



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**Trabajo de Fin de Máster Titulado:**

**“ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN GÉNICA ASOCIADOS AL EFECTO DE LOS FÁRMACOS TRASTUZUMAB, PERTUZUMAB Y T-DM1 EN CLONES RESISTENTES DE CÁNCER DE MAMA HER2+”**

**Realizado por:**

**JEFFERSON ENRIQUE ESTUPIÑÁN VALENCIA**

**Directores del proyecto:**

Jorge P. Espinosa Espinosa, MSc.  
Dámaris P. Intriago-Baldeón, MSc.

**Como requisito para la obtención del título de:**

**MAGÍSTER EN BIOMEDICINA**

**QUITO, ABRIL DEL 2024**

## **DECLARACIÓN JURAMENTADA**

Yo, **JEFFERSON ENRIQUE ESTUPIÑÁN VALENCIA**, ecuatoriano, con cédula de ciudadanía N° 1723529903, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido presentado anteriormente para ningún grado o calificación profesional, y se basa en las referencias bibliográficas descritas en este documento.

A través de esta declaración, cedo los derechos de propiedad intelectual a la **UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK**, según lo establecido en la Ley de Propiedad Intelectual, reglamento y normativa institucional vigente.

-----  
**Jefferson Enrique Estupiñán Valencia**

**C.I.: 1723529903**

## **DECLARACIÓN DE LOS DIRECTORES DE TESIS**

Declaramos haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

---

**JORGE ESPINOSA ESPINOSA**

MSc. en Bioinformática



firmado electrónicamente por:  
**DAMARIS PRISCILA  
INTRIAGO BALDEON**

---

**DÁMARIS INTRIAGO BALDEÓN**

MSc. en Medicina Molecular

**LOS PROFESORES INFORMANTES:**

MARÍA FERNANDA GUTIÉRREZ BRAVO

RUBÉN ALEXANDER MALDONADO ORBE

Después de revisar el trabajo presentado lo han calificado como apto para su defensa  
oral ante el tribunal examinador.

---

**María Fernanda Gutiérrez, Ph.D.**

---

**Alexander Maldonado, MSc.**

Quito, 10 de abril de 2024

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE**

Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.

-----  
**Jefferson Enrique Estupiñán Valencia**

C.I.: 1723529903

Artículo de tesis

# Análisis bioinformático de los patrones de expresión génica asociados al efecto de los fármacos Trastuzumab, Pertuzumab y T-DM1 en clones resistentes de cáncer de mama HER2+.

Jefferson Estupiñán<sup>1,2</sup>, Dámaris P. Intriago-Baldeón (Tutora)<sup>1,2\*</sup> and Jorge Espinosa (Tutor)<sup>1,2,3,4\*</sup>

<sup>1</sup> Maestría en Biomedicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Particular Internacional SEK, Quito 170302, Ecuador; [jefferson.estupinan@uisek.edu.ec](mailto:jefferson.estupinan@uisek.edu.ec).

<sup>2</sup> Grupo de Investigación en Biomedicina Experimental y Aplicada, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Particular Internacional SEK, Quito 170302, Ecuador; [damaris.intriago@uisek.edu.ec](mailto:damaris.intriago@uisek.edu.ec).

<sup>3</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), 46010 Valencia, Spain; [jorge.espinosae@uisek.edu.ec](mailto:jorge.espinosae@uisek.edu.ec).

<sup>4</sup> University Research Institute for Biotechnology and Biomedicine (BIOTECMED), Universidad de Valencia, Valencia, Spain. [jorge.espinosae@uisek.edu.ec](mailto:jorge.espinosae@uisek.edu.ec).

\*Autores de Correspondencia: [jorge.espinosae@uisek.edu.ec](mailto:jorge.espinosae@uisek.edu.ec); [damaris.intriago@uisek.edu.ec](mailto:damaris.intriago@uisek.edu.ec).

**Resumen:** La resistencia a las terapias dirigidas constituye uno de los retos actuales en el tratamiento del subtipo de cáncer de mama HER2+. En este contexto, con el fin de superar la resistencia a los tratamientos que emplean anticuerpos monoclonales (*mAbs*), se han desarrollado conjugados anticuerpo-fármaco (*ADCs*), como el Trastuzumab-*emtansina* (T-DM1). Sin embargo, se ha reportado la capacidad de las células cancerosas de adquirir resistencia a estos fármacos. En este sentido, es necesario dilucidar los mecanismos moleculares que promueven la aparición de resistencia a este tipo de fármacos. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue identificar los patrones de expresión génica asociados al efecto de los fármacos Trastuzumab (T), la combinación Trastuzumab + Pertuzumab (TP) y T-DM1 en clones resistentes de cáncer de mama HER2+, mediante un análisis transcriptómico *in silico*, para establecer potenciales dianas terapéuticas. Se analizaron los datos de GSE121105 y GSE100192 presentes en la base de datos GEO del NCBI; los genes diferencialmente expresados (DEGs) fueron analizados utilizando herramientas como edgeR y limma en RStudio. Posteriormente, se enriquecieron los DEGs en la ontología génica (GO), incluidas las funciones moleculares (MF), los componentes celulares (CC), y los procesos biológicos (BP) y se realizó un análisis de enriquecimiento de vías con GSEA. En este estudio, se identificaron 14 genes en común relacionados con el efecto del Trastuzumab en clones resistentes, 27 genes comunes en clones resistentes a TP y 614 genes comunes para clones resistentes a T-DM1. Los genes IGFBP3 (subexpresado en la resistencia a Trastuzumab), CKS2 (sobrexpresado en la resistencia a TP) y HMGCS2 (subexpresado en la resistencia a T-DM1 y sobrexpresado en resistencia a Trastuzumab y en la resistencia TP) mostraron diferencias relevantes en sus patrones de expresión génica y podrían ser considerados potenciales dianas terapéuticas que contribuyan a superar las resistencias a los *mAbs* y al conjugado T-DM1 en el cáncer de mama HER2+.

**Palabras clave:** cáncer de mama, anticuerpos monoclonales, conjugado, resistencia, bioinformática, expresión diferencial.

**Abstract:** Resistance to targeted therapies is one of the current challenges in the treatment of HER2+ breast cancer subtype. In this context, to overcome resistance to treatments using monoclonal antibodies (*mAbs*), antibody-drug conjugates (*ADCs*), such as Trastuzumab-*emtansine* (T-DM1), have been developed. However, the ability of cancer cells to acquire resistance to these drugs has been reported. In this regard, it is necessary to elucidate the molecular mechanisms that promote the emergence of resistance to this type of drugs. Therefore, the aim of this study was to identify gene expression patterns associated with the effect of the drugs Trastuzumab (T), the combination Trastuzumab + Pertuzumab (TP) and T-DM1 in resistant HER2+ breast cancer clones, by *in silico* transcriptomic analysis, to establish potential therapeutic targets. Data from GSE121105 and GSE100192 present in the NCBI GEO database were analyzed; differentially expressed genes (DEGs) were analyzed using tools such as edgeR and limma in RStudio. Subsequently, DEGs were enriched in gene ontology (GO), including molecular functions (MF), cellular components (CC), and biological processes (BP) and pathway enrichment analysis was performed with GSEA. In this study, 14 common genes related to the effect of Trastuzumab in resistant clones, 27 common genes in TP-resistant clones, and 614 common genes for T-DM1-resistant clones were identified. The genes IGFBP3 (downexpressed in Trastuzumab resistance), CKS2 (overexpressed in TP resistance) and HMGCS2 (downexpressed in T-DM1 resistance and overexpressed in Trastuzumab resistance and TP resistance) showed relevant differences in their gene expression patterns and could be considered as potential therapeutic targets contributing to overcome resistance to *mAbs* and T-DM1 conjugate in the HER2+ breast cancer.

**Keywords:** breast cancer, monoclonal antibodies, conjugate, resistance, bioinformatics, differential expression.

## 1. Introducción.

El cáncer de mama es la patología ginecológica que ocupa el primer lugar en incidencia y mortalidad en la población femenina a nivel mundial (Smolarz et al., 2022). Uno de los subtipos moleculares del cáncer de mama es el HER2+, el cual se caracteriza por la sobreexpresión del receptor HER2, derivado del gen *ERBB2*, en las células tumorales malignas de mama, lo que promueve su proliferación descontrolada (Krishnamurti & Silverman, 2014). Este subtipo molecular es identificado en alrededor del 20% al 30% de los casos de cáncer de mama diagnosticados en una etapa temprana, lo cual está asociado con una evolución clínica más agresiva de esta enfermedad (Gale et al., 2020). En la actualidad, el tratamiento sistémico estándar aprobado contra el cáncer de mama HER2+ localizado consiste en una combinación de quimioterapia neoadyuvante (QTNA) y terapia anti-HER2 (Walbaum et al., 2023). Los medicamentos dirigidos contra el receptor HER2 han demostrado ser efectivos principalmente para pacientes con cáncer de mama cuyos tumores malignos presentan altas concentraciones de esta proteína (National Cancer Institute, 2022). Sin embargo, el número de muertes causadas por este subtipo de cáncer de mama sigue aumentando en todo el mundo. En este sentido, la mayoría de los medicamentos contra el cáncer de mama HER2+ que se introdujeron en el mercado entre 2009 y 2013 solo otorgan beneficios mínimos en términos de supervivencia global, lo cual resalta la necesidad urgente de mejorar su eficacia terapéutica (Hafaez et al., 2020).

