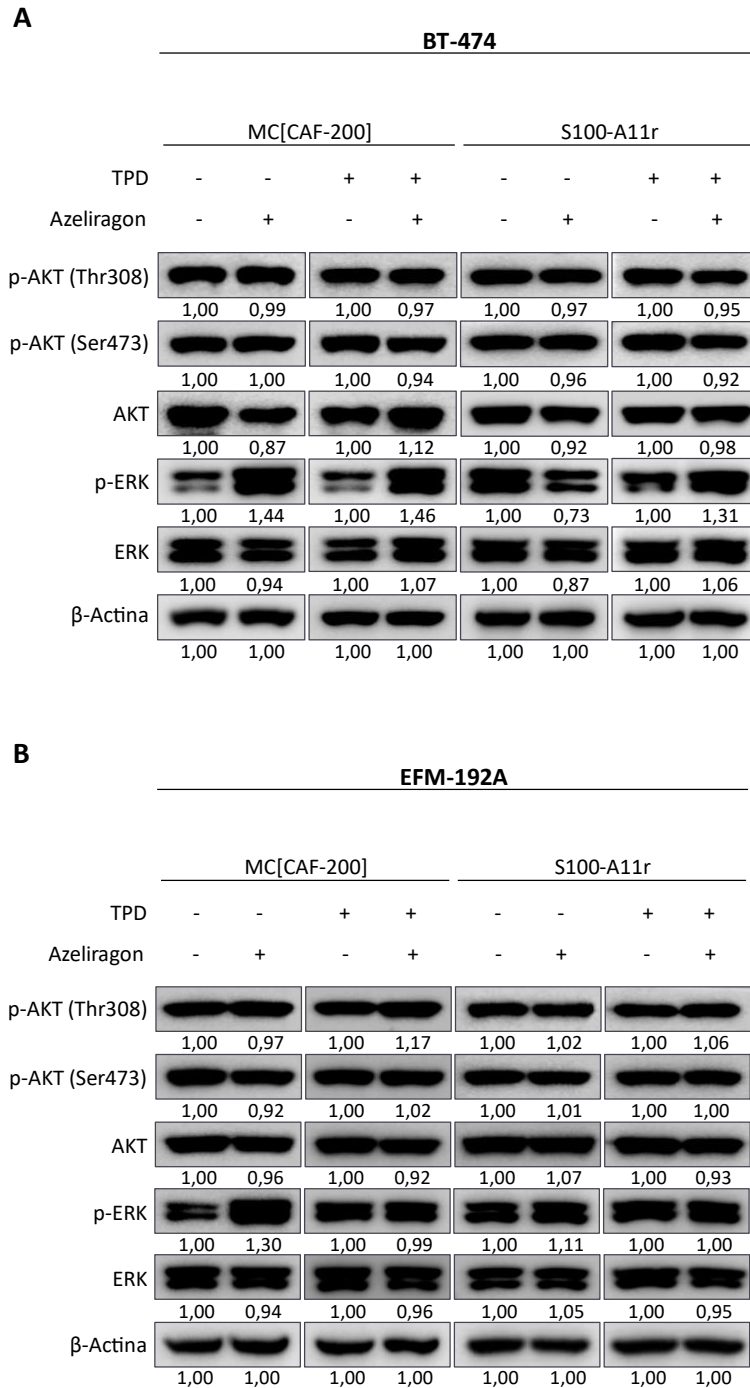


Figura 33. A, B. Análisis por western blot en BT-474 y EFM-192A, respectivamente, de las formas fosforiladas y totales de AKT y ERK. Se analizó el efecto del tratamiento con azeliragon 20 μ M, durante 6 horas, en las células incubadas con medio condicionado de CAF-200 o S100-A11 exógena 20 ng/ml, en ausencia y presencia de la terapia TPD (trastuzumab 15 μ g/ml; pertuzumab 20 μ g/ml; docetaxel 0,5 y 1 nM, respectivamente). MC[CAF-200]: medio condicionado de CAF-200. S100-A11r: proteína S100-A11 recombinante. Los niveles de abundancia relativa de la regulación positiva o negativa de las proteínas se determinaron

mediante el análisis densitométrico de las imágenes, normalizándolos con el control de carga β -actina y con el respectivo control sin tratamiento. Se muestran imágenes representativas para $n=2$.

Adicionalmente, se detectó un aumento de p-ERK tras el tratamiento con azeliragon en las células tumorales incubadas con el medio condicionado de CAF-200 (1,44 vs 1,00 en BT-474; 1,30 vs 1,00 en EFM-192A), así como en BT-474 incubada con la proteína S100-A11 exógena y la terapia TPD (1,31 vs 1,00) (Figura 33. A, B).

Estos resultados permitieron caracterizar el efecto molecular de azeliragon en el modelo de resistencia generado con S100-A11 exógena y con el medio condicionado de CAF-200 en las líneas de cáncer de mama HER2+ BT-474 y EFM-192A, sugiriendo el eje de señalización S100-A11/AGER/p-STAT3 como potencial mecanismo molecular implicado en la resistencia a la terapia TPD en estas líneas celulares.

6. Significado clínico de la expresión de S100-A11 en los CAF y de p-STAT3 en células tumorales en la respuesta a la terapia anti-HER2 neoadyuvante en cáncer de mama precoz HER2+ humano

El papel de la proteína S100-A11 derivada de los CAF en la resistencia adquirida a la terapia anti-HER2 en combinación con docetaxel, observado en el modelo *in vitro* de este estudio, se exploró en una cohorte de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama precoz HER2+, tratadas con trastuzumab más pertuzumab más taxanos en esquema de neoadyuvancia. Con este objetivo, mediante IHQ en muestras de FFPE, se valoró la tinción de S100-A11 en el estroma, particularmente en los CAF, y de p-STAT3 en las células tumorales, evaluando la prevalencia y el significado clínico de su expresión en biopsias diagnósticas previas al tratamiento neoadyuvante.

6.1. Características clinico-patológicas de la cohorte

En la cohorte se incluyeron 77 muestras tumorales procedentes de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama precoz HER2+, previas al inicio del tratamiento neoadyuvante con trastuzumab y pertuzumab más quimioterapia. La serie de casos presentó una mediana de edad de 53 años (rango de edad 28-87 años) y una media de seguimiento de 4,58 años, cuyos datos demográficos se encuentran recogidos en la Tabla 7.

	N.º de casos (n = 77)	%	Baja expresión S100-A11 (n = 43; 55,8 %)		Alta expresión S100-A11 (n = 34; 44,2 %)		χ^2 p	Baja expresión p-STAT3 (n = 21; 27,3 %)		Alta expresión p-STAT3 (n = 56; 72,7 %)		χ^2 p
			N.º de casos	%	N.º de casos	%		N.º de casos	%	N.º de casos	%	
Edad (mediana, rango)	53 (28-87)											
Estado hormonal												
Premenopáusica	29	37,7	16	37,2	13	38,2	0,926	7	33,3	22	39,3	0,631
Postmenopáusica	48	62,3	27	62,8	21	61,8		14	66,7	34	60,7	
Historia familiar												
No	50	64,9	26	60,5	24	70,6	0,355	12	57,1	38	67,9	0,380
Sí	27	35,1	17	39,5	10	29,4		9	42,9	18	32,1	
Tipo morfológico												
NOS	69	89,6	41	95,3	28	82,4	0,097	20	95,2	49	85,7	0,507
CLI	5	6,5	2	4,7	3	8,8		1	4,8	4	7,1	
Otros	3	3,9	0	0	3	8,8		0	0,0	3	5,4	
Grado histológico (Scarff-Bloom-Richardson)												
II	23	29,9	14	32,6	9	26,5	0,562	4	19,0	19	33,9	0,204
III	54	70,1	29	67,4	25	73,5		17	81,0	37	66,1	
Estado ER												
Negativo	27	35,1	19	44,2	8	23,5	0,059	11	52,4	16	28,6	0,051
Positivo	50	64,9	24	55,8	26	76,5		10	47,6	40	71,4	
Estado PR												
Negativo	46	59,7	31	72,1	15	44,1	0,013	15	71,4	31	55,4	0,200
Positivo	31	40,3	12	27,9	19	55,9		6	28,6	25	44,6	
Ki-67												
< 20 %	10	13,0	4	9,3	6	17,6	0,358	3	14,3	7	12,5	0,232
≥ 20 %	67	87,0	39	90,7	28	82,4		18	85,7	49	87,5	

(Tabla 7. Continúa en la siguiente página)

	N.º de casos (n = 77)		Baja expresión S100-A11 (n = 43; 55,8 %)				χ^2 p	Alta expresión S100-A11 (n = 34; 44,2 %)				χ^2 p
	N.º de casos	%	Baja expresión p-STAT3 (n = 21; 27,3 %)		Alta expresión p-STAT3 (n = 56; 72,7 %)							
			N.º de casos	%	N.º de casos	%						
<i>(Tabla 7. Continúa de la página anterior)</i>												
T												
1	2	2,6	1	2,3	1	2,9	0,568	0	0,0	2	3,6	0,199
2	56	72,7	30	69,8	26	76,5		14	66,7	42	75,0	
3	12	15,6	6	14,0	6	17,6		3	14,3	9	16,1	
4	6	7,8	5	11,6	1	2,9		4	19,0	2	3,6	
Desconocido	1	1,3	1	2,3	0	0,0		0	0,0	1	1,8	
N												
0	38	49,4	20	46,5	18	52,9	0,492	10	47,6	28	50,0	0,830
1	37	48,1	22	51,2	15	44,1		11	52,4	26	46,4	
2	1	1,3	1	2,3	0	0,0		0	0,0	1	1,8	
3	1	1,3	0	0,0	1	2,9		0	0,0	1	1,8	

Tabla 7. Características clínico-patológicas de las pacientes de cáncer de mama precoz HER2+ en tratamiento con terapia anti-HER2 más quimioterapia en esquema de neoadyuvancia, y distribución de los casos en función de la expresión de S100-A11 en CAF y de p-STAT3 en células tumorales en relación con las características clínico-patológicas. Se muestra la distribución del número de casos y el porcentaje para cada categoría. Carcinoma NOS: carcinoma ductal infiltrante de tipo no especial. CLI: carcinoma lobulillar infiltrante. ER: receptor de estrógenos. PR: receptor de progesterona. T y N: tumor y nodo, respectivamente (sistema de estadificación TNM).

La mayoría de los casos de la serie fueron carcinoma infiltrante de tipo NOS (89,6 %), todos con grado histológico II y III, según el grado de Scarff-Bloom-Richardson. El 62,3 % de las pacientes fueron postmenopáusicas, y el 35,1 % tenía antecedentes familiares. Un 64,9 % de los casos presentó expresión para ER, el 40,3 % para PR, con un índice de proliferación Ki-67 alto (mayor o igual al 20 %) en el 87,0 % de los tumores (Tabla 7).

6.2. Identificación de la expresión y distribución celular y subcelular de S100-A11 y de p-STAT3 en muestras de cáncer de mama precoz HER2+ humano

En las secciones de tejido de los casos estudiados se observó la expresión de S100-A11, tanto a nivel estromal como tumoral. En el componente estromal se detectó expresión en fibroblastos asociados al tumor, tanto a nivel citoplasmático como nuclear, mostrando una distribución parcheada, de intensidad mayoritariamente moderada. Además, se detectó expresión de S100-A11 en algunas células inmunes mononucleares (principalmente linfocitos y macrófagos) y células endoteliales de ese estroma. En cuanto a las células tumorales, se observó un patrón de tinción de S100-A11 en general difuso, con una intensidad de expresión entre leve y fuerte. La detección en estas células fue predominantemente citoplasmática y, ocasionalmente, también nuclear (Figura 34. A-D).

S100-A11

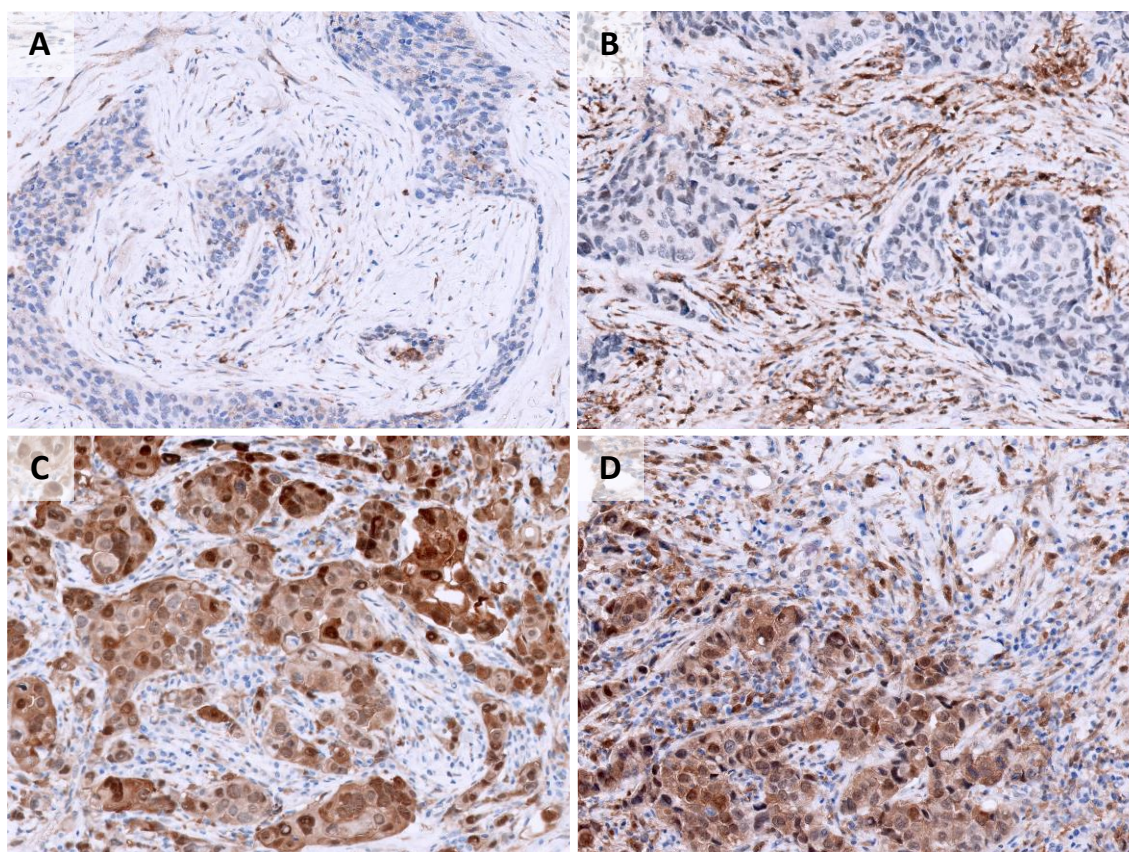


Figura 34. Imágenes representativas de la detección de S100-A11 (1:10000) mediante IHQ a partir de secciones de muestras FFPE de tumores de mama HER2+. **A.** Tinción leve y parcheada de S100-A11 en fibroblastos estromales y en células tumorales. **B.** Tinción de S100-A11 positiva de intensidad moderada en fibroblastos estromales con tinción negativa en células tumorales. **C.** Tinción de S100-A11 difusa y de intensidad variable en células tumorales con tinción negativa en fibroblastos estromales. **D.** Tinción positiva de S100-A11, difusa en células tumorales y parcheada en fibroblastos estromales, de intensidad variable. Tinción con DAB; contratinción con hematoxilina (imágenes 200x).

La expresión de p-STAT3 se observó de forma nuclear en células tumorales, con un patrón de tinción heterogénea, parcheada en la lesión, y de intensidad entre leve y fuerte. Acompañando a esa expresión nuclear se identificaba una tinción citoplasmática leve en las mismas células. En el componente estromal se halló tinción a nivel nuclear, principalmente en linfocitos, y ocasionalmente en células endoteliales y en algunas células inmunes mononucleadas (Figura 35. A, B).

p-STAT3

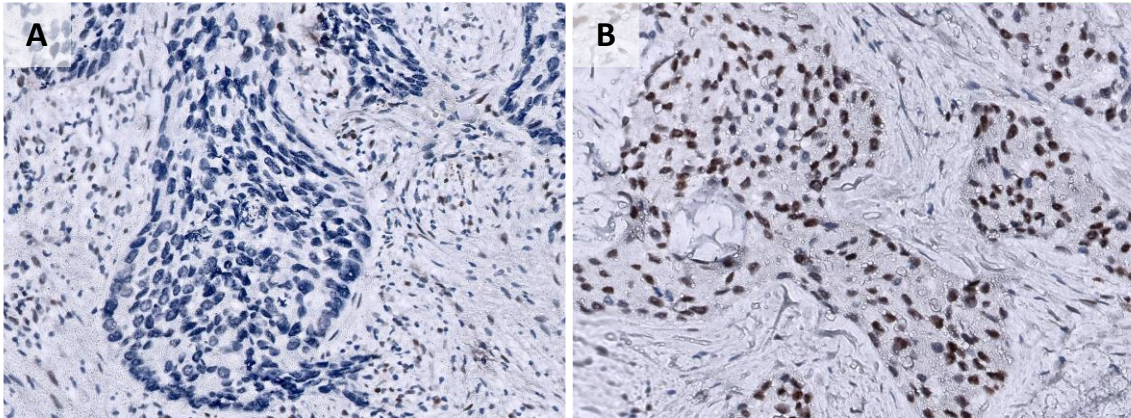


Figura 35. Imágenes representativas de la detección de p-STAT3 (1:200) mediante IHQ a partir de secciones de muestras FFPE de tumores de mama HER2+. **A.** Tinción negativa de p-STAT3 en células tumorales. **B.** Tinción de p-STAT3 positiva parcheada y de intensidad moderada en células tumorales. Tinción con DAB; contratinción con hematoxilina (imágenes 200x).

6.3. Definición de la sobreexpresión de S100-A11 en los CAF y de p-STAT3 en células tumorales

Para determinar el punto de corte que definiría la sobreexpresión de S100-A11 en los CAF y de p-STAT3 en células tumorales en la cohorte de estudio, a partir de los datos de *H-score* se realizó un análisis de curva ROC basado en la identificación de pacientes con enfermedad residual tras el tratamiento neoadyuvante (Figura 36. A, B). El punto de corte seleccionado que determinaría una alta expresión de S100-A11 en los CAF fue un valor de *H-score* superior o igual a 82, con una sensibilidad del 75,7 % y una especificidad del 72,5 %. En el caso de p-STAT3 en las células tumorales, se determinó como punto de corte un valor de *H-score* superior o igual a 11, con una sensibilidad y especificidad del 83,8 % y 32,5 %, respectivamente. El cálculo del área bajo la curva (AUC) para cada proteína definió un modelo de clasificación con un rendimiento moderado en el caso de S100-A11 (AUC = 0,680), y un clasificador de predicción débil o aleatoria en el caso de p-STAT3 (AUC = 0,513).

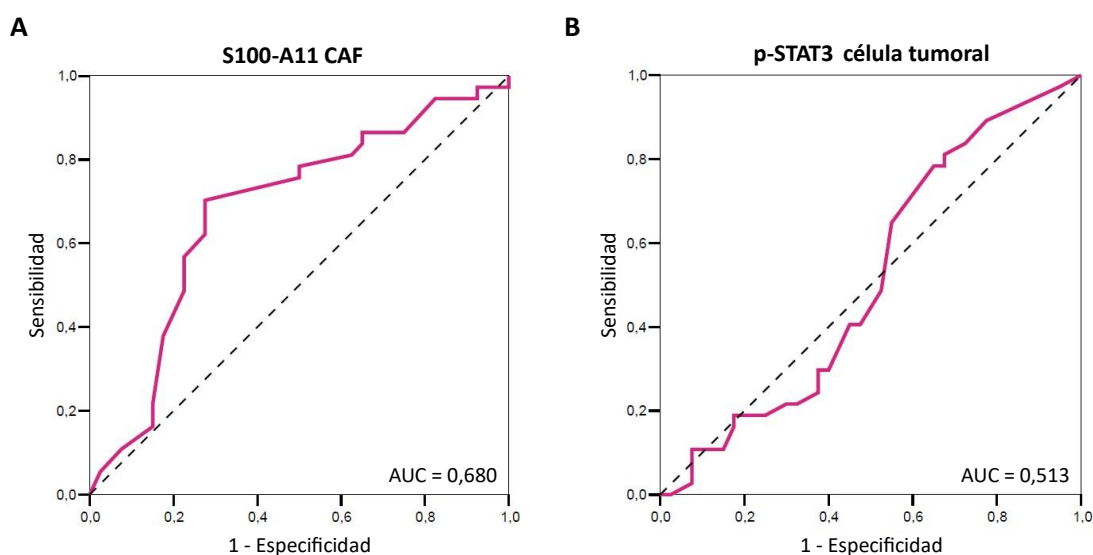


Figura 36. A, B. Representación de curva ROC para la determinación del punto de corte que define la sobreexpresión de S100-A11 en los CAF (fibroblastos asociados a cáncer) y de p-STAT3 en células tumorales, respectivamente. De acuerdo con el análisis de la curva ROC, basado en la identificación de casos con enfermedad residual tras el tratamiento neoadyuvante, el valor de H-score establecido como punto de corte fue de ≥ 82 (75,7 % de sensibilidad y 72,5 % de especificidad) para la sobreexpresión de S100-A11, y de ≥ 11 (83,8 % de sensibilidad y 32,5 % de especificidad) para la sobreexpresión de p-STAT3.

A partir de la determinación del valor de H-score en todos los casos de la cohorte, se valoró la distribución de estos en función del punto de corte establecido para cada proteína (Figura 37. A, B). Un 55,8 % de los casos (43/77) presentó baja expresión de S100-A11 en los CAF, mientras que el 44,2 % de los casos (34/77) mostró niveles altos de expresión. En el caso de p-STAT3 en las células tumorales el 27,3 % de los tumores analizados (21/77) tuvo niveles de expresión bajos, y en el 72,7 % de los casos (56/77) fueron altos (Tabla 7).

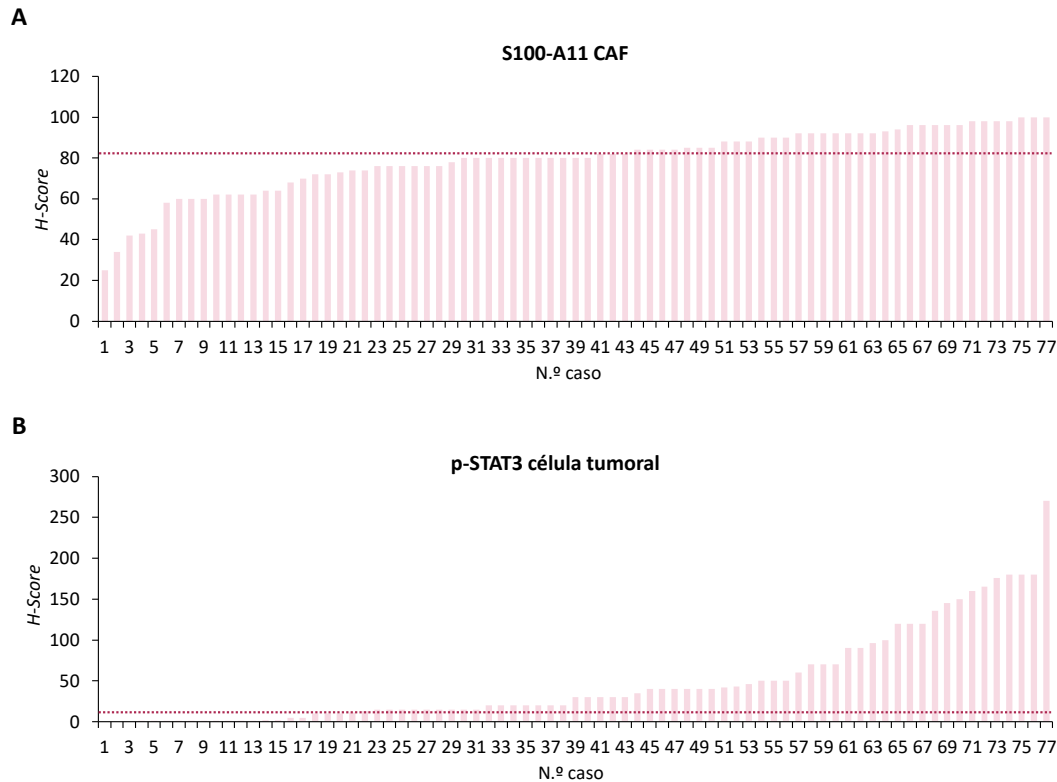


Figura 37. A, B. Representación de la distribución de los casos analizadas de pacientes con cáncer de mama precoz HER2+ en función del H-score determinado para S100-A11 en los CAF (fibroblastos asociados a cáncer) y para p-STAT3 en células tumorales, respectivamente. El punto de corte, representado por la línea de puntos, se estableció en ≥ 82 para S100-A11 y en ≥ 11 para p-STAT3. El número de caso (1-77) es representativo y no se corresponde con el mismo caso entre los gráficos A y B.

6.4. La sobreexpresión de S100-A11 en los CAF correlaciona con una alta expresión de p-STAT3 en las células tumorales en tumores de mama HER2+ de estadio precoz

Se midió el grado de asociación entre los niveles de expresión de S100-A11 en los CAF y los de p-STAT3 en células tumorales, ambas como variables continuas con escala de medida numérica (basada en los datos de *H-score*). Para ello se aplicó un análisis de correlación bivalente utilizando la prueba rho de Spearman, hallándose una correlación significativa entre los niveles de expresión de ambos marcadores (p -valor $< 0,001$). Sin embargo, dadas las diferencias en la escala de los valores de expresión entre ambos marcadores, no se halló una asociación lineal entre los dos rangos, obteniendo un coeficiente de correlación de Spearman moderado (ρ (ro) = 0,461).

Posteriormente, se analizó la correlación de la sobreexpresión de S100-A11 en los CAF, como variable discontinua (alta y baja expresión), con los niveles de expresión de p-STAT3 en células tumorales, como variable continua. La prueba no paramétrica U de Mann-Whitney mostró una correlación estadísticamente significativa (p -valor = 0,031), obteniendo niveles de expresión de p-STAT3 superiores en el grupo con alta expresión de S100-A11, respecto a los niveles obtenidos en el grupo con baja expresión de S100-A11 (Mediana H -score = 40 vs 15) (Figura 38).

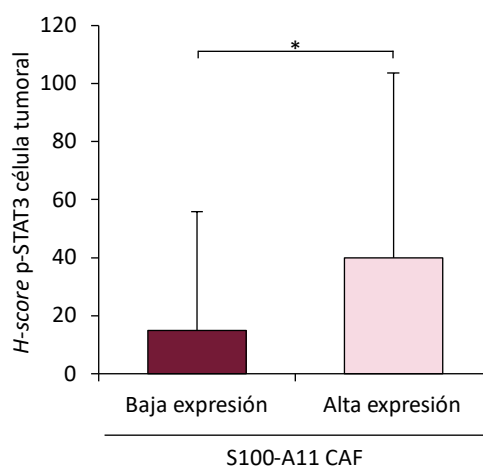


Figura 38. Representación de los niveles de expresión de p-STAT3 en células tumorales con relación a la sobreexpresión de S100-A11 en los CAF (fibroblastos asociados a cáncer). Se representa la mediana de H-score de p-STAT3 en las células tumorales respecto a la expresión de S100-A11 en los CAF, categorizada en baja y alta expresión. Las barras de error representan el valor calculado de la desviación estándar. (*): $p < 0,05$.

Finalmente, mediante la prueba de Chi-cuadrado se analizó la correlación entre la sobreexpresión de S100-A11 en los CAF y la sobreexpresión de p-STAT3 en las células tumorales, ambas como variables categóricas. De las pacientes que presentaron alta expresión de S100-A11 en los CAF, el 91,2 % de los casos (31/34) mostraron alta expresión de p-STAT3 en las células tumorales (p -valor < 0,001) (Figura 39) (Tabla 8). Dentro del grupo con baja expresión de S100-A11 en los CAF, el 58,1 % de los tumores tuvieron alta expresión de p-STAT3 en célula tumoral (25/43) (p -valor < 0,001).

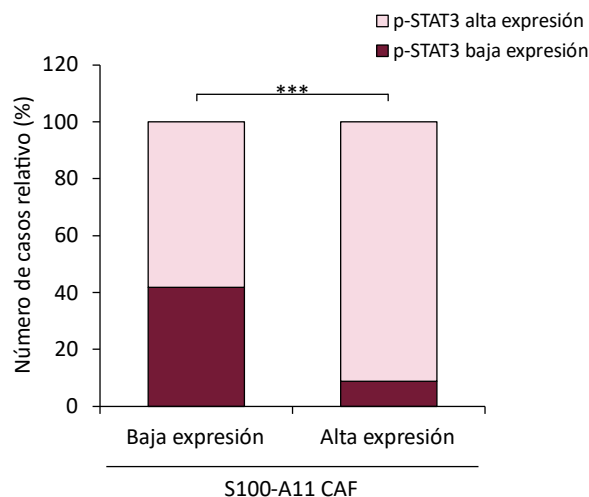


Figura 39. Asociación entre la sobreexpresión de S100-A11 en los CAF (fibroblastos asociados a cáncer) y la sobreexpresión de p-STAT3 en células tumorales. Representación del porcentaje de casos con alta y baja expresión de p-STAT3 en células tumorales en relación con la alta y baja expresión de S100-A11 en los CAF. (***) : p-valor < 0,001.

	S100-A11 CAF				χ^2 p
	Baja expresión		Alta expresión		
	N.º de casos (n = 43)	%	N.º de casos (n = 34)	%	
p-STAT3 célula tumoral					
Baja expresión	18	41,9	3	8,8	< 0,001
Alta expresión	25	58,1	31	91,2	

Tabla 8. Asociación entre la expresión de S100-A11 en los CAF (fibroblastos asociados a cáncer) y de p-STAT3 en células tumorales. Se muestra la distribución del número de casos y el porcentaje para cada categoría.

En resumen, la asociación entre la sobreexpresión de S100-A11 en los CAF y de p-STAT3 en las células tumorales fue demostrada mediante su análisis como variables discontinuas, es decir, definiendo para cada proteína dos categorías de expresión (alta y baja), y también como variables continuas con un rango numérico correspondiente a los niveles de expresión. Los resultados de estos análisis, en conjunto, permitieron confirmar en casos clínicos que existe una asociación entre el papel biológico que efectúan estas proteínas en tumores de mama HER2+, sugiriendo la relación entre el mecanismo molecular asociado a la proteína S100-A11 derivada de los CAF y la activación de STAT3 en las células tumorales.

