



Modulación de la expresión génica en líneas celulares de Cáncer de Mama sometidas a diferentes tratamientos farmacológicos

Duvan Andrés Morales Mendoza

Dirección

Victoria Eugenia Villegas Gálvez Ph.D.

Codirección

Sandra Milena Rondón Lagos Ph.D.

Trabajo presentado como requisito para optar por el título de Biólogo

Facultad de Ciencias Naturales. Pregrado en Biología. Universidad del Rosario
Bogotá, 2020.

RESUMEN

El Cáncer de Mama (CM) es el tipo de neoplasia maligna más frecuente entre mujeres y aunque la muerte por esta enfermedad ha disminuido con las nuevas alternativas de diagnóstico y tratamiento sigue siendo uno de los mayores problemas de salud en el mundo. En Colombia, el CM es el tumor diagnosticado con mayor frecuencia y la principal causa de muerte por cáncer en mujeres. La decisión terapéutica para el manejo de pacientes con CM se basa no sólo en la evaluación de factores pronósticos, como Receptores de Estrógenos (RE), Receptores de Progesterona (RP) y Receptor del factor de Crecimiento Epidérmico 2 (HER2), sino en la evaluación de parámetros clínicos y patológicos. Sin embargo, aunque este ha sido un enfoque exitoso, algunos pacientes recaen o eventualmente desarrollan resistencia al tratamiento. Por lo expuesto anteriormente, se hace necesaria la identificación de nuevos marcadores pronósticos y predictivos que puedan proporcionar blancos terapéuticos en aras de superar la resistencia al tratamiento. Dentro de los muchos genes que han adquirido importancia en la actualidad por su posible papel como biomarcadores de expresión temprana y por lo tanto potenciales blancos terapéuticos en CM, se destacan los genes *GLII*, *ZNF217* y *KI67*. Teniendo en cuenta la alta frecuencia de pacientes que no responden a la terapia o que con el tiempo desarrollan resistencia a la misma, y el papel que desempeñan los genes *GLII*, *ZNF217* y *KI67*, se planteó como objetivo de investigación, la evaluación de la expresión de estos genes en líneas celulares de CM tratadas con diferentes fármacos, esto con el fin de comprender el papel que desempeñan estos genes en la terapia y como posibles biomarcadores en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas personalizadas. Los resultados de este estudio muestran que la expresión de estos genes se ve modificada dependiendo del estado de los *RE* y *HER2* en las células tumorales. Por ejemplo, en células *RE+/RP+/HER2-* el gen *GLII* podría considerarse como biomarcador de respuesta a tratamiento bien sea individual o combinado. Contrariamente se observa que en células *RE-/RP-/HER2-*, donde los genes *GLII*, *ZNF217* y *KI67* podrían considerarse como biomarcadores de resistencia independiente de si el tratamiento es individual o combinado. Respecto a células *RE-/RP-/HER2+*, estos genes responden de diferentes formas a cada uno de los tratamientos, lo que se traduce en una respuesta más compleja. Estos resultados confirman la heterogeneidad que representa el CM donde las células responden de manera diversa a los tratamientos dependiendo del estado de los receptores. Se espera que resultados como los obtenidos en este trabajo sean la base para proponer estudios en muestras de pacientes que

eventualmente puedan considerarse de utilidad para apoyar la decisión acerca de los beneficios o contraindicaciones de la quimioterapia, terapia hormonal y de terapias combinadas en pacientes con CM.

Palabras clave: Cáncer de Mama, biomarcador, *ZNF217*, *KI67*, *GLII*, hormonoterapia, quimioterapia.