Por esta razón, los nuevos medicamentos oncológicos que involucran el uso de anticuerpos monoclonales (mAbs) específicos unidos a fármacos citotóxicos, denominados conjugados anticuerpo-droga (*Antibody-drug conjugates*, ADCs), se presentan como una prometedora alternativa. El progreso acelerado en el desarrollo de los ADCs contra el cáncer de mama HER2+ ha generado nuevas y mejores oportunidades terapéuticas para los pacientes que padecen esta enfermedad (Abelman et al., 2022). Esta modalidad terapéutica permite identificar y eliminar células cancerosas de manera precisa y efectiva. Actualmente, existen algunos ejemplos de mAbs que son altamente específicos y efectivos en el tratamiento del cáncer de mama HER2+ (Subhan & Torchilin, 2023). En este sentido, el Trastuzumab es un mAb recombinante humanizado, el cual es empleado como un tratamiento estándar para el cáncer de mama HER2+ desde hace más de una década; este fármaco mejora la supervivencia de los pacientes cuando se combina con quimioterapia. Por otro lado, el Pertuzumab es un mAb anti-HER2 IgG1, dirigido al dominio de dimerización del receptor HER2; se ha demostrado que este fármaco actúa en sinergia con el Trastuzumab para detener el crecimiento tumoral. Estudios clínicos previos han confirmado que la adición de Pertuzumab a tratamientos con Trastuzumab mejora significativamente la supervivencia de pacientes con cáncer de mama metastásico y en etapas iniciales, sin aumentar el riesgo de desarrollar problemas cardíacos (Oh & Bang, 2020). Dentro de este contexto, el Trastuzumab-emtansina (*Trastuzumab-emtansine*, T-DM1) marcó un hito al ser el primer ADC autorizado para el tratamiento del cáncer de mama en estadio avanzado (Drago et al., 2021). Cuando el T-DM1 se une a las células cancerosas, éste es internalizado y, posteriormente, el enlace químico existente entre el Trastuzumab y el DM1 se rompe, lo cual libera al agente citotóxico en el interior de la célula (Lyseng-Williamson, 2020). T-DM1 promueve el bloqueo de la señalización inducida por el receptor HER2, la respuesta inmunitaria mediada por Fc y la disrupción de la estructura de los microtúbulos. Aunque el T-DM1 ha demostrado ser efectivo en muchos pacientes, no todos responden de manera favorable (Rinnerthaler et al., 2019).

Dado que los ADCs son fármacos que poseen estructuras moleculares complejas y su mecanismo de acción involucra varios pasos, la resistencia puede surgir en diferentes etapas, desde la identificación del antígeno, la captación de la sustancia, el procesamiento interno, hasta la liberación del agente citotóxico y el control del proceso apoptótico (Khoury et al., 2023). Estos mecanismos de resistencia así como sus efectos sobre la expresión génica representan un desafío importante en el desarrollo de tratamientos más efectivos contra el cáncer de mama HER2+ y enfatizan la necesidad de investigar a fondo los mecanismos moleculares que inducen la resistencia a los ADCs, con el fin de encontrar nuevas estrategias para superarlos. Se ha documentado que los cambios en la expresión génica pueden estar asociados con la resistencia a estos fármacos (Ríos-Luci et al., 2017). Por lo tanto, **el objetivo de este estudio** fue identificar los patrones de expresión génica asociados al efecto de los fármacos Trastuzumab, Pertuzumab y T-DM1 en clones resistentes de cáncer de mama HER2+, mediante un análisis transcriptómico *in silico*, para establecer potenciales dianas terapéuticas en el contexto de esta neoplasia maligna.

## 2. Materiales y métodos.

### 2.1. Selección de estudios y bases de datos.

El presente estudio comenzó con la búsqueda de información en la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO) del Centro Nacional de Biotecnología (NCBI, por sus siglas en inglés) sobre el uso de Trastuzumab, Pertuzumab y T-DM1 en el tratamiento del cáncer de mama HER2+ y la resistencia a estos mAbs y ADC. A continuación, se seleccionaron dos estudios que emplearon la línea celular tumoral humana de cáncer de mama BT-474; en estos estudios, se empleó el secuenciador Illumina HiSeq 200 (GSE121105) junto con Microarray 2.0 ST (GSE100192). Para realizar la descarga de archivos, se utilizó la base de datos SRATools (versión 3.0.7). Se analizaron 21 muestras del proyecto GSE121105 y 15 muestras del proyecto GSE100192. Posteriormente, se obtuvo el archivo de secuencias de ácidos nucleicos correspondiente a la versión más reciente del genoma humano de referencia (GRCh38) utilizando la plataforma *Ensembl genome browser 111*.

## 2.2 Análisis de calidad de datos, alineamiento, cuantificación y normalización de recuentos.

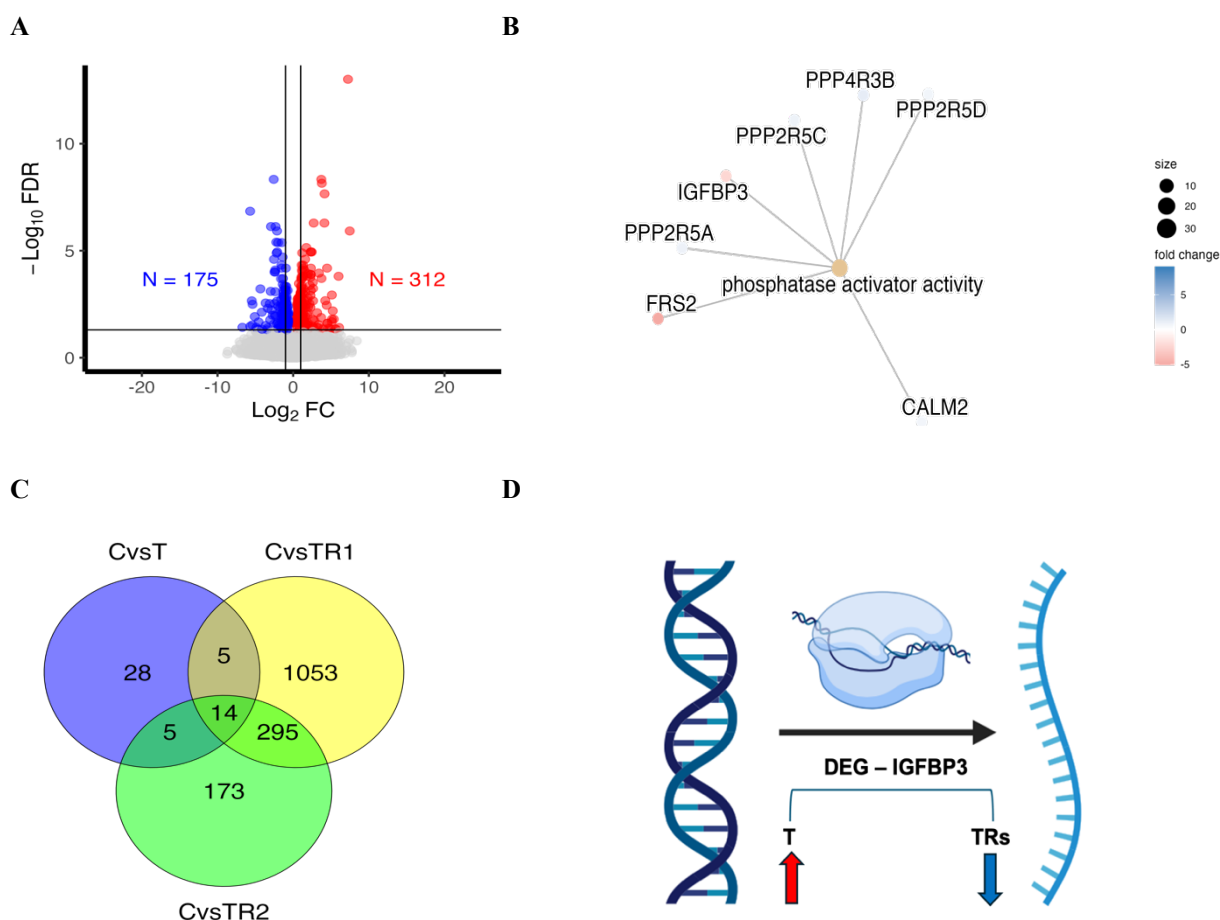
Desde la terminal, para el proceso de verificación de la calidad de las lecturas crudas, se utilizó la herramienta FastQC v0.12.1. Una vez identificados los adaptadores y las secuencias de mala calidad, se aplicó una corrección con la herramienta Trimmomatic (versión 0.39) (Bolger et al., 2014). El proceso de pseudo alineamiento y cuantificación se realizó con la herramienta Kallisto (versión 0.50) (Bray et al., 2016). Finalmente, el proceso de normalización de recuentos se llevó a cabo con la herramienta edgeR (versión 4.0.9) (Robinson et al., 2010) y para el caso de GSE121105 y GEO2R, con el paquete limma (Ritchie et al., 2015) mediante la prueba de cuasi verosimilitud para GSE100192.

## 2.3 Análisis de la expresión diferencial de genes y análisis de enriquecimiento funcional.

Los análisis de genes diferencialmente expresados (*DEGs*, por sus siglas en inglés) para los estudios seleccionados se realizaron utilizando Rstudio (023.12.1.402) (Posit team, 2024) con la herramienta edgeR (versión 4.0.9) (Robinson et al., 2010). Mientras que, para el análisis de enriquecimiento funcional, se utilizó el paquete clusterProfiler 4.10.1 (Wu et al., 2021) y las bases de datos de Ontología Génica para conjuntos de datos RNA-seq (*GO*, por su siglas en inglés), para la determinación de funciones moleculares (*MF*), componentes celulares (*CC*) y procesos biológicos (*BP*) involucrados. Finalmente, para la interpretación del conjunto de genes implicados, se aplicó el método computacional de análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (*GSEA*, por sus siglas en inglés) (Subramanian et al., 2005). La prueba de enriquecimiento utilizada fue la prueba hipergeométrica con un *p-value cutoff* de 0.01.