6.5. Asociaciones clínico-patológicas de S100-A11 en los CAF y de p-STAT3 en células tumorales

Se analizó la correlación de la sobreexpresión de S100-A11 en los CAF y la de p-STAT3 en células tumorales con las variables clínico-patológicas estudiadas en la cohorte. La sobreexpresión de los marcadores no correlacionó con el estado hormonal, historia familiar, grado y tipo histológicos, proliferación, o tamaño tumoral (Tabla 7). Se identificó una correlación estadísticamente significativa entre la sobreexpresión de S100-A11 y la expresión de PR. Aunque no se alcanzó la significancia estadística, se detectó una posible asociación entre la expresión de ER y la sobreexpresión de S100-A11 (p -valor = 0,059) y de p-STAT3 (p -valor = 0,051).

6.6. La sobreexpresión de S100-A11 en los CAF correlaciona con la presencia de enfermedad residual tras el tratamiento neoadyuvante en tumores de mama HER2+ de estadio precoz

La expresión de S100-A11 en los CAF correlacionó de forma significativa con la respuesta patológica del tumor (p -valor < 0,001). De los tumores que presentaron baja expresión de S100-A11 en los CAF, el 81,4 % tuvieron respuesta completa tras el tratamiento neoadyuvante (Miller y Payne G5), frente a un 29,4 % de los tumores con alta expresión de S100-A11 que presentaron respuesta completa (p -valor < 0,001) (Tabla 9). En cuanto a la respuesta axilar, si bien no se detectó una correlación con la expresión de S100-A11, se observó una mayor proporción de casos que presentaron tumor en axila (respuesta B o D) en el grupo con alta expresión de S100-A11 (23,5 % dentro de este grupo de tumores) respecto a la proporción de número de casos en los que se detectó tumor en axila dentro del grupo con baja expresión de S100-A11 (9,3 % dentro de este grupo de tumores) (Tabla 9). La expresión de p-STAT3 en las células tumorales, sin embargo, no correlacionó con la respuesta tumoral y axilar tras la terapia neoadyuvante.

	S100-A11 CAF				χ^2 p	p-STAT3 célula tumoral				χ^2 p
	Baja expresión		Alta expresión			Baja expresión		Alta expresión		
	N.º de casos (n = 43)	%	N.º de casos (n = 34)	%		N.º de casos (n = 21)	%	N.º de casos (n = 56)	%	
Respuesta tumoral (Miller y Payne)										
G3	4	9,3	10	29,4	< 0,001	5	23,8	9	16,1	0,600
G4	4	9,3	14	41,2		1	4,8	17	30,3	
G5	35	81,4	10	29,4		15	71,4	30	53,6	
Respuesta axilar (Miller y Payne modificado)										
Tumor ausente (A, D)	39	90,7	26	76,5	0,087	18	85,7	47	83,9	0,847
Tumor presente (B, C)	4	9,3	8	23,5		3	14,3	9	16,1	
Tumor residual										
Ausente	32	74,4	8	23,5	< 0,001	13	61,9	27	48,2	0,284
Presente	11	25,6	26	76,5		8	38,1	29	51,8	

Tabla 9. Asociación entre la expresión de S100-A11 en los CAF (fibroblastos asociados a cáncer) y de p-STAT3 en células tumorales con la respuesta patológica del tumor, la respuesta axilar y la presencia de tumor residual tras el tratamiento neoadyuvante. Se muestra la distribución del número de casos y el porcentaje para cada categoría.

Se analizó la ausencia o presencia de tumor residual en los casos tras recibir el tratamiento neoadyuvante, entendiendo la ausencia de tumor residual como respuesta patológica completa (pCR), correspondiente con una respuesta tumoral G5 más una respuesta axilar A o D. El análisis de asociación entre la sobreexpresión de S100-A11 en los CAF y la presencia de enfermedad residual reveló una correlación estadísticamente significativa (p -valor $< 0,001$). De los tumores clasificados con alta expresión de S100-A11 en los CAF, el 76,5 % presentó tumor residual tras el tratamiento neoadyuvante (26/34), no alcanzando la pCR. De los casos con baja expresión de S100-A11 en los CAF la mayoría, un 74,4 %, no presentó tumor residual, consiguiendo por lo tanto la pCR (32/43) (Tabla 9).

Aunque no se observó correlación entre la expresión de p-STAT3 en las células tumorales y la presencia de tumor residual (p -valor = 0,284), se detectó un mayor número de casos con tumor residual dentro del grupo con alta expresión de p-STAT3 (51,8 %; 29/56) respecto al identificado dentro del grupo con baja expresión de p-STAT3 (38,1 %; 8/21) (Tabla 9).

Los datos manifestaron una correlación positiva entre la expresión de S100-A11 en los CAF y la presencia de tumor en mama y axila, asociándose a la presencia de enfermedad residual tras el tratamiento neoadyuvante. Esta asociación entre la expresión de S100-A11 en los CAF y la presencia de enfermedad residual postratamiento reflejó su valor pronóstico en los tumores de mama HER2+ de estadio precoz. Por otro lado, su correlación con la presencia de enfermedad residual tras el tratamiento neoadyuvante también estaría sugiriendo que S100-A11 en los CAF podría tener un valor como marcador predictivo de respuesta patológica a la terapia anti-HER2 neoadyuvante en las pacientes de cáncer de mama precoz HER2+. Por otro lado, los datos de correlación no mostraron una asociación entre la expresión de p-STAT3 y la respuesta patológica de los tumores de mama HER2+ tras el tratamiento neoadyuvante, por lo que los resultados de este trabajo no reflejaron un posible papel para p-STAT3 como factor asociado al pronóstico y/o a la respuesta a la terapia anti-HER2 en los tumores de mama HER2+ de estadio precoz.

Del total de pacientes evaluadas, un 9,1 % de los casos manifestó recaída del tumor (7/77). En el análisis de correlación no se encontró asociación de la recaída con la sobreexpresión de S100-A11 en los CAF (p -valor = 0,942) ni con la de p-STAT3 en las células tumorales (p -valor = 0,332) (Tabla 10).

	S100-A11 CAF				χ^2 p	p-STAT3 célula tumoral				χ^2 p
	Baja expresión		Alta expresión			Baja expresión		Alta expresión		
	N.º de casos (n = 43)	%	N.º de casos (n = 34)	%		N.º de casos (n = 43)	%	N.º de casos (n = 34)	%	
Recaída										
No	39	90,7	31	91,2	0,942	18	85,7	52	92,9	0,332
Sí	4	9,3	3	8,8		3	14,3	4	7,1	

Tabla 10. Asociación entre la expresión de S100-A11 en los CAF (fibroblastos asociados a cáncer) y de p-STAT3 en células tumorales con recaída del tumor. Se muestra la distribución del número de casos y el porcentaje para cada categoría.

En el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier no se detectaron diferencias en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) de las pacientes en relación con la sobreexpresión de S100-A11 en los CAF (p -valor = 0,135) (Figura 40. A). El número de eventos que presentaron *exitus* por enfermedad fue de 3 (3,9 % de los casos). Así, el análisis de las curvas de supervivencia global (SG) tampoco arrojó diferencias en relación con la sobreexpresión de S100-A11 en los CAF (p -valor = 0,683) (Figura 40. B).

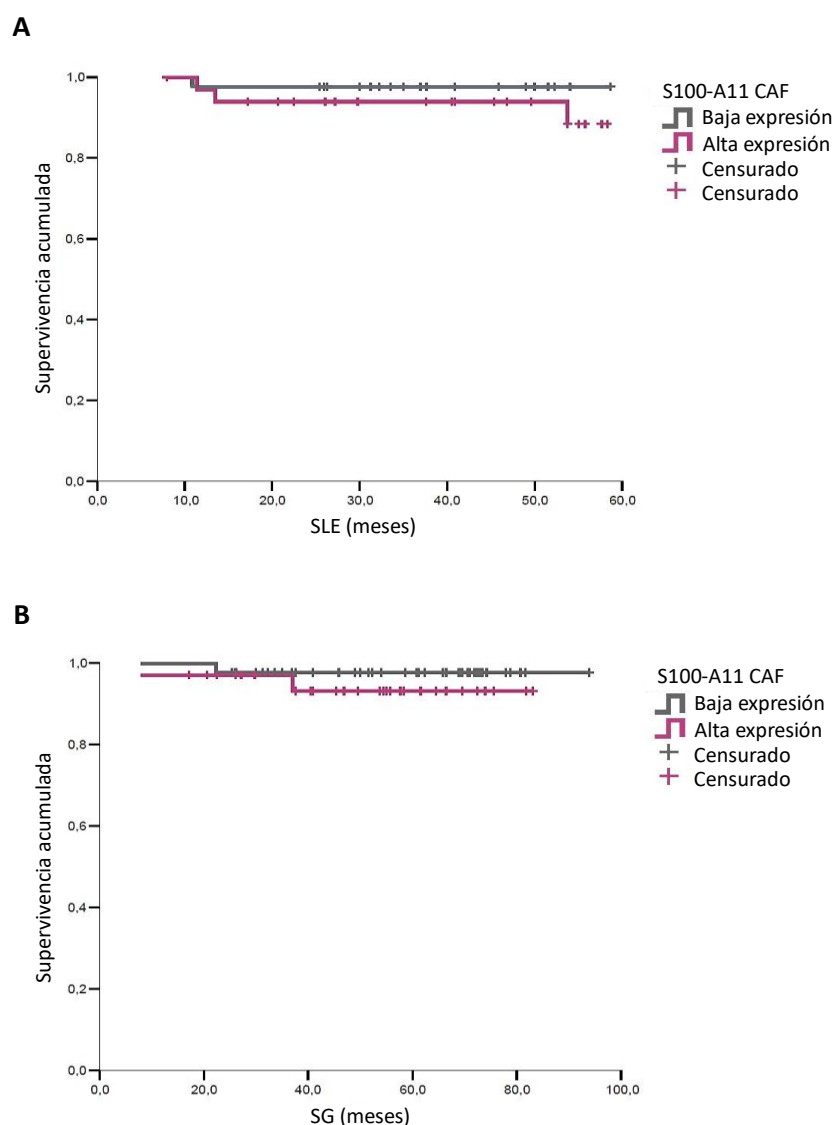


Figura 40. A, B. Análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y de la supervivencia global (SG), respectivamente, en la cohorte de 77 casos de cáncer de mama precoz HER2+ en esquema de tratamiento neoadyuvante con terapia anti-HER2 más quimioterapia.

Finalmente, se analizó la asociación entre la expresión agrupada de S100-A11 en los CAF y de p-STAT3 en células tumorales con la presencia de tumor residual tras la terapia neoadyuvante. La mayoría de los tumores clasificados con baja expresión de S100-A11 no presentaron tumor

residual, tanto el grupo que además presentaba baja expresión de p-STAT3 (61,1 %), como el grupo con alta expresión de p-STAT3 (84,0 %) (Tabla 11). Dentro del grupo de tumores con alta expresión de S100-A11 en los CAF y alta expresión de p-STAT3 en células tumorales el 80,6 % presentaron enfermedad residual postratamiento (Tabla 11). Por otro lado, del total de tumores en los que se identificó presencia de tumor residual, el grupo más frecuente fue el de los tumores con alta expresión de S100-A11 acompañada de una alta expresión de p-STAT3 (25/37, representando un 67,6 % del total de los casos que tenían tumor residual). Por último, cabe mencionar que sólo hubo tres casos clasificados dentro del grupo de tumores con alta expresión de S100-A11 en los CAF y baja expresión de p-STAT3 en célula tumoral, por lo que no se pudo establecer una asociación concluyente respecto a la presencia de enfermedad residual dentro de esta categoría.

	S100-A11 bajo p-STAT3 bajo		S100-A11 bajo p-STAT3 alto		S100-A11 alto p-STAT3 bajo		S100-A11 alto p-STAT3 alto		χ^2 p
	N.º de casos (n = 18)	%	N.º de casos (n = 25)	%	N.º de casos (n = 3)	%	N.º de casos (n = 31)	%	
Tumor residual									
Ausente	11	61,1	21	84,0	2	66,7	6	19,4	< 0,001
Presente	7	38,9	4	16,0	1	33,3	25	80,6	

Tabla 11. Asociación de la expresión conjunta de S100-A11 en los CAF y de p-STAT3 en células tumorales con la presencia de tumor residual tras el tratamiento neoadyuvante. “Alto” y “bajo” hacen referencia a la alta y baja expresión, respectivamente. Se muestra la distribución del número de casos y el porcentaje para cada categoría.

La baja expresión de S100-A11 en los CAF en los tumores de mama HER2+ de estadio precoz se asoció a la ausencia de tumor residual postratamiento, por lo que la mayoría de estos tumores alcanzaron la pCR, tanto si iba acompañada de una alta como de una baja expresión de p-STAT3 en las células tumorales. Por otro lado, en el grupo de tumores con sobreexpresión de S100-A11 y de p-STAT3 la mayoría de los casos no alcanzaron pCR, siendo además éste el grupo de tumores más frecuente dentro del total de los casos identificados con presencia de tumor residual tras el tratamiento neoadyuvante. En conjunto, estos resultados mostraron de nuevo el valor de la proteína S100-A11 en los CAF como un factor asociado a la presencia de enfermedad residual y, por lo tanto, a un peor pronóstico de las pacientes de cáncer de mama HER2+ de estadio precoz. La correlación de su expresión con una peor pCR tras el tratamiento neoadyuvante sugirió su posible valor como un factor predictivo de respuesta a la terapia anti-HER2.

Discusión



Los tumores de mama HER2+ constituyen aproximadamente un 15-20 % de los tumores de mama diagnosticados. El tratamiento de elección en estas pacientes, basado en la terapia anti-HER2, con trastuzumab y pertuzumab, en combinación con taxanos ha mejorado significativamente el resultado clínico en estadios precoces [53,249]. Sin embargo, una proporción significativa de las pacientes no responde al tratamiento y desarrolla una resistencia clínica, por lo que estudiar y comprender cómo se desarrolla la resistencia a la terapia anti-HER2, así como la búsqueda de estrategias para revertirla, continúan siendo una prioridad clínica [53,74].

La literatura demuestra que el TME juega un papel crucial en la regulación de numerosos procesos biológicos en las células tumorales, condicionando el comportamiento del tumor y su respuesta a la terapia en diversos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama. Dentro del TME, uno de los componentes celulares que predomina en el estroma tumoral son los fibroblastos que se encuentran asociados con las células cancerosas, denominados CAF. Los estudios han prestado especial atención a los CAF como uno de los principales contribuyentes a la comunicación entre las células tumorales y las células estromales circundantes [92,93,250]. Esto es debido a su capacidad para producir y secretar una variedad de factores de crecimiento y citocinas, con una gran influencia en el comportamiento del tumor, afectando a la proliferación tumoral, la metástasis y la resistencia a tratamientos [125,251,252]. La creciente evidencia sugiere que el beneficio clínico y la superación de la resistencia a fármacos, incluyendo las terapias anti-HER2, podrían reorientar los protocolos terapéuticos a los CAF, destacando la relevancia de la identificación de candidatos o marcadores modulables en el secretoma de los fibroblastos estromales [251,253].

1. Efecto del secretoma del fibroblasto CAF-200 en la respuesta a la terapia TPD en líneas celulares de cáncer de mama HER2+

A través de la secreción de múltiples factores, los CAF modulan el comportamiento de las células tumorales, condicionando en algunos casos su respuesta a la terapia. El medio procedente de células en cultivo, denominado medio condicionado, contiene el conjunto de proteínas secretadas por las células (secretoma) y constituye una aproximación experimental ampliamente utilizada en estudios que abordan el efecto paracrino de líneas celulares [254]. Los ensayos *in vitro* comprendidos en este trabajo se basaron en un modelo experimental con medio condicionado derivado de una línea de CAF (de tumor HER2+), denominada CAF-200, tratada con trastuzumab más pertuzumab más docetaxel (TPD). Se analizó su efecto en la respuesta a la

terapia TPD de las líneas celulares HER2+ BT-474 y EFM-192A, cuya sensibilidad a la terapia anti-HER2 ha sido ampliamente estudiada en nuestro grupo de manera previa [212].

Los ensayos de proliferación con medio condicionado de CAF-200 permitieron caracterizar el efecto del fibroblasto CAF-200 en la respuesta de las dos líneas HER2+ al tratamiento con TPD. Los resultados sugirieron que CAF-200 secreta una variedad de factores solubles con un efecto estadísticamente significativo en la respuesta a la terapia anti-HER2 de BT-474 y EFM-192A, demostrando ambas líneas tumorales un aumento de la resistencia a TPD. Estos resultados concuerdan con el estudio publicado previamente por Mao y colaboradores, en el que se demostró el papel de los CAF en la generación de resistencia a trastuzumab en líneas celulares de cáncer de mama HER2+, a través de la activación de vías como PI3K/AKT/mTOR y JAK/STAT3, y de la expansión de las CSC [255]. En el trabajo de Guardia y colaboradores, la inducción de resistencia a la terapia anti-HER2 basada en trastuzumab y pertuzumab por el efecto paracrino de los CAF fue también indicada en líneas celulares de cáncer de mama HER2+, incluyendo BT-474 [256]. Por otro lado, la contribución de los CAF en la resistencia a trastuzumab en BT-474 también ha sido asociada al efecto inmunomodulador que presentan algunas subpoblaciones específicas de fibroblastos estromales [135]. Basándose en un modelo de medio condicionado procedente de CAF, el grupo de Zervantonakis señaló su efecto en la resistencia de BT-474 y EFM-192A al tratamiento con lapatinib [257]. Además, investigaciones recientes han señalado el enriquecimiento de subpoblaciones específicas de CAF (CAF-S1 o CAF PDPN⁺) en tumores con resistencia a trastuzumab, sugiriendo su participación en la generación del fenotipo resistente a la terapia anti-HER2 [258,259]. Sonnenblick y colaboradores, a partir de muestras de cáncer de mama HER2+ del ensayo clínico FinHer, mostraron una asociación entre la resistencia a trastuzumab y la presencia de un estroma con elevada proporción de miofibroblastos reactivos [138]. A pesar de la evidencia existente acerca de los CAF y su contribución a la resistencia a trastuzumab y otras terapias anti-HER2, hasta la fecha no se han publicado estudios que describan su efecto en la respuesta a la terapia basada en la combinación de trastuzumab y pertuzumab con taxanos.

Los cultivos 3D proporcionan, respecto a los cultivos en monocapa, un modelo con una mayor complejidad de interacción intercelular y un gradiente en la distribución de nutrientes, factores solubles y fármacos del medio extracelular. Su uso en estudios de sensibilidad a fármacos en células tumorales resulta interesante al disponer de una citoarquitectura más representativa del tumor [227]. Estudios previos han explorado el efecto de los CAF en modelos de esferoides de líneas tumorales de cáncer de mama [260,261] y, específicamente, algunos trabajos han evaluado la respuesta a trastuzumab de BT-474 y EFM-192A en modelos celulares basados en

esferoides [262–264]. El modelo 3D multicultivo empleado por Nguyen y colaboradores permitió caracterizar el efecto antagónico de los CAF y trastuzumab en BT-474, resultando en una disminución de la respuesta ADCC mediada por el anticuerpo anti-HER2 [135]. Sin embargo, no hay evidencia científica del resultado del tratamiento con la combinación de trastuzumab y pertuzumab más quimioterapia en modelos 3D de líneas celulares de cáncer de mama HER2+, ni del efecto de los CAF en la modulación de la respuesta a esta combinación terapéutica. En el modelo tridimensional generado en este trabajo destacó el efecto del medio condicionado de CAF-200 en la promoción de la formación de esferoides de las dos líneas tumorales aún en presencia de la terapia TPD, contrarrestando el efecto de ésta observado en condiciones basales. Este papel protector del fibroblasto podría estar relacionado con la resistencia a la terapia observada previamente en los cultivos 2D en monocapa. Cabe mencionar que los ensayos de formación de esferoides tienen una gran utilidad en el estudio de CSC, debido a la capacidad de esta subpoblación de células para crecer en condiciones de independencia de anclaje. El enriquecimiento de CSC dentro del nicho tumoral se ha relacionado con la resistencia a trastuzumab [255,265] y con la actividad paracrina de los CAF [112,157,266], por lo que el modelo de este trabajo podría complejizarse para adaptarlo al estudio de CSC [267,268] con el fin de evaluar si la resistencia a la terapia TPD generada por CAF-200 estaría mediada a través de la inducción de un fenotipo *stem*.

La transformación inducida por el estroma en las células tumorales durante la adquisición de resistencia a terapias puede ir acompañada, en determinados casos, de la promoción de características como la migración e invasión celular [252]. Los ensayos de migración con líneas HER2+ demostraron que las moléculas secretadas por CAF-200 conferirían también a las células una mayor capacidad migratoria, incluso en presencia del tratamiento con TPD. Numerosos estudios han demostrado la influencia de los CAF en la migración de células de cáncer de mama mediante ensayos con medio condicionado [229,269]. Wen y colaboradores demostraron que la IL-32 contenida en el sobrenadante derivado de los CAF activaba en la línea de cáncer de mama TN BT-549 la señalización intracelular mediada por la proteína MAPK p38, produciendo un incremento en su capacidad de migración [270]. Por otro lado, el grupo de Pelon determinó la función paracrina de subpoblaciones específicas de CAF, identificadas a partir de secciones de nodos linfáticos de tumores de mama metastásicos, en la regulación positiva de la capacidad invasiva de las líneas celulares luminales MCF-7 y T47D [229]. Tanto la migración celular como la resistencia a la terapia se encuentran estrechamente relacionadas con las propiedades mesenquimales adquiridas durante el proceso de EMT, en el cual los CAF han demostrado tener un papel clave en cáncer de mama [271].

La modulación de la respuesta al tratamiento que experimentan las células tumorales como consecuencia de las secreciones del microambiente viene determinada por la regulación de múltiples cascadas de señalización intracelular. El análisis de la expresión y fosforilación de proteínas implicadas en las vías de señalización de JAK/STAT3, MAPK/ERK, y PI3K/AKT/mTOR permitió indagar en posibles mecanismos moleculares asociados a la resistencia a la terapia TPD inducida por el fibroblasto CAF-200. Tras la adición del medio condicionado de CAF-200 y en presencia de la terapia, destacó de forma notable el incremento en la fosforilación de STAT3 y ERK, sugiriendo la activación de las rutas JAK/STAT3 y MAPK/ERK en las células tumorales en condiciones de resistencia a la terapia.

El factor de transcripción STAT3 se ha reportado ampliamente en la literatura como regulador transcripcional en cáncer, incluyendo el cáncer de mama [272,273]. Su activación se ha relacionado con la adquisición de resistencia a trastuzumab en cáncer de mama HER2+ [230,274,275] y a docetaxel en TN [276]. La activación de STAT3 sugerida en nuestro modelo de resistencia concuerda con los resultados previos de Mao y colaboradores, en los que describieron la generación de resistencia a trastuzumab por efecto del secretoma de los CAF mediante la activación de la vía JAK/STAT3 en células BT-474 [255]. La investigación reciente llevada a cabo por el grupo de Dittmer también indicó la fosforilación de STAT3 en BT-474 como un evento de señalización intracelular asociado al mecanismo de resistencia a fulvestrant (un antagonista de ER) mediado por el efecto paracrino de los CAF [277]. Además, la activación del factor de transcripción ha sido asociada a la resistencia a lapatinib y a taxanos mediada por los CAF, en cáncer de mama y cáncer de ovario, respectivamente [261,278].

La activación de STAT3 en las células tumorales también se asocia al incremento de la capacidad de migración e invasión a través de la inducción de propiedades mesenquimales [272], por lo que el incremento en la migración de las líneas HER2+ observado tras la adición del medio de los fibroblastos CAF-200 podría estar mediada en parte por la activación de STAT3.

La literatura sugiere la vía MAPK/ERK como mecanismo implicado en la resistencia a fármacos en cáncer [279,280]. En estudios previos en nuestro grupo se demostró la activación de ERK como mecanismo de resistencia a trastuzumab asociado al efecto autocrino de CCL5 en líneas celulares de cáncer de mama HER2+ [281]. Por otro lado, diversos estudios han señalado el efecto del estroma, mediante la activación de ERK, en la resistencia a inhibidores de *BRAF*, en modelos de melanoma y glioma [279,282]. Específicamente, el papel de los CAF en la inducción de resistencia a trastuzumab mediante la activación de ERK en líneas celulares de cáncer de mama HER2+ fue también indicado en la investigación de Mao y colaboradores [255]. No

obstante, por el momento la literatura carece de estudios publicados que señalen la activación de ERK específicamente en modelos de resistencia a terapia anti-HER2 combinada con taxanos mediada por los CAF.

2. Análisis del secretoma de CAF-200 e identificación de dianas potenciales a la generación de resistencia a TPD

La evidencia científica señala que diversos tratamientos, incluyendo la quimioterapia y terapias dirigidas, inducen en los CAF una potente remodelación fenotípica, determinando el espectro de proteínas que secretan al espacio extracelular [116,118–120,283]. Aunque algunos trabajos han demostrado la influencia de la quimioterapia en los CAF, incluyendo en los tumores de mama [121,284], la literatura no contempla estudios que analicen el efecto del tratamiento anti-HER2 combinado con taxanos en los CAF de tumores HER2+.

Dado que el fenotipo de los CAF y su perfil secretor se encuentran regulados por los mecanismos de reprogramación y la señalización intracelular [100], de forma previa al estudio del secretoma se analizó el efecto del tratamiento con TPD en la proliferación, migración y señalización intracelular del fibroblasto CAF-200. Se conoce que la supervivencia, motilidad y actividad migratoria de los CAF dependen en gran parte de la activación de ERK [285], así como de AKT y STAT3 [103,286,287]. En tumores de mama, el grupo de Eck describió que la activación de ERK aumentaba el fenotipo invasor y la capacidad de migración de los CAF [288]. De acuerdo con estos datos, los fibroblastos CAF-200 mostraron en los ensayos de migración una actividad potenciada tras el tratamiento con TPD, paralelamente con un incremento en la fosforilación de ERK y una tendencia al alza en la de AKT y STAT3. Sin embargo, la proliferación del fibroblasto, en este caso, no se vio alterada tras el tratamiento. Por otro lado, la expresión de Snail en los CAF ha sido descrita como factor crucial en su activación, siendo asociada además a un fenotipo de CAF relacionado con la inducción de fenotipos tumorales quimiorresistentes [100,234,235]. En este caso, el fibroblasto CAF-200 mostró un incremento en la expresión de Snail que, según indicaron Zhang y colaboradores en su trabajo, podría estar vinculado con el aumento de la actividad de ERK en los CAF [289].

La caracterización del secretoma de los CAF mediante el análisis proteómico se ha convertido durante la última década en un procedimiento habitual en investigación [290]. Aunque inicialmente estos estudios se han enfocado en el análisis comparativo del secretoma de los CAF y los NAF [291–293], el propósito de indagar en el papel de los CAF durante el tratamiento (y dilucidar posibles mecanismos de resistencia mediados por su efecto paracrino) ha conducido a varios investigadores a explorar la modulación del secretoma de los fibroblastos tras su

tratamiento con diversas terapias [117–119,294]. El análisis mediante espectrometría de masas llevado a cabo en este trabajo permitió conocer el perfil de citocinas, factores de crecimiento y proteínas solubles del secretoma del fibroblasto CAF-200. La estrategia de análisis reveló proteínas moduladas de forma significativa en el secretoma tras el tratamiento del fibroblasto con la terapia TPD.

Las proteínas sobreexpresadas fueron filtradas en base a criterios de robustez analítica que garantizaron su selección, y posteriormente fueron empleadas en análisis de enriquecimiento de rutas y de redes de interacción. El análisis de sobrerrepresentación de vías de señalización ofreció información mecanística preliminar sobre el listado de proteínas derivadas del secretoma del fibroblasto, indicando su participación en vías de señalización implicadas en procesos oncogénicos, asociadas al aumento de la proliferación y supervivencia celular. También se identificaron reacciones de resistencia a trastuzumab, entre otros, como procesos sobrerrepresentados en el análisis. En conjunto, estos resultados sugirieron el presumible papel de algunas proteínas derivadas del secretoma de CAF-200 en el estímulo de la supervivencia y la generación de resistencia en las células tumorales. Por otro lado, las redes de interacción de proteínas mostraron un panorama inicial integrando las posibles conexiones físicas y funcionales que podrían darse durante la actividad celular de dichas proteínas. Las proteínas 14-3-3 ζ y HSP90- α formaron uno de los nodos de interacción observados y, aunque la revisión de la literatura científica arrojó datos que sugerían su interacción física [238], no se halló descrita su interacción funcional. Por otro lado, la predicción de la base de datos de STRING también sugirió la interacción funcional de CCL2 y PAI-1 en secretomas proinflamatorios en distintos modelos celulares [241,242,295]. En conjunto, los análisis de anotación funcional y de interacción reforzaron la hipótesis sobre la función de las proteínas sobreexpresadas en el secretoma de CAF-200 en la activación de procesos oncogénicos y la generación de fenotipos resistentes, contribuyendo además al argumento para la selección de las proteínas en los posteriores ensayos. Cabe señalar que esta red de interacción no considera la posible interacción de las proteínas del secretoma seleccionadas con otras que no hayan quedado contempladas en el análisis, por ejemplo, al no estar sobreexpresadas tras el tratamiento con TPD del fibroblasto. Además, en la generación de resistencia a la terapia no sólo participan diferentes proteínas, sino también otro tipo de moléculas efectoras, como los microRNA, cuyo análisis no ha sido incluido en este trabajo y que también pueden regular la actividad de las proteínas estudiadas.

El listado de proteínas identificadas en el secretoma del fibroblasto CAF-200 se acotó finalmente mediante el estudio bibliográfico de cada una de ellas, reduciéndolo a un número de seis proteínas que constituyeron el núcleo de candidatos para valorar su contribución en la

resistencia adquirida a TPD en las líneas celulares de cáncer de mama HER2+. Los criterios de selección en relación con la literatura revisada incluyeron: el papel de la proteína en tumores en la adquisición de fenotipos resistentes a terapias dirigidas (incluyendo la terapia anti-HER2) o fenotipos quimiorresistentes; su contribución en la regulación positiva de procesos celulares y biológicos relacionados con la tumorigénesis en el cáncer de mama, incluyendo el cáncer de mama HER2+; las funciones extracelulares identificadas para la proteína y, en particular, como molécula secretada por células del estroma tumoral; estudios del valor pronóstico de la proteína o su posible potencial como diana “accionable” con posible utilidad clínica.