1. INTRODUCCIÓN

El Cáncer de Mama (CM) es el tipo de cáncer más frecuente en mujeres a nivel mundial con alrededor de 2 millones de casos nuevos y 600 mil muertes anuales (Bray F, 2018). Esta enfermedad presenta múltiples formas de clasificación: histopatológica, dependiente del tamaño tumoral, metastásico, invasivo o ductal, molecular, entre otras. La clasificación molecular se basa en la expresión de tres biomarcadores ya estandarizados a nivel clínico: 1) Receptores de estrógeno (*RE*), 2) Receptores de progesterona (*RP*) y 3) Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (*HER2*), quienes subdividen a la enfermedad en cuatro grupos de acuerdo a la presencia/ausencia de los mismos (Cortese *et al.*, 2014). Pese a que este ha sido un pilar fundamental para dirigir los tratamientos en los últimos años, el incremento de la resistencia ha traído consigo dificultades importantes en el éxito de los enfoques terapéuticos. En consecuencia, de cada 100 mujeres que han recibido algún tratamiento para su enfermedad en un estadio temprano, 30 recaen nuevamente (Gonzalez-Angulo *et al.*, 2013; Szostakowska *et al.*, 2019).

Establecer fenotipos de sensibilidad y resistencia basada en biomarcadores para los regímenes de tratamiento contra el Cáncer de Mama, es una herramienta primordial para asegurar un buen pronóstico en las pacientes (Nass & Kalinski, 2015). De hecho, es importante contar con factores predictivos eficientes y confiables ya que son los que pueden dirigir la toma de decisiones de los clínicos en cuanto a la administración de fármacos más adecuados en cada caso particular (Cortese *et al.*, 2014). Sin embargo, pese a que para el Cáncer de Mama se tienen biomarcadores estándar, resulta un desafío determinar una ruta terapéutica adecuada para cada paciente debido a la respuesta heterogénea que estos presentan (Vendrell *et al.*, 2019). En ese orden de ideas, se vuelve una necesidad urgente contar con factores pronósticos capaces de identificar el resultado al tratamiento de la enfermedad llevado a cabo con diferentes estrategias

terapéuticas, lo que finalmente daría la oportunidad de generar paneles de terapia opcionales para tratar de forma más efectiva a las pacientes. Dentro del panel de biomarcadores propuestos para el Cáncer de Mama, se tomaron tres oncogenes cuya expresión diferencial puede ser asociada a un mal pronóstico o respuesta al tratamiento, dichos genes fueron: *GLII*, *ZNF217* y *KI67*. La expresión de estos genes se asocia con el sostenimiento en las señales de proliferación celular, evasión de la muerte celular e inmortalidad replicativa. Es el caso del gen *GLII* (oncogén asociado a glioma tipo 1) considerado un activador transcripcional que promueve el crecimiento celular y supervivencia principalmente a través de la vía *SHH*. Además, en Cáncer de Mama, *GLII* se sobre expresa entre el 40 y el 100% en los tumores (Xu *et al.*, 2010). Por otro lado, *ZNF217* también es un activador transcripcional y su expresión se caracteriza por evadir la inhibición del crecimiento inducida por TGF- β , amplificación de las vías de inmortalidad celular como cMYC, AKT y la vía MAPK/ERK entre otras.

Finalmente, *KI67* es un gen que codifica para una proteína que se expresa en todas las fases del ciclo celular y se considera un marcador de proliferación celular, por consiguiente, se emplea como indicador de resistencia a la terapia en muchos tipos de cáncer. Pese a lo anterior, todavía se presentan ambigüedades en cuanto a su expresión, por ejemplo, Prihantono y colaboradores (2017) encontraron que altos niveles de mRNA de *KI67* se asocian con sensibilidad a la quimioterapia adyuvante y tumores con bajos niveles de mRNA tienden a no responder a este tratamiento lo que implica la necesidad de continuar investigando su relación con el pronóstico de las pacientes en términos de respuesta al tratamiento.

Para el carcinoma mamario, debido a su gran heterogeneidad, se emplean tres tipos de terapia: hormonoterapia, quimioterapia y terapia contra blancos moleculares. Estas se aplican dependiendo de la expresión de los biomarcadores estándar, características tumorales y estado de la paciente (Cortese *et al.*, 2014). Hasta el momento, son pocos los estudios que describen la expresión de nuevos biomarcadores pronósticos para el Cáncer de Mama bajo un esquema completo de monoterapias y terapias combinadas y que, además, recojan en su mayoría a los subtipos tumorales de la enfermedad. Nass y Kalinski (2015) resaltan la importancia del uso de líneas celulares como modelos iniciales de carcinomas mamarios para entender la generación