## 3. Resultados

### 3.1 Análisis bioinformático transcriptómico horizontal en células BT-474 resistentes a Trastuzumab.



**Figura 1.** Caracterización genómica de la línea celular humana de cáncer de mama BT-474 resistente a Trastuzumab. **A)** Volcanograma de los DEGs en clon 1 resistente a Trastuzumab frente a la línea celular BT-474 (C). El punto de corte para los DEGs fue un cambio de 2 veces y un valor p de 0,05. Los genes que cumplieron los dos criterios están marcados con color rojo, si se encuentran sobreexpresados, o marcados con color azul, si se encuentran subexpresados; los genes filtrados están marcados con color gris. El eje de abscisas representa el cambio en la expresión de un gen como logaritmo 2 del *Fold change* (FC). El



eje de las ordenadas representa la significancia en una escala logarítmica de base 10 del *False Discovery Rate* (FDR). **B**) Gráfico de red según la anotación funcional para *MF*; actividad activadora de fosfatasa de los DEGs en clon 1 resistente a Trastuzumab frente a la línea celular BT-474. **C**) Diagrama de Venn de DEGs de la línea celular BT-474 versus BT-474 con Trastuzumab (CvsT), versus clon 1 resistente a Trastuzumab (CvsTR1) y versus clon 2 resistente a Trastuzumab (CvsTR2). El Diagrama de Venn representa el solapamiento de genes en los clones resistentes frente a la línea celular BT-474. **D**) Representación gráfica de la DEG del IGFBP3 frente a Trastuzumab (T) y frente a los 2 clones resistentes a Trastuzumab (TRs).

Se realizó un análisis bioinformático a partir de los datos obtenidos en GEO para identificar los genes diferencialmente expresados y aquellos genes en común que son DEGs en clones resistentes a Trastuzumab. Los volcanogramas de los DEGs indicaron que las células BT-474 diferían en 487 y 1367 genes de los clones resistentes TR1 y TR2, respectivamente (**Figura 1A y Figura A1A**). En la anotación funcional, se identificó una función molecular (*MF*) que presenta subexpresión, la actividad activadora de fosfatasa; esta función exhibe subexpresión de los genes IGFBP3 y FRS2 (**Figura 1B**), los cuales están involucrados en vías de señalización características del cáncer de mama HER2+ como PI3K/AKT y RAS/ERK, respectivamente (Qiu et al., 2019; Takeuchi & Gotoh, 2023).

Esta subexpresión de la actividad activadora de las fosfatasa refleja una inhibición de ciertas fosfatasa que regulan negativamente las vías de señalización del cáncer de mama HER2+ en clones resistentes a Trastuzumab (Qiu et al., 2019), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el estudio que es referente para esta investigación (Gale et al., 2020). También, las funciones moleculares como la unión a cadherinas, la unión a proteínas dependientes de calcio y el constituyente estructural del ribosoma se conectaron con la actividad activadora de fosfatasa con genes que no evidenciaron cambios diferenciales en su expresión génica (**Figura A2**). Finalmente, en congruencia con lo anterior, el análisis *GO* para procesos biológicos mostró que la segregación cromosómica nuclear y la segregación mitótica de cromátidas hermanas se encuentran alteradas; estos procesos son fundamentales para mantener la integridad genómica (**Figuras A1B**) (Kawasumi et al., 2017).

Por otro lado, los genes en común entre los clones resistentes a Trastuzumab fueron 309 y los genes relacionados al efecto del Trastuzumab en los clones resistentes fueron 14 (**Figura 1C**). Dentro de este grupo, el gen que codifica para la proteína 3 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP3) mostró una sobreexpresión cuando la línea celular BT-474 fue tratada con Trastuzumab y una subexpresión en los clones resistentes al Trastuzumab (**Figura 1D**). Mientras que, existieron 11 genes en común que codifican para proteínas y mantuvieron su expresión en ambas condiciones, frente al Trastuzumab y en clones resistentes al Trastuzumab (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Expresión de genes comunes producto del tratamiento con Trastuzumab y en clones resistentes a Trastuzumab

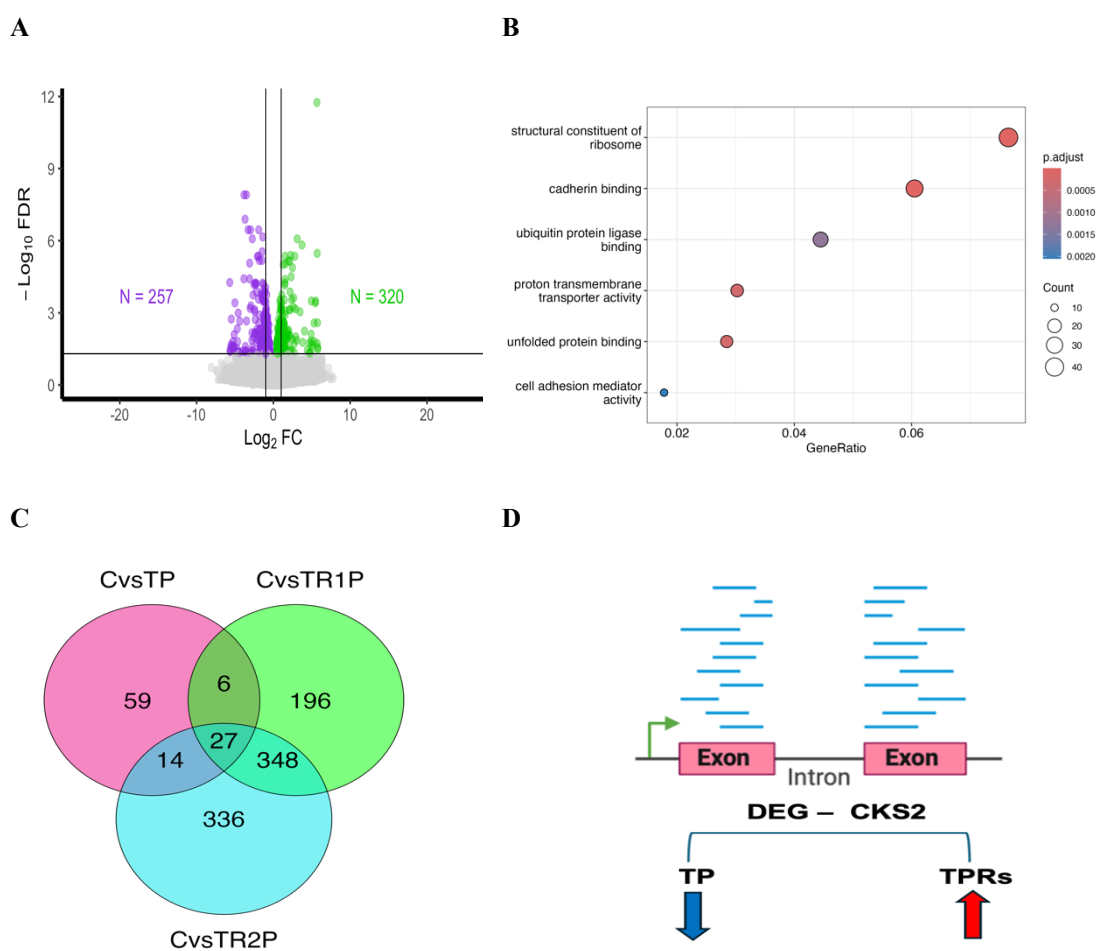
Gen (Proteína Codificante)	Descripción del gen	Expresión
SLC39A8	<i>solute carrier family 39 member 8</i>	Subexpresado
ZNF3	<i>zinc finger protein 3</i>	Subexpresado
SETMAR	<i>SET domain and mariner transposase fusion gene</i>	Subexpresado
NCAM2	<i>neural cell adhesion molecule 2</i>	Subexpresado
CRYM	<i>crystallin mu</i>	Sobreexpresado
SAT1	<i>spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1</i>	Sobreexpresado
HMGCS2	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2</i>	Sobreexpresado
CLCA2	<i>chloride channel accessory 2</i>	Subexpresado
BTG2	<i>BTG anti-proliferation factor 2</i>	Sobreexpresado
YPEL5	<i>yippee like 5</i>	Sobreexpresado
GABARAPL1	<i>GABA type A receptor associated protein like 1</i>	Sobreexpresado

### 3.2 Análisis bioinformático horizontal entre células BT-474 resistentes a la combinación Trastuzumab y Pertuzumab.

Se realizó la identificación de los genes codificantes para proteínas en los clones resistentes a la combinación de Trastuzumab y Pertuzumab. En primer lugar, los volcanogramas de los DEGs indicaron que las células BT-474 diferían en 577 y 725 genes de los clones TR1P y TR2P, respectivamente (**Figura 2A y Figura A3A**). Para el análisis ontológico, existieron dos *MFs* que estuvieron significativamente alteradas en el clon resistente a Trastuzumab combinado con Pertuzumab; éstos fueron el componente estructural del ribosoma, el cual juega un papel importante en la regulación del ciclo celular, la apoptosis y la resistencia a fármacos por la expresión de las proteínas ribosomales (Ying et al., 2023), y la unión a cadherinas, en la cual la E-cadherina posee una mayor interacción con HER2, lo que provoca la inducción de la transición epitelio-mesénquima y la resistencia a la terapia con Trastuzumab (**Figura 2B**) (Margan et al., 2020). En cambio, el enriquecimiento *GO* para los

procesos biológicos (BPs) mostró que la fosforilación oxidativa, la traducción citoplasmática, la respiración aeróbica y el proceso metabólico del ATP están significativamente enriquecidos (**Figura A3B**). Cabe mencionar que la reconfiguración metabólica está relacionada con la recurrencia tumoral, tal como lo indicó el estudio de referencia para esta investigación (Gale et al., 2020).