Las proteínas seleccionadas, en última instancia, fueron: 14-3-3 ζ , CCL2, HMGB1, HSP90- α , PAI-1 y S100-A11. La literatura científica recoge diversos trabajos en los que se ha dilucidado el papel funcional de la proteína 14-3-3 ζ en la regulación de la resistencia a fármacos en cáncer. Los estudios avalan su función en la generación de quimiorresistencia en múltiples tipos de tumor, incluyendo tumores gástricos, de vejiga y de mama [296–298], asociándose en este último a la resistencia a antraciclinas a través de la inhibición de la apoptosis inducida por fármacos [299]. En cáncer de mama, también se ha indicado su papel en la generación de resistencia a paclitaxel y a doxorubicina, mediante la formación de ejes de señalización con microRNAs específicos [300,301]. Además, la secreción de 14-3-3 ζ por macrófagos del estroma tumoral de tumores de páncreas ha sido reportada como mecanismo asociado a quimioresistencia [302]. Por otro lado, la quimiocina CCL2 juega un papel clave en el TME, así como su receptor, CCR2 [303], por lo que el bloqueo de este eje de señalización, de manera individual o en combinación con otros agentes terapéuticos, ha sido ampliamente explorado en la literatura científica, incluyendo ensayos clínicos en cáncer de páncreas, de próstata y de mama [304–306]. El papel de CCL2 en el estroma tumoral se ha asociado principalmente al reclutamiento de macrófagos protumorigénicos; en tumores de mama y gástricos HER2+ esta función ha demostrado estar vinculada a la eficacia de trastuzumab [307,308]. Además, la literatura indica la contribución de CCL2 en la resistencia a tamoxifeno en tumores de mama ER+ [309] y a quimioterapia, incluyendo paclitaxel, en tumores de ovario [310]. La función extracelular de HMGB1 también ha sido reportada en la literatura, indicando su papel *in vitro* en el TME como regulador positivo de la proliferación de células tumorales de glioma [311]. Se ha demostrado el papel *in vitro* de esta proteína secretada por los CAF en la adquisición de propiedades metastásicas en líneas celulares de cáncer de pulmón de célula no pequeña [312]. Además, algunos estudios han sugerido el potencial clínico de la inhibición farmacológica de HMGB1 y el desarrollo de estrategias de combinación terapéutica en cáncer de mama [313,314]. Por ejemplo, en modelos murinos de tumores de mama de subtipo *basal-like*, el bloqueo de HMGB1 extracelular ha demostrado inhibir el crecimiento

tumoral, mejorando la eficacia de anticuerpos anti-PD-1 [315]. Por otro lado, los inhibidores de proteínas HSP90 han emergido como estrategias con posible utilidad clínica en cáncer para superar la resistencia a diversos fármacos [316]. Múltiples estudios han empleado estos inhibidores en distintos modelos celulares de cáncer de mama HER2+ para superar la resistencia a trastuzumab [317,318]. Específicamente, el papel de la forma HSP90- α secretada ha sido indicado en la literatura, asociado a un aumento de la supervivencia celular y de la capacidad invasiva de líneas celulares de cáncer de mama TN [319,320], así como a la inducción de quimiorresistencia en modelos celulares *in vitro* de carcinoma hepatocelular y pancreático [321,322]. En el TME, además, HSP90- α presenta una función extracelular clave en la comunicación tumor-estroma [323]. El bloqueo de HSP90- α secretada por macrófagos estromales ha demostrado inhibir el crecimiento tumoral en modelos *in vitro* de adenocarcinoma pancreático [324]. La contribución de la proteína PAI-1 en la resistencia a paclitaxel ha sido descrita en modelos celulares y murinos de cáncer de mama TN [325]. Algunos trabajos basados en estudios de expresión génica sugieren su papel clave en la remodelación del TME, sugiriendo su función en la modulación de la composición y actividad de las células inmunes en tumores sólidos [326,327]. Diversos estudios han demostrado el papel de la proteína PAI-1 derivada específicamente de los CAF en la malignización de las células tumorales, mediante la inducción de quimiorresistencia en modelos de cáncer de pulmón de célula no pequeña [328], o de la capacidad invasiva en modelos de carcinoma de célula escamosa [329], sugiriendo la posible utilidad clínica de su inhibición farmacológica [328,330]. Finalmente, la literatura recoge el papel oncogénico de la proteína S100-A11 en distintos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama [162,331–333]. En estos tumores, los estudios de expresión génica también han sugerido su posible valor pronóstico [168,172]. La contribución de S100-A11 a la generación de quimiorresistencia a agentes como 5-fluorouracilo y cisplatino ha sido observada en líneas celulares de cáncer de pulmón y cáncer gástrico [178,179]. En cuanto a su papel en el TME, en modelos celulares de adenocarcinoma pancreático se ha estudiado el efecto paracrina de la proteína S100-A11 secretada en el estroma tumoral sobre la comunicación entre las células tumorales y los CAF [334,335]. Además, el estudio *in silico* de su función en el TME en un panel de distintos tipos tumorales sugiere la relación de su expresión con la presencia de un microambiente inmunosupresivo y con la inducción de resistencia a fármacos como sorafenib [180]. La evidencia creciente sobre la función de los miembros de la familia S100 en la resistencia a fármacos sugiere el posible papel de estas proteínas como biomarcadores predictivos de respuesta a terapia [171], así como su modulación farmacológica como posible estrategia para superar la resistencia a terapias en cáncer.

El estudio de la proliferación celular tras la adición exógena de estas proteínas permitió indagar en el efecto de cada una de ellas en la generación de resistencia al tratamiento con TPD en las células de cáncer de mama HER2+ BT-474 y EFM-192A. Los ensayos con S100-A11 y con CCL2 ofrecieron, respecto al resto de proteínas, los resultados más significativos y homogéneos en cuanto a la generación de resistencia a la terapia, observándose un aumento de la proliferación de las líneas HER2+ tratadas con TPD, con un patrón de incremento lineal (en relación con el de la concentración de proteína recombinante) que fue estadísticamente significativo en todos los casos. Los resultados con el resto de proteínas fueron más heterogéneos y moderados. La adición de la proteína 14-3-3 ζ incrementó la resistencia a TPD en las células EFM-192A con todas las concentraciones de proteína ensayadas. Algunas concentraciones específicas de las proteínas HMGB1 y PAI-1 demostraron aumentar la resistencia a TPD en las dos líneas tumorales HER2+, produciendo un aumento moderado y estadísticamente significativo de la proliferación celular en presencia de la terapia. Finalmente, la adición exógena de HSP90- α resultó en un aumento significativo de la proliferación de EFM-192A tratada con TPD. Sin embargo, en BT-474 se observó una tendencia de disminución de la proliferación celular tras su adición.

En conjunto, los resultados indicaron un efecto de la terapia TPD en la modulación del patrón de proteínas secretadas por el fibroblasto CAF-200, posiblemente relacionado con la regulación de cascadas de señalización intracelular y con una alteración fenotípica de los fibroblastos que, además, incrementó su capacidad migratoria. Los estudios de anotación funcional y la evidencia científica hallada sobre las proteínas identificadas en el secretoma del fibroblasto acotaron un listado de candidatos, cuya validación funcional mediante la adición exógena de proteínas recombinantes permitió determinar el papel de cada una de ellas en la inducción de resistencia a la terapia TPD en las líneas celulares de cáncer de mama HER2+, BT-474 y EFM-192A. Los resultados de estos ensayos, que reflejaron el mayor aumento en la tasa proliferativa (en presencia de la terapia TPD) con la adición de S100-A11, junto con la literatura expuesta anteriormente, impulsaron a continuar este trabajo con la exploración del potencial de S100-A11 en el contexto de la resistencia a TPD en cáncer de mama HER2+.

3. Papel de la proteína S100-A11 en la adquisición de resistencia a la terapia anti-HER2 combinada con taxanos en cáncer de mama HER2+

3.1. Efecto celular de S100-A11 en la respuesta a la terapia TPD en líneas celulares de cáncer de mama HER2+

La función de algunos miembros de la familia S100 en modelos celulares de cáncer de mama ha sido explorada en diversos trabajos. Mientras que la unión de S100-A14 intracelular a HER2

modula la señalización *downstream* y produce un aumento del crecimiento de células BT-474 [336], la secreción de S100-A4 en células de cáncer de mama TN podría estar asociada, mediante un efecto autocrino, a la disminución en la proliferación celular [337]. Liu y colaboradores estudiaron la función S100-A4 secretada por CAF en modelos celulares y murinos de cáncer de mama TN, señalando su papel promotor en la migración y metástasis [338]. En conjunto, la evidencia refleja la complejidad funcional a la que atiende esta familia de proteínas, siendo particular la función que realiza cada S100 y específica del tipo celular y tisular, de la sublocalización celular y del contexto fisiopatológico en el que se exprese. Sin embargo, el papel colectivo y la posible coordinación de este grupo de proteínas y de su implicación a nivel funcional en cáncer de mama todavía se desconoce.

En este trabajo se estudió la actividad de la forma extracelular de S100-A11 en la proliferación celular de líneas tumorales de cáncer de mama HER2+, demostrando que su adición exógena reducía su sensibilidad al tratamiento con TPD. El silenciamiento génico de *S100A11* en CAF-200 resultó en una reversión parcial de la resistencia a la terapia inducida por el medio condicionado derivado del fibroblasto. Esta parcialidad se debe, probablemente, al hecho de que la generación de resistencia se trata de un evento multifactorial, en el que posiblemente contribuyan distintas proteínas derivadas de CAF-200. Además, la eliminación de S100-A11 del medio condicionado no fue completa, según revelaron los resultados del ensayo de ELISA. No obstante, estos resultados permitieron validar la contribución de la proteína S100-A11 contenida en el secretoma de CAF-200 en la generación de resistencia a la terapia TPD.

Aunque el papel de la proteína S100-A11 en la proliferación y viabilidad celular en líneas celulares de cáncer de mama no ha sido expresamente explorado en la literatura, sí hay evidencia en líneas celulares de otros tipos tumorales. Estudios con modelos celulares de glioma, cáncer de pulmón, gástrico y pancreático, han indicado la expresión de S100-A11 como factor clave en la promoción de la proliferación celular [332,333,339,340]. Asociada al eje miR-491-5p/S100-A11, recientemente Ma y colaboradores describieron su papel estimulador de la proliferación de células de cáncer colorrectal [341]. La función positiva de S100-A11 en el crecimiento de las células tumorales también ha sido reportada en ensayos *in vivo* en modelos de colangiocarcinoma intrahepático [342]. Por otro lado, a nivel extracelular, Sato y colaboradores identificaron que la proteína S100-A11 secretada por células de mesotelioma pleural tenía un papel autocrino, produciendo un aumento de la proliferación tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* [331]. Algunos estudios en adenocarcinoma de páncreas han reportado su secreción y función en el estroma tumoral, describiendo su efecto paracrino sobre la proliferación de los CAF

[334,335]. Estos resultados apoyan un papel clave de S100-A11 en la comunicación CAF-tumor, además de sugerir el posible papel de la proteína también en los fibroblastos estromales.

Recientemente, Ji y colaboradores indicaron que la sobreexpresión de S100-A11 en un panel de distintos tipos tumorales correlacionaba con la presencia de un TME compuesto por células de carácter inmunosupresor, incluyendo los CAF. Además, determinaron la asociación de la proteína con la resistencia a varias terapias, como sorafenib y JQ1 [180]. Otros estudios han demostrado la contribución de S100-A11 en la adquisición de resistencia a fármacos en líneas tumorales. Su papel promotor en la resistencia a quimioterápicos como el cisplatino y el 5-fluorouracilo ha sido demostrado en células de cáncer gástrico y cáncer de pulmón [178,179]. Además, en glioblastoma, la expresión de S100-A11 en el TME forma parte de una firma genética asociada a la generación de resistencia a la radioterapia [181].

3.2. Mecanismo molecular asociado a la modulación de S100-A11 extracelular en el modelo de resistencia a TPD en líneas celulares de cáncer de mama HER2+

La sobreexpresión de S100-A11 ha sido reportada en los tumores de mama, sugiriendo su implicación en la malignización y en la promoción del crecimiento de las células tumorales, asociándose además a un peor pronóstico [172,176]. Aunque la evidencia sugiere que las proteínas S100 favorecen el crecimiento y la progresión tumoral a través del estímulo de vías de señalización que regulan la supervivencia celular [166], todavía no se ha proporcionado una interpretación mecanística clara de las funciones de S100-A11 en cáncer de mama.

La forma secretada de S100-A11 actúa como una molécula efectora, activando la señalización intracelular mediante su unión al receptor AGER [343,344]. Aunque se ha demostrado que AGER transduce las señales extracelulares de S100-A11 [345], la interacción directa entre ambas proteínas, así como la señalización desencadenada en células tumorales de cáncer de mama, todavía no han sido esclarecidas. La interacción de AGER con las proteínas S100, incluyendo S100-A11, activa diversas moléculas o vías de señalización intracelular, incluyendo MAPK (ERK1/2, p38, SAPK/JNK), STAT3 y AKT [346–348]. Así, el incremento en la fosforilación de STAT3 observado en este trabajo en las líneas HER2+ tras la incubación con la proteína S100-A11 podría estar asociado a la transducción de la señalización vía AGER, de la misma manera que este efecto producido en STAT3 tras la adición de medio condicionado puede deberse, en parte, al efecto de la S100-A11 secretada en ese medio condicionado mediante la activación de AGER. Cabe mencionar que la activación de STAT3 vía S100-A11 extracelular también ha sido reportada en

otros contextos patológicos distintos a cáncer, como modelos de nefrotoxicidad y de inflamación [348,349].

La contribución de S100-A11 del secretoma de CAF-200 en la fosforilación de STAT3 se confirmó mediante el silenciamiento génico de S100-A11 en el fibroblasto, demostrando una reducción en la capacidad del medio condicionado para fosforilar STAT3 en las líneas de cáncer de mama HER2+, sin alterar en cambio la fosforilación de ERK y AKT. Sato y colaboradores también observaron una menor fosforilación de STAT3 tras la neutralización de la actividad de S100-A11 en su modelo celular *in vitro* de mesotelioma pleural. Además, el bloqueo de la activación de STAT3 mediante el tratamiento con stattic permitió a los investigadores inhibir la proliferación celular inducida por S100-A11 [331]. De manera similar, en este trabajo se consiguió la resensibilización de las líneas tumorales BT-474 y EFM-192A a la terapia TPD mediante el tratamiento combinado con stattic, en presencia de S100-A11 o de medio condicionado de CAF-200. En BT-474 y otras líneas tumorales de cáncer de mama HER2+ la combinación de stattic con trastuzumab ha demostrado tener un efecto sinérgico en la inhibición de la proliferación celular *in vitro* [246]. En conjunto, los resultados sugerirían que la resistencia en nuestro modelo se debe, en parte, a la activación de STAT3 mediada por la proteína S100-A11 derivada de CAF-200, y es susceptible de revertirse mediante la intervención directa en dicha ruta de señalización.

3.3. Reversión de la resistencia a la terapia TPD mediante la inhibición farmacológica del eje S100-A11/AGER

La forma secretada de S100-A11 estimula el crecimiento celular principalmente a través de su unión al receptor AGER [331,335,343,344]. Se conoce que AGER es un receptor de superficie celular que activa múltiples cascadas de señalización, constituyendo un nodo de estímulo de mecanismos de crecimiento y estrés celular asociados a la carcinogénesis y la progresión tumoral. Su sobreexpresión ha sido reportada en distintos tipos tumorales, incluyendo los tumores de mama [199,350], por lo que algunos autores han sugerido su papel como biomarcador y diana terapéutica en cáncer [188,203,206,351].

En el modelo de resistencia con S100-A11 empleado en este trabajo se evaluó el efecto del bloqueo del eje S100-A11/AGER utilizando azeliragon, un antagonista selectivo del receptor [207]. La inhibición farmacológica de AGER aumentó la sensibilidad de las células al tratamiento con TPD, revirtiendo de manera significativa la resistencia inducida por S100-A11 exógena. Estos resultados sugirieron la participación de AGER en el mecanismo de resistencia a la terapia generado por S100-A11 en las líneas de cáncer de mama HER2+ BT-474 y EFM-192A. De la misma manera, el tratamiento con azeliragon resultó en una disminución parcial de la resistencia a la

terapia mediada por el medio condicionado de CAF-200, sugiriendo el papel del receptor en la transmisión de parte de las múltiples señales derivadas del secretoma del fibroblasto que contribuyen en el proceso de resistencia. Diversos estudios han demostrado, en otros tipos de cáncer, la inhibición de la proliferación celular tras inducir el bloqueo farmacológico de AGER [352,353], y específicamente del eje S100-A11/AGER [331,354]. Además, estudios en modelos murinos de cáncer de mama TN han señalado la inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* tras la modulación farmacológica y génica de AGER [201,203]. Aunque la función de azeliragon no ha sido ampliamente explorada en modelos de cáncer, recientemente algunos estudios en cáncer de mama han reportado el uso de este inhibidor y de compuestos derivados en modelos murinos de cáncer de mama TN [209,210]. Magna y colaboradores indicaron la inhibición del crecimiento tumoral y de la actividad metastásica tras el tratamiento con azeliragon en un modelo murino de xenoinjerto de TN. Sin embargo, en su modelo *in vitro* no hallaron un efecto del inhibidor en la viabilidad y la proliferación celular [209].

En conjunto, la literatura sugiere el potencial de la inhibición farmacológica de AGER para atenuar la proliferación y el crecimiento tumoral, avalando nuestros resultados obtenidos con azeliragon en líneas HER2+. Es indispensable en este punto señalar la relevancia y el interés que tendría para este trabajo desarrollar un modelo murino que permitiera confirmar los hallazgos obtenidos en nuestro modelo de resistencia generado con S100-A11, con el objetivo de evaluar *in vivo* el efecto de azeliragon en la resensibilización de las líneas HER2+ a la terapia TPD.

A nivel molecular, el tratamiento con azeliragon resultó en una disminución de la fosforilación de STAT3 en las células tratadas con TPD e incubadas con la proteína S100-A11, sugiriendo que la inhibición de la resistencia observada con azeliragon en estas condiciones experimentales podría estar asociada a la reducción de p-STAT3. Por otro lado, el tratamiento con azeliragon produjo un incremento en la fosforilación de ERK en las líneas HER2+ incubadas con S100-A11 en ausencia de la terapia. Según sugieren algunos autores, esta activación podría estar asociada a una respuesta de compensación debida a la disminución en la fosforilación de STAT3 observada [331,355]. Otros estudios han señalado previamente la reducción de los niveles de fosforilación de STAT3 tras el bloqueo de AGER en modelos de cáncer de mama de subtipo TN [201,209]. Magna y colaboradores indicaron el efecto de azeliragon en la supresión de la metástasis en líneas celulares, mediada por una disminución de la fosforilación de STAT3 [209]. Nasser y colaboradores, mediante la inhibición de AGER también señalaron el papel de STAT3 en el mecanismo asociado al crecimiento tumoral y metástasis inducido por el receptor en modelos murinos [201]. Por otro lado, estudios con modelos celulares en el área de investigación en

enfermedad de Alzheimer también han indicado la afectación de la vía JAK/STAT y la reducción de p-STAT3 por efecto del tratamiento con azeliragon [356,357].

Los hallazgos con azeliragon demostraron inhibir la fosforilación de STAT3 y la resistencia a la terapia TPD inducidas por S100-A11, demostrando el papel de AGER en la transmisión de la señalización intracelular mediada por la proteína. La contribución de la actividad de STAT3 en el mecanismo de resistencia mediado por S100-A11 en las líneas HER2+ fue confirmada tras el bloqueo de STAT3 mediante stattic, consiguiendo la resensibilización de las líneas a la terapia TPD. En conjunto, los resultados de este trabajo revelaron el eje S100-A11/AGER/p-STAT3 como potencial mecanismo de resistencia a la terapia TPD y el receptor AGER como posible diana terapéutica. Estos hallazgos sugieren la relevancia de la modulación de la actividad del secretoma de los CAF como posible estrategia terapéutica para superar la resistencia a la terapia anti-HER2 combinada con taxanos en el cáncer de mama HER2+ (Figura 41).

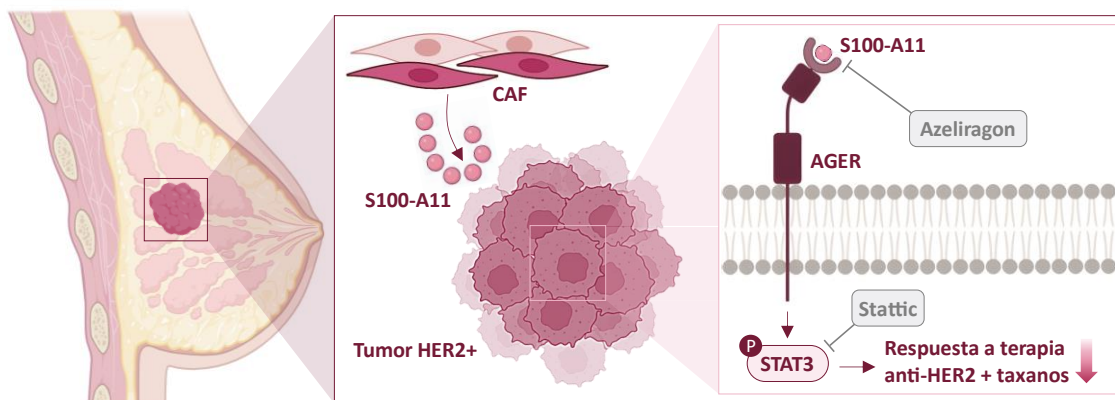


Figura 41. Modelo de resistencia al tratamiento anti-HER2 propuesto en este trabajo. La proteína S100-A11 secretada por los fibroblastos asociados a cáncer (CAF) ejerce un efecto paracrino, influyendo en la biología del tumor de mama HER2+. La unión de S100-A11 al receptor AGER de la membrana de las células tumorales produce la fosforilación y activación de STAT3 intracelular, desencadenando una reacción biológica asociada a una reducción de la respuesta de estas células tumorales al tratamiento con terapia anti-HER2, basada en trastuzumab y pertuzumab, combinada con taxanos. El bloqueo farmacológico del eje S100-A11/AGER/p-STAT3 mediante azeliragon (un antagonista de AGER) o stattic (un inhibidor de STAT3) permite revertir la resistencia de las células tumorales a esta combinación terapéutica, mejorando la eficacia de la terapia anti-HER2 combinada con taxanos en los tumores de mama HER2+. Creado con BioRender.com.

3.4. Significado clínico de la expresión de S100-A11 en los CAF en la respuesta a la terapia anti-HER2 neoadyuvante en tumores de mama HER2+ de estadio precoz

La literatura ha indicado la sobreexpresión de S100-A11 en tumores de mama, sugiriendo su función oncogénica y su contribución al desarrollo de la enfermedad [168,172,176,180]. Aunque la función particular de S100-A11 en cáncer de mama todavía no se conoce con claridad, su expresión diferencial hallada en estos tumores ha conducido a su emergencia como posible biomarcador asociado a mal pronóstico [172,176,177]. Recientemente, tras el análisis de la expresión de S100-A11 en un panel de distintos tipos tumorales, incluyendo tumores de mama, se ha indicado su asociación con la resistencia a diversos fármacos, así como su correlación con la presencia de CAF y de otras células del TME, como macrófagos y linfocitos T reguladores, que favorecen la generación de un microambiente de carácter inmunosupresor [180]. La evidencia científica reciente señala el posible valor pronóstico y predictivo de algunos componentes del TME, como por ejemplo el caso de los linfocitos infiltrantes de tumor estromales (sTILs, por sus siglas en inglés) [358]. Además, el papel del sistema inmune y de células NK CD57⁺ circulantes ha sido explorado en relación con la pCR a trastuzumab y pertuzumab en el cáncer de mama precoz HER2+ [359,360]. Sin embargo, la función de la proteína S100-A11 derivada específicamente de los CAF (u otras células del TME) y su valor pronóstico y/o predictivo de respuesta a terapia en tumores de mama todavía no han sido reportados en la literatura.

Teniendo en cuenta los hallazgos obtenidos en nuestro modelo *in vitro*, se realizó un estudio retrospectivo analizando de la expresión de S100-A11 en fibroblastos estromales, o CAF, en biopsias de tumores diagnosticados de carcinoma de mama HER2+ de estadio precoz, con el objetivo de evaluar su influencia en el resultado clínico de las pacientes tras el tratamiento neoadyuvante con trastuzumab y pertuzumab más quimioterapia basada en taxanos.

En cuanto al estudio de la expresión y distribución subcelular, los tumores de mama HER2+ analizados mostraron expresión de S100-A11 en las células tumorales, predominantemente citoplasmática, hallándose también su expresión en núcleos, tal y como ha sido previamente reportado en la literatura [168,176]. Sin embargo, el objetivo de este trabajo fue la identificación de la expresión de S100-A11 en el componente estromal, en cuyo caso se detectó tanto en el citoplasma como en el núcleo de los fibroblastos asociados a tumor. Por otro lado, de acuerdo con la función de la proteína p-STAT3 como factor de transcripción nuclear, su expresión fue detectada principalmente en el núcleo de las células neoplásicas, tal y como se ha descrito previamente en tumores de mama HER2+ [246].

Inicialmente no se detectó la correlación de la sobreexpresión de S100-A11 en los CAF con las variables clínico-patológicas analizadas, excepto con la expresión de PR, con la que sí se halló una asociación estadísticamente significativa. Además, aunque no se alcanzó la significancia estadística, se detectó una posible asociación con un fenotipo de ER positivo. Aunque no hay estudios publicados que analicen la correlación de la expresión de S100-A11 identificada específicamente en el estroma tumoral con variables clínico-patológicas, algunos trabajos con casos clínicos sí han abordado este tipo de asociación en relación con la expresión de S100-A11 en tumores de mama. En ese contexto, el trabajo de McKiernan y colaboradores señaló una correlación de los niveles de ARNm de S100-A11 con un mayor grado histológico, así como con un fenotipo de ER negativo, en tumores de mama de estadio temprano [177]. Por otro lado, Liu y colaboradores reportaron que la expresión de S100-A11 en tumores de mama de tipo CDI no correlacionaba con el grado histológico, el tamaño tumoral, o con el estado de receptores hormonales [176]. Por otro lado, el estudio de los niveles de p-STAT3 en las células tumorales en este trabajo no mostró una asociación con los factores clínico-patológicos analizados, aunque, de manera similar a S100-A11, los datos también sugirieron su posible correlación con la expresión de ER de la cohorte. Estudios de la correlación clínico-patológica de la expresión de p-STAT3 en tumores de mama han indicado su asociación con el tamaño tumoral [361]. Sin embargo, recientemente el grupo de Nakagawa no observó la asociación entre la expresión de p-STAT3 en tumores de mama ER+, ER- o de subtipo TN, con factores como el tamaño tumoral o la expresión de receptores hormonales [362].

En los tumores de mama HER2+ incluidos en este estudio, la expresión de S100-A11 en los CAF correlacionó de forma estadísticamente significativa con la respuesta patológica del tumor, observándose en el grupo de tumores con sobreexpresión de S100-A11 en los CAF una disminución significativa de casos que habían alcanzado respuesta G5 de Miller y Payne. Aunque en cuanto a la respuesta axilar no se encontró una correlación con significancia estadística, en los tumores que presentaban CAF con alta expresión de S100-A11 se identificó una mayor proporción de casos con presencia de células tumorales en axila postratamiento, respecto a la proporción de casos sin respuesta axilar hallada en el grupo de tumores con baja expresión de S100-A11. Dado que la presencia de enfermedad residual tras el tratamiento neoadyuvante es una situación asociada a la resistencia del tumor a la terapia, el criterio de evaluación clínica seguido en este estudio fue la respuesta patológica tras el tratamiento anti-HER2 neoadyuvante. La mayoría de los tumores de mama HER2+ que tenían alta expresión S100-A11 en los CAF manifestaron enfermedad residual tras haber recibido la terapia anti-HER2, mientras que una minoría alcanzó pCR. Esta reducción significativa de la respuesta patológica observada en el

grupo con alta expresión de S100-A11 sugirió, en concordancia con los hallazgos obtenidos previamente en este trabajo en líneas celulares de cáncer de mama HER2+, que la proteína S100-A11 asociada a los CAF puede tener un papel clave en la respuesta del tumor a la terapia basada en la combinación de trastuzumab y pertuzumab más taxanos.

Sonnenblick y colaboradores indicaron en su investigación que la activación de STAT3 en tumores de mama HER2+ de estadio precoz se asociaba con una firma genética asociada a la presencia de un estroma reactivo con un carácter predictivo de la respuesta a trastuzumab [230]. Sin embargo, en este trabajo la expresión de p-STAT3 en las células tumorales de forma individual no mostró estar correlacionada con la respuesta patológica a la terapia anti-HER2 en los tumores de mama HER2+ de estadio precoz del estudio.

En la cohorte de este estudio se demostró la correlación entre la sobreexpresión de S100-A11 en los CAF con la presencia de altos niveles de p-STAT3 en las células tumorales, por lo que la mayoría de los tumores que sobreexpresaban S100-A11 en los CAF presentaban también una alta expresión de p-STAT3 en las células tumorales. De acuerdo con los hallazgos obtenidos previamente en nuestra experimentación *in vitro*, este resultado reveló una asociación entre la actividad celular y biológica desarrollada por ambas proteínas en el entorno de los tumores de mama HER2+. En la mayoría de los tumores que presentaban sobreexpresión tanto de S100-A11 como de p-STAT3 se detectó enfermedad residual tras el tratamiento neoadyuvante, siendo además éste el tipo de tumor (en cuanto a la expresión de ambos marcadores) identificado con mayor frecuencia dentro del total de tumores que presentaron enfermedad residual. Por otro lado, un número muy reducido de casos de la serie fueron atribuidos a la categoría de tumores S100-A11 alta expresión/p-STAT3 baja expresión, por lo que no se pudo hallar en este caso una asociación concluyente con la respuesta patológica. La proporción de este grupo de tumores que pese a la baja expresión de p-STAT3 sí presentó enfermedad residual, posiblemente tengan asociado un mecanismo de resistencia a la terapia en el que contribuyan en mayor proporción ejes de señalización distintos al eje S100-A11/p-STAT3, teniendo en cuenta que S100-A11 puede activar otros eventos de señalización intracelular, como las proteínas MAPK y AKT [346,347], que podrían estar reduciendo la eficacia del tratamiento anti-HER2. Además, tal y como se ha mencionado anteriormente, además de la proteína S100-A11, múltiples factores del TME pueden estar contribuyendo a los mecanismos moleculares que subyacen a la resistencia a la terapia, obstaculizando la respuesta patológica del tumor. Los tumores clasificados con baja expresión de S100-A11 tuvieron mayoritariamente pCR, tanto si ésta iba acompañada de la alta como de la baja expresión de p-STAT3 en las células tumorales. Cabe mencionar que en los tumores en los que la baja expresión de S100-A11 en CAF iba acompañada de una alta expresión

de p-STAT3 en células tumorales es posible que otras moléculas, además de S100-A11, puedan estar gobernando la activación de STAT3. La mayor parte de este grupo de tumores alcanzó pCR a pesar de la sobreexpresión de p-STAT3, por lo que la actividad del factor de transcripción en este caso podría estar asociada a la regulación de otros procesos celulares no implicados en la generación de resistencia a la terapia. Además, en este escenario, con baja expresión de S100-A11, probablemente la contribución de otras moléculas del TME y la regulación de otras vías de señalización podría estar también interrelacionada con la actividad de p-STAT3, determinando el hecho de que estos tumores finalmente no presenten resistencia al tratamiento y alcancen la pCR.

El régimen de tratamiento basado en el doble bloqueo anti-HER2 ha demostrado un importante beneficio clínico en las pacientes con cáncer de mama HER2+ de estadio precoz, mejorando la SLE a 5 años [53]. Por este motivo, el número de casos de recaída de la enfermedad y de *exitus* identificados en la cohorte fue pequeño, dificultando la posibilidad de inferir en la posible relación de la expresión de la proteína S100-A11 estromal con la recaída de la enfermedad y las curvas de supervivencia. No obstante, dado que el riesgo de recaída de la enfermedad es significativamente mayor en pacientes con enfermedad residual postratamiento [66,363,364], la pCR de los tumores se considera un criterio de valoración sustituto (variable subrogada) para la predicción del beneficio clínico a largo plazo, en términos de SLE. En este estudio, el análisis de asociación entre la expresión de S100-A11 en los CAF y la presencia de enfermedad residual demostró una correlación positiva entre ambos factores, sugiriendo por lo tanto el valor pronóstico de la expresión de S100-A11 en los CAF, asociándose a una mayor probabilidad de recaída a largo plazo y, por lo tanto, a un peor pronóstico en las pacientes de estadio precoz.

En resumen, los resultados demostraron que la expresión de S100-A11 en los CAF se comportó como un factor de mal pronóstico en la cohorte de casos del estudio, correlacionando con la presencia de enfermedad residual tras el tratamiento anti-HER2 neoadyuvante. Esto sugeriría el posible valor pronóstico de S100-A11 en los CAF, asociándose a una mayor probabilidad de no alcanzar pCR y, por lo tanto, de presentar recaída de la enfermedad a largo plazo, en las pacientes de cáncer de mama precoz HER2+. En cuanto a su papel en la respuesta a la terapia anti-HER2, nuestros hallazgos indicaron su correlación con una peor respuesta patológica al tratamiento, sugiriendo el valor de la proteína S100-A11 en los CAF como un posible biomarcador predictivo de respuesta a la terapia anti-HER2 neoadyuvante en las pacientes de cáncer de mama HER2+ de estadio precoz. La expresión de p-STAT3 en las células tumorales individualmente careció de valor pronóstico o predictivo en la cohorte de casos estudiados. Sin embargo, la expresión de p-

STAT3 en las células tumorales sí demostró estar correlacionada con la expresión de S100-A11 en los CAF en los tumores HER2+, indicando la relación biológica entre la proteína S100-A11 estromal y la activación del factor de transcripción en los tumores HER2+. No obstante, S100-A11 pareció ser, en esta cohorte de casos, el factor que podría estar asociado a la respuesta de los tumores al tratamiento neoadyuvante. En este sentido, la determinación de los niveles de S100-A11 en los CAF de las pacientes con cáncer de mama precoz HER2+ candidatas al tratamiento anti-HER2 podría ser empleada como biomarcador predictivo de la respuesta al tratamiento. No obstante, para ello sería necesario profundizar en esta investigación con futuros estudios que permitieran esclarecer el posible valor de la proteína S100-A11 en los CAF como biomarcador predictivo de respuesta a la terapia anti-HER2 neoadyuvante. En ese caso, la combinación de la terapia anti-HER2 con terapia dirigida a la proteína S100-A11 de los CAF podría emerger como una estrategia terapéutica para las pacientes de estadio precoz con sobreexpresión de S100-A11, mejorando la tasa de pCR y la eficacia de la terapia anti-HER2 en el cáncer de mama HER2+.

Finalmente, es relevante señalar algunas de las limitaciones que presentó este estudio. En primer lugar, una limitación sería el hecho de partir de una única línea de CAF para la identificación de factores con un papel en la generación de resistencia a la terapia anti-HER2, y de dos líneas celulares de cáncer de mama HER2+ para llevar a cabo la caracterización celular y molecular del modelo de resistencia generado por la proteína S100-A11. Por otro lado, pese a que AGER es el principal receptor descrito en la transducción de la señalización mediada por S100-A11 extracelular, el papel de otros receptores, como TLR-4, también ha sido sugerido en la transducción de la señal de las proteínas S100 [158,365]. Aunque esto ha sido confirmado para el caso particular de otros miembros de la familia S100, como S100-A8 y S100-A9 [243], sería interesante tener en cuenta su posible papel en nuestro modelo experimental. Además, es necesario mencionar que AGER puede unir otros ligandos además de S100-A11 [194], resultando recomendable profundizar y caracterizar su función en el modelo experimental propuesto, en relación con la modulación farmacológica del receptor. Por otro lado, aunque los resultados en muestras clínicas de pacientes de cáncer de mama HER2+ permitieron reforzar los datos derivados de los ensayos *in vitro*, también se presentaron algunas limitaciones para tener en cuenta de cara a la interpretación de los resultados. En primer lugar, el hecho de ser un estudio unicéntrico y retrospectivo, dado que esto repercute en el tamaño muestral, así como en el impacto y la relevancia de los resultados a nivel clínico. Además, dada la disponibilidad del número de muestras procedentes de casos que cumplieran con las características necesarias (tratamiento, seguimiento...) para su inclusión en este estudio clínico, en el diseño de este no se

estimó mediante cálculo matemático el tamaño muestral apropiado, influyendo por lo tanto en la potencia estadística del estudio. Finalmente, pese a que la mediana de seguimiento de los casos fue adecuada, una proporción de casos presentaba un tiempo de seguimiento inferior a la misma, lo cual podría suponer una limitación del ensayo, influyendo además en la evaluación de los eventos de recaída a largo plazo.

Conclusiones



De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir que:

1. El medio condicionado derivado de la línea de fibroblastos CAF-200, tratada con trastuzumab y pertuzumab más docetaxel, aumentó la resistencia de las líneas celulares de cáncer de mama HER2+ BT-474 y EFM-192A a esta combinación terapéutica.
2. La exposición de las líneas BT-474 y EFM-192A al medio condicionado de CAF-200 estimuló su capacidad de migración y de formación de esferoides, contrarrestando el efecto del tratamiento con trastuzumab y pertuzumab más docetaxel.
3. El medio condicionado de CAF-200 resultó en un incremento de la fosforilación de STAT3 (tirosina 705) y ERK (treonina 202/tirosina 204) en las líneas BT-474 y EFM-192A, en ausencia y presencia de la terapia basada en trastuzumab y pertuzumab más docetaxel.
4. El tratamiento de CAF-200 con trastuzumab y pertuzumab más docetaxel resultó en un aumento de su capacidad migratoria, mientras que no alteró su tasa de proliferación. Además, moduló el perfil de secreción del fibroblasto, modificando la abundancia de determinadas proteínas.
5. La validación funcional de las proteínas 14-3-3 ζ , CCL2, HMGB1, HSP90- α , PAI-1 y S100-A11, realizada mediante su adición exógena de forma individual, resultó, en todos los casos, en un incremento de la proliferación celular de al menos una línea celular HER2+, en presencia de la terapia con trastuzumab y pertuzumab más docetaxel.
6. La adición exógena de la proteína S100-A11 generó resistencia al tratamiento con trastuzumab y pertuzumab más docetaxel en BT-474 y EFM-192A. Por el contrario, la reducción del nivel de S100-A11 en el medio condicionado derivado del fibroblasto CAF-200 dio lugar a una disminución en la capacidad del medio para inducir resistencia a esta combinación terapéutica.
7. La adición exógena de S100-A11 incrementó la fosforilación de STAT3 en BT-474 y EFM-192A y, de manera moderada, la de ERK y AKT (serina 473) respectivamente, en ausencia y presencia de la terapia con trastuzumab y pertuzumab más docetaxel. Por otro lado, la fosforilación de STAT3 inducida en BT-474 y EFM-192A por el medio condicionado de CAF-200 se redujo tras la disminución de la cantidad de S100-A11 en el medio.
8. El tratamiento con stattic o con azeliragon redujo la proliferación de las células BT-474 y EFM-192A tratadas con trastuzumab y pertuzumab más docetaxel, incubadas con S100-A11 exógena, revirtiendo la resistencia a esta combinación terapéutica inducida por la proteína S100-A11.
9. En la serie de casos clínicos de cáncer de mama precoz HER2+ incluidos en la cohorte del estudio, la sobreexpresión de S100-A11 en los CAF correlacionó con la presencia de

enfermedad residual y con peores tasas de pCR, comportándose como un factor asociado a mal pronóstico.

10. La sobreexpresión de S100-A11 en los CAF correlacionó con una alta expresión de p-STAT3 en las células tumorales de los tumores de mama HER2+ de estadio precoz incluidos en el estudio. Del total de casos que no alcanzaron pCR, los tumores identificados con mayor frecuencia fueron aquellos que presentaban sobreexpresión de S100-A11 en los CAF y sobreexpresión de p-STAT3 en las células tumorales.

Bibliografia

1. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Fuchs, H.E.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2022. *CA Cancer J Clin* **2022**, *72*, 7–33, doi:10.3322/caac.21708.
2. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* **2021**, *71*, 209–249, doi:10.3322/caac.21660.
3. LAS_CIFRAS_DEL_CANCER_EN_ESPANA_2022.Pdf.
4. situacionCancer.Pdf.
5. Tan, P.H.; Ellis, I.; Allison, K.; Brogi, E.; Fox, S.B.; Lakhani, S.; Lazar, A.J.; Morris, E.A.; Sahin, A.; Salgado, R.; et al. The 2019 World Health Organization Classification of Tumours of the Breast. *Histopathology* **2020**, *77*, 181–185, doi:10.1111/his.14091.
6. Connolly, J.L.; Boyages, J.; Schnitt, S.J.; Recht, A.; Silen, W.; Sadowsky, N.; Harris, J.R. In Situ Carcinoma of the Breast. *Annu Rev Med* **1989**, *40*, 173–180, doi:10.1146/annurev.me.40.020189.001133.
7. Board, W.C. of T.E. *Breast Tumours*; ISBN 978-92-832-4500-1.
8. Bloom, H.J.; Richardson, W.W. Histological Grading and Prognosis in Breast Cancer; a Study of 1409 Cases of Which 359 Have Been Followed for 15 Years. *Br J Cancer* **1957**, *11*, 359–377, doi:10.1038/bjc.1957.43.
9. Elston, C.W.; Ellis, I.O.; Pinder, S.E. Pathological Prognostic Factors in Breast Cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **1999**, *31*, 209–223, doi:10.1016/s1040-8428(99)00034-7.
10. Frierson, H.F.; Wolber, R.A.; Berean, K.W.; Franquemont, D.W.; Gaffey, M.J.; Boyd, J.C.; Wilbur, D.C. Interobserver Reproducibility of the Nottingham Modification of the Bloom and Richardson Histologic Grading Scheme for Infiltrating Ductal Carcinoma. *Am J Clin Pathol* **1995**, *103*, 195–198, doi:10.1093/ajcp/103.2.195.
11. Giuliano, A.E.; Edge, S.B.; Hortobagyi, G.N. Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer. *Ann Surg Oncol* **2018**, *25*, 1783–1785, doi:10.1245/s10434-018-6486-6.
12. Sawyers, C.L. The Cancer Biomarker Problem. *Nature* **2008**, *452*, 548–552, doi:10.1038/nature06913.
13. Perou, C.M.; Sørlie, T.; Eisen, M.B.; van de Rijn, M.; Jeffrey, S.S.; Rees, C.A.; Pollack, J.R.; Ross, D.T.; Johnsen, H.; Akslén, L.A.; et al. Molecular Portraits of Human Breast Tumours. *Nature* **2000**, *406*, 747–752, doi:10.1038/35021093.
14. Prat, A.; Perou, C.M. Deconstructing the Molecular Portraits of Breast Cancer. *Mol Oncol* **2011**, *5*, 5–23, doi:10.1016/j.molonc.2010.11.003.
15. Perou, C.M. Molecular Stratification of Triple-Negative Breast Cancers. *Oncologist* **2011**, *16 Suppl 1*, 61–70, doi:10.1634/theoncologist.2011-S1-61.
16. Prat, A.; Parker, J.S.; Karginova, O.; Fan, C.; Livasy, C.; Herschkowitz, J.I.; He, X.; Perou, C.M. Phenotypic and Molecular Characterization of the Claudin-Low Intrinsic Subtype of Breast Cancer. *Breast Cancer Research* **2010**, *12*, R68, doi:10.1186/bcr2635.

17. Rivenbark, A.G.; O'Connor, S.M.; Coleman, W.B. Molecular and Cellular Heterogeneity in Breast Cancer: Challenges for Personalized Medicine. *Am J Pathol* **2013**, *183*, 1113–1124, doi:10.1016/j.ajpath.2013.08.002.
18. Sotiriou, C.; Pusztai, L. Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. *N Engl J Med* **2009**, *360*, 790–800, doi:10.1056/NEJMra0801289.
19. Kwa, M.; Makris, A.; Esteva, F.J. Clinical Utility of Gene-Expression Signatures in Early Stage Breast Cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **2017**, *14*, 595–610, doi:10.1038/nrclinonc.2017.74.
20. van de Vijver, M.J.; He, Y.D.; van't Veer, L.J.; Dai, H.; Hart, A.A.M.; Voskuil, D.W.; Schreiber, G.J.; Peterse, J.L.; Roberts, C.; Marton, M.J.; et al. A Gene-Expression Signature as a Predictor of Survival in Breast Cancer. *N Engl J Med* **2002**, *347*, 1999–2009, doi:10.1056/NEJMoa021967.
21. Chia, S.K.; Bramwell, V.H.; Tu, D.; Shepherd, L.E.; Jiang, S.; Vickery, T.; Mardis, E.; Leung, S.; Ung, K.; Pritchard, K.I.; et al. A 50-Gene Intrinsic Subtype Classifier for Prognosis and Prediction of Benefit from Adjuvant Tamoxifen. *Clin Cancer Res* **2012**, *18*, 4465–4472, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0286.
22. Paik, S.; Shak, S.; Tang, G.; Kim, C.; Baker, J.; Cronin, M.; Baehner, F.L.; Walker, M.G.; Watson, D.; Park, T.; et al. A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* **2004**, *351*, 2817–2826, doi:10.1056/NEJMoa041588.
23. Kirk, R. Risk Factors. Oncotype DX Assay Predicts Local Recurrence in Breast Cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **2010**, *7*, 300, doi:10.1038/nrclinonc.2010.75.
24. Harbeck, N.; Penault-Llorca, F.; Cortes, J.; Gnant, M.; Houssami, N.; Poortmans, P.; Ruddy, K.; Tsang, J.; Cardoso, F. Breast Cancer. *Nat Rev Dis Primers* **2019**, *5*, 1–31, doi:10.1038/s41572-019-0111-2.
25. Gusterson, B.A.; Gelber, R.D.; Goldhirsch, A.; Price, K.N.; Sève-Söderborgh, J.; Anbazhagan, R.; Styles, J.; Rudenstam, C.M.; Golouh, R.; Reed, R. Prognostic Importance of C-erbB-2 Expression in Breast Cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* **1992**, *10*, 1049–1056, doi:10.1200/JCO.1992.10.7.1049.
26. Al, S.; Df, S.; L, V.; Sj, D.; Ja, D.; Mi, G.; Ra, W. The Neu Oncogene: An Erb-B-Related Gene Encoding a 185,000-Mr Tumour Antigen. *Nature* **1984**, *312*, doi:10.1038/312513a0.
27. Yarden, Y.; Sliwkowski, M.X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2001**, *2*, 127–137, doi:10.1038/35052073.
28. Schlessinger, J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* **2000**, *103*, 211–225, doi:10.1016/s0092-8674(00)00114-8.
29. Jura, N.; Shan, Y.; Cao, X.; Shaw, D.E.; Kuriyan, J. Structural analysis of the catalytically inactive kinase domain of the human EGF receptor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 21608–21613, doi:10.1073/pnas.0912101106.
30. Dawson, J.P.; Berger, M.B.; Lin, C.-C.; Schlessinger, J.; Lemmon, M.A.; Ferguson, K.M. Epidermal Growth Factor Receptor Dimerization and Activation Require Ligand-Induced Conformational Changes in the Dimer Interface. *Mol Cell Biol* **2005**, *25*, 7734–7742, doi:10.1128/MCB.25.17.7734-7742.2005.

31. Kennedy, S.P.; Hastings, J.F.; Han, J.Z.R.; Croucher, D.R. The Under-Appreciated Promiscuity of the Epidermal Growth Factor Receptor Family. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2016**, *4*.
32. Tzahar, E.; Waterman, H.; Chen, X.; Levkowitz, G.; Karunakaran, D.; Lavi, S.; Ratzkin, B.J.; Yarden, Y. A Hierarchical Network of Interreceptor Interactions Determines Signal Transduction by Neu Differentiation Factor/Neuregulin and Epidermal Growth Factor. *Mol Cell Biol* **1996**, *16*, 5276–5287, doi:10.1128/MCB.16.10.5276.
33. Baselga, J. Treatment of HER2-Overexpressing Breast Cancer. *Annals of Oncology* **2010**, *21*, vii36–vii40, doi:10.1093/annonc/mdq421.
34. Manning, B.D.; Toker, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* **2017**, *169*, 381–405, doi:10.1016/j.cell.2017.04.001.
35. Barbosa, R.; Acevedo, L.A.; Marmorstein, R. The MEK/ERK Network as a Therapeutic Target in Human Cancer. *Molecular Cancer Research* **2021**, *19*, 361–374, doi:10.1158/1541-7786.MCR-20-0687.
36. Hu, X.; Li, J.; Fu, M.; Zhao, X.; Wang, W. The JAK/STAT Signaling Pathway: From Bench to Clinic. *Sig Transduct Target Ther* **2021**, *6*, 1–33, doi:10.1038/s41392-021-00791-1.
37. Slamon, D.J.; Clark, G.M.; Wong, S.G.; Levin, W.J.; Ullrich, A.; McGuire, W.L. Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2/Neu Oncogene. *Science* **1987**, *235*, 177–182, doi:10.1126/science.3798106.
38. Ross, J.S.; Slodkowska, E.A.; Symmans, W.F.; Pusztai, L.; Ravdin, P.M.; Hortobagyi, G.N. The HER-2 Receptor and Breast Cancer: Ten Years of Targeted Anti-HER-2 Therapy and Personalized Medicine. *Oncologist* **2009**, *14*, 320–368, doi:10.1634/theoncologist.2008-0230.
39. Harris, L.; Fritsche, H.; Mennel, R.; Norton, L.; Ravdin, P.; Taube, S.; Somerfield, M.R.; Hayes, D.F.; Bast, R.C.; American Society of Clinical Oncology American Society of Clinical Oncology 2007 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast Cancer. *J Clin Oncol* **2007**, *25*, 5287–5312, doi:10.1200/JCO.2007.14.2364.
40. Wolff, A.C.; Hammond, M.E.H.; Hicks, D.G.; Dowsett, M.; McShane, L.M.; Allison, K.H.; Allred, D.C.; Bartlett, J.M.S.; Bilous, M.; Fitzgibbons, P.; et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol* **2013**, *31*, 3997–4013, doi:10.1200/JCO.2013.50.9984.
41. Albanell, J.; Andreu, X.; Calasanz, M.J.; Concha, Á.; Corominas, J.M.; García-Caballero, T.; López, J.A.; López-Ríos, F.; Ramón Y Cajal, S.; Vera-Sempere, F.J.; et al. Guidelines for HER2 Testing in Breast Cancer: A National Consensus of the Spanish Society of Pathology (SEAP) and the Spanish Society of Medical Oncology (SEOM). *Clin Transl Oncol* **2009**, *11*, 363–375, doi:10.1007/s12094-009-0370-6.
42. Albanell, J.; Baselga, J. Trastuzumab, a Humanized Anti-HER2 Monoclonal Antibody, for the Treatment of Breast Cancer. *Drugs Today (Barc)* **1999**, *35*, 931–946.

43. Eiermann, W.; International Herceptin Study Group Trastuzumab Combined with Chemotherapy for the Treatment of HER2-Positive Metastatic Breast Cancer: Pivotal Trial Data. *Ann Oncol* **2001**, *12 Suppl 1*, S57-62.
44. Buzdar, A.U.; Ibrahim, N.K.; Francis, D.; Booser, D.J.; Thomas, E.S.; Theriault, R.L.; Pusztai, L.; Green, M.C.; Arun, B.K.; Giordano, S.H.; et al. Significantly Higher Pathologic Complete Remission Rate after Neoadjuvant Therapy with Trastuzumab, Paclitaxel, and Epirubicin Chemotherapy: Results of a Randomized Trial in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Operable Breast Cancer. *J Clin Oncol* **2005**, *23*, 3676–3685, doi:10.1200/JCO.2005.07.032.
45. Piccart-Gebhart, M.J.; Procter, M.; Leyland-Jones, B.; Goldhirsch, A.; Untch, M.; Smith, I.; Gianni, L.; Baselga, J.; Bell, R.; Jackisch, C.; et al. Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* **2005**, *353*, 1659–1672, doi:10.1056/NEJMoa052306.
46. Romond, E.H.; Perez, E.A.; Bryant, J.; Suman, V.J.; Geyer, C.E.; Davidson, N.E.; Tan-Chiu, E.; Martino, S.; Paik, S.; Kaufman, P.A.; et al. Trastuzumab plus Adjuvant Chemotherapy for Operable HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* **2005**, *353*, 1673–1684, doi:10.1056/NEJMoa052122.
47. Slamon, D.; Eiermann, W.; Robert, N.; Pienkowski, T.; Martin, M.; Rolski, J.; Chan, A.; Mackey, J.; Liu, M.; Pinter, T.; et al. Phase III Randomized Trial Comparing Doxorubicin and Cyclophosphamide Followed by Docetaxel (AC→T) with Doxorubicin and Cyclophosphamide Followed by Docetaxel and Trastuzumab (AC→TH) with Docetaxel, Carboplatin and Trastuzumab (TCH) in Her2neu Positive Early Breast Cancer Patients: BCIRG 006 Study. *Cancer Research* **2009**, *69*, 62, doi:10.1158/0008-5472.SABCS-09-62.
48. Metzger-Filho, O.; Winer, E.P.; Krop, I. Pertuzumab: Optimizing HER2 Blockade. *Clin Cancer Res* **2013**, *19*, 5552–5556, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0518.
49. Cortés, J.; Fumoleau, P.; Bianchi, G.V.; Petrella, T.M.; Gelmon, K.; Pivot, X.; Verma, S.; Albanell, J.; Conte, P.; Lluch, A.; et al. Pertuzumab Monotherapy After Trastuzumab-Based Treatment and Subsequent Reintroduction of Trastuzumab: Activity and Tolerability in Patients With Advanced Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer. *JCO* **2012**, *30*, 1594–1600, doi:10.1200/JCO.2011.37.4207.
50. Baselga, J.; Cortés, J.; Kim, S.-B.; Im, S.-A.; Hegg, R.; Im, Y.-H.; Roman, L.; Pedrini, J.L.; Pienkowski, T.; Knott, A.; et al. Pertuzumab plus Trastuzumab plus Docetaxel for Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med* **2012**, *366*, 109–119, doi:10.1056/NEJMoa1113216.
51. Miles, D.; Ciruelos, E.; Schneeweiss, A.; Puglisi, F.; Peretz-Yablonski, T.; Campone, M.; Bondarenko, I.; Nowecki, Z.; Errihani, H.; Paluch-Shimon, S.; et al. Final Results from the PERUSE Study of First-Line Pertuzumab plus Trastuzumab plus a Taxane for HER2-Positive Locally Recurrent or Metastatic Breast Cancer, with a Multivariable Approach to Guide Prognostication. *Annals of Oncology* **2021**, *32*, 1245–1255, doi:10.1016/j.annonc.2021.06.024.
52. von Minckwitz, G.; Procter, M.; de Azambuja, E.; Zardavas, D.; Benyunes, M.; Viale, G.; Suter, T.; Arahmani, A.; Rouchet, N.; Clark, E.; et al. Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* **2017**, *377*, 122–131, doi:10.1056/NEJMoa1703643.
53. Gianni, L.; Pienkowski, T.; Im, Y.-H.; Roman, L.; Tseng, L.-M.; Liu, M.-C.; Lluch, A.; Staroslawska, E.; de la Haba-Rodriguez, J.; Im, S.-A.; et al. Efficacy and Safety of Neoadjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Women with Locally Advanced, Inflammatory, or Early HER2-Positive Breast Cancer

- (NeoSphere): A Randomised Multicentre, Open-Label, Phase 2 Trial. *The Lancet Oncology* **2012**, *13*, 25–32, doi:10.1016/S1470-2045(11)70336-9.
54. Swain, S.M.; Miles, D.; Kim, S.-B.; Im, Y.-H.; Im, S.-A.; Semiglazov, V.; Ciruelos, E.; Schneeweiss, A.; Loi, S.; Monturus, E.; et al. Pertuzumab, Trastuzumab, and Docetaxel for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer (CLEOPATRA): End-of-Study Results from a Double-Blind, Randomised, Placebo-Controlled, Phase 3 Study. *The Lancet Oncology* **2020**, *21*, 519–530, doi:10.1016/S1470-2045(19)30863-0.
 55. Junttila, T.T.; Akita, R.W.; Parsons, K.; Fields, C.; Lewis Phillips, G.D.; Friedman, L.S.; Sampath, D.; Sliwkowski, M.X. 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, doi:10.1016/j.ccr.2009.03.020.
 56. Baselga, J.; Albanell, J. Mechanism of Action of Anti-HER2 Monoclonal Antibodies. *Annals of Oncology* **2001**, *12*, S35–S41, doi:10.1093/annonc/12.suppl_1.S35.
 57. Spector, N.L.; Blackwell, K.L. Understanding the Mechanisms behind Trastuzumab Therapy for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer. *J Clin Oncol* **2009**, *27*, 5838–5847, doi:10.1200/JCO.2009.22.1507.
 58. Klapper, L.N.; Waterman, H.; Sela, M.; Yarden, Y. Tumor-Inhibitory Antibodies to HER-2/ErbB-2 May Act by Recruiting c-Cbl and Enhancing Ubiquitination of HER-2. *Cancer Res* **2000**, *60*, 3384–3388.
 59. Yakes, F.M.; Chinratanalab, W.; Ritter, C.A.; King, W.; Seelig, S.; Arteaga, C.L. Herceptin-Induced Inhibition of Phosphatidylinositol-3 Kinase and Akt Is Required for Antibody-Mediated Effects on P27, Cyclin D1, and Antitumor Action. *Cancer Res* **2002**, *62*, 4132–4141.
 60. Arnould, L.; Gelly, M.; Penault-Llorca, F.; Benoit, L.; Bonnetain, F.; Migeon, C.; Cabaret, V.; Fermeaux, V.; Bertheau, P.; Garnier, J.; et al. Trastuzumab-Based Treatment of HER2-Positive Breast Cancer: An Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Mechanism? *Br J Cancer* **2006**, *94*, 259–267, doi:10.1038/sj.bjc.6602930.
 61. Nami, B.; Maadi, H.; Wang, Z. Mechanisms Underlying the Action and Synergism of Trastuzumab and Pertuzumab in Targeting HER2-Positive Breast Cancer. *Cancers (Basel)* **2018**, *10*, 342, doi:10.3390/cancers10100342.
 62. Bria, E.; Nistico, C.; Cuppone, F.; Carlini, P.; Ciccarese, M.; Milella, M.; Natoli, G.; Terzoli, E.; Cognetti, F.; Giannarelli, D. Benefit of Taxanes as Adjuvant Chemotherapy for Early Breast Cancer. *Cancer* **2006**, *106*, 2337–2344, doi:10.1002/cncr.21886.
 63. Rowinsky, E.K.; Cazenave, L.A.; Donehower, R.C. Taxol: A Novel Investigational Antimicrotubule Agent. *J Natl Cancer Inst* **1990**, *82*, 1247–1259, doi:10.1093/jnci/82.15.1247.
 64. Cragg, G.M. Paclitaxel (Taxol): A Success Story with Valuable Lessons for Natural Product Drug Discovery and Development. *Med Res Rev* **1998**, *18*, 315–331, doi:10.1002/(sici)1098-1128(199809)18:5<315::aid-med3>3.0.co;2-w.
 65. Verweij, J.; Clavel, M.; Chevalier, B. Paclitaxel (Taxol™) and Docetaxel (Taxotere™): Not Simply Two of a Kind. *Annals of Oncology* **1994**, *5*, 495–505, doi:10.1093/oxfordjournals.annonc.a058903.