Los genes en común encontrados entre los clones resistentes a la combinación Trastuzumab + Pertuzumab fueron 375 y los genes relacionados al efecto de la combinación de estos fármacos en los clones resistentes fueron 27 (**Figura 2C**). En este contexto, el gen que codifica para la subunidad reguladora de proteína quinasa CDC28 2 (CKS2) presentó una subexpresión, cuando la línea celular BT-474 fue tratada con Trastuzumab + Pertuzumab, y una sobreexpresión en los clones resistentes a esta combinación de fármacos (**Figura 2D**). Mientras que, otros 10 genes en común mantuvieron su expresión en ambas condiciones, tal como se muestra en la **Tabla 2**. La expresión de los genes IGFBP3, SLC39A8, ZNF3, SETMAR, NCAM2, HMGCS2, BTG2, YPEL5 descritos en la **Tabla 1** se mantuvo en las condiciones experimentales mencionadas.



**Figura 2.** Caracterización genómica de la línea celular BT-474 resistente a la combinación Trastuzumab y Pertuzumab. **A)** Volcanograma de los DEGs en clon 1 resistente a Trastuzumab y Pertuzumab frente a la línea celular BT-474. El punto de corte para los DEGs fue un cambio de 2 veces y un valor p de 0,05. Los genes que cumplieron los dos criterios están marcados con color verde, si se encuentran sobreexpresados, o con color morado, si se encuentran subexpresados; los genes filtrados están marcados con color gris. El eje de abscisas representa el cambio en la expresión de un gen como logaritmo 2 del *Fold change* (FC). El eje de las ordenadas representa la significancia en una escala logarítmica de base 10 del *False Discovery Rate* (FDR). **B)** Gráfico de puntos según la anotación funcional para *MF* de los DEGs en clon 1 resistente a Trastuzumab + Pertuzumab frente a la línea celular BT-474. **C)** Diagrama de Venn de DEGs de la línea celular BT-474 versus BT-474 tratada con Trastuzumab + Pertuzumab (CvsTP), versus clon 1 resistente a Trastuzumab + Pertuzumab (CvsTR1P) y versus clon 2 resistente a Trastuzumab + Pertuzumab (CvsTR2P). El Diagrama de Venn representa el solapamiento de genes en los clones resistentes frente a la línea celular BT-474. **D)** Representación gráfica de la DEG del CSK2 frente a Trastuzumab + Pertuzumab (TP) y frente a los 2 clones resistentes a Trastuzumab + Pertuzumab (TPRs).

**Tabla 2.** Expresión de genes comunes producto del tratamiento de Trastuzumab + Pertuzumab en clones resistentes a esta combinación de fármacos.

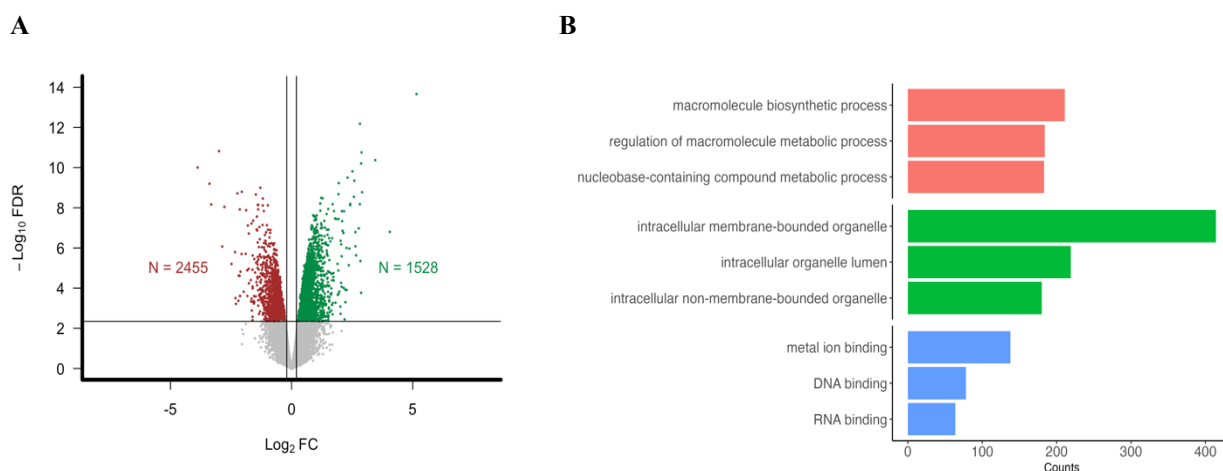
Gen (Proteína Codificante)	Descripción del gen	Expresión
ANXA1	<i>annexin A1</i>	Subexpresado

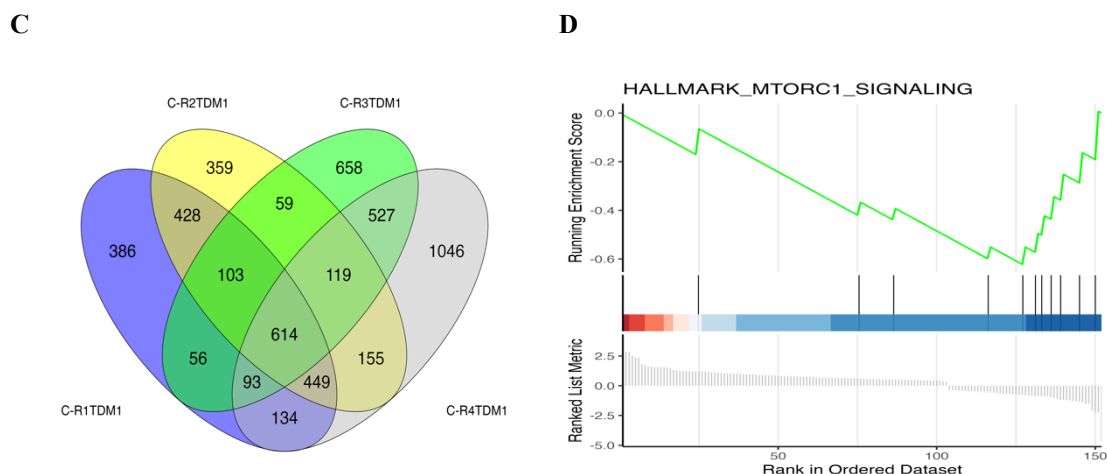
YPEL2	<i>yippee like 2</i>	Sobreexpresado
MXI1	<i>MAX interactor 1, dimerization protein</i>	Sobreexpresado
CCN1	<i>cellular communication network factor 1</i>	Subexpresado
SCGB2A2	<i>secretoglobin family 2A member 2</i>	Sobreexpresado
SQLE	<i>squalene epoxidase</i>	Subexpresado
CXCL14	<i>C-X-C motif chemokine ligand 14</i>	Subexpresado
ADAMTS1	<i>ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 1</i>	Subexpresado
PKP3	<i>plakophilin 3</i>	Subexpresado
CAMK2N1	<i>calcium/calmodulin dependent protein kinase II inhibitor 1</i>	Sobreexpresado

### 3.3 Análisis bioinformático horizontal entre células BT-474 resistentes a T-DM1.

Se determinaron los DEGs en clones resistentes al anticuerpo monoclonal conjugado T-DM1 de la línea celular BT-474. El volcánograma muestra 3983 genes que tuvieron una expresión diferencial en el clon 1 resistente a T-DM1 frente a la línea celular BT-474, dentro de los cuales 2455 genes se encontraron subexpresados y 1526 genes se encontraron sobreexpresados (**Figura 3A**). A partir de los DEGs solapados en los clones resistentes a T-DM1, se determinaron los tres procesos biológicos (*BP*), componentes celulares (*CC*) y funciones moleculares (*MF*) que presentaron un mayor conteo de genes en el análisis *GO* (**Figura 3B**). Además, el enriquecimiento de los DEGs en términos de *BPs* mostró que los genes intervienen en el proceso biosintético de macromoléculas, en la regulación del proceso metabólico de macromoléculas y en el proceso metabólico de compuestos que contienen nucleobases. Para los *CCs*, los DEGs mostraron una mayor presencia en organelos intracelulares; los DEGs comunes estuvieron asociados a la unión de iones metálicos, a la unión del ADN y a la unión del ARN en términos de *MFs* para los clones resistentes a T-DM1. Mientras que, el número de genes en común que se mantuvieron en los clones resistentes a T-DM1 se muestran en el Diagrama de Venn (**Figura 3C**), donde 614 genes fueron identificados, los cuales están asociados a las resistencias. Se identificó una vía de señalización asociada a un signo distintivo del cáncer, en donde sus proteínas exhibieron una reducción en su expresión, la cual incluye al complejo MTORC1 (Complejo 1 de la diana mamífera de la rapamicina), a partir del enriquecimiento con *GSEA* (**Figura 3D**).

Mediante un mapa de calor, se representaron 39 genes en común que fueron significativos en los clones resistentes, los cuales están directamente relacionados con los signos distintivos del cáncer, según la base de datos *GSEA*. El mapa de calor muestra que, de los 6 procesos biológicos enriquecidos, el proceso de desarrollo de glándulas contiene al gen que codifica para la 3-Hidroxiclороquina-3-Metilglutaril-Coenzima A Sintasa 2, mitocondrial (HMGCS2), el cual exhibe una marcada subexpresión, mientras que los genes codificantes CYP1A1 junto con el factor de transcripción GATA-3 trans-activo específico de células T (GATA3) mostraron una marcada sobreexpresión (**Figura 5**). Además, los genes BAX y BCL2 estuvieron sobreexpresados en los procesos biológicos de homeostasis tisular, regulación de la vía de señalización apoptótica, el desarrollo de glándulas, la vía de señalización extrínseca apoptótica y la homeostasis de la estructura anatómica.