66. Schneeweiss, A.; Chia, S.; Hickish, T.; Harvey, V.; Eniu, A.; Waldron-Lynch, M.; Eng-Wong, J.; Kirk, S.; Cortés, J. Long-Term Efficacy Analysis of the Randomised, Phase II TRYPHAENA Cardiac Safety Study: Evaluating Pertuzumab and Trastuzumab plus Standard Neoadjuvant Anthracycline-Containing and Anthracycline-Free Chemotherapy Regimens in Patients with HER2-Positive Early Breast Cancer. *Eur J Cancer* **2018**, *89*, 27–35, doi:10.1016/j.ejca.2017.10.021.
67. von Minckwitz, G.; Schneeweiss, A.; Loibl, S.; Salat, C.; Denkert, C.; Rezai, M.; Blohmer, J.U.; Jackisch, C.; Paepke, S.; Gerber, B.; et al. Neoadjuvant Carboplatin in Patients with Triple-Negative and HER2-Positive Early Breast Cancer (GeparSixto; GBG 66): A Randomised Phase 2 Trial. *Lancet Oncol* **2014**, *15*, 747–756, doi:10.1016/S1470-2045(14)70160-3.
68. Ogitani, Y.; Aida, T.; Hagihara, K.; Yamaguchi, J.; Ishii, C.; Harada, N.; Soma, M.; Okamoto, H.; Oitate, M.; Arakawa, S.; et al. DS-8201a, A Novel HER2-Targeting ADC with a Novel DNA Topoisomerase I Inhibitor, Demonstrates a Promising Antitumor Efficacy with Differentiation from T-DM1. *Clinical Cancer Research* **2016**, *22*, 5097–5108, doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2822.
69. Hurvitz, S.A.; Hegg, R.; Chung, W.-P.; Im, S.-A.; Jacot, W.; Ganju, V.; Chiu, J.W.Y.; Xu, B.; Hamilton, E.; Madhusudan, S.; et al. Trastuzumab Deruxtecan versus Trastuzumab Emtansine in Patients with HER2-Positive Metastatic Breast Cancer: Updated Results from DESTINY-Breast03, a Randomised, Open-Label, Phase 3 Trial. *The Lancet* **2023**, *401*, 105–117, doi:10.1016/S0140-6736(22)02420-5.
70. Lewis Phillips, G.D.; Li, G.; Dugger, D.L.; Crocker, L.M.; Parsons, K.L.; Mai, E.; Blättler, W.A.; Lambert, J.M.; Chari, R.V.J.; Lutz, R.J.; et al. Targeting HER2-Positive Breast Cancer with Trastuzumab-DM1, an Antibody–Cytotoxic Drug Conjugate. *Cancer Research* **2008**, *68*, 9280–9290, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1776.
71. von Minckwitz, G.; Huang, C.-S.; Mano, M.S.; Loibl, S.; Mamounas, E.P.; Untch, M.; Wolmark, N.; Rastogi, P.; Schneeweiss, A.; Redondo, A.; et al. Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* **2019**, *380*, 617–628, doi:10.1056/NEJMoa1814017.
72. Murthy, R.K.; Loi, S.; Okines, A.; Paplomata, E.; Hamilton, E.; Hurvitz, S.A.; Lin, N.U.; Borges, V.; Abramson, V.; Anders, C.; et al. Tucatinib, Trastuzumab, and Capecitabine for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med* **2020**, *382*, 597–609, doi:10.1056/NEJMoa1914609.
73. Mieog, J.S.D.; van der Hage, J.A.; van de Velde, C.J.H. Preoperative Chemotherapy for Women with Operable Breast Cancer. *Cochrane Database Syst Rev* **2007**, *2007*, CD005002, doi:10.1002/14651858.CD005002.pub2.
74. Díaz-Redondo, T.; Lavado-Valenzuela, R.; Jimenez, B.; Pascual, T.; Gálvez, F.; Falcón, A.; Alamo, M. del C.; Morales, C.; Amerigo, M.; Pascual, J.; et al. Different Pathological Complete Response Rates According to PAM50 Subtype in HER2+ Breast Cancer Patients Treated With Neoadjuvant Pertuzumab/Trastuzumab vs. Trastuzumab Plus Standard Chemotherapy: An Analysis of Real-World Data. *Frontiers in Oncology* **2019**, *9*.
75. Burrell, R.A.; McGranahan, N.; Bartek, J.; Swanton, C. The Causes and Consequences of Genetic Heterogeneity in Cancer Evolution. *Nature* **2013**, *501*, 338–345, doi:10.1038/nature12625.
76. Scaltriti, M.; Rojo, F.; Ocaña, A.; Anido, J.; Guzman, M.; Cortes, J.; Di Cosimo, S.; Matias-Guiu, X.; Ramon y Cajal, S.; Arribas, J.; et al. Expression of p95HER2, a Truncated Form of the HER2 Receptor, and Response to Anti-HER2 Therapies in Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* **2007**, *99*, 628–638, doi:10.1093/jnci/djk134.

77. Mitra, D.; Brumlik, M.J.; Okamgba, S.U.; Zhu, Y.; Duplessis, T.T.; Parvani, J.G.; Lesko, S.M.; Brogi, E.; Jones, F.E. An Oncogenic Isoform of HER2 Associated with Locally Disseminated Breast Cancer and Trastuzumab Resistance. *Mol Cancer Ther* **2009**, *8*, 2152–2162, doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0295.
78. Ritter, C.A.; Perez-Torres, M.; Rinehart, C.; Guix, M.; Dugger, T.; Engelman, J.A.; Arteaga, C.L. Human Breast Cancer Cells Selected for Resistance to Trastuzumab in Vivo Overexpress Epidermal Growth Factor Receptor and ErbB Ligands and Remain Dependent on the ErbB Receptor Network. *Clin Cancer Res* **2007**, *13*, 4909–4919, doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0701.
79. Luque-Cabal, M.; García-Tejido, P.; Fernández-Pérez, Y.; Sánchez-Lorenzo, L.; Palacio-Vázquez, I. Mechanisms Behind the Resistance to Trastuzumab in HER2-Amplified Breast Cancer and Strategies to Overcome It. *Clin Med Insights Oncol* **2016**, *10*, 21–30, doi:10.4137/CMO.S34537.
80. Gallardo, A.; Lerma, E.; Escuin, D.; Tibau, A.; Muñoz, J.; Ojeda, B.; Barnadas, A.; Adrover, E.; Sánchez-Tejada, L.; Giner, D.; et al. Increased Signalling of EGFR and IGF1R, and Deregulation of PTEN/PI3K/Akt Pathway Are Related with Trastuzumab Resistance in HER2 Breast Carcinomas. *Br J Cancer* **2012**, *106*, 1367–1373, doi:10.1038/bjc.2012.85.
81. Lu, Y.; Zi, X.; Mascarenhas, D.; Pollak, M. Insulin-Like Growth Factor-I Receptor Signaling and Resistance to Trastuzumab (Herceptin). *Journal of the National Cancer Institute* **2001**, *93*, 6.
82. Chaganty, B.K.R.; Qiu, S.; Gest, A.; Lu, Y.; Ivan, C.; Calin, G.A.; Weiner, L.M.; Fan, Z. Trastuzumab Upregulates PD-L1 as a Potential Mechanism of Trastuzumab Resistance through Engagement of Immune Effector Cells and Stimulation of IFN γ Secretion. *Cancer Lett* **2018**, *430*, 47–56, doi:10.1016/j.canlet.2018.05.009.
83. Hutcheson, I.; Barrow, D.; Hasmann, M.; Nicholson, R. Induction of erbB3/EGFR Heterodimers Mediates Resistance to Pertuzumab in a Tamoxifen-Resistant MCF-7 Breast Cancer Cell Line. *Molecular Cancer Therapeutics* **2007**.
84. Zhang, Y.; Wu, S.; Zhuang, X.; Weng, G.; Fan, J.; Yang, X.; Xu, Y.; Pan, L.; Hou, T.; Zhou, Z.; et al. Identification of an Activating Mutation in the Extracellular Domain of HER2 Conferring Resistance to Pertuzumab. *OTT* **2019**, *Volume 12*, 11597–11608, doi:10.2147/OTT.S232912.
85. Wuerkenbieke, D.; Wang, J.; Li, Y.; Ma, C. miRNA-150 downregulation promotes pertuzumab resistance in ovarian cancer cells via AKT activation. *Arch Gynecol Obstet* **2015**, *292*, 1109–1116, doi:10.1007/s00404-015-3742-x.
86. Irie, H.; Kawabata, R.; Fujioka, Y.; Nakagawa, F.; Itadani, H.; Nagase, H.; Ito, K.; Uchida, J.; Ohkubo, S.; Matsuo, K. Acquired Resistance to Trastuzumab/Pertuzumab or to T-DM1 in Vivo Can Be Overcome by HER2 Kinase Inhibition with TAS0728. *Cancer Sci* **2020**, *111*, 2123–2131, doi:10.1111/cas.14407.
87. Hanker, A.B.; Pfefferle, A.D.; Balko, J.M.; Kuba, M.G.; Young, C.D.; Sánchez, V.; Sutton, C.R.; Cheng, H.; Perou, C.M.; Zhao, J.J.; et al. Mutant PIK3CA Accelerates HER2-Driven Transgenic Mammary Tumors and Induces Resistance to Combinations of Anti-HER2 Therapies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110*, 14372–14377, doi:10.1073/pnas.1303204110.
88. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57–70, doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9.

89. Hanahan, D.; Coussens, L.M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* **2012**, *21*, 309–322, doi:10.1016/j.ccr.2012.02.022.
90. Quail, D.F.; Joyce, J.A. Microenvironmental Regulation of Tumor Progression and Metastasis. *Nature Medicine* **2013**, *19*, 1423–1437, doi:10.1038/nm.3394.
91. Kalluri, R. The Biology and Function of Fibroblasts in Cancer. *Nature Reviews Cancer* **2016**, *16*, 582–598, doi:10.1038/nrc.2016.73.
92. Bhowmick, N.A.; Neilson, E.G.; Moses, H.L. Stromal Fibroblasts in Cancer Initiation and Progression. *Nature* **2004**, *432*, 332–337, doi:10.1038/nature03096.
93. Marsh, T.; Pietras, K.; McAllister, S.S. Fibroblasts as Architects of Cancer Pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* **2013**, *1832*, 1070–1078, doi:10.1016/j.bbadis.2012.10.013.
94. Desmoulière, A.; Darby, I.A.; Gabbiani, G. Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab Invest* **2003**, *83*, 1689–1707. doi:10.1097/01.lab.0000101911.53973.90.
95. Castor, C.W.; Wilson, S.M.; Heiss, P.R.; Seidman, J.C. Activation of Lung Connective Tissue Cells in Vitro. *Am Rev Respir Dis* **1979**, *120*, 101–106, doi:10.1164/arrd.1979.120.1.101.
96. Tomasek, J.J.; Gabbiani, G.; Hinz, B.; Chaponnier, C.; Brown, R.A. Myofibroblasts and Mechano-Regulation of Connective Tissue Remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2002**, *3*, 349–363, doi:10.1038/nrm809.
97. Foster, D.S.; Jones, R.E.; Ransom, R.C.; Longaker, M.T.; Norton, J.A. The Evolving Relationship of Wound Healing and Tumor Stroma. *JCI Insight* **2018**, *3*, e99911, 99911, doi:10.1172/jci.insight.99911.
98. Dvorak, H.F. Tumors: Wounds That Do Not Heal. Similarities between Tumor Stroma Generation and Wound Healing. *N Engl J Med* **1986**, *315*, 1650–1659, doi:10.1056/NEJM198612253152606.
99. Durning, P.; Schor, S.L.; Sellwood, R.A. Fibroblasts from Patients with Breast Cancer Show Abnormal Migratory Behaviour in Vitro. *Lancet* **1984**, *2*, 890–892, doi:10.1016/s0140-6736(84)90653-6.
100. Fang, Z.; Meng, Q.; Xu, J.; Wang, W.; Zhang, B.; Liu, J.; Liang, C.; Hua, J.; Zhao, Y.; Yu, X.; et al. Signaling Pathways in Cancer-Associated Fibroblasts: Recent Advances and Future Perspectives. *Cancer Commun (Lond)* **2023**, *43*, 3–41, doi:10.1002/cac2.12392.
101. Kojima, Y.; Acar, A.; Eaton, E.N.; Mellody, K.T.; Scheel, C.; Ben-Porath, I.; Onder, T.T.; Wang, Z.C.; Richardson, A.L.; Weinberg, R.A.; et al. Autocrine TGF- β and Stromal Cell-Derived Factor-1 (SDF-1) Signaling Drives the Evolution of Tumor-Promoting Mammary Stromal Myofibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107*, 20009–20014, doi:10.1073/pnas.1013805107.
102. Ringuette Goulet, C.; Bernard, G.; Tremblay, S.; Chabaud, S.; Bolduc, S.; Pouliot, F. Exosomes Induce Fibroblast Differentiation into Cancer-Associated Fibroblasts through TGF β Signaling. *Mol Cancer Res* **2018**, *16*, 1196–1204, doi:10.1158/1541-7786.MCR-17-0784.

103. Wu, F.; Yang, J.; Liu, J.; Wang, Y.; Mu, J.; Zeng, Q.; Deng, S.; Zhou, H. Signaling Pathways in Cancer-Associated Fibroblasts and Targeted Therapy for Cancer. *Signal Transduct Target Ther* **2021**, *6*, 218, doi:10.1038/s41392-021-00641-0.
104. Shen, T.; Li, Y.; Zhu, S.; Yu, J.; Zhang, B.; Chen, X.; Zhang, Z.; Ma, Y.; Niu, Y.; Shang, Z. YAP1 Plays a Key Role of the Conversion of Normal Fibroblasts into Cancer-Associated Fibroblasts That Contribute to Prostate Cancer Progression. *J Exp Clin Cancer Res* **2020**, *39*, 36, doi:10.1186/s13046-020-1542-z.
105. Calvo, F.; Ege, N.; Grande-Garcia, A.; Hooper, S.; Jenkins, R.P.; Chaudhry, S.I.; Harrington, K.; Williamson, P.; Moeendarbary, E.; Charras, G.; et al. Mechanotransduction and YAP-Dependent Matrix Remodelling Is Required for the Generation and Maintenance of Cancer-Associated Fibroblasts. *Nat Cell Biol* **2013**, *15*, 637–646, doi:10.1038/ncb2756.
106. Jiang, L.; Gonda, T.A.; Gamble, M.V.; Salas, M.; Seshan, V.; Tu, S.; Twaddell, W.S.; Hegyi, P.; Lazar, G.; Steele, I.; et al. Global Hypomethylation of Genomic DNA in Cancer-Associated Myofibroblasts. *Cancer Res* **2008**, *68*, 9900–9908, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1319.
107. Chhabra, Y.; Weeraratna, A.T. Fibroblasts in Cancer: Unity in Heterogeneity. *Cell* **2023**, *186*, 1580–1609, doi:10.1016/j.cell.2023.03.016.
108. Potenta, S.; Zeisberg, E.; Kalluri, R. The Role of Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Progression. *Br J Cancer* **2008**, *99*, 1375–1379, doi:10.1038/sj.bjc.6604662.
109. Cortez, E.; Roswall, P.; Pietras, K. Functional Subsets of Mesenchymal Cell Types in the Tumor Microenvironment. *Seminars in Cancer Biology* **2014**, *25*, 3–9, doi:10.1016/j.semcancer.2013.12.010.
110. Karagiannis, G.S.; Poutahidis, T.; Erdman, S.E.; Kirsch, R.; Riddell, R.H.; Diamandis, E.P. Cancer-Associated Fibroblasts Drive the Progression of Metastasis through Both Paracrine and Mechanical Pressure on Cancer Tissue. *Mol Cancer Res* **2012**, *10*, 1403–1418, doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0307.
111. Bhowmick, N.A.; Chytil, A.; Plieth, D.; Gorska, A.E.; Dumont, N.; Shappell, S.; Washington, M.K.; Neilson, E.G.; Moses, H.L. TGF- β Signaling in Fibroblasts Modulates the Oncogenic Potential of Adjacent Epithelia. *Science* **2004**, *303*, 848–851, doi:10.1126/science.1090922.
112. Su, S.; Chen, J.; Yao, H.; Liu, J.; Yu, S.; Lao, L.; Wang, M.; Luo, M.; Xing, Y.; Chen, F.; et al. CD10+GPR77+ Cancer-Associated Fibroblasts Promote Cancer Formation and Chemoresistance by Sustaining Cancer Stemness. *Cell* **2018**, *172*, 841-856.e16, doi:10.1016/j.cell.2018.01.009.
113. Orimo, A.; Gupta, P.B.; Sgroi, D.C.; Arenzana-Seisdedos, F.; Delaunay, T.; Naeem, R.; Carey, V.J.; Richardson, A.L.; Weinberg, R.A. Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion. *Cell* **2005**, *121*, 335–348, doi:10.1016/j.cell.2005.02.034.
114. Zullo, J.; Matsumoto, K.; Xavier, S.; Ratliff, B.; Goligorsky, M.S. The Cell Secretome, a Mediator of Cell-to-Cell Communication. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **2015**, *120*, 17–20, doi:10.1016/j.prostaglandins.2015.03.012.

115. Padgaonkar, M.; Shendre, S.; Chatterjee, P.; Banerjee, S. Cancer Secretome: Finding out Hidden Messages in Extracellular Secretions. *Clin Transl Oncol* **2023**, *25*, 1145–1155, doi:10.1007/s12094-022-03027-y.
116. Barker, H.E.; Paget, J.T.E.; Khan, A.A.; Harrington, K.J. The Tumour Microenvironment after Radiotherapy: Mechanisms of Resistance and Recurrence. *Nat Rev Cancer* **2015**, *15*, 409–425, doi:10.1038/nrc3958.
117. Linares, J.; Marín-Jiménez, J.A.; Badia-Ramentol, J.; Calon, A. Determinants and Functions of CAFs Secretome During Cancer Progression and Therapy. *Front Cell Dev Biol* **2021**, *8*, 621070, doi:10.3389/fcell.2020.621070.
118. Garvey, C.M.; Lau, R.; Sanchez, A.; Sun, R.X.; Fong, E.J.; Doche, M.E.; Chen, O.; Jusuf, A.; Lenz, H.-J.; Larson, B.; et al. Anti-EGFR Therapy Induces EGF Secretion by Cancer-Associated Fibroblasts to Confer Colorectal Cancer Chemoresistance. *Cancers* **2020**, *12*, 1393, doi:10.3390/cancers12061393.
119. Sun, Y.; Campisi, J.; Higano, C.; Beer, T.M.; Porter, P.; Coleman, I.; True, L.; Nelson, P.S. Treatment-Induced Damage to the Tumor Microenvironment Promotes Prostate Cancer Therapy Resistance through WNT16B. *Nat Med* **2012**, *18*, 1359–1368, doi:10.1038/nm.2890.
120. Maia, A.; Wiemann, S. Cancer-Associated Fibroblasts: Implications for Cancer Therapy. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, 3526, doi:10.3390/cancers13143526.
121. Chan, T.-S.; Hsu, C.-C.; Pai, V.C.; Liao, W.-Y.; Huang, S.-S.; Tan, K.-T.; Yen, C.-J.; Hsu, S.-C.; Chen, W.-Y.; Shan, Y.-S.; et al. Metronomic Chemotherapy Prevents Therapy-Induced Stromal Activation and Induction of Tumor-Initiating Cells. *J Exp Med* **2016**, *213*, 2967–2988, doi:10.1084/jem.20151665.
122. Lotti, F.; Jarrar, A.M.; Pai, R.K.; Hitomi, M.; Lathia, J.; Mace, A.; Gantt, G.A. Jr.; Sukhdeo, K.; DeVecchio, J.; Vasanji, A.; Leahy, P.; Hjelmeland, A.B.; Kalady, M.F.; Rich JN. Chemotherapy activates cancer-associated fibroblasts to maintain colorectal cancer-initiating cells by IL-17A. *J Exp Med* **2013**, *210*, 2851–2872, doi:10.1084/jem.20131195.
123. Tao, L.; Huang, G.; Wang, R.; Pan, Y.; He, Z.; Chu, X.; Song, H.; Chen, L. Cancer-associated fibroblasts treated with cisplatin facilitates chemoresistance of lung adenocarcinoma through IL-11/IL-11R/STAT3 signaling pathway. *Sci Rep* **2016**, *6*, 38408, doi:10.1038/srep38408.
124. Brandi, J.; Manfredi, M.; Speziali, G.; Gosetti, F.; Marengo, E.; Cecconi, D. Proteomic Approaches to Decipher Cancer Cell Secretome. *Semin Cell Dev Biol* **2018**, *78*, 93–101, doi:10.1016/j.semcdb.2017.06.030.
125. De, P.; Aske, J.; Sulaiman, R.; Dey, N. Bête Noire of Chemotherapy and Targeted Therapy: CAF-Mediated Resistance. *Cancers* **2022**, *14*, 1519, doi:10.3390/cancers14061519.
126. Zhai, J.; Shen, J.; Xie, G.; Wu, J.; He, M.; Gao, L.; Zhang, Y.; Yao, X.; Shen, L. Cancer-Associated Fibroblasts-Derived IL-8 Mediates Resistance to Cisplatin in Human Gastric Cancer. *Cancer Letters* **2019**, *454*, 37–43, doi:10.1016/j.canlet.2019.04.002.
127. Hu, J.L.; Wang, W.; Lan, X.L.; Zeng, Z.C.; Liang, Y.S.; Yan, Y.R.; Song, F.Y.; Wang, F.F.; Zhu, X.H.; Liao, W.J.; et al. CAFs Secreted Exosomes Promote Metastasis and Chemotherapy Resistance by

- Enhancing Cell Stemness and Epithelial-Mesenchymal Transition in Colorectal Cancer. *Molecular Cancer* **2019**, *18*, 91, doi:10.1186/s12943-019-1019-x.
128. Wei, L.; Ye, H.; Li, G.; Lu, Y.; Zhou, Q.; Zheng, S.; Lin, Q.; Liu, Y.; Li, Z.; Chen, R. Cancer-Associated Fibroblasts Promote Progression and Gemcitabine Resistance via the SDF-1/SATB-1 Pathway in Pancreatic Cancer. *Cell Death Dis* **2018**, *9*, 1065, doi:10.1038/s41419-018-1104-x.
129. Leung, C.S.; Yeung, T.-L.; Yip, K.-P.; Wong, K.-K.; Ho, S.Y.; Mangala, L.S.; Sood, A.K.; Lopez-Berestein, G.; Sheng, J.; Wong, S.T.C.; et al. Cancer-Associated Fibroblasts Regulate Endothelial Adhesion Protein LPP to Promote Ovarian Cancer Chemoresistance. *J Clin Invest* **2018**, *128*, 589–606, doi:10.1172/JCI95200.
130. Zhang, Z.; Karthaus, W.R.; Lee, Y.S.; Gao, V.R.; Wu, C.; Russo, J.W.; Liu, M.; Mota, J.M.; Abida, W.; Linton, E.; et al. Tumor Microenvironment-Derived NRG1 Promotes Antiandrogen Resistance in Prostate Cancer. *Cancer Cell* **2020**, *38*, 279-296.e9, doi:10.1016/j.ccell.2020.06.005.
131. Apicella, M.; Giannoni, E.; Fiore, S.; Ferrari, K.J.; Fernández-Pérez, D.; Isella, C.; Granchi, C.; Minutolo, F.; Sottile, A.; Comoglio, P.M.; et al. Increased Lactate Secretion by Cancer Cells Sustains Non-Cell-Autonomous Adaptive Resistance to MET and EGFR Targeted Therapies. *Cell Metabolism* **2018**, *28*, 848-865.e6, doi:10.1016/j.cmet.2018.08.006.
132. Howell, A.; Landberg, G.; Bergh, J. Breast Tumour Stroma Is a Prognostic Indicator and Target for Therapy. *Breast Cancer Research* **2009**, *11*, S16, doi:10.1186/bcr2435.
133. Dittmer, J.; Leyh, B. The Impact of Tumor Stroma on Drug Response in Breast Cancer. *Seminars in Cancer Biology* **2015**, *31*, 3–15, doi:10.1016/j.semcancer.2014.05.006.
134. Mao, Y.; Zhang, Y.; Qu, Q.; Zhao, M.; Lou, Y.; Liu, J.; Huang, O.; Chen, X.; Wu, J.; Shen, K. Cancer-Associated Fibroblasts Induce Trastuzumab Resistance in HER2 Positive Breast Cancer Cells. *Mol Biosyst* **2015**, *11*, 1029–1040, doi:10.1039/c4mb00710g.
135. Nguyen, M.; De Ninno, A.; Mencattini, A.; Mermet-Meillon, F.; Fornabaio, G.; Evans, S.S.; Cossutta, M.; Khira, Y.; Han, W.; Sirven, P.; et al. Dissecting Effects of Anti-Cancer Drugs and Cancer-Associated Fibroblasts by On-Chip Reconstitution of Immunocompetent Tumor Microenvironments. *Cell Rep* **2018**, *25*, 3884-3893.e3, doi:10.1016/j.celrep.2018.12.015.
136. Fernández-Nogueira, P.; Mancino, M.; Fuster, G.; López-Plana, A.; Jauregui, P.; Almendro, V.; Enreig, E.; Menéndez, S.; Rojo, F.; Noguera-Castells, A.; et al. Tumor-Associated Fibroblasts Promote HER2-Targeted Therapy Resistance through FGFR2 Activation. *Clin Cancer Res* **2020**, *26*, 1432–1448, doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-0353.
137. Hanker, A.B.; Garrett, J.T.; Estrada, M.V.; Moore, P.D.; Ericsson, P.G.; Koch, J.P.; Langley, E.; Singh, S.; Kim, P.S.; Frampton, G.M.; et al. HER2-Overexpressing Breast Cancers Amplify FGFR Signaling upon Acquisition of Resistance to Dual Therapeutic Blockade of HER2. *Clinical Cancer Research* **2017**, *23*, 4323–4334, doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2287.
138. Sonnenblick, A.; Salmon-Divon, M.; Salgado, R.; Dvash, E.; Pondé, N.; Zahavi, T.; Salmon, A.; Loibl, S.; Denkert, C.; Joensuu, H.; et al. Reactive Stroma and Trastuzumab Resistance in HER2-Positive Early Breast Cancer. *International Journal of Cancer* **2020**, *147*, 266–276, doi:10.1002/ijc.32859.

139. Paulsson, J.; Micke, P. Prognostic Relevance of Cancer-Associated Fibroblasts in Human Cancer. *Semin Cancer Biol* **2014**, *25*, 61–68, doi:10.1016/j.semcan.2014.02.006.
140. Chen, Y.; McAndrews, K.M.; Kalluri, R. Clinical and Therapeutic Relevance of Cancer-Associated Fibroblasts. *Nat Rev Clin Oncol* **2021**, *18*, 792–804, doi:10.1038/s41571-021-00546-5.
141. Gascard, P.; Tlsty, T.D. Carcinoma-Associated Fibroblasts: Orchestrating the Composition of Malignancy. *Genes Dev* **2016**, *30*, 1002–1019, doi:10.1101/gad.279737.116.
142. Hu, D.; Li, Z.; Zheng, B.; Lin, X.; Pan, Y.; Gong, P.; Zhuo, W.; Hu, Y.; Chen, C.; Chen, L.; et al. Cancer-associated Fibroblasts in Breast Cancer: Challenges and Opportunities. *Cancer Commun (Lond)* **2022**, *42*, 401–434, doi:10.1002/cac2.12291.
143. Giussani, M.; Merlino, G.; Cappelletti, V.; Tagliabue, E.; Daidone, M.G. Tumor-Extracellular Matrix Interactions: Identification of Tools Associated with Breast Cancer Progression. *Seminars in Cancer Biology* **2015**, *35*, 3–10, doi:10.1016/j.semcan.2015.09.012.
144. Sprague, B.L.; Vacek, P.M.; Mulrow, S.E.; Evans, M.F.; Trentham-Dietz, A.; Herschorn, S.D.; James, T.A.; Surachaicharn, N.; Keikhosravi, A.; Eliceiri, K.W.; et al. Collagen Organization in Relation to Ductal Carcinoma In Situ Pathology and Outcomes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2021**, *30*, 80–88, doi:10.1158/1055-9965.EPI-20-0889.
145. Witkiewicz, A.K.; Dasgupta, A.; Nguyen, K.H.; Liu, C.; Kovatich, A.J.; Schwartz, G.F.; Pestell, R.G.; Sotgia, F.; Rui, H.; Lisanti, M.P. Stromal Caveolin-1 Levels Predict Early DCIS Progression to Invasive Breast Cancer. *Cancer Biol Ther* **2009**, *8*, 1071–1079, doi:10.4161/cbt.8.11.8874.
146. Strell, C.; Paulsson, J.; Jin, S.-B.; Tobin, N.P.; Mezheyski, A.; Roswall, P.; Mutgan, C.; Mitsios, N.; Johansson, H.; Wickberg, S.M.; et al. Impact of Epithelial-Stromal Interactions on Peritumoral Fibroblasts in Ductal Carcinoma in Situ. *J Natl Cancer Inst* **2019**, *111*, 983–995, doi:10.1093/jnci/djy234.
147. Shaker, H.; Bundred, N.J.; Albadry, H.; Nicholson, S.; Castle, J.; Lumsden, L.J.; Pritchard, S.; Landberg, G.; Kirwan, C.C. PO-21 - Stromal Fibroblasts in Preinvasive Breast Cancer (Ductal Carcinoma in Situ, DCIS) Demonstrate a Cancer-like Procoagulant Phenotypic Switch That May Facilitate Invasion. *Thromb Res* **2016**, *140 Suppl 1*, S184, doi:10.1016/S0049-3848(16)30154-2.
148. Yu, L.-N.; Liu, Z.; Tian, Y.; Zhao, P.-P.; Hua, X. FAP-a and GOLPH3 Are Hallmarks of DCIS Progression to Invasive Breast Cancer. *Frontiers in Oncology* **2019**, *9*.
149. Kanzaki, R.; Pietras, K. Heterogeneity of Cancer-Associated Fibroblasts: Opportunities for Precision Medicine. *Cancer Science* **2020**, *111*, 2708–2717, doi:10.1111/cas.14537.
150. Scott, A.M.; Wiseman, G.; Welt, S.; Adjei, A.; Lee, F.-T.; Hopkins, W.; Divgi, C.R.; Hanson, L.H.; Mitchell, P.; Gansen, D.N.; et al. A Phase I Dose-Escalation Study of Sibrotuzumab in Patients with Advanced or Metastatic Fibroblast Activation Protein-Positive Cancer. *Clin Cancer Res* **2003**, *9*, 1639–1647.
151. Zhang, Y.; Elechalawar, C.K.; Hossen, M.N.; Francek, E.R.; Dey, A.; Wilhelm, S.; Bhattacharya, R.; Mukherjee, P. Gold Nanoparticles Inhibit Activation of Cancer-Associated Fibroblasts by Disrupting Communication from Tumor and Microenvironmental Cells. *Bioactive Materials* **2021**, *6*, 326–332, doi:10.1016/j.bioactmat.2020.08.009.

152. Biffi, G.; Oni, T.E.; Spielman, B.; Hao, Y.; Elyada, E.; Park, Y.; Preall, J.; Tuveson, D.A. IL1-Induced JAK/STAT Signaling Is Antagonized by TGF β to Shape CAF Heterogeneity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Discov* **2019**, *9*, 282–301, doi:10.1158/2159-8290.CD-18-0710.
153. Bockorny, B.; Macarulla, T.; Semenisty, V.; Borazanci, E.; Feliu, J.; Ponz-Sarvisé, M.; Abad, D.G.; Oberstein, P.; Alistar, A.; Muñoz, A.; et al. Motixafortide and Pembrolizumab Combined to Nanoliposomal Irinotecan, Fluorouracil, and Folinic Acid in Metastatic Pancreatic Cancer: The COMBAT/KEYNOTE-202 Trial. *Clin Cancer Res* **2021**, *27*, 5020–5027, doi:10.1158/1078-0432.CCR-21-0929.
154. Ko, A.H.; Kim, K.-P.; Siveke, J.T.; Lopez, C.D.; Lacy, J.; O'Reilly, E.M.; Macarulla, T.; Manji, G.A.; Lee, J.; Ajani, J.; et al. Atezolizumab Plus PEGPH20 Versus Chemotherapy in Advanced Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Gastric Cancer: MORPHEUS Phase Ib/II Umbrella Randomized Study Platform. *Oncologist* **2023**, *28*, 553-e472, doi:10.1093/oncolo/oyad022.
155. Singha, N.C.; Nekoroski, T.; Zhao, C.; Symons, R.; Jiang, P.; Frost, G.I.; Huang, Z.; Shepard, H.M. Tumor-Associated Hyaluronan Limits Efficacy of Monoclonal Antibody Therapy. *Molecular Cancer Therapeutics* **2015**, *14*, 523–532, doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0580.
156. Chauhan, V.P.; Martin, J.D.; Liu, H.; Lacorre, D.A.; Jain, S.R.; Kozin, S.V.; Stylianopoulos, T.; Mousa, A.S.; Han, X.; Adstamongkonkul, P.; et al. Angiotensin Inhibition Enhances Drug Delivery and Potentiates Chemotherapy by Decompressing Tumour Blood Vessels. *Nat Commun* **2013**, *4*, 2516, doi:10.1038/ncomms3516.
157. Cazet, A.S.; Hui, M.N.; Elsworth, B.L.; Wu, S.Z.; Roden, D.; Chan, C.-L.; Skhinas, J.N.; Collot, R.; Yang, J.; Harvey, K.; et al. Targeting Stromal Remodeling and Cancer Stem Cell Plasticity Overcomes Chemoresistance in Triple Negative Breast Cancer. *Nat Commun* **2018**, *9*, 2897, doi:10.1038/s41467-018-05220-6.
158. Bresnick, A.R.; Weber, D.J.; Zimmer, D.B. S100 Proteins in Cancer. *Nat Rev Cancer* **2015**, *15*, 96–109, doi:10.1038/nrc3893.
159. Ikura, M.; Ames, J.B. Genetic Polymorphism and Protein Conformational Plasticity in the Calmodulin Superfamily: Two Ways to Promote Multifunctionality. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 1159–1164, doi:10.1073/pnas.0508640103.
160. Spratt, D.E.; Barber, K.R.; Marlatt, N.M.; Ngo, V.; Macklin, J.A.; Xiao, Y.; Konermann, L.; Duennwald, M.L.; Shaw, G.S. A Subset of Calcium-Binding S100 Proteins Show Preferential Heterodimerization. *FEBS J* **2019**, *286*, 1859–1876, doi:10.1111/febs.14775.
161. Botelho, H.M.; Fritz, G.; Gomes, C.M. Analysis of S100 Oligomers and Amyloids. *Methods Mol Biol* **2012**, *849*, 373–386, doi:10.1007/978-1-61779-551-0_25.
162. Allgöwer, C.; Kretz, A.-L.; von Karstedt, S.; Wittau, M.; Henne-Bruns, D.; Lemke, J. Friend or Foe: S100 Proteins in Cancer. *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, 2037, doi:10.3390/cancers12082037.
163. Donato, R. S100: A Multigenic Family of Calcium-Modulated Proteins of the EF-Hand Type with Intracellular and Extracellular Functional Roles. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2001**, *33*, 637–668, doi:10.1016/S1357-2725(01)00046-2.

164. Yap, K.L.; Ames, J.B.; Swindells, M.B.; Ikura, M. Diversity of Conformational States and Changes within the EF-Hand Protein Superfamily. *Proteins* **1999**, *37*, 499–507, doi:10.1002/(sici)1097-0134(19991115)37:3<499::aid-prot17>3.0.co;2-y.
165. Donato, R.; Sorci, G.; Riuzzi, F.; Arcuri, C.; Bianchi, R.; Brozzi, F.; Tubaro, C.; Giambanco, I. S100B's Double Life: Intracellular Regulator and Extracellular Signal. *Biochim Biophys Acta* **2009**, *1793*, 1008–1022, doi:10.1016/j.bbamcr.2008.11.009.
166. Donato, R.; Cannon, B.R.; Sorci, G.; Riuzzi, F.; Hsu, K.; Weber, D.J.; Geczy, C.L. Functions of S100 Proteins. *Curr Mol Med* **2013**, *13*, 24–57.
167. Inada, H.; Naka, M.; Tanaka, T.; Davey, G.E.; Heizmann, C.W. Human S100A11 Exhibits Differential Steady-State RNA Levels in Various Tissues and a Distinct Subcellular Localization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1999**, *263*, 135–138, doi:10.1006/bbrc.1999.1319.
168. Cross, S.S.; Hamdy, F.C.; Deloulme, J.C.; Rehman, I. Expression of S100 Proteins in Normal Human Tissues and Common Cancers Using Tissue Microarrays: S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 Are All Overexpressed in Common Cancers. *Histopathology* **2005**, *46*, 256–269, doi:10.1111/j.1365-2559.2005.02097.x.
169. Zhang, L.; Zhu, T.; Miao, H.; Liang, B. The Calcium Binding Protein S100A11 and Its Roles in Diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2021**, *9*.
170. He, H.; Li, J.; Weng, S.; Li, M.; Yu, Y. S100A11: Diverse Function and Pathology Corresponding to Different Target Proteins. *Cell Biochem Biophys* **2009**, *55*, 117–126, doi:10.1007/s12013-009-9061-8.
171. Hua, X.; Zhang, H.; Jia, J.; Chen, S.; Sun, Y.; Zhu, X. Roles of S100 Family Members in Drug Resistance in Tumors: Status and Prospects. *Biomed Pharmacother* **2020**, *127*, 110156, doi:10.1016/j.biopha.2020.110156.
172. Zhang, S.; Wang, Z.; Liu, W.; Lei, R.; Shan, J.; Li, L.; Wang, X. Distinct Prognostic Values of S100 mRNA Expression in Breast Cancer. *Sci Rep* **2017**, *7*, 39786, doi:10.1038/srep39786.
173. Emberley, E.D.; Niu, Y.; Njue, C.; Kliewer, E.V.; Murphy, L.C.; Watson, P.H. Psoriasis (S100A7) Expression Is Associated with Poor Outcome in Estrogen Receptor-Negative Invasive Breast Cancer. *Clin Cancer Res* **2003**, *9*, 2627–2631.
174. Oue, N.; Hamai, Y.; Mitani, Y.; Matsumura, S.; Oshimo, Y.; Aung, P.P.; Kuraoka, K.; Nakayama, H.; Yasui, W. Gene Expression Profile of Gastric Carcinoma: Identification of Genes and Tags Potentially Involved in Invasion, Metastasis, and Carcinogenesis by Serial Analysis of Gene Expression. *Cancer Res* **2004**, *64*, 2397–2405, doi:10.1158/0008-5472.can-03-3514.
175. Kondo, A.; Sakaguchi, M.; Makino, E.; Namba, M.; Okada, S.; Huh, N. Localization of S100C Immunoreactivity in Various Human Tissues. *Acta Med Okayama* **2002**, *56*, 31–34, doi:10.18926/AMO/31719.
176. Liu, X.-G.; Wang, X.-P.; Li, W.-F.; Yang, S.; Zhou, X.; Li, S.-J.; Li, X.-J.; Hao, D.-Y.; Fan, Z.-M. Ca²⁺-Binding Protein S100A11: A Novel Diagnostic Marker for Breast Carcinoma. *Oncol Rep* **2010**, *23*, 1301–1308, doi:10.3892/or_00000764.

177. McKiernan, E.; McDermott, E.W.; Evoy, D.; Crown, J.; Duffy, M.J. The Role of S100 Genes in Breast Cancer Progression. *Tumour Biol* **2011**, *32*, 441–450, doi:10.1007/s13277-010-0137-2.
178. Zagryzhskaya, A.; Surova, O.; Akbar, N.S.; Allavena, G.; Gyuraszova, K.; Zborovskaya, I.B.; Tchekvina, E.M.; Zhivotovsky, B. Tudor Staphylococcal Nuclease Drives Chemoresistance of Non-Small Cell Lung Carcinoma Cells by Regulating S100A11. *Oncotarget* **2015**, *6*, 12156–12173, doi:10.18632/oncotarget.3495.
179. Cui, Y.; Li, L.; Li, Z.; Yin, J.; Lane, J.; Ji, J.; Jiang, W.G. Dual Effects of Targeting S100A11 on Suppressing Cellular Metastatic Properties and Sensitizing Drug Response in Gastric Cancer. *Cancer Cell Int* **2021**, *21*, 243, doi:10.1186/s12935-021-01949-1.
180. Ji, X.; Qin, X.; Huang, X.; Wang, W.; Li, H.; Zheng, C.; Huang, Y. S100A11: A Potential Carcinogen and Prognostic Marker That Correlates with the Immunosuppressive Microenvironment in Pan-Cancer. *J Cancer* **2023**, *14*, 88–98, doi:10.7150/jca.78011.
181. Ji, H.; Zhao, H.; Jin, J.; Liu, Z.; Gao, X.; Wang, F.; Dong, J.; Yan, X.; Zhang, J.; Wang, N.; et al. Novel Immune-Related Gene-Based Signature Characterizing an Inflamed Microenvironment Predicts Prognosis and Radiotherapy Efficacy in Glioblastoma. *Frontiers in Genetics* **2022**, *12*.
182. Fritz, G. RAGE: A Single Receptor Fits Multiple Ligands. *Trends in Biochemical Sciences* **2011**, *36*, 625–632, doi:10.1016/j.tibs.2011.08.008.
183. Bierhaus, A.; Humpert, P.M.; Morcos, M.; Wendt, T.; Chavakis, T.; Arnold, B.; Stern, D.M.; Nawroth, P.P. Understanding RAGE, the Receptor for Advanced Glycation End Products. *J Mol Med (Berl)* **2005**, *83*, 876–886, doi:10.1007/s00109-005-0688-7.
184. Schmidt, A.M.; Yan, S.D.; Yan, S.F.; Stern, D.M. The Multiligand Receptor RAGE as a Progression Factor Amplifying Immune and Inflammatory Responses. *J Clin Invest* **2001**, *108*, 949–955.
185. Dattilo, B.M.; Fritz, G.; Leclerc, E.; Kooi, C.W.V.; Heizmann, C.W.; Chazin, W.J. The Extracellular Region of the Receptor for Advanced Glycation End Products Is Composed of Two Independent Structural Units. *Biochemistry* **2007**, *46*, 6957–6970, doi:10.1021/bi7003735.
186. Kozlyuk, N.; Gilston, B.A.; Salay, L.E.; Gogliotti, R.D.; Christov, P.P.; Kim, K.; Ovee, M.; Waterson, A.G.; Chazin, W.J. A Fragment-Based Approach to Discovery of Receptor for Advanced Glycation End Products Inhibitors. *Proteins* **2021**, *89*, 1399–1412, doi:10.1002/prot.26162.
187. Moysa, A.; Hammerschmid, D.; Szczepanowski, R.H.; Sobott, F.; Dadlez, M. Enhanced Oligomerization of Full-Length RAGE by Synergy of the Interaction of Its Domains. *Sci Rep* **2019**, *9*, 20332, doi:10.1038/s41598-019-56993-9.
188. Riehl, A.; Németh, J.; Angel, P.; Hess, J. The Receptor RAGE: Bridging Inflammation and Cancer. *Cell Communication and Signaling* **2009**, *7*, 12, doi:10.1186/1478-811X-7-12.
189. Leclerc, E.; Vetter, S.W. The Role of S100 Proteins and Their Receptor RAGE in Pancreatic Cancer. *Biochim Biophys Acta* **2015**, *1852*, 2706–2711, doi:10.1016/j.bbadis.2015.09.022.
190. Sugaya, K.; Fukagawa, T.; Matsumoto, K.; Mita, K.; Takahashi, E.; Ando, A.; Inoko, H.; Ikemura, T. Three Genes in the Human MHC Class III Region near the Junction with the Class II: Gene for Receptor of Advanced Glycosylation End Products, PBX2 Homeobox Gene and a Notch Homolog,

- Human Counterpart of Mouse Mammary Tumor Gene Int-3. *Genomics* **1994**, *23*, 408–419, doi:10.1006/geno.1994.1517.
191. Hudson, B.I.; Carter, A.M.; Harja, E.; Kalea, A.Z.; Arriero, M.; Yang, H.; Grant, P.J.; Schmidt, A.M. Identification, Classification, and Expression of RAGE Gene Splice Variants. *FASEB J* **2008**, *22*, 1572–1580, doi:10.1096/fj.07-9909com.
192. Hofmann, M.A.; Drury, S.; Fu, C.; Qu, W.; Taguchi, A.; Lu, Y.; Avila, C.; Kambham, N.; Bierhaus, A.; Nawroth, P.; et al. RAGE Mediates a Novel Proinflammatory Axis: A Central Cell Surface Receptor for S100/Calgranulin Polypeptides. *Cell* **1999**, *97*, 889–901, doi:10.1016/s0092-8674(00)80801-6.
193. Rojas, A.; Figueroa, H.; Morales, E. Fueling Inflammation at Tumor Microenvironment: The Role of Multiligand/Rage Axis. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 334–341, doi:10.1093/carcin/bgp322.
194. El-Far, A.H.; Sroga, G.; Al Jaouni, S.K.; Mousa, S.A. Role and Mechanisms of RAGE-Ligand Complexes and RAGE-Inhibitors in Cancer Progression. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, 3613, doi:10.3390/ijms21103613.
195. Sato, H.; Sakaguchi, M.; Yamamoto, H.; Tomida, S.; Aoe, K.; Shien, K.; Yoshioka, T.; Namba, K.; Torigoe, H.; Soh, J.; et al. Therapeutic Potential of Targeting S100A11 in Malignant Pleural Mesothelioma. *Oncogenesis* **2018**, *7*, 1–12, doi:10.1038/s41389-017-0017-3.
196. Sun, H.; Wang, C.; Hu, B.; Gao, X.; Zou, T.; Luo, Q.; Chen, M.; Fu, Y.; Sheng, Y.; Zhang, K.; et al. Exosomal S100A4 Derived from Highly Metastatic Hepatocellular Carcinoma Cells Promotes Metastasis by Activating STAT3. *Sig Transduct Target Ther* **2021**, *6*, 1–12, doi:10.1038/s41392-021-00579-3.
197. Dahlmann, M.; Okhrimenko, A.; Marcinkowski, P.; Osterland, M.; Herrmann, P.; Smith, J.; Heizmann, C.W.; Schlag, P.M.; Stein, U. RAGE Mediates S100A4-Induced Cell Motility via MAPK/ERK and Hypoxia Signaling and Is a Prognostic Biomarker for Human Colorectal Cancer Metastasis. *Oncotarget* **2014**, *5*, 3220–3233, doi:10.18632/oncotarget.1908.
198. Leclerc, E.; Fritz, G.; Weibel, M.; Heizmann, C.W.; Galichet, A. S100B and S100A6 Differentially Modulate Cell Survival by Interacting with Distinct RAGE (Receptor for Advanced Glycation End Products) Immunoglobulin Domains *. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 31317–31331, doi:10.1074/jbc.M703951200.
199. Hsieh, H.-L.; Schäfer, B.W.; Sasaki, N.; Heizmann, C.W. Expression Analysis of S100 Proteins and RAGE in Human Tumors Using Tissue Microarrays. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2003**, *307*, 375–381, doi:10.1016/S0006-291X(03)01190-2.
200. Kuniyasu, H.; Oue, N.; Wakikawa, A.; Shigeishi, H.; Matsutani, N.; Kuraoka, K.; Ito, R.; Yokozaki, H.; Yasui, W. Expression of Receptors for Advanced Glycation End-Products (RAGE) Is Closely Associated with the Invasive and Metastatic Activity of Gastric Cancer. *J Pathol* **2002**, *196*, 163–170, doi:10.1002/path.1031.
201. Nasser, M.W.; Wani, N.A.; Ahirwar, D.K.; Powell, C.A.; Ravi, J.; Elbaz, M.; Zhao, H.; Padilla, L.; Zhang, X.; Shilo, K.; et al. RAGE Mediates S100A7-Induced Breast Cancer Growth and Metastasis by Modulating the Tumor Microenvironment. *Cancer Research* **2015**, *75*, 974–985, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2161.

202. Nankali, M.; Karimi, J.; Goodarzi, M.T.; Saidijam, M.; Khodadadi, I.; Razavi, A.N.E.; Rahimi, F. Increased Expression of the Receptor for Advanced Glycation End-Products (RAGE) Is Associated with Advanced Breast Cancer Stage. *Oncology Research and Treatment* **2016**, *39*, 622–628, doi:10.1159/000449326.
203. Kwak, T.; Drews-Elger, K.; Ergonul, A.; Miller, P.C.; Braley, A.; Hwang, G.H.; Zhao, D.; Besser, A.; Yamamoto, Y.; Yamamoto, H.; et al. Targeting of RAGE-Ligand Signaling Impairs Breast Cancer Cell Invasion and Metastasis. *Oncogene* **2017**, *36*, 1559–1572, doi:10.1038/onc.2016.324.
204. Pujals, M.; Mayans, C.; Bellio, C.; Méndez, O.; Greco, E.; Fasani, R.; Alemany-Chavarria, M.; Zamora, E.; Padilla, L.; Mitjans, F.; et al. RAGE/SNAIL1 Signaling Drives Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Oncogene* **2023**, *42*, 2610–2628, doi:10.1038/s41388-023-02778-4.
205. Rigracciolo, D.C.; Nohata, N.; Lappano, R.; Cirillo, F.; Talia, M.; Adame-Garcia, S.R.; Arang, N.; Lubrano, S.; De Francesco, E.M.; Belfiore, A.; et al. Focal Adhesion Kinase (FAK)-Hippo/YAP Transduction Signaling Mediates the Stimulatory Effects Exerted by S100A8/A9-RAGE System in Triple-Negative Breast Cancer (TNBC). *J Exp Clin Cancer Res* **2022**, *41*, 193, doi:10.1186/s13046-022-02396-0.
206. Gebhardt, C.; Riehl, A.; Durchdewald, M.; Németh, J.; Fürstenberger, G.; Müller-Decker, K.; Enk, A.; Arnold, B.; Bierhaus, A.; Nawroth, P.P.; et al. RAGE Signaling Sustains Inflammation and Promotes Tumor Development. *J Exp Med* **2008**, *205*, 275–285, doi:10.1084/jem.20070679.
207. Kostura, M.J.; Kindy, M.S.; Burstein, A.; Valcarce, C.; Poliseti, D.; Andrews, R.; Mjalli, A.M. P3-032: Efficacy of RAGE Antagonists in Murine Model of Alzheimer's Disease. *Alzheimer's & Dementia* **2014**, *10*, P638–P639, doi:10.1016/j.jalz.2014.05.1119.
208. Sabbagh, M.N.; Agro, A.; Bell, J.; Aisen, P.S.; Schweizer, E.; Galasko, D. PF-04494700, an Oral Inhibitor of Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE), in Alzheimer Disease. *Alzheimer Disease & Associated Disorders* **2011**, *25*, 206, doi:10.1097/WAD.0b013e318204b550.
209. Magna, M.; Hwang, G.H.; McIntosh, A.; Drews-Elger, K.; Takabatake, M.; Ikeda, A.; Mera, B.J.; Kwak, T.; Miller, P.; Lippman, M.E.; et al. RAGE Inhibitor TTP488 (Azelnaragon) Suppresses Metastasis in Triple-Negative Breast Cancer. *npj Breast Cancer* **2023**, *9*, 1–15, doi:10.1038/s41523-023-00564-9.
210. Xie, J.; Xu, H.; Wu, X.; Xie, Y.; Lu, X.; Wang, L. Design, Synthesis and Anti-TNBC Activity of Azelnaragon Triazole Analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2021**, *54*, 128444, doi:10.1016/j.bmcl.2021.128444.
211. Valiente, M.; Sepúlveda, J.M.; Pérez, A. Emerging Targets for Cancer Treatment: S100A9/RAGE. *ESMO Open* **2023**, *8*, 100751, doi:10.1016/j.esmoop.2022.100751.
212. Zazo, S.; González-Alonso, P.; Martín-Aparicio, E.; Chamizo, C.; Cristóbal, I.; Arpi, O.; Rovira, A.; Albanell, J.; Eroles, P.; Lluch, A.; et al. Generation, Characterization, and Maintenance of Trastuzumab-Resistant HER2+ Breast Cancer Cell Lines. *Am J Cancer Res* **2016**, *6*, 2661–2678.
213. Pegram, M.D.; Lipton, A.; Hayes, D.F.; Weber, B.L.; Baselga, J.M.; Tripathy, D.; Baly, D.; Baughman, S.A.; Twaddell, T.; Glaspy, J.A.; et al. Phase II Study of Receptor-Enhanced Chemosensitivity Using Recombinant Humanized Anti-p185HER2/Neu Monoclonal Antibody plus Cisplatin in Patients with

- HER2/Neu-Overexpressing Metastatic Breast Cancer Refractory to Chemotherapy Treatment. *J Clin Oncol* **1998**, *16*, 2659–2671, doi:10.1200/JCO.1998.16.8.2659.
214. Garg, A.; Li, J.; Clark, E.; Knott, A.; Carrothers, T.J.; Marier, J.-F.; Cortés, J.; Brewster, M.; Visich, J.; Lum, B. Exposure-Response Analysis of Pertuzumab in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer: Absence of Effect on QTc Prolongation and Other ECG Parameters. *Cancer Chemother Pharmacol* **2013**, *72*, 1133–1141, doi:10.1007/s00280-013-2279-6.
215. Nahta, R.; Yuan, L.X.H.; Zhang, B.; Kobayashi, R.; Esteva, F.J. Insulin-like Growth Factor-I Receptor/Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Heterodimerization Contributes to Trastuzumab Resistance of Breast Cancer Cells. *Cancer Res* **2005**, *65*, 11118–11128, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3841.
216. Garrett, J.T.; Sutton, C.R.; Kuba, M.G.; Cook, R.S.; Arteaga, C.L. Dual Blockade of HER2 in HER2-Overexpressing Tumor Cells Does Not Completely Eliminate HER3 Function. *Clin Cancer Res* **2013**, *19*, 610–619, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2024.
217. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408, doi:10.1006/meth.2001.1262.
218. Walker, J.M. The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation. *Methods Mol Biol* **1994**, *32*, 5–8, doi:10.1385/0-89603-268-X:5.
219. Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis. *Nat Methods* **2012**, *9*, 671–675, doi:10.1038/nmeth.2089.
220. Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* **1976**, *72*, 248–254, doi:10.1006/abio.1976.9999.
221. Zubarev, R.A. The Challenge of the Proteome Dynamic Range and Its Implications for In-Depth Proteomics. *PROTEOMICS* **2013**, *13*, 723–726, doi:10.1002/pmic.201200451.
222. Vastrik, I.; D'Eustachio, P.; Schmidt, E.; Joshi-Tope, G.; Gopinath, G.; Croft, D.; de Bono, B.; Gillespie, M.; Jassal, B.; Lewis, S.; et al. Reactome: A Knowledge Base of Biologic Pathways and Processes. *Genome Biology* **2007**, *8*, R39, doi:10.1186/gb-2007-8-3-r39.
223. Szklarczyk, D.; Gable, A.L.; Lyon, D.; Junge, A.; Wyder, S.; Huerta-Cepas, J.; Simonovic, M.; Doncheva, N.T.; Morris, J.H.; Bork, P.; et al. STRING V11: Protein-Protein Association Networks with Increased Coverage, Supporting Functional Discovery in Genome-Wide Experimental Datasets. *Nucleic Acids Res* **2019**, *47*, D607–D613, doi:10.1093/nar/gky1131.
224. Ogston, K.N.; Miller, I.D.; Payne, S.; Hutcheon, A.W.; Sarkar, T.K.; Smith, I.; Schofield, A.; Heys, S.D. A New Histological Grading System to Assess Response of Breast Cancers to Primary Chemotherapy: Prognostic Significance and Survival. *Breast* **2003**, *12*, 320–327, doi:10.1016/s0960-9776(03)00106-1.
225. Corkery, B.; Crown, J.; Clynes, M.; O'Donovan, N. Epidermal Growth Factor Receptor as a Potential Therapeutic Target in Triple-Negative Breast Cancer. *Ann Oncol* **2009**, *20*, 862–867, doi:10.1093/annonc/mdn710.

226. Breslin, S.; Lowry, M.C.; O'Driscoll, L. Neratinib Resistance and Cross-Resistance to Other HER2-Targeted Drugs Due to Increased Activity of Metabolism Enzyme Cytochrome P4503A4. *Br J Cancer* **2017**, *116*, 620–625, doi:10.1038/bjc.2016.445.
227. Nowacka, M.; Sterzynska, K.; Andrzejewska, M.; Nowicki, M.; Januchowski, R. Drug Resistance Evaluation in Novel 3D in Vitro Model. *Biomed Pharmacother* **2021**, *138*, 111536, doi:10.1016/j.biopha.2021.111536.
228. Sakamoto, R.; Rahman, M.M.; Shimomura, M.; Itoh, M.; Nakatsura, T. Time-Lapse Imaging Assay Using the BioStation CT: A Sensitive Drug-Screening Method for Three-Dimensional Cell Culture. *Cancer Sci* **2015**, *106*, 757–765, doi:10.1111/cas.12667.
229. Pelon, F.; Bourachot, B.; Kieffer, Y.; Magagna, I.; Mermet-Meillon, F.; Bonnet, I.; Costa, A.; Givel, A.-M.; Attieh, Y.; Barbazan, J.; et al. Cancer-Associated Fibroblast Heterogeneity in Axillary Lymph Nodes Drives Metastases in Breast Cancer through Complementary Mechanisms. *Nat Commun* **2020**, *11*, 404, doi:10.1038/s41467-019-14134-w.
230. Sonnenblick, A.; Brohée, S.; Fumagalli, D.; Vincent, D.; Venet, D.; Ignatiadis, M.; Salgado, R.; Van den Eynden, G.; Rothé, F.; Desmedt, C.; et al. Constitutive Phosphorylated STAT3-Associated Gene Signature Is Predictive for Trastuzumab Resistance in Primary HER2-Positive Breast Cancer. *BMC Medicine* **2015**, *13*, 177, doi:10.1186/s12916-015-0416-2.
231. Ortiz-Otero, N.; Marshall, J.R.; Lash, B.; King, M.R. Chemotherapy-Induced Release of Circulating-Tumor Cells into the Bloodstream in Collective Migration Units with Cancer-Associated Fibroblasts in Metastatic Cancer Patients. *BMC Cancer* **2020**, *20*, 873, doi:10.1186/s12885-020-07376-1.
232. Serini, G.; Bochaton-Piallat, M.L.; Ropraz, P.; Geinoz, A.; Borsi, L.; Zardi, L.; Gabbiani, G. The Fibronectin Domain ED-A Is Crucial for Myofibroblastic Phenotype Induction by Transforming Growth Factor-Beta1. *J Cell Biol* **1998**, *142*, 873–881, doi:10.1083/jcb.142.3.873.
233. Berdiel-Acer, M.; Maia, A.; Hristova, Z.; Borgoni, S.; Vetter, M.; Burmester, S.; Becki, C.; Michels, B.; Abnaof, K.; Binenbaum, I.; et al. Stromal NRG1 in Luminal Breast Cancer Defines Pro-Fibrotic and Migratory Cancer-Associated Fibroblasts. *Oncogene* **2021**, *40*, 2651–2666, doi:10.1038/s41388-021-01719-3.
234. Stanisavljevic, J.; Loubat-Casanovas, J.; Herrera, M.; Luque, T.; Peña, R.; Lluch, A.; Albanell, J.; Bonilla, F.; Rovira, A.; Peña, C.; et al. Snail1-Expressing Fibroblasts in the Tumor Microenvironment Display Mechanical Properties That Support Metastasis. *Cancer Research* **2015**, *75*, 284–295, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1903.
235. Li, Z.; Chan, K.; Qi, Y.; Lu, L.; Ning, F.; Wu, M.; Wang, H.; Wang, Y.; Cai, S.; Du, J. Participation of CCL1 in Snail-Positive Fibroblasts in Colorectal Cancer Contribute to 5-Fluorouracil/Paclitaxel Chemoresistance. *Cancer Res Treat* **2018**, *50*, 894–907, doi:10.4143/crt.2017.356.
236. Rothfels, K.; Milacic, M.; Matthews, L.; Haw, R.; Sevilla, C.; Gillespie, M.; Stephan, R.; Gong, C.; Ragueneau, E.; May, B.; et al. Using the Reactome Database. *Curr Protoc* **2023**, *3*, e722, doi:10.1002/cpz1.722.
237. Hou, Y.; Liang, Z.; Qi, L.; Tang, C.; Liu, X.; Tang, J.; Zhao, Y.; Zhang, Y.; Fang, T.; Luo, Q.; et al. Baicalin Targets HSP70/90 to Regulate PKR/PI3K/AKT/eNOS Signaling Pathways. *Molecules* **2022**, *27*, 1432, doi:10.3390/molecules27041432.