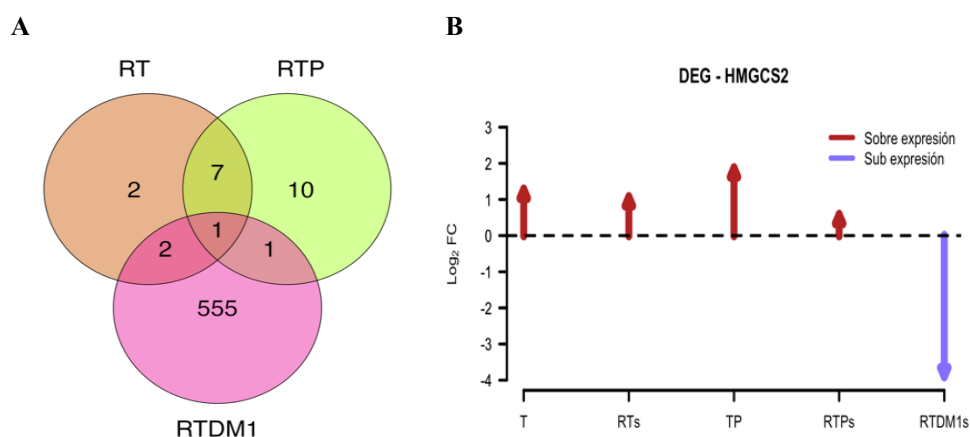




**Figura 3.** Caracterización genómica de las líneas celulares BT-474 resistentes a T-DM1. **A)** Volcanograma de los DEGs en clon 1 resistente a T-DM1 frente a la línea celular BT-474. El punto de corte para los DEGs fue un cambio de 2 veces y un valor p de 0,05. Los genes que cumplen los dos criterios están marcados con color verde, si se encuentran sobreexpresados, o con color café, si se encuentran subexpresados; los genes filtrados están marcados con color gris. El eje de abscisas representa el cambio en la expresión de un gen como logaritmo 2 del *Fold change* (*FC*). El eje de las ordenadas representa la significancia en una escala logarítmica de base 10 del *False Discovery Rate* (*FDR*). **B)** Gráfico de barras de Ontología Génica (*GO*) para *BP*, *CC* y *MF* de los DEGs de los clones resistentes a T-DM1 frente a la línea celular BT-474 con un nivel de especificidad de 5. **C)** Diagrama de Venn de DEGs de la línea celular BT-474 frente al clon 1 resistente a T-DM1 (C-R1TDM1), frente al clon 2 resistente a T-DM1 (C-R2TDM1), frente al clon 3 resistente a T-DM1 (C-R3TDM1) y frente al clon 4 resistente a T-DM1 (C-R4TDM1). El Diagrama de Venn representa el solapamiento de genes en los clones resistentes frente a la línea celular BT-474. **D)** Gráfico de enriquecimiento de *GSEA* de la vía de señalización que involucra al complejo MTORC1 en el clon R4TDM1 frente a la línea celular BT-474.

### 3.4 El gen HMGCS2 como diana terapéutica en las resistencias frente a Trastuzumab, Pertuzumab y T-DM1

Para establecer tratamientos personalizados, es necesario conocer los genes que son comunes, así como su expresión en las diferentes condiciones experimentales. Por ello, se buscaron genes en común en todas las resistencias frente a Trastuzumab, Pertuzumab y T-DM1, tal como lo muestra el Diagrama de Venn (**Figura 4A**). A partir del solapamiento de genes, se obtuvieron 8 genes en común entre las resistencias para Trastuzumab y la combinación Trastuzumab + Pertuzumab. De la misma manera, se identificaron 3 genes en común para las resistencias a Trastuzumab frente a las resistencias a T-DM1 y 2 genes comunes para el efecto de la combinación de Trastuzumab + Pertuzumab frente a las resistencias a T-DM1. El gen en común que se presentó en todas las resistencias luego de aplicar los puntos de corte fue el gen HMGCS2.



**Figura 4.** El gen HMGCS2 está presente en todas las células BT-474 resistentes a los anticuerpos monoclonales y al ADC. **A)** Diagrama de Venn de los DEGs comunes de la línea celular BT-474 frente a los clones resistentes a Trastuzumab (RT), frente a los clones resistentes a Trastuzumab + Pertuzumab (RTP) y frente a los clones resistentes a T-DM1 (RTDM1). **B)** Representación gráfica de la expresión del gen HMGCS2 en cada uno de los tratamientos utilizados.

Por último, para comprender mejor la participación del gen HMGCS2, se representó su expresión diferencial en las tres resistencias; en este sentido, frente a las resistencias a Trastuzumab y a la combinación Trastuzumab + Pertuzumab, este gen mostró sobreexpresión. En contraste, para las resistencias frente al anticuerpo monoclonal conjugado T-DM1, este gen exhibió una marcada subexpresión (**Figura 4B**).



#### 4. Discusión.

A pesar de que el desarrollo de nuevas tecnologías acopladas con la terapia dirigida contribuye a la lucha contra el cáncer de mama HER2+ de manera significativa, la farmacoterapia sigue siendo uno de los tratamientos más accesibles para el tratamiento de esta enfermedad. Los fármacos como los anticuerpos monoclonales y sus conjugados han mostrado resultados favorables en los ensayos clínicos realizados. Sin embargo, la farmacoresistencia propia de la exposición a estos medicamentos constituye un problema asociado a este tipo de tratamientos. Por ello, la caracterización de los mecanismos moleculares que promueven las resistencias a las terapias anti-HER2 es un objetivo clave para poder mejorar los tratamientos farmacológicos adyuvantes.

En esta investigación, se analizaron los datos transcriptómicos de GSE121105 y GSE100192. Se identificaron patrones de expresión génica y los genes comunes en clones resistentes a los anticuerpos monoclonales Trastuzumab y la combinación Trastuzumab + Pertuzumab y en clones resistentes al anticuerpo monoclonal conjugado T-DM1. Se encontraron 14 genes diferencialmente expresados que están asociados al efecto del Trastuzumab en clones resistentes, de los cuales el gen IGFBP3 mostró un cambio en su expresión en la línea celular BT-474 y en los clones resistentes a este fármaco. Por otro lado, el gen GABARAPL1, que codifica para proteínas involucradas en la autofagia y el reciclaje celular, exhibió una sobreexpresión, inclusive en los clones resistentes (Hervouet et al., 2015). De la misma manera, la sobreexpresión del gen BTG2 en los clones resistentes a Trastuzumab está asociada con la supresión de la proliferación en el subtipo molecular de cáncer de mama HER2+ (Wang et al., 2022). Por otro lado, la subexpresión de IGFBP3 podría contribuir a la resistencia al Trastuzumab debido a que la sobreexpresión de este gen está asociada con un efecto supresor de tumores, como la inducción de la apoptosis y la inhibición de la proliferación celular (Cai et al., 2020; Mohanraj & Oh, 2011; Qiu et al., 2019). Esto concuerda con la inhibición de la función molecular involucrada, la actividad activadora de fosfatasas, lo cual podría estar asociado al desarrollo de la resistencia mediante la interacción entre el receptor HER2 y la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR (Heynen et al., 2022).

En el caso de la combinación Trastuzumab + Pertuzumab en la línea celular BT-474, se encontraron 18 DEGs comunes y codificantes que están relacionados con el efecto de esta intervención farmacológica en los clones resistentes; de los cuales, 8 mantuvieron su expresión de la misma manera que en los clones resistentes a Trastuzumab (incluido IGFBP3). Por otro lado, el gen CKS2 exhibió diferencias en su expresión frente a los fármacos y en los clones resistentes. La sobreexpresión de CKS2 en los clones resistentes a la combinación Trastuzumab + Pertuzumab promueve una mayor proliferación celular, lo que podría conferir resistencia a las terapias dirigidas contra HER2 que emplean los fármacos estudiados (Huang et al., 2019; Zhou et al., 2021).

Un hallazgo importante y novedoso de este estudio fue la identificación de los genes diferencialmente expresados que están relacionados con los signos distintivos del cáncer en los clones resistentes a T-DM1; en este contexto, se destaca la subexpresión del gen HMGCS2 y la sobreexpresión de los genes CYP1A1, BAX y BCL2. El gen HMGCS2, que codifica para la enzima mitocondrial HMG-CoA sintasa, es responsable de la reacción anabólica para la producción de cetonas, lo cual sugiere que cuando éste se encuentra subexpresado, existe una reprogramación del metabolismo energético que reduce la cetogénesis; esto promovería la inducción de un mecanismo diferente para la obtención de combustible lo que, a su vez, induciría la inhibición de la muerte celular en las células cancerosas y promovería el desarrollo de la resistencia al ADC en el cáncer de mama HER2+ (Camarero et al., 2006; Corbet et al., 2023; C. Huang et al., 2023; Long et al., 2016; Wang et al., 2017). Se requiere realizar investigaciones que estén enfocadas en el rol del gen HMGCS2 en clones de cáncer de mama HER2+ resistentes a T-DM1, ya que los cuerpos cetónicos se comportan como oncometabolitos (Martinez-Outschoorn et al., 2012).

Por otro lado, la sobreexpresión del gen CYP1A1, que codifica para enzimas del citocromo P450 que están encargadas de metabolizar fármacos, esteroides y convertir hidrocarburos aromáticos policíclicos en compuestos cancerígenos, puede conferir resistencia a T-DM1, debido a una posible regulación positiva de estas enzimas que inhiben la acción del agente citotóxico y aumentan las posibilidades de supervivencia de las células cancerosas (AbuHammad & Zihlif, 2013; Chen et al., 2023; Liu et al., 2022). Adicionalmente, el gen BAX se encuentra sobreexpresado favoreciendo la actividad del ADC, mientras que el gen BCL2 también se encuentra sobreexpresado, lo que podría contribuir al desarrollo de la resistencia que presentan los clones frente al T-DM1 (Kheraldine et al., 2021; Mohammadi et al., 2022).