238. Nichols, R.J.; Dzamko, N.; Morrice, N.A.; Campbell, D.G.; Deak, M.; Ordureau, A.; Macartney, T.; Tong, Y.; Shen, J.; Prescott, A.R.; et al. 14-3-3 Binding to LRRK2 Is Disrupted by Multiple Parkinson's Disease-Associated Mutations and Regulates Cytoplasmic Localization. *Biochemical Journal* **2010**, *430*, 393–404, doi:10.1042/BJ20100483.
239. Gu, Y.-M.; Jin, Y.-H.; Choi, J.-K.; Baek, K.-H.; Yeo, C.-Y.; Lee, K.-Y. Protein Kinase A Phosphorylates and Regulates Dimerization of 14-3-3 ζ . *FEBS Letters* **2006**, *580*, 305–310, doi:10.1016/j.febslet.2005.12.024.
240. Rinaldi, L.; Delle Donne, R.; Catalanotti, B.; Torres-Quesada, O.; Enzler, F.; Moraca, F.; Nisticò, R.; Chiuso, F.; Piccinin, S.; Bachmann, V.; et al. Feedback Inhibition of cAMP Effector Signaling by a Chaperone-Assisted Ubiquitin System. *Nat Commun* **2019**, *10*, 2572, doi:10.1038/s41467-019-10037-y.
241. Olnes, M.J.; Kotliarov, Y.; Biancotto, A.; Cheung, F.; Chen, J.; Shi, R.; Zhou, H.; Wang, E.; Tsang, J.S.; Nussenblatt, R.; et al. Effects of Systemically Administered Hydrocortisone on the Human Immunome. *Sci Rep* **2016**, *6*, 23002, doi:10.1038/srep23002.
242. Viheriälä, T.; Hongisto, H.; Sorvari, J.; Skottman, H.; Nymark, S.; Ilmarinen, T. Cell Maturation Influences the Ability of hESC-RPE to Tolerate Cellular Stress. *Stem Cell Res Ther* **2022**, *13*, 1–15, doi:10.1186/s13287-022-02712-7.
243. Nasser, M.W.; Elbaz, M.; Ahirwar, D.K.; Ganju, R.K. Conditioning Solid Tumor Microenvironment through Inflammatory Chemokines and S100 Family Proteins. *Cancer Letters* **2015**, *365*, 11–22, doi:10.1016/j.canlet.2015.05.002.
244. Zou, S.; Tong, Q.; Liu, B.; Huang, W.; Tian, Y.; Fu, X. Targeting STAT3 in Cancer Immunotherapy. *Molecular Cancer* **2020**, *19*, 145, doi:10.1186/s12943-020-01258-7.
245. khaki-khatibi, F.; Ghorbani, M.; Sabzichi, M.; Ramezani, F.; Mohammadian, J. Adjuvant Therapy with Stattic Enriches the Anti-Proliferative Effect of Doxorubicin in Human ZR-75-1 Breast Cancer Cells via Arresting Cell Cycle and Inducing Apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2019**, *109*, 1240–1248, doi:10.1016/j.biopha.2018.10.183.
246. Chung, S.S.; Giehl, N.; Wu, Y.; Vadgama, J.V. STAT3 Activation in HER2-Overexpressing Breast Cancer Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cell Traits. *International Journal of Oncology* **2014**, *44*, 403–411, doi:10.3892/ijo.2013.2195.
247. Maycotte, P.; Gearheart, C.M.; Barnard, R.; Aryal, S.; Mulcahy Levy, J.M.; Fosmire, S.P.; Hansen, R.J.; Morgan, M.J.; Porter, C.C.; Gustafson, D.L.; et al. STAT3-Mediated Autophagy Dependence Identifies Subtypes of Breast Cancer Where Autophagy Inhibition Can Be Efficacious. *Cancer Research* **2014**, *74*, 2579–2590, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-3470.
248. Katsumi, T.; Guicciardi, M.E.; Azad, A.; Bronk, S.F.; Krishnan, A.; Gores, G.J. Activated cholangiocytes release macrophage-polarizing extracellular vesicles bearing the DAMP S100A11. *Am J Physiol Cell Physiol* **2019**, *317*, C788-C799. doi:10.1152/ajpcell.00250.2019.
249. Swain, S.M.; Miles, D.; Kim, S.-B.; Im, Y.-H.; Im, S.-A.; Semiglazov, V.; Ciruelos, E.; Schneeweiss, A.; Loi, S.; Monturus, E.; et al. Pertuzumab, Trastuzumab, and Docetaxel for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer (CLEOPATRA): End-of-Study Results from a Double-Blind, Randomised, Placebo-Controlled, Phase 3 Study. *Lancet Oncol* **2020**, *21*, 519–530, doi:10.1016/S1470-2045(19)30863-0.

250. Kalluri, R. The Biology and Function of Fibroblasts in Cancer. *Nat Rev Cancer* **2016**, *16*, 582–598, doi:10.1038/nrc.2016.73.
251. Sahai, E.; Astsaturov, I.; Cukierman, E.; DeNardo, D.G.; Egeblad, M.; Evans, R.M.; Fearon, D.; Greten, F.R.; Hingorani, S.R.; Hunter, T.; et al. A Framework for Advancing Our Understanding of Cancer-Associated Fibroblasts. *Nat Rev Cancer* **2020**, *20*, 174–186, doi:10.1038/s41568-019-0238-1.
252. Fiori, M.E.; Di Franco, S.; Villanova, L.; Bianca, P.; Stassi, G.; De Maria, R. Cancer-Associated Fibroblasts as Abettors of Tumor Progression at the Crossroads of EMT and Therapy Resistance. *Mol Cancer* **2019**, *18*, 70, doi:10.1186/s12943-019-0994-2.
253. Rizzolio, S.; Giordano, S.; Corso, S. The Importance of Being CAFs (in Cancer Resistance to Targeted Therapies). *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **2022**, *41*, 319, doi:10.1186/s13046-022-02524-w.
254. Dowling, P.; Clynes, M. Conditioned Media from Cell Lines: A Complementary Model to Clinical Specimens for the Discovery of Disease-Specific Biomarkers. *PROTEOMICS* **2011**, *11*, 794–804, doi:10.1002/pmic.201000530.
255. Mao, Y.; Zhang, Y.; Qu, Q.; Zhao, M.; Lou, Y.; Liu, J.; Huang, O.; Chen, X.; Wu, J.; Shen, K. Cancer-Associated Fibroblasts Induce Trastuzumab Resistance in HER2 Positive Breast Cancer Cells. *Mol Biosyst* **2015**, *11*, 1029–1040, doi:10.1039/c4mb00710g.
256. Guardia, C.; Bianchini, G.; Arpí-LLucià, O.; Menendez, S.; Casadevall, D.; Galbardi, B.; Dugo, M.; Servitja, S.; Montero, J.C.; Soria-Jiménez, L.; et al. Preclinical and Clinical Characterization of Fibroblast-Derived Neuregulin-1 on Trastuzumab and Pertuzumab Activity in HER2-Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res* **2021**, *27*, 5096–5108, doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-2915.
257. Zervantonakis, I.K.; Poskus, M.D.; Scott, A.L.; Selfors, L.M.; Lin, J.-R.; Dillon, D.A.; Pathania, S.; Sorger, P.K.; Mills, G.B.; Brugge, J.S. Fibroblast–Tumor Cell Signaling Limits HER2 Kinase Therapy Response via Activation of MTOR and Antiapoptotic Pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2020**, *117*, 16500–16508, doi:10.1073/pnas.2000648117.
258. Du, R.; Zhang, X.; Lu, X.; Ma, X.; Guo, X.; Shi, C.; Ren, X.; Ma, X.; He, Y.; Gao, Y.; et al. PDPN Positive CAFs Contribute to HER2 Positive Breast Cancer Resistance to Trastuzumab by Inhibiting Antibody-Dependent NK Cell-Mediated Cytotoxicity. *Drug Resist Updat* **2023**, *68*, 100947, doi:10.1016/j.drug.2023.100947.
259. Rivas, E.I.; Linares, J.; Zwick, M.; Gómez-Llonin, A.; Guiu, M.; Labernadie, A.; Badia-Ramentol, J.; Lladó, A.; Bardia, L.; Pérez-Núñez, I.; et al. Targeted Immunotherapy against Distinct Cancer-Associated Fibroblasts Overcomes Treatment Resistance in Refractory HER2+ Breast Tumors. *Nat Commun* **2022**, *13*, 5310, doi:10.1038/s41467-022-32782-3.
260. Seidl, P.; Huettinger, R.; Knuechel, R.; Kunz-Schughart, L.A. Three-Dimensional Fibroblast–Tumor Cell Interaction Causes Downregulation of RACK1 mRNA Expression in Breast Cancer Cells in Vitro. *International Journal of Cancer* **2002**, *102*, 129–136, doi:10.1002/ijc.10675.
261. Marusyk, A.; Tabassum, D.P.; Janiszewska, M.; Place, A.E.; Trinh, A.; Rozhok, A.I.; Pyne, S.; Guerriero, J.L.; Shu, S.; Ekram, M.; et al. Spatial Proximity to Fibroblasts Impacts Molecular Features and Therapeutic Sensitivity of Breast Cancer Cells Influencing Clinical Outcomes. *Cancer Research* **2016**, *76*, 6495–6506, doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-1457.

262. Ballangrud, Å.M.; Yang, W.-H.; Palm, S.; Enmon, R.; Borchardt, P.E.; Pellegrini, V.A.; McDevitt, M.R.; Scheinberg, D.A.; Sgouros, G. Alpha-Particle Emitting Atomic Generator (Actinium-225)-Labeled Trastuzumab (Herceptin) Targeting of Breast Cancer Spheroids: Efficacy versus HER2/Neu Expression. *Clinical Cancer Research* **2004**, *10*, 4489–4497, doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0800.
263. Rodríguez, C.E.; Moverer, L.M.; Reidel, S.I.; Marino, L.; de Kier Joffé, E.D.B.; Jasnis, M.A.; Fisman, G.L. Abstract 2881: Cytotoxic Effect of Trastuzumab on Macrophage-Infiltrated Human Mammary Tumor Spheroids. *Cancer Research* **2012**, *72*, 2881, doi:10.1158/1538-7445.AM2012-2881.
264. Breslin, S.; O’Driscoll, L. The Relevance of Using 3D Cell Cultures, in Addition to 2D Monolayer Cultures, When Evaluating Breast Cancer Drug Sensitivity and Resistance. *Oncotarget* **2016**, *7*, 45745–45756, doi:10.18632/oncotarget.9935.
265. Rodríguez, C.E.; Reidel, S.; Jasnis, M.A.; Bal de Kier joffe, E.; Fisman, G.L. Abstract 349: Autophagy, Cancer Stem Cells, and Trastuzumab Resistance in Three Dimensional Cultures of HER2+ Breast Cancer Cells. *Cancer Res* **2015**, *75*, 349–349, doi:10.1158/1538-7445.AM2015-349.
266. Boesch, M.; Onder, L.; Cheng, H.-W.; Novkovic, M.; Mörbe, U.; Sopper, S.; Gastl, G.; Jochum, W.; Ruhstaller, T.; Knauer, M.; et al. Interleukin 7-Expressing Fibroblasts Promote Breast Cancer Growth through Sustenance of Tumor Cell Stemness. *Oncoimmunology* **2018**, *7*, e1414129, doi:10.1080/2162402X.2017.1414129.
267. Chiou, S.-H.; Yu, C.-C.; Huang, C.-Y.; Lin, S.-C.; Liu, C.-J.; Tsai, T.-H.; Chou, S.-H.; Chien, C.-S.; Ku, H.-H.; Lo, J.-F. Positive Correlations of Oct-4 and Nanog in Oral Cancer Stem-like Cells and High-Grade Oral Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* **2008**, *14*, 4085–4095, doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4404.
268. Zhong, Y.; Guan, K.; Guo, S.; Zhou, C.; Wang, D.; Ma, W.; Zhang, Y.; Li, C.; Zhang, S. Spheres Derived from the Human SK-RC-42 Renal Cell Carcinoma Cell Line Are Enriched in Cancer Stem Cells. *Cancer Lett* **2010**, *299*, 150–160, doi:10.1016/j.canlet.2010.08.013.
269. Eiro, N.; González, L.; Martínez-Ordoñez, A.; Fernandez-Garcia, B.; González, L.O.; Cid, S.; Dominguez, F.; Perez-Fernandez, R.; Vizoso, F.J. Cancer-Associated Fibroblasts Affect Breast Cancer Cell Gene Expression, Invasion and Angiogenesis. *Cell Oncol.* **2018**, *41*, 369–378, doi:10.1007/s13402-018-0371-y.
270. Wen, S.; Hou, Y.; Fu, L.; Xi, L.; Yang, D.; Zhao, M.; Qin, Y.; Sun, K.; Teng, Y.; Liu, M. Cancer-Associated Fibroblast (CAF)-Derived IL32 Promotes Breast Cancer Cell Invasion and Metastasis via Integrin B3–P38 MAPK Signalling. *Cancer Letters* **2019**, *442*, 320–332, doi:10.1016/j.canlet.2018.10.015.
271. Dongre, A.; Weinberg, R.A. New Insights into the Mechanisms of Epithelial–Mesenchymal Transition and Implications for Cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2019**, *20*, 69–84, doi:10.1038/s41580-018-0080-4.
272. Ma, J.; Qin, L.; Li, X. Role of STAT3 Signaling Pathway in Breast Cancer. *Cell Communication and Signaling* **2020**, *18*, 33, doi:10.1186/s12964-020-0527-z.
273. Santoni, M.; Miccini, F.; Cimadamore, A.; Piva, F.; Massari, F.; Cheng, L.; Lopez-Beltran, A.; Montironi, R.; Battelli, N. An Update on Investigational Therapies That Target STAT3 for the Treatment of Cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2021**, *30*, 245–251, doi:10.1080/13543784.2021.1891222.

274. Jiang, L.; Ren, L.; Chen, H.; Pan, J.; Zhang, Z.; Kuang, X.; Chen, X.; Bao, W.; Lin, C.; Zhou, Z.; et al. NCAPG Confers Trastuzumab Resistance via Activating SRC/STAT3 Signaling Pathway in HER2-Positive Breast Cancer. *Cell Death Dis* **2020**, *11*, 547, doi:10.1038/s41419-020-02753-x.
275. Li, G.; Zhao, L.; Li, W.; Fan, K.; Qian, W.; Hou, S.; Wang, H.; Dai, J.; Wei, H.; Guo, Y. Feedback Activation of STAT3 Mediates Trastuzumab Resistance via Upregulation of MUC1 and MUC4 Expression. *Oncotarget* **2014**, *5*, 8317–8329.
276. Byun, W.S.; Bae, E.S.; Cui, J.; Park, H.J.; Oh, D.-C.; Lee, S.K. Antitumor Activity of Pulvomycin via Targeting Activated-STAT3 Signaling in Docetaxel-Resistant Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Biomedicines* **2021**, *9*, 436, doi:10.3390/biomedicines9040436.
277. Dittmer, A.; Dittmer, J. Carcinoma-Associated Fibroblasts Promote Growth of Sox2-Expressing Breast Cancer Cells. *Cancers* **2020**, *12*, 3435, doi:10.3390/cancers12113435.
278. Wang, L.; Zhang, F.; Cui, J.-Y.; Chen, L.; Chen, Y.-T.; Liu, B.-W. CAFs Enhance Paclitaxel Resistance by Inducing EMT through the IL-6/JAK2/STAT3 Pathway. *Oncol Rep* **2018**, *39*, 2081–2090, doi:10.3892/or.2018.6311.
279. Straussman, R.; Morikawa, T.; Shee, K.; Barzily-Rokni, M.; Qian, Z.R.; Du, J.; Davis, A.; Mongare, M.M.; Gould, J.; Frederick, D.T.; et al. Tumour Micro-Environment Elicits Innate Resistance to RAF Inhibitors through HGF Secretion. *Nature* **2012**, *487*, 500–504, doi:10.1038/nature11183.
280. Senthebane, D.A.; Jonker, T.; Rowe, A.; Thomford, N.E.; Munro, D.; Dandara, C.; Wonkam, A.; Govender, D.; Calder, B.; Soares, N.C.; et al. The Role of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: 3D Extracellular Matrices as Accomplices. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, *19*, 2861, doi:10.3390/ijms19102861.
281. Zazo, S.; González-Alonso, P.; Martín-Aparicio, E.; Chamizo, C.; Luque, M.; Sanz-Alvarez, M.; Mínguez, P.; Gómez-López, G.; Cristobal, I.; Caramés, C.; et al. Autocrine CCL5 Effect Mediates Trastuzumab Resistance by ERK Pathway Activation in HER2-Positive Breast Cancer. *Mol Cancer Ther* **2020**, molcanther.1172.2019, doi:10.1158/1535-7163.MCT-19-1172.
282. Hirata, E.; Girotti, M.R.; Viros, A.; Hooper, S.; Spencer-Dene, B.; Matsuda, M.; Larkin, J.; Marais, R.; Sahai, E. Intravital Imaging Reveals How BRAF Inhibition Generates Drug-Tolerant Microenvironments with High Integrin B1/FAK Signaling. *Cancer Cell* **2015**, *27*, 574–588, doi:10.1016/j.ccell.2015.03.008.
283. Peiris-Pagès, M.; Sotgia, F.; Lisanti, M.P. Chemotherapy Induces the Cancer-Associated Fibroblast Phenotype, Activating Paracrine Hedgehog-Gli Signalling in Breast Cancer Cells. *Oncotarget* **2015**, *6*, 10728–10745.
284. Sonnenberg, M.; van der Kuip, H.; Haubeiß, S.; Fritz, P.; Schroth, W.; Friedel, G.; Simon, W.; Mürdter, T.E.; Aulitzky, W.E. Highly Variable Response to Cytotoxic Chemotherapy in Carcinoma-Associated Fibroblasts (CAFs) from Lung and Breast. *BMC Cancer* **2008**, *8*, 364, doi:10.1186/1471-2407-8-364.
285. Ishii, G.; Hashimoto, H.; Asada, K.; Ito, T.; Hoshino, A.; Fujii, S.; Kojima, M.; Kuwata, T.; Harigaya, K.; Nagai, K.; et al. Fibroblasts Associated with Cancer Cells Keep Enhanced Migration Activity after Separation from Cancer Cells: A Novel Character of Tumor Educated Fibroblasts. *International Journal of Oncology* **2010**, *37*, 317–325, doi:10.3892/ijo_00000680.

286. Albregues, J.; Bertero, T.; Grasset, E.; Bonan, S.; Mael, M.; Bourget, I.; Philippe, C.; Herraiz Serrano, C.; Benamar, S.; Croce, O.; et al. Epigenetic Switch Drives the Conversion of Fibroblasts into Proinvasive Cancer-Associated Fibroblasts. *Nat Commun* **2015**, *6*, 10204, doi:10.1038/ncomms10204.
287. Albregues, J.; Bourget, I.; Pons, C.; Butet, V.; Hofman, P.; Tartare-Deckert, S.; Feral, C.C.; Meneguzzi, G.; Gaggioli, C. LIF Mediates Proinvasive Activation of Stromal Fibroblasts in Cancer. *Cell Reports* **2014**, *7*, 1664–1678, doi:10.1016/j.celrep.2014.04.036.
288. Eck, S.; Côté, A.; Winkelman, W.; Brinckerhoff, C. CXCR4 and MMP-1 Are Elevated in Breast Carcinoma-Associated Fibroblasts and in Normal Mammary Fibroblasts Exposed to Factors Secreted by Breast Cancer Cells. *Mol Cancer Res* **2009**, *7*, 1033–1044, doi:10.1158/1541-7786.MCR-09-0015.
289. Zhang, K.; Grither, W.R.; Van Hove, S.; Biswas, H.; Ponik, S.M.; Eliceiri, K.W.; Keely, P.J.; Longmore, G.D. Mechanical Signals Regulate and Activate SNAIL1 Protein to Control the Fibrogenic Response of Cancer-Associated Fibroblasts. *J Cell Sci* **2016**, *129*, 1989–2002, doi:10.1242/jcs.180539.
290. Neagu, A.-N.; Whitham, D.; Buonanno, E.; Jenkins, A.; Alexa-Stratulat, T.; Tamba, B.I.; Darie, C.C. Proteomics and Its Applications in Breast Cancer. *Am J Cancer Res* **2021**, *11*, 4006–4049.
291. Torres, S.; Bartolomé, R.A.; Mendes, M.; Barderas, R.; Fernandez-Aceñero, M.J.; Peláez-García, A.; Peña, C.; Lopez-Lucendo, M.; Villar-Vázquez, R.; Herreros, A.G. de; et al. Proteome Profiling of Cancer-Associated Fibroblasts Identifies Novel Proinflammatory Signatures and Prognostic Markers for Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* **2013**, *19*, 6006–6019, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1130.
292. Hawsawi, N.M.; Ghebeh, H.; Hendrayani, S.-F.; Tulbah, A.; Al-Eid, M.; Al-Tweigeri, T.; Ajarim, D.; Alaiya, A.; Dermime, S.; Aboussekhra, A. Breast Carcinoma-Associated Fibroblasts and Their Counterparts Display Neoplastic-Specific Changes. *Cancer Res* **2008**, *68*, 2717–2725, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0192.
293. Brunoro, G.V.F.; Carvalho, P.C.; Barbosa, V.C.; Pagnoncelli, D.; De Moura Gallo, C.V.; Perales, J.; Zahedi, R.P.; Valente, R.H.; Neves-Ferreira, A.G. da C. Differential Proteomic Comparison of Breast Cancer Secretome Using a Quantitative Paired Analysis Workflow. *BMC Cancer* **2019**, *19*, 365, doi:10.1186/s12885-019-5547-y.
294. Tommelein, J.; De Vlieghere, E.; Verset, L.; Melsens, E.; Leenders, J.; Descamps, B.; Debucquoy, A.; Vanhove, C.; Pauwels, P.; Gespach, C.P.; et al. Radiotherapy-Activated Cancer-Associated Fibroblasts Promote Tumor Progression through Paracrine IGF1R Activation. *Cancer Research* **2018**, *78*, 659–670, doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-0524.
295. Hamsanathan, S.; Gurkar, A.U. Lipids as Regulators of Cellular Senescence. *Frontiers in Physiology* **2022**, *13*.
296. Yu, C.-C.; Li, C.-F.; Chen, I.-H.; Lai, M.-T.; Lin, Z.-J.; Korla, P.K.; Chai, C.-Y.; Ko, G.; Chen, C.-M.; Hwang, T.; et al. YWHAZ Amplification/Overexpression Defines Aggressive Bladder Cancer and Contributes to Chemo-/Radio-Resistance by Suppressing Caspase-Mediated Apoptosis. *J Pathol* **2019**, *248*, 476–487, doi:10.1002/path.5274.

297. Zhao, J.; Fu, X.; Chen, H.; Min, L.; Sun, J.; Yin, J.; Guo, J.; Li, H.; Tang, Z.; Ruan, Y.; et al. G3BP1 Interacts with YWHAZ to Regulate Chemoresistance and Predict Adjuvant Chemotherapy Benefit in Gastric Cancer. *Br J Cancer* **2021**, *124*, 425–436, doi:10.1038/s41416-020-01067-1.
298. Kashkoulinejad-Kouhi, T.; Safarian, S.; Arnaiz, B.; Saa, L. Enhancement of Cisplatin Sensitivity in Human Breast Cancer MCF-7 Cell Line through BiP and 14-3-3 ζ Co-Knockdown. *Oncol Rep* **2021**, *45*, 665–679, doi:10.3892/or.2020.7898.
299. Li, Y.; Zou, L.; Li, Q.; Haibe-Kains, B.; Tian, R.; Li, Y.; Desmedt, C.; Sotiriou, C.; Szallasi, Z.; Iglehart, J.D.; et al. Amplification of LAPTM4B and YWHAZ Contributes to Chemotherapy Resistance and Recurrence of Breast Cancer. *Nat Med* **2010**, *16*, 214–218, doi:10.1038/nm.2090.
300. Kong, Z.; Han, Q.; Zhu, B.; Wan, L.; Feng, E. Circ_0069094 Regulates Malignant Phenotype and Paclitaxel Resistance in Breast Cancer Cells via Targeting the miR-136-5p/YWHAZ Axis. *Thorax Cancer* **2023**, *14*, 1831–1842, doi:10.1111/1759-7714.14928.
301. Wang, W.; Zhang, L.; Wang, Y.; Ding, Y.; Chen, T.; Wang, Y.; Wang, H.; Li, Y.; Duan, K.; Chen, S.; et al. Involvement of miR-451 in Resistance to Paclitaxel by Regulating YWHAZ in Breast Cancer. *Cell Death Dis* **2017**, *8*, e3071, doi:10.1038/cddis.2017.460.
302. D’Errico, G.; Alonso-Nocelo, M.; Vallespinos, M.; Hermann, P.C.; Alcalá, S.; García, C.P.; Martín-Hijano, L.; Valle, S.; Earl, J.; Cassiano, C.; et al. Tumor-Associated Macrophage-Secreted 14-3-3 ζ Signals via AXL to Promote Pancreatic Cancer Chemoresistance. *Oncogene* **2019**, *38*, 5469–5485, doi:10.1038/s41388-019-0803-9.
303. Kadomoto, S.; Izumi, K.; Mizokami, A. Roles of CCL2-CCR2 Axis in the Tumor Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22*, 8530, doi:10.3390/ijms22168530.
304. Nywening, T.M.; Wang-Gillam, A.; Sanford, D.E.; Belt, B.A.; Panni, R.Z.; Cusworth, B.M.; Toriola, A.T.; Nieman, R.K.; Worley, L.A.; Yano, M.; et al. Targeting Tumour-Associated Macrophages with CCR2 Inhibition in Combination with FOLFIRINOX in Patients with Borderline Resectable and Locally Advanced Pancreatic Cancer: A Single-Centre, Open-Label, Dose-Finding, Non-Randomised, Phase 1b Trial. *Lancet Oncol* **2016**, *17*, 651–662, doi:10.1016/S1470-2045(16)00078-4.
305. Pienta, K.J.; Machiels, J.-P.; Schrijvers, D.; Alekseev, B.; Shkolnik, M.; Crabb, S.J.; Li, S.; Seetharam, S.; Puchalski, T.A.; Takimoto, C.; et al. Phase 2 Study of Carlumab (CNTO 888), a Human Monoclonal Antibody against CC-Chemokine Ligand 2 (CCL2), in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Invest New Drugs* **2013**, *31*, 760–768, doi:10.1007/s10637-012-9869-8.
306. Masuda, T.; Noda, M.; Kogawa, T.; Kitagawa, D.; Hayashi, N.; Jomori, T.; Nakanishi, Y.; Nakayama, K.I.; Ohno, S.; Mimori, K. Phase I Dose-Escalation Trial to Repurpose Propagermanium, an Oral CCL2 Inhibitor, in Patients with Breast Cancer. *Cancer Sci* **2020**, *111*, 924–931, doi:10.1111/cas.14306.
307. Triulzi, T.; Forte, L.; Regondi, V.; Di Modica, M.; Ghirelli, C.; Carcangiu, M.L.; Sfondrini, L.; Balsari, A.; Tagliabue, E. HER2 Signaling Regulates the Tumor Immune Microenvironment and Trastuzumab Efficacy. *Oncoimmunology* **2019**, *8*, e1512942, doi:10.1080/2162402X.2018.1512942.
308. Sun, W.; Wang, X.; Wang, D.; Lu, L.; Lin, H.; Zhang, Z.; Jia, Y.; Nie, X.; Liu, T.; Fu, W. CD40 \times HER2 Bispecific Antibody Overcomes the CCL2-Induced Trastuzumab Resistance in HER2-Positive Gastric Cancer. *J Immunother Cancer* **2022**, *10*, e005063, doi:10.1136/jitc-2022-005063.

309. Li, D.; Ji, H.; Niu, X.; Yin, L.; Wang, Y.; Gu, Y.; Wang, J.; Zhou, X.; Zhang, H.; Zhang, Q. Tumor-Associated Macrophages Secrete CC-Chemokine Ligand 2 and Induce Tamoxifen Resistance by Activating PI3K/Akt/mTOR in Breast Cancer. *Cancer Sci* **2020**, *111*, 47–58, doi:10.1111/cas.14230.
310. Pasquier, J.; Gosset, M.; Geyl, C.; Hoarau-Véchet, J.; Chevrot, A.; Pocard, M.; Mirshahi, M.; Lis, R.; Rafii, A.; Touboul, C. CCL2/CCL5 Secreted by the Stroma Induce IL-6/PYK2 Dependent Chemoresistance in Ovarian Cancer. *Mol Cancer* **2018**, *17*, 47, doi:10.1186/s12943-018-0787-z.
311. Li, Z.; Fu, W.-J.; Chen, X.-Q.; Wang, S.; Deng, R.-S.; Tang, X.-P.; Yang, K.-D.; Niu, Q.; Zhou, H.; Li, Q.-R.; et al. Autophagy-Based Unconventional Secretion of HMGB1 in Glioblastoma Promotes Chemosensitivity to Temozolomide through Macrophage M1-like Polarization. *J Exp Clin Cancer Res* **2022**, *41*, 74, doi:10.1186/s13046-022-02291-8.
312. Ren, Y.; Cao, L.; Wang, L.; Zheng, S.; Zhang, Q.; Guo, X.; Li, X.; Chen, M.; Wu, X.; Furlong, F.; et al. Autophagic Secretion of HMGB1 from Cancer-Associated Fibroblasts Promotes Metastatic Potential of Non-Small Cell Lung Cancer Cells via NFκB Signaling. *Cell Death Dis* **2021**, *12*, 858, doi:10.1038/s41419-021-04150-4.
313. Dong, H.; Zhang, L.; Liu, S. Targeting HMGB1: An Available Therapeutic Strategy for Breast Cancer Therapy. *Int J Biol Sci* **2022**, *18*, 3421–3434, doi:10.7150/ijbs.73504.
314. Liu, L.; Liu, S.; Luo, H.; Chen, C.; Zhang, X.; He, L.; Tu, G. GPR30-Mediated HMGB1 Upregulation in CAFs Induces Autophagy and Tamoxifen Resistance in ERα-Positive Breast Cancer Cells. *Aging (Albany NY)* **2021**, *13*, 16178–16197, doi:10.18632/aging.203145.
315. Hubert, P.; Roncarati, P.; Demoulin, S.; Pilard, C.; Ancion, M.; Reynders, C.; Lerho, T.; Bruyere, D.; Lebeau, A.; Radermecker, C.; et al. Extracellular HMGB1 Blockade Inhibits Tumor Growth through Profoundly Remodeling Immune Microenvironment and Enhances Checkpoint Inhibitor-Based Immunotherapy. *J Immunother Cancer* **2021**, *9*, e001966, doi:10.1136/jitc-2020-001966.
316. Jhaveri, K.; Modi, S. HSP90 Inhibitors for Cancer Therapy and Overcoming Drug Resistance. *Adv Pharmacol* **2012**, *65*, 471–517, doi:10.1016/B978-0-12-397927-8.00015-4.
317. Park, S.; Kim, Y.-J.; Park, J.M.; Park, M.; Nam, K.D.; Farrand, L.; Nguyen, C.-T.; La, M.T.; Ann, J.; Lee, J.; et al. The C-Terminal HSP90 Inhibitor NCT-58 Kills Trastuzumab-Resistant Breast Cancer Stem-like Cells. *Cell Death Discov* **2021**, *7*, 354, doi:10.1038/s41420-021-00743-2.
318. Scaltriti, M.; Serra, V.; Normant, E.; Guzman, M.; Rodriguez, O.; Lim, A.R.; Slocum, K.L.; West, K.A.; Rodriguez, V.; Prudkin, L.; et al. Antitumor Activity of the Hsp90 Inhibitor IPI-504 in HER2-Positive Trastuzumab-Resistant Breast Cancer. *Mol Cancer Ther* **2011**, *10*, 817–824, doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0966.
319. Zou, M.; Bhatia, A.; Dong, H.; Jayaprakash, P.; Guo, J.; Sahu, D.; Hou, Y.; Tsen, F.; Tong, C.; O'Brien, K.; et al. Evolutionarily Conserved Dual Lysine Motif Determines the Non-Chaperone Function of Secreted Hsp90alpha in Tumour Progression. *Oncogene* **2017**, *36*, 2160–2171, doi:10.1038/onc.2016.375.
320. Dong, H.; Zou, M.; Bhatia, A.; Jayaprakash, P.; Hofman, F.; Ying, Q.; Chen, M.; Woodley, D.T.; Li, W. Breast Cancer MDA-MB-231 Cells Use Secreted Heat Shock Protein-90alpha (Hsp90α) to Survive a Hostile Hypoxic Environment. *Sci Rep* **2016**, *6*, 20605, doi:10.1038/srep20605.