Por último, el enriquecimiento *GSEA* para el clon resistente a T-DM1 mostró que la vía de señalización asociada al complejo mTORC1 podría estar involucrada en el desarrollo de la resistencia a este fármaco; esto sugiere que la activación anormal de esta vía podría constituir un mecanismo subyacente de la resistencia al fármaco. Por lo tanto, esta vía podría ser considerada como un objetivo potencial para revertir la resistencia. En este contexto, la proteína mTOR juega un papel importante como regulador de la dinámica de los lisosomas debido a su actividad proteolítica (Casadevall et al., 2022); es preciso recordar que este proceso está involucrado en el mecanismo de acción de T-DM1 (Najjar et al., 2022). A pesar de que la vía de señalización PI3K/AKT está relacionada con la formación del complejo mTORC1, ésta no fue identificada durante el análisis bioinformático, lo cual sugiere la participación de otras vías de señalización en este escenario celular (Chang et al., 2022; Khoury et al., 2023).

En base a los análisis transcriptómicos desarrollados para las tres resistencias estudiadas, se encontró que el gen codificante HMGCS2 fue común a estos tres escenarios, pero su expresión tuvo variaciones. Para el caso del Trastuzumab y la combinación

Trastuzumab + Pertuzumab, este gen estaba sobreexpresado, lo que puede promover una mayor expresión o actividad de la enzima HMG-CoA sintasa 2, que suprime el crecimiento tumoral, debido al posible aumento del estrés oxidativo dentro de las mitocondrias en los clones resistentes (Hwang et al., 2023). En contraste, la subexpresión de este gen en los clones resistentes a T-DM1 podría estar relacionada con el mecanismo de acción de este fármaco. Cabe mencionar que la expresión diferencial de HMGCS2 ha sido documentada en varios tipos de cánceres como el de próstata, colon, pulmón, melanoma, riñón e hígado (Mao et al., 2023; Puchalska & Crawford, 2017; Wan et al., 2019).

A pesar de que este estudio generó interesantes hallazgos, como la elevada expresión del gen HMGCS2 que está asociada a la resistencia a Trastuzumab y a la combinación de Trastuzumab + Pertuzumab, junto con la marcada subexpresión de este gen en clones resistentes a T-DM1, existen varias limitaciones asociadas a este análisis bioinformático. En primer lugar, los resultados obtenidos deben ser validados mediante experimentos *in vitro*; esto permitirá corroborar la veracidad de los patrones de expresión génica observados y explorar su significado a nivel biológico. Otra limitación importante es la falta de datos clínicos de pacientes, lo que dificulta extrapolar estos hallazgos a escenarios clínicos reales. Además, las líneas celulares resistentes establecidas en condiciones de laboratorio podrían no reflejar con precisión el estado transcriptómico y la heterogeneidad de los tumores primarios o metastásicos de los pacientes tratados con T-DM1. Asimismo, este estudio carece de información sobre las mutaciones o alteraciones genéticas presentes en las células resistentes, lo que podría influir en los patrones de expresión génica observados. Otra limitación es la falta de datos sobre isoformas transcripcionales o modificaciones postraduccionales de HMGCS2, factores que podrían modular su función en la resistencia tumoral a fármacos. Finalmente, los análisis transcriptómicos no proporcionan información sobre los niveles de proteína o la actividad enzimática de HMGCS2, lo que es fundamental para comprender su impacto metabólico real.

## 5. Conclusiones.

Este estudio identificó los patrones de expresión génica asociados al efecto de los anticuerpos monoclonales Trastuzumab, Pertuzumab y al conjugado T-DM1 en clones resistentes de cáncer de mama HER2+. Los genes diferencialmente expresados que fueron comunes a las resistencias estudiadas podrían constituir potenciales dianas terapéuticas que contribuyan a superar este problema a nivel terapéutico. En este sentido, se identificaron los genes IGFBP3 y CKS2, los cuales presentaron cambios en su expresión génica en las resistencias a los mAbs. De la misma manera, se identificó el gen HMGCS2, que fue común a todas las resistencias analizadas, y su expresión cambió en función del tipo de fármaco relacionado con la resistencia. Este gen está implicado en varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama; sin embargo, no existe información sobre su rol en la adquisición de resistencia a los fármacos estudiados en el subtipo molecular de cáncer de mama HER2+. Los resultados obtenidos en este análisis bioinformático aportan conocimientos sobre los posibles mecanismos moleculares que promueven la aparición de las resistencias a los anticuerpos monoclonales y conjugados en el tratamiento del cáncer de mama HER2+. Es necesario realizar investigaciones adicionales que involucren análisis experimentales a nivel *in vitro* con el fin de validar los resultados obtenidos.

**6. Agradecimientos:** A mis tutores Jorge Espinosa y Dámaris P. Intriago-Baldeón, ya que gracias a su paciencia y entrega me ayudaron a finalizar mi trabajo de fin de maestría. También, a los docentes de la Maestría en Biomedicina de la UISEK quienes despertaron mi interés en este campo de la investigación.

**7. Conflictos de Interés:** Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## 8. Referencias citadas

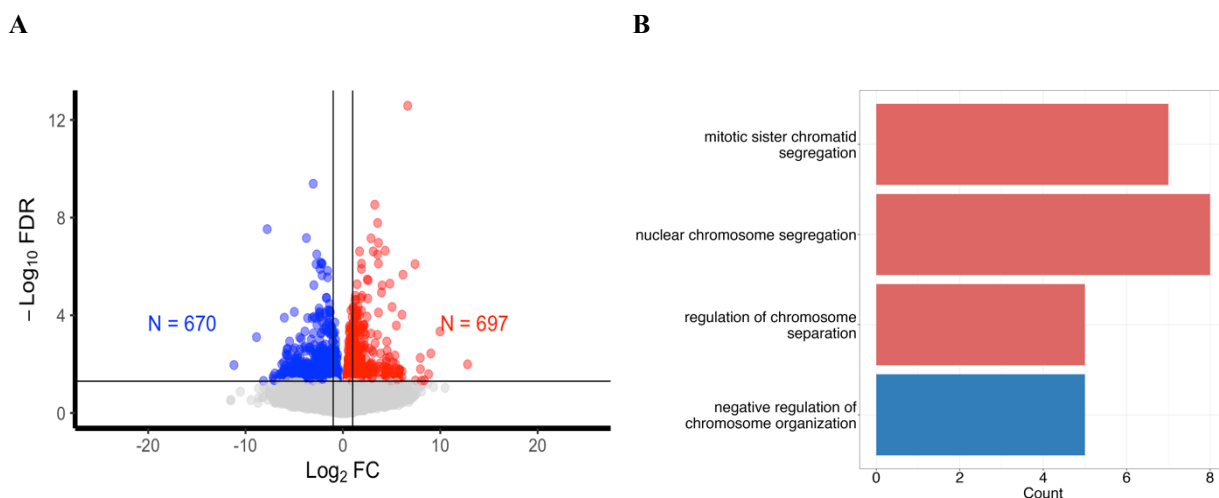
- Abelman, R. O., Medford, A., Spring, L., & Bardia, A. (2022). Antibody Drug Conjugates in Breast Cancer: Spotlight on HER2 HHS Public Access. *Cancer Journal*, 28(6), 423–428. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000634>
- AbuHammad, S., & Zihlif, M. (2013). Gene expression alterations in doxorubicin resistant MCF7 breast cancer cell line. *Genomics*, 101(4), 213–220. <https://doi.org/10.1016/J.YGENO.2012.11.009>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU170>
- Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., & Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature Biotechnology*, 34(5), 525–527. <https://doi.org/10.1038/nbt.3519>
- Cai, Q., Dozmorov, M., & Oh, Y. (2020). IGFBP-3/IGFBP-3 Receptor System as an Anti-Tumor and Anti-Metastatic Signaling in Cancer. In *Cells* (Vol. 9, Issue 5). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9051261>
- Camarero, N., Mascaró, C., Mayordomo, C., Vilardell, F., Haro, D., & Marrero, P. F. (2006). Ketogenic HMGCS2 Is a c-Myc target gene expressed in differentiated cells of human colonic epithelium and down-regulated in colon cancer. *Molecular Cancer Research : MCR*, 4(9), 645–653. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-05-0267>
- Casadevall, D., Hernández-Prat, A., García-Alonso, S., Arpí-Lluciá, O., Menéndez, S., Qin, M., Guardia, C., Morancho, B., Sánchez-Martín, F. J., Zazo, S., Gavilán, E., Sabbaghi, M. A., Eroles, P., Cejalvo, J. M., Lluch, A., Rojo, F., Pandiella, A.,

- Rovira, A., & Albanell, J. (2022). mTOR Inhibition and T-DM1 in HER2-Positive Breast Cancer. *Molecular Cancer Research : MCR*, 20(7), 1108–1121. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-21-0545>
- Chang, C. A., Jen, J., Jiang, S., Sayad, A., Mer, A. S., Brown, K. R., Nixon, A. M. L., Dhabaria, A., Tang, K. H., Venet, D., Sotiriou, C., Deng, J., Wong, K. K., Adams, S., Meyn, P., Heguy, A., Skok, J. A., Tsirigos, A., Ueberheide, B., ... Neel, B. G. (2022). Ontogeny and Vulnerabilities of Drug-Tolerant Persisters in HER2+ Breast Cancer. *Cancer Discovery*, 12(4), 1022–1045. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1265>
- Chen, S., Li, X., Li, Y., He, X., Bryant, M., Qin, X., Li, F., Seo, J. E., Guo, X., Mei, N., & Guo, L. (2023). The involvement of hepatic cytochrome P450s in the cytotoxicity of lapatinib. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 197(1), 69–78. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFAD099>
- Corbet, A. K., Bikorimana, E., Boyd, R. I., Shokry, D., Kries, K., Gupta, A., Paton, A., Sun, Z., Fazal, Z., Freemantle, S. J., Nelson, E. R., Spinella, M. J., & Singh, R. (2023). G0S2 promotes antiestrogenic and pro-migratory responses in ER+ and ER- breast cancer cells. *Translational Oncology*, 33. <https://doi.org/10.1016/J.TRANON.2023.101676>
- Drago, J. Z., Modi, S., & Chandralapaty, S. (2021). Unlocking the potential of antibody-drug conjugates for cancer therapy HHS Public Access. *Nat Rev Clin Oncol*, 18(6), 327–344. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00470-8>
- Gale, M., Li, Y., Cao, J., Liu, Z. Z., Holmbeck, M. A., Zhang, M., Lang, S. M., Wu, L., Carmo, M. Do, Gupta, S., Aoshima, K., DiGiovanna, M. P., Stern, D. F., Rimm, D. L., Shadel, G. S., Chen, X., & Yan, Q. (2020). Acquired resistance to HER2-targeted therapies creates vulnerability to ATP synthase inhibition. *Cancer Research*, 80(3), 524–535. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3985>
- Hafaez, U., Parakh, S., Gan, H. K., & Scott, A. M. (2020). Antibody–Drug Conjugates for Cancer Therapy. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules25204764>
- Hervouet, E., Claude-Taupin, A., Gauthier, T., Perez, V., Fraichard, A., Adami, P., Despouy, G., Monnien, F., Algros, M. P., Jouvenot, M., Delage-Mourroux, R., & Boyer-Guittaut, M. (2015). The autophagy GABARAPL1 gene is epigenetically regulated in breast cancer models. *BMC Cancer*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/S12885-015-1761-4>
- Heynen, G. J. J. E., Lisek, K., Vogel, R., Wulf-Goldenberg, A., Alcaniz, J., Montaudon, E., Marangoni, E., & Birchmeier, W. (2022). Targeting SHP2 phosphatase in breast cancer overcomes RTK-mediated resistance to PI3K inhibitors. *Breast Cancer Research : BCR*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/S13058-022-01521-3>
- Huang, C., Deng, W., Xu, H. zhou, Zhou, C., Zhang, F., Chen, J., Bao, Q., Zhou, X., Liu, M., Li, J., & Liu, C. (2023). Short-chain fatty acids reprogram metabolic profiles with the induction of reactive oxygen species production in human colorectal adenocarcinoma cells. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 21, 1606–1620. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2023.02.022>
- Huang, N., Wu, Z., Hong, H., Wang, X., Yang, F., & Li, H. (2019). Overexpression of CKS2 is associated with a poor prognosis and promotes cell proliferation and invasion in breast cancer. *Molecular Medicine Reports*, 19(6), 4761–4769. <https://doi.org/10.3892/MMR.2019.10134>
- Hwang, S., Park, S., Kim, J. H., Bang, S. B., Kim, H. J., Ka, N. L., Ko, Y., Kim, S. S., Lim, G. Y., Lee, S., Shin, Y. K., Park, S. Y., Kim, S., & Lee, M. O. (2023). Targeting HMG-CoA synthase 2 suppresses tamoxifen-resistant breast cancer growth by augmenting mitochondrial oxidative stress-mediated cell death. *Life Sciences*, 328, 121827. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2023.121827>
- Kawasumi, R., Abe, T., Arakawa, H., Garre, M., Hirota, K., & Branzei, D. (2017). ESCO1/2's roles in chromosome structure and interphase chromatin organization. *Genes & Development*, 31(21), 2136–2150. <https://doi.org/10.1101/GAD.306084.117>
- Kheraldine, H., Gupta, I., Alhussain, H., Jabeen, A., Cyprian, F. S., Akhtar, S., Al Moustafa, A. E., & Rachid, O. (2021). Substantial cell apoptosis provoked by naked PAMAM dendrimers in HER2-positive human breast cancer via JNK and ERK1/ERK2 signalling pathways. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 2881–2890. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2021.05.011>
- Khoury, R., Saleh, K., Khalife, N., Saleh, M., Chahine, C., Ibrahim, R., & Lecesne, A. (2023). Mechanisms of Resistance to Antibody-Drug Conjugates. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms24119674>
- Krishnamurti, U., & Silverman, J. F. (2014). HER2 in Breast Cancer: A Review and Update. *Advances in Anatomic Pathology*, 21(2). [www.anatomicpathology.com](http://www.anatomicpathology.com)
- Liu, Z., Gao, J., Gu, R., Shi, Y., Hu, H., Liu, J., Huang, J., Zhong, C., Zhou, W., Yang, Y., & Gong, C. (2022). Comprehensive Analysis of Transcriptomics and Genetic Alterations Identifies Potential Mechanisms Underlying Anthracycline Therapy Resistance in Breast Cancer. *Biomolecules*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/BIOM12121834>
- Long, J. P., Li, X. N., & Zhang, F. (2016). Targeting metabolism in breast cancer: How far we can go? *World Journal of Clinical Oncology*, 7(1), 122–130. <https://doi.org/10.5306/WJCO.V7.I1.122>
- Lyseng-Williamson, K. A. (2020). Trastuzumab Emtansine: A Review of Its Adjuvant Use in Residual Invasive HER2-Positive Early Breast Cancer. *Drugs*, 80(16), 1723–1730. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01408-7>
- Mao, H., Wang, R., Shao, F., Zhao, M., Tian, D., Xia, H., & Zhao, Y. (2023). HMGCS2 serves as a potential biomarker for inhibition of renal clear cell carcinoma growth. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-023-41343-7>
- Margan, M. M., Cimpean, A. M., Ceausu, A. R., & Raica, M. (2020). Differential Expression of E-Cadherin and P-Cadherin in Breast Cancer Molecular Subtypes. *Anticancer Research*, 40(10), 5557–5566. <https://doi.org/10.21873/ANTICANRES.14568>
- Martinez-Outschoorn, U. E., Lin, Z., Whitaker-Menezes, D., Howell, A., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2012). Ketone body utilization drives tumor growth and metastasis. *Cell Cycle*, 11(21), 3964–3971. <https://doi.org/10.4161/CC.22137>