321. Liao, Y.; Yang, Y.; Pan, D.; Ding, Y.; Zhang, H.; Ye, Y.; Li, J.; Zhao, L. HSP90 α Mediates Sorafenib Resistance in Human Hepatocellular Carcinoma by Necroptosis Inhibition under Hypoxia. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, 243, doi:10.3390/cancers13020243.
322. Xue, N.; Du, T.; Lai, F.; Jin, J.; Ji, M.; Chen, X. Secreted HSP90 α -LRP1 Signaling Promotes Tumor Metastasis and Chemoresistance in Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, 5532, doi:10.3390/ijms23105532.
323. Tang, X.; Chang, C.; Guo, J.; Lincoln, V.; Liang, C.; Chen, M.; Woodley, D.T.; Li, W. Tumour-Secreted Hsp90 α on External Surface of Exosomes Mediates Tumour - Stromal Cell Communication via Autocrine and Paracrine Mechanisms. *Sci Rep* **2019**, *9*, 15108, doi:10.1038/s41598-019-51704-w.
324. Fan, C.-S.; Chen, L.-L.; Hsu, T.-A.; Chen, C.-C.; Chua, K.V.; Li, C.-P.; Huang, T.-S. Endothelial-Mesenchymal Transition Harnesses HSP90 α -Secreting M2-Macrophages to Exacerbate Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J Hematol Oncol* **2019**, *12*, 138, doi:10.1186/s13045-019-0826-2.
325. Zhang, Q.; Lei, L.; Jing, D. Knockdown of SERPINE1 Reverses Resistance of Triple-negative Breast Cancer to Paclitaxel via Suppression of VEGFA. *Oncol Rep* **2020**, *44*, 1875–1884, doi:10.3892/or.2020.7770.
326. Saidak, Z.; Soudet, S.; Lottin, M.; Salle, V.; Sevestre, M.-A.; Clatot, F.; Galmiche, A. A Pan-Cancer Analysis of the Human Tumor Coagulome and Its Link to the Tumor Immune Microenvironment. *Cancer Immunol Immunother* **2021**, *70*, 923–933, doi:10.1007/s00262-020-02739-w.
327. Wang, S.; Pang, L.; Liu, Z.; Meng, X. SERPINE1 Associated with Remodeling of the Tumor Microenvironment in Colon Cancer Progression: A Novel Therapeutic Target. *BMC Cancer* **2021**, *21*, 767, doi:10.1186/s12885-021-08536-7.
328. Masuda, T.; Nakashima, T.; Namba, M.; Yamaguchi, K.; Sakamoto, S.; Horimasu, Y.; Miyamoto, S.; Iwamoto, H.; Fujitaka, K.; Miyata, Y.; et al. Inhibition of PAI-1 Limits Chemotherapy Resistance in Lung Cancer through Suppressing Myofibroblast Characteristics of Cancer-Associated Fibroblasts. *J Cell Mol Med* **2019**, *23*, 2984–2994, doi:10.1111/jcmm.14205.
329. Sakamoto, H.; Koma, Y.-I.; Higashino, N.; Kodama, T.; Tanigawa, K.; Shimizu, M.; Fujikawa, M.; Nishio, M.; Shigeoka, M.; Kakeji, Y.; et al. PAI-1 Derived from Cancer-Associated Fibroblasts in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Promotes the Invasion of Cancer Cells and the Migration of Macrophages. *Lab Invest* **2021**, *101*, 353–368, doi:10.1038/s41374-020-00512-2.
330. Wei, W.-F.; Zhou, H.-L.; Chen, P.-Y.; Huang, X.-L.; Huang, L.; Liang, L.-J.; Guo, C.-H.; Zhou, C.-F.; Yu, L.; Fan, L.-S.; et al. Cancer-Associated Fibroblast-Derived PAI-1 Promotes Lymphatic Metastasis via the Induction of EndoMT in Lymphatic Endothelial Cells. *J Exp Clin Cancer Res* **2023**, *42*, 160, doi:10.1186/s13046-023-02714-0.
331. Sato, H.; Sakaguchi, M.; Yamamoto, H.; Tomida, S.; Aoe, K.; Shien, K.; Yoshioka, T.; Namba, K.; Torigoe, H.; Soh, J.; et al. Therapeutic Potential of Targeting S100A11 in Malignant Pleural Mesothelioma. *Oncogenesis* **2018**, *7*, 1–12, doi:10.1038/s41389-017-0017-3.
332. Wang, H.; Yin, M.; Ye, L.; Gao, P.; Mao, X.; Tian, X.; Xu, Z.; Dai, X.; Cheng, H. S100A11 Promotes Glioma Cell Proliferation and Predicts Grade-Related Unfavorable Prognosis. *Technol Cancer Res Treat* **2021**, *20*, 15330338211011961, doi:10.1177/15330338211011961.

333. Zeng, X.; Guo, H.; Liu, Z.; Qin, Z.; Cong, Y.; Ren, N.; Zhang, Y.; Zhang, N. S100A11 Activates the Pentose Phosphate Pathway to Induce Malignant Biological Behaviour of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cell Death Dis* **2022**, *13*, 1–13, doi:10.1038/s41419-022-05004-3.
334. Mitsui, Y.; Tomonobu, N.; Watanabe, M.; Kinoshita, R.; Sumardika, I.W.; Youyi, C.; Murata, H.; Yamamoto, K.; Sadahira, T.; Rodrigo, A.G.H.; et al. Upregulation of Mobility in Pancreatic Cancer Cells by Secreted S100A11 Through Activation of Surrounding Fibroblasts. *Oncol Res* **2019**, *27*, 945–956, doi:10.3727/096504019X15555408784978.
335. Takamatsu, H.; Yamamoto, K.; Tomonobu, N.; Murata, H.; Inoue, Y.; Yamauchi, A.; Sumardika, I.W.; Chen, Y.; Kinoshita, R.; Yamamura, M.; et al. Extracellular S100A11 Plays a Critical Role in Spread of the Fibroblast Population in Pancreatic Cancers. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics* **2019**, *27*, 713–727, doi:10.3727/096504018X15433161908259.
336. Xu, C.; Chen, H.; Wang, X.; Gao, J.; Che, Y.; Li, Y.; Ding, F.; Luo, A.; Zhang, S.; Liu, Z. S100A14, a Member of the EF-Hand Calcium-Binding Proteins, Is Overexpressed in Breast Cancer and Acts as a Modulator of HER2 Signaling. *Journal of Biological Chemistry* **2014**, *289*, 827–837, doi:10.1074/jbc.M113.469718.
337. Dukhanina, E.A.; Portseva, T.N.; Dukhanin, A.S.; Georgieva, S.G. Triple-Negative and Triple-Positive Breast Cancer Cells Reciprocally Control Their Growth and Migration via the S100A4 Pathway. *Cell Adhesion & Migration* **2022**, *16*, 65–71, doi:10.1080/19336918.2022.2072554.
338. Liu, Y.; Geng, Y.-H.; Yang, H.; Yang, H.; Zhou, Y.-T.; Zhang, H.-Q.; Tian, X.-X.; Fang, W.-G. Extracellular ATP Drives Breast Cancer Cell Migration and Metastasis via S100A4 Production by Cancer Cells and Fibroblasts. *Cancer Lett* **2018**, *430*, 1–10, doi:10.1016/j.canlet.2018.04.043.
339. Hao, J.; Wang, K.; Yue, Y.; Tian, T.; Xu, A.; Hao, J.; Xiao, X.; He, D. Selective Expression of S100A11 in Lung Cancer and Its Role in Regulating Proliferation of Adenocarcinomas Cells. *Mol Cell Biochem* **2012**, *359*, 323–332, doi:10.1007/s11010-011-1026-8.
340. Koh, S.A.; Lee, K.H. HGF-Mediated S100A11 Overexpression Enhances Proliferation and Invasion of Gastric Cancer. *Am J Transl Res* **2018**, *10*, 3385–3394.
341. Ma, G.; Dai, W.; Zhang, J.; Li, Q.; Gu, B.; Song, Y.; Yang, X. ELK1-mediated Upregulation of lncRNA LBX2-AS1 Facilitates Cell Proliferation and Invasion via Regulating miR-491-5p/S100A11 Axis in Colorectal Cancer. *Int J Mol Med* **2021**, *48*, 138, doi:10.3892/ijmm.2021.4971.
342. Zhang, M.-X.; Gan, W.; Jing, C.-Y.; Zheng, S.-S.; Yi, Y.; Zhang, J.; Xu, X.; Lin, J.-J.; Zhang, B.-H.; Qiu, S.-J. S100A11 Promotes Cell Proliferation via P38/MAPK Signaling Pathway in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Mol Carcinog* **2019**, *58*, 19–30, doi:10.1002/mc.22903.
343. Cecil, D.L.; Johnson, K.; Rediske, J.; Lotz, M.; Schmidt, A.M.; Terkeltaub, R. Inflammation-Induced Chondrocyte Hypertrophy Is Driven by Receptor for Advanced Glycation End Products. *J Immunol* **2005**, *175*, 8296–8302, doi:10.4049/jimmunol.175.12.8296.
344. Sakaguchi, M.; Sonogawa, H.; Murata, H.; Kitazoe, M.; Futami, J.; Kataoka, K.; Yamada, H.; Huh, N. S100A11, an Dual Mediator for Growth Regulation of Human Keratinocytes. *Mol Biol Cell* **2008**, *19*, 78–85, doi:10.1091/mbc.E07-07-0682.

345. Hung, K.-W.; Chang, Y.-M.; Yu, C. Resonance Assignments of Ca²⁺-Bound Human S100A11. *Biomol NMR Assign* **2013**, *7*, 211–214, doi:10.1007/s12104-012-9412-z.
346. Hudson, B.I.; Lippman, M.E. Targeting RAGE Signaling in Inflammatory Disease. *Annual Review of Medicine* **2018**, *69*, 349–364, doi:10.1146/annurev-med-041316-085215.
347. Kierdorf, K.; Fritz, G. RAGE Regulation and Signaling in Inflammation and Beyond. *Journal of Leukocyte Biology* **2013**, *94*, 55–68, doi:10.1189/jlb.1012519.
348. Liu, C.; Du, H.; Wang, Y.; Gong, N.; Qi, W.; Zhou, X.; Shi, L. S100A11 Regulates Nasal Epithelial Cell Remodeling and Inflammation in CRSwNPs via the RAGE-Mediated AMPK-STAT3 Pathway. *Molecular Immunology* **2021**, *140*, 35–46, doi:10.1016/j.molimm.2021.09.014.
349. Xian, Z.; Tian, J.; Zhao, Y.; Yi, Y.; Li, C.; Han, J.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Wang, L.; Liu, S.; et al. Differences in P38-STAT3-S100A11 Signaling after the Administration of Aristolochic Acid I and IVa May Account for the Disparity in Their Nephrotoxicity. *Phytomedicine* **2023**, *114*, 154815, doi:10.1016/j.phymed.2023.154815.
350. Yin, C.; Li, H.; Zhang, B.; Liu, Y.; Lu, G.; Lu, S.; Sun, L.; Qi, Y.; Li, X.; Chen, W. RAGE-Binding S100A8/A9 Promotes the Migration and Invasion of Human Breast Cancer Cells through Actin Polymerization and Epithelial-Mesenchymal Transition. *Breast Cancer Res Treat* **2013**, *142*, 297–309, doi:10.1007/s10549-013-2737-1.
351. Logsdon, C.; Fuentes, M.; Huang, E.; Arumugam, T. RAGE and RAGE Ligands in Cancer. *CMM* **2007**, *7*, 777–789, doi:10.2174/156652407783220697.
352. Shibano, N.; Adachi, A.; Wakitani, K.; Asano, E.; Sekiguchi, F.; Okada, T.; Nishikawa, H.; Toyooka, N.; Kawabata, A. Azeliragon, a RAGE Antagonist, Suppresses Cell Survival and Proliferation of Human Prostate Cancer-Derived LNCaP Cells: Analysis of Altered Cell Signaling. *Proceedings for Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society* **2022**, *95*, 3-P-272, doi:10.1254/jpsuppl.95.0_3-P-272.
353. Kong, W.; Zhu, L.; Li, T.; Chen, J.; Fan, B.; Ji, W.; Zhang, C.; Cai, X.; Hu, C.; Sun, X.; et al. Azeliragon Inhibits PAK1 and Enhances the Therapeutic Efficacy of AKT Inhibitors in Pancreatic Cancer. *European Journal of Pharmacology* **2023**, *948*, 175703, doi:10.1016/j.ejphar.2023.175703.
354. Huang, Y.-K.; Chou, R.-H.; Yu, C. Tranilast Blocks the Interaction between the Protein S100A11 and Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) V Domain and Inhibits Cell Proliferation. *Journal of Biological Chemistry* **2016**, *291*, 14300–14310, doi:10.1074/jbc.M116.722215.
355. Zheng, Z.-Y.; Chu, M.-Y.; Lin, W.; Zheng, Y.-Q.; Xu, X.-E.; Chen, Y.; Liao, L.-D.; Wu, Z.-Y.; Wang, S.-H.; Li, E.-M.; et al. Blocking STAT3 Signaling Augments MEK/ERK Inhibitor Efficacy in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cell Death Dis* **2022**, *13*, 1–14, doi:10.1038/s41419-022-04941-3.
356. Yang, L.; Liu, Y.; Wang, Y.; Li, J.; Liu, N. Azeliragon Ameliorates Alzheimer's Disease via the Janus Tyrosine Kinase and Signal Transducer and Activator of Transcription Signaling Pathway. *Clinics (Sao Paulo)* **2021**, *76*, doi:10.6061/clinics/2021/e2348.
357. Xue, J.; Jia, P.; Zhang, D.; Yao, Z. TTP488 Ameliorates NLRP3 -associated Inflammation, Viability, Apoptosis, and ROS Production in an Alzheimer's Disease Cell Model by Mediating the JAK1 / STAT3 / NFκB / IRF3 Pathway. *Cell Biochem Funct* **2021**, *39*, 555–561, doi:10.1002/cbf.3623.

358. Dieci, M.V.; Conte, P.; Bisagni, G.; Brandes, A.A.; Frassoldati, A.; Cavanna, L.; Musolino, A.; Giotta, F.; Rimanti, A.; Garrone, O.; et al. Association of Tumor-Infiltrating Lymphocytes with Distant Disease-Free Survival in the ShortHER Randomized Adjuvant Trial for Patients with Early HER2+ Breast Cancer. *Ann Oncol* **2019**, *30*, 418–423, doi:10.1093/annonc/mdz007.
359. Bianchini, G.; Pusztai, L.; Pienkowski, T.; Im, Y.-H.; Bianchi, G.V.; Tseng, L.-M.; Liu, M.-C.; Lluch, A.; Galeota, E.; Magazzù, D.; et al. Immune Modulation of Pathologic Complete Response after Neoadjuvant HER2-Directed Therapies in the NeoSphere Trial. *Ann Oncol* **2015**, *26*, 2429–2436, doi:10.1093/annonc/mdv395.
360. Muntasell, A.; Servitja, S.; Cabo, M.; Bermejo, B.; Pérez-Buira, S.; Rojo, F.; Costa-García, M.; Arpí, O.; Moraru, M.; Serrano, L.; et al. High Numbers of Circulating CD57+ NK Cells Associate with Resistance to HER2-Specific Therapeutic Antibodies in HER2+ Primary Breast Cancer. *Cancer Immunology Research* **2019**, *7*, 1280–1292, doi:10.1158/2326-6066.CIR-18-0896.
361. Dolled-Filhart, M.; Camp, R.L.; Kowalski, D.P.; Smith, B.L.; Rimm, D.L. Tissue Microarray Analysis of Signal Transducers and Activators of Transcription 3 (Stat3) and Phospho-Stat3 (Tyr705) in Node-Negative Breast Cancer Shows Nuclear Localization Is Associated with a Better Prognosis¹. *Clinical Cancer Research* **2003**, *9*, 594–600.
362. Nakagawa, T.; Oda, G.; Kawachi, H.; Ishikawa, T.; Okamoto, K.; Uetake, H. Nuclear Expression of P-STAT3 Is Associated with Poor Prognosis in ER(-) Breast Cancer. *Clinics and Practice* **2022**, *12*, 157–167, doi:10.3390/clinpract12020020.
363. Cortazar, P.; Zhang, L.; Untch, M.; Mehta, K.; Costantino, J.P.; Wolmark, N.; Bonnefoi, H.; Cameron, D.; Gianni, L.; Valagussa, P.; et al. Pathological Complete Response and Long-Term Clinical Benefit in Breast Cancer: The CTNeoBC Pooled Analysis. *Lancet* **2014**, *384*, 164–172, doi:10.1016/S0140-6736(13)62422-8.
364. Untch, M.; Fasching, P.A.; Konecny, G.E.; Hasmüller, S.; Lebeau, A.; Kreienberg, R.; Camara, O.; Müller, V.; du Bois, A.; Kühn, T.; et al. Pathologic Complete Response after Neoadjuvant Chemotherapy plus Trastuzumab Predicts Favorable Survival in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Overexpressing Breast Cancer: Results from the TECHNO Trial of the AGO and GBG Study Groups. *J Clin Oncol* **2011**, *29*, 3351–3357, doi:10.1200/JCO.2010.31.4930.
365. Singh, P.; Ali, S.A. Multifunctional Role of S100 Protein Family in the Immune System: An Update. *Cells* **2022**, *11*, 2274, doi:10.3390/cells11152274.

Anexos

Anexo I–Formulario de aprobación del Comité Ético

INFORME DEL COMITE DE ÉTICA DE LA INVESTIGACION

Dra. Lucía Llanos Jiménez, Secretaria Técnica del COMITE DE ÉTICA DE LA INVESTIGACION DE LA FUNDACION JIMENEZ DIAZ

CERTIFICA:

Que en la reunión del CEIm-FJD que tuvo lugar el 18 de diciembre de 2018 (acta nº 22/18) se evaluó el estudio referido y, ha decidido, una vez aceptadas las respuestas a las aclaraciones menores:

A P R O B A R

La propuesta para que se realice el estudio titulado: **“Caracterización y repercusión terapéutica de la ecología del cáncer de mama HER2 positivo”**. PI18/00382. Version de Abril de 2019

1. En dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente –Real decreto 1090/2015 y Decreto 39/94 de la CAM– para que la decisión del citado CEIm sea válida.
2. El Estudio reúne las normas éticas estándar de nuestra Institución para la realización de este tipo de estudios.
3. Se cumplen los preceptos éticos formulados en la Orden SAS 3470/2009 y la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y en sus posteriores revisiones, así como aquellos exigidos por la normativa aplicable en función de las características del estudio.
4. El CEImFJD, tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm FJD es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que en el caso de que algún miembro participe en el estudio o declare algún conflicto de interés no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen.
5. Asimismo, hacemos constar que existe contraprestación económica para el centro, según convocatoria de la ayuda.
6. Además, este comité recuerda la obligación de realizar el seguimiento del estudio de acuerdo a la legislación vigente.


Lo que firmo en Madrid a 11 de Abril de 2019


 Dra. Lucía Llanos Jiménez
 Secretaria Técnica CEImFJD

Conocido y conforme:


 Alberto Montero Manso
 Area Gestión Investigación

Vº Bº


 Juan Antonio Alvaro de la Parra
 Gerente FJD

PIC179-18_FJD

Anexo II–Listado de publicaciones

Parte de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han sido recogidos en la siguiente publicación:

Luque, M.; Sanz-Álvarez, M.; Santamaría, A.; Zazo, S.; Cristóbal, I.; de la Fuente, L.; Mínguez, P.; Eroles, P.; Rovira, A.; Albanell, J.; et al. Targeted Therapy Modulates the Secretome of Cancer-Associated Fibroblasts to Induce Resistance in HER2-Positive Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22, 13297, doi:10.3390/ijms222413297.

Además, la doctoranda ha participado en los siguientes artículos científicos:

1. Sanz-Álvarez, M.; **Luque, M.**; Morales-Gallego, M.; Cristóbal, I.; Ramírez-Merino, N.; Rangel, Y.; Izarzugaza, Y.; Eroles, P.; Albanell, J.; Madoz-Gúrpide, J.; et al. Generation and Characterization of Trastuzumab/Pertuzumab-Resistant HER2-Positive Breast Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci* 2023, 25, 207, doi:10.3390/ijms25010207.
2. **Luque, M.**; Sanz-Álvarez, M.; Morales-Gallego, M.; Madoz-Gúrpide, J.; Zazo, S.; Domínguez, C.; Cazorla, A.; Izarzugaza, Y.; Arranz, J.L.; Cristóbal, I.; et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Immune Response in HER2-Positive Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 2022, 14, 6034, doi:10.3390/cancers14246034.
3. Santos, A.; Cristóbal, I.; Rubio, J.; Caramés, C.; **Luque, M.**; Sanz-Álvarez, M.; Zazo, S.; Madoz-Gúrpide, J.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. MicroRNA-19b Plays a Key Role in 5-Fluorouracil Resistance and Predicts Tumor Progression in Locally Advanced Rectal Cancer Patients. *Int J Mol Sci* 2022, 23, 12447, doi:10.3390/ijms232012447.
4. **Luque, M.**; Cristóbal, I.; Sanz-Álvarez, M.; Santos, A.; Zazo, S.; Eroles, P.; Arpí, O.; Rovira, A.; Albanell, J.; Madoz-Gúrpide, J.; et al. CIP2A as a Key Regulator for AKT Phosphorylation Has Partial Impact Determining Clinical Outcome in Breast Cancer. *JCM* 2022, 11, 1610, doi:10.3390/jcm11061610.
5. Santos, A.; Cristóbal, I.; Rubio, J.; Caramés, C.; **Luque, M.**; Sanz-Álvarez, M.; Morales-Gallego, M.; Madoz-Gúrpide, J.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. MicroRNA-199b Deregulation Shows Oncogenic Properties and Promising Clinical Value as Circulating Marker in Locally Advanced Rectal Cancer Patients. *IJMS* 2022, 23, 2203, doi:10.3390/ijms23042203.
6. Cristóbal, I.; Santos, A.; Rubio, J.; Caramés, C.; Zazo, S.; Sanz-Álvarez, M.; **Luque, M.**; Madoz-Gúrpide, J.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. Validation of microRNA-199b as A Promising Predictor of Outcome and Response to Neoadjuvant Treatment in Locally Advanced Rectal Cancer Patients. 2021, 14.
7. Sanz-Álvarez, M.; Martín-Aparicio, E.; **Luque, M.**; Zazo, S.; Martínez-Useros, J.; Eroles, P.; Rovira, A.; Albanell, J.; Madoz-Gúrpide, J.; Rojo, F. The Novel Oral mTORC1/2 Inhibitor TAK-228 Reverses Trastuzumab Resistance in HER2-Positive Breast Cancer Models. *Cancers* 2021, 13, 2778, doi:10.3390/cancers13112778.
8. Rubio, J.; Cristóbal, I.; Santos, A.; Caramés, C.; **Luque, M.**; Sanz-Álvarez, M.; Zazo, S.; Madoz-Gúrpide, J.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. Low MicroRNA-19b Expression Shows a Promising Clinical Impact in Locally Advanced Rectal Cancer. *Cancers (Basel)* 2021, 13, 1456, doi:10.3390/cancers13061456.

9. Sanz-Álvarez, M.; Cristóbal, I.; Luque, M.; Santos, A.; Zazo, S.; Madoz-Gúrpide, J.; Caramés, C.; Chiang, C.-M.; García-Foncillas, J.; Eroles, P.; et al. Expression of Phosphorylated BRD4 Is Markedly Associated with the Activation Status of the PP2A Pathway and Shows a Strong Prognostic Value in Triple Negative Breast Cancer Patients. *Cancers (Basel)* 2021, 13, 1246, doi:10.3390/cancers13061246.
10. Cristóbal, I.; Rubio, J.; Torrejón, B.; Santos, A.; Caramés, C.; **Luque, M.**; Sanz-Álvarez, M.; Alonso, R.; Zazo, S.; Madoz-Gúrpide, J.; et al. MicroRNA-199b Deregulation Shows a Strong SET-Independent Prognostic Value in Early-Stage Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Medicine* 2020, 9, 2419, doi:10.3390/jcm9082419.
11. Cristóbal, I.; Rubio, J.; Santos, A.; Torrejón, B.; Caramés, C.; Imedio, L.; Mariblanca, S.; **Luque, M.**; Sanz-Alvarez, M.; Zazo, S.; et al. MicroRNA-199b Downregulation Confers Resistance to 5-Fluorouracil Treatment and Predicts Poor Outcome and Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Locally Advanced Rectal Cancer Patients. *Cancers* 2020, 12, 1655, doi:10.3390/cancers12061655.
12. Cristóbal, I.; Rubio, J.; Santos, A.; **Luque, M.**; Sanz-Alvarez, M.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. Therapeutic Implications of the PP2A/MET Signalling Axis in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity and Antitumour Properties. *British Journal of Pharmacology* 2020, 177, 3850–3851, doi:https://doi.org/10.1111/bph.15130.
13. Cristóbal, I.; **Luque, M.**; Sanz-Alvarez, M.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. Clinical Impact and Regulation of the circCAMSAP1/ miR-328-5p/E2F1 Axis in Colorectal Cancer. *Molecular Therapy* 2020, 28, 1387–1388, doi:10.1016/j.ymthe.2020.05.003.
14. Zazo, S.; González-Alonso, P.; Martín-Aparicio, E.; Chamizo, C.; **Luque, M.**; Sanz-Alvarez, M.; Mínguez, P.; Gómez-López, G.; Cristobal, I.; Caramés, C.; et al. Autocrine CCL5 Effect Mediates Trastuzumab Resistance by ERK Pathway Activation in HER2-Positive Breast Cancer. *Mol Cancer Ther* 2020, molcanther.1172.2019, doi:10.1158/1535-7163.MCT-19-1172.
15. González-Alonso, P.; Zazo, S.; Martín-Aparicio, E.; **Luque, M.**; Chamizo, C.; Sanz-Álvarez, M.; Mínguez, P.; Gómez-López, G.; Cristóbal, I.; Caramés, C.; et al. The Hippo Pathway Transducers YAP1/TEAD Induce Acquired Resistance to Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 2020, 12, doi:10.3390/cancers12051108.
16. Cristóbal, I.; Caramés, C.; Rubio, J.; Sanz-Alvarez, M.; **Luque, M.**; Madoz-Gúrpide, J.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. Functional and Clinical Impact of CircRNAs in Oral Cancer. *Cancers (Basel)* 2020, 12, doi:10.3390/cancers12041041.
17. Cristóbal, I.; **Luque, M.**; Sanz-Alvarez, M.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. Relevance of the PP2A Pathway in the Molecular Mechanisms of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2019, 61, 658–659, doi:10.1165/rcmb.2019-0058LE.
18. Cristóbal, I.; Sanz-Alvarez, M.; **Luque, M.**; Rojo, F.; García-Foncillas, J. Post-Translational Regulation Could Determine Functional Differences between SET Alpha and Beta Isoforms in Chronic Lymphocytic Leukaemia. *British Journal of Haematology* 2019, 186, 638–638, doi:https://doi.org/10.1111/bjh.15935.
19. Cristóbal, I.; Sanz-Alvarez, M.; **Luque, M.**; Rojo, F.; García-Foncillas, J. Letter by Cristóbal et al Regarding Article, “Protein Phosphatase 2A Regulates Cardiac Na⁺ Channels.” *Circ Res* 2019, 124, e59, doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.314905.

20. Cristóbal, I.; Sanz-Álvarez, M.; **Luque, M.**; Caramés, C.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. The Role of MicroRNAs in Hepatoblastoma Tumors. *Cancers* 2019, 11, 409, doi:10.3390/cancers11030409.
21. Cristóbal, I.; Torrejón, B.; Rubio, J.; Santos, A.; Pedregal, M.; Caramés, C.; Zazo, S.; **Luque, M.**; Sanz-Alvarez, M.; Madoz-Gúrpide, J.; et al. Deregulation of SET Is Associated with Tumor Progression and Predicts Adverse Outcome in Patients with Early-Stage Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Medicine* 2019, 8, 346, doi:10.3390/jcm8030346.
22. Torrejón, B.; Cristóbal, I.; Caramés, C.; Prieto-Potín, I.; Chamizo, C.; Santos, A.; Sanz-Alvarez, M.; Serna-Blasco, R.; **Luque, M.**; Madoz-Gúrpide, J.; et al. Analysis of Potential Alterations Affecting SETBP1 as a Novel Contributing Mechanism to Inhibit PP2A in Colorectal Cancer Patients. *World J Surg* 2018, 42, 3771–3778, doi:10.1007/s00268-018-4684-9.
23. Cristóbal, I.; Torrejón, B.; Santos, A.; **Luque, M.**; Sanz-Alvarez, M.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. Dissecting the Therapeutic Implications of the Complex SMAD4 Regulatory Network in Metastatic Colorectal Cancer. *European Journal of Surgical Oncology* 2018, 44, 1283–1284, doi:10.1016/j.ejso.2018.04.021.
24. Cristóbal, I.; Sanz-Alvarez, M.; Torrejón, B.; Santos, A.; **Luque, M.**; Rojo, F.; García-Foncillas, J. Potential Therapeutic Impact of miR-145 Deregulation in Colorectal Cancer. *Molecular Therapy* 2018, 26, 1399–1400, doi:10.1016/j.ymthe.2018.05.008.