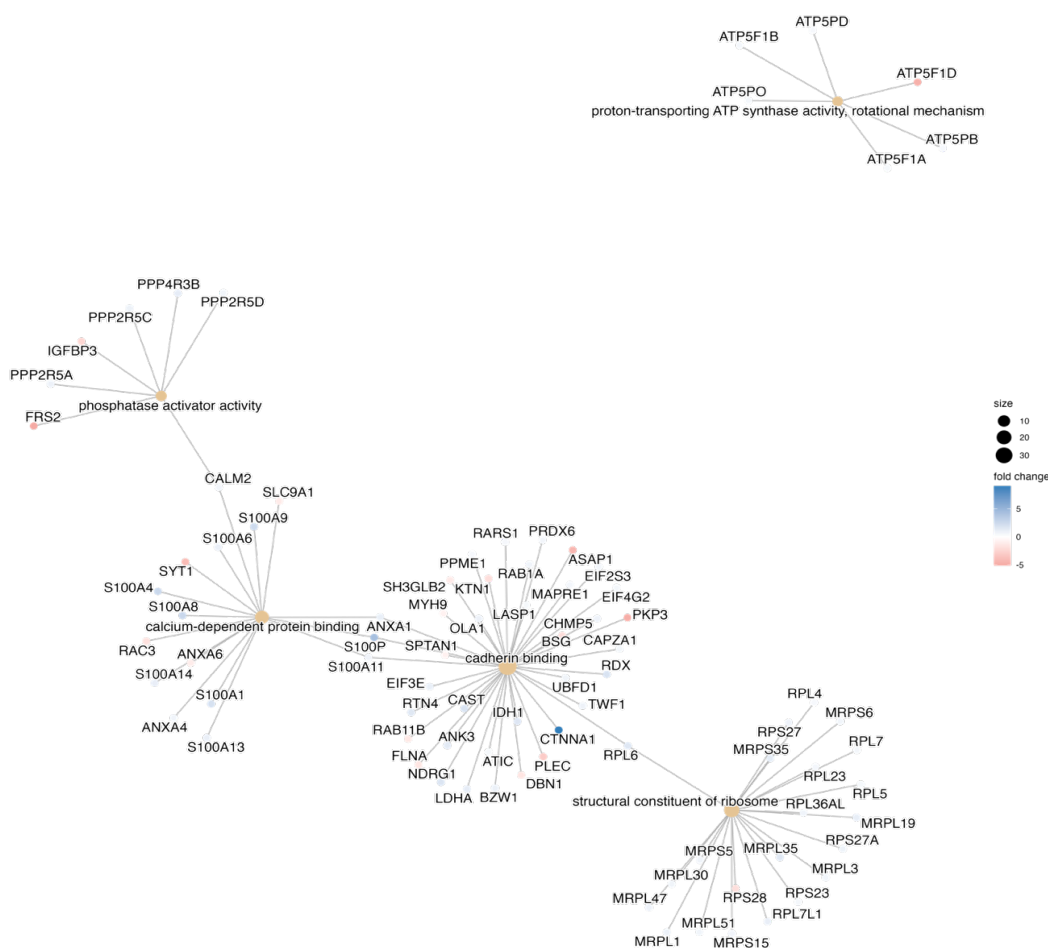
- Mohammadi, K., Salimi, M., Angaji, S. A., Saniotis, A., & Mahjoobi, F. (2022). Association study of Bif-1 gene expression with histopathological characteristics and hormone receptors in breast cancer. *BMC Women's Health*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/S12905-022-02075-4>
- Mohanraj, L., & Oh, Y. (2011). Targeting IGF-I, IGF1Rs and IGF-I Receptor System in Cancer: The Current and Future in Breast Cancer Therapy. In *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* (Vol. 6).
- Najjar, M. K., Manore, S. G., Regua, A. T., & Lo, H. W. (2022). Antibody-Drug Conjugates for the Treatment of HER2-Positive Breast Cancer. *Genes*, 13(11). <https://doi.org/10.3390/GENES13112065>
- National Cancer Institute. (2022, August 26). *Terapia dirigida para el cáncer de mama metastásico con concentraciones bajas de HER2*. National Institutes of Health. <https://www.cancer.gov/espanol/noticias/temas-y-relatos-blog/2022/cancer-seno-concentraciones-bajas-her2-enherthu>
- Oh, D. Y., & Bang, Y. J. (2020). HER2-targeted therapies — a role beyond breast cancer. In *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 17, Issue 1, pp. 33–48). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0268-3>
- Posit team. (2024). *RStudio: Integrated Development Environment for R* (2023.12.1.402).
- Puchalska, P., & Crawford, P. A. (2017). Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel Metabolism, Signaling, and Therapeutics. *Cell Metabolism*, 25(2), 262–284. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2016.12.022>
- Qiu, N., He, Y. fang, Zhang, S. ming, Zhan, Y. tao, Han, G. dong, Jiang, M., He, W. xing, Zhou, J., Liang, H. ling, Ao, X., Xia, H. ming, Li, J., Yang, Y. yang, He, Z. min, Zou, Z. zhi, & Li, H. sheng. (2019). Cullin7 enhances resistance to trastuzumab therapy in Her2 positive breast cancer via degrading IRS-1 and downregulating IGF1R-3 to activate the PI3K/AKT pathway. *Cancer Letters*, 464, 25–36. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2019.08.008>
- Rinnerthaler, G., Gampenrieder, S. P., & Greil, R. (2019). HER2 Directed Antibody-Drug-Conjugates beyond T-DM1 in Breast Cancer. *Molecular Sciences*, 20(1115). <https://doi.org/10.3390/ijms20051115>
- Ríos-Luci, C., García-Alonso, S., Díaz-Rodríguez, E., Nadal-Serrano, M., Arribas, J., Ocaña, A., & Pandiella, A. (2017). Resistance to the Antibody-Drug Conjugate T-DM1 Is Based in a Reduction in Lysosomal Proteolytic Activity. *Cancer Research*, 77(17), 4639–4651. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-3127>
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47–e47. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKV007>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE*, 26(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Subhan, M. A., & Torchilin, V. P. (2023). Advances in Targeted Therapy of Breast Cancer with Antibody-Drug Conjugate. *Pharmaceutics*, 15(1242). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041242>
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43), 15545–15550. [https://doi.org/10.1073/PNAS.0506580102/SUPPL\\_FILE/06580FIG7.JPG](https://doi.org/10.1073/PNAS.0506580102/SUPPL_FILE/06580FIG7.JPG)
- Takeuchi, Y., & Gotoh, N. (2023). Inflammatory cytokine-enriched microenvironment plays key roles in the development of breast cancers. *Cancer Science*, 114(5), 1792–1799. <https://doi.org/10.1111/CAS.15734>
- Walbaum G., B., Acevedo C., F., Carrillo B., D., Camus A., M., Manzor V., M., Martínez R., R., Veglia Q., P., Murature S., G., Salvado U., V., Muñoz M., S., Merino L., T., Sánchez R., C., Walbaum G., B., Acevedo C., F., Carrillo B., D., Camus A., M., Manzor V., M., Martínez R., R., Veglia Q., P., ... Sánchez R., C. (2023). Cáncer de mama Her2-positivo: Terapias sistémicas actuales y experiencia local. *Revista de Cirugía*, 75(1), 43–52. <https://doi.org/10.35687/S2452-454920230011653>
- Wan, S., Xi, M., Zhao, H. B., Hua, W., Liu, Y. L., Zhou, Y. L., Zhuo, Y. J., Liu, Z. Z., Cai, Z. D., Wan, Y. P., & Zhong, W. De. (2019). HMGCS2 functions as a tumor suppressor and has a prognostic impact in prostate cancer. *Pathology, Research and Practice*, 215(8). <https://doi.org/10.1016/J.PRP.2019.152464>
- Wang, J., Shidfar, A., Ivancic, D., Ranjan, M., Liu, L., Choi, M. R., Parimi, V., Gursel, D. B., Sullivan, M. E., Najor, M. S., Abukhdeir, A. M., Scholtens, D., & Khan, S. A. (2017). Overexpression of lipid metabolism genes and PBX1 in the contralateral breasts of women with estrogen receptor-negative breast cancer. *International Journal of Cancer*, 140(11), 2484–2497. <https://doi.org/10.1002/IJC.30680>
- Wang, R., Wang, R., Tian, J., Wang, J., Tang, H., Wu, T., & Wang, H. (2022). BTG2 as a tumor target for the treatment of luminal A breast cancer. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 23(5). <https://doi.org/10.3892/ETM.2022.11269>
- Wu, T., Hu, E., Xu, S., Chen, M., Guo, P., Dai, Z., Feng, T., Zhou, L., Tang, W., Zhan, L., Fu, X., Liu, S., Bo, X., & Yu, G. (2021). clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *Innovation*, 2(3). <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2021.100141>
- Ying, Y., Bian, L., Meng, Y., Zhang, M., Yao, Y., Bo, F., & Li, D. (2023). Comparative Proteomic Analysis of Irradiation-Induced Radioresistant Breast Cancer Cells Using Label-Free Quantitation. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 28(10). <https://doi.org/10.31083/J.FBL2810244>
- Zhou, Q., Liu, X., Lv, M., Sun, E., Lu, X., & Lu, C. (2021). Genes That Predict Poor Prognosis in Breast Cancer via Bioinformatical Analysis. *BioMed Research International*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6649660>

**Anexo 1.** Análisis bioinformático transcriptómico entre células resistentes a Trastuzumab (Clon 2)



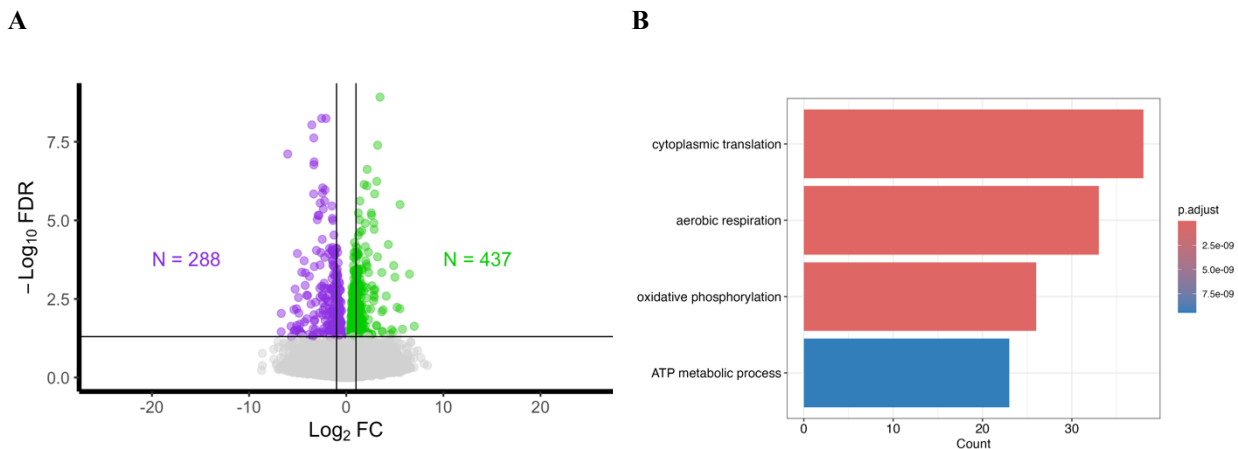
**Figura A1.** Caracterización genómica de la línea celular BT-474 resistente a Trastuzumab (Clon 2). **A)** Volcanograma de los DEGs en clon 2 resistente a Trastuzumab frente a la línea BT-474. El punto de corte para los DEGs fue un cambio de 2 veces y un valor p de 0,05. Los genes que cumplen los dos criterios se colorean en rojo, si se encuentran sobreexpresados o en azul, si se encuentran subexpresados; los genes filtrados se colorean en gris. El eje de abscisas representa el cambio en la expresión de un gen como logaritmo 2 del *Fold change* (FC). El eje de las ordenadas representa la significancia en una escala logarítmica en base 10 del *False Discovery Rate* (FDR). **B)** Gráfico de barras según la anotación funcional para BP de los DEGs en clon 2 resistente a Trastuzumab frente a la línea celular BT-474.

**Anexo 2.** Gráfico de red completo para las funciones moleculares en clon 1 resistente a Trastuzumab



**Figura A2.** Gráfico de red según la anotación funcional para las cuatro categorías más relevantes de *MFs* de los DEGs en clon 1 resistente a Trastuzumab frente a la línea celular BT-474.

### Anexo 3. Análisis bioinformático horizontal de las células resistentes a Trastuzumab con Pertuzumab (Clon 2)



**Figura A3.** Caracterización genómica de la línea celular BT-474 resistente a la combinación Trastuzumab y Pertuzumab (Clon 2). **A)** Volcanograma de los DEGs en clon 2 resistente a la combinación de Trastuzumab y Pertuzumab frente a la línea celular BT-474. El punto de corte para los DEGs fue un cambio de 2 veces y un valor P de 0,05. Los genes que cumplen los dos criterios se colorean en verde, si se encuentran sobreexpresados o en morado, si se encuentran subexpresados; los genes filtrados se colorean en gris. El eje de abscisas representa el cambio en la expresión de un gen como logaritmo 2 del *Fold change* (*FC*). El eje de las ordenadas representa la significancia en una escala logarítmica en base 10 del *False Discovery Rate* (*FDR*). **B)** Gráfico de barras según la anotación funcional para *BP* de los DEGs en clon 2 resistente a Trastuzumab con Pertuzumab frente a la línea celular BT-474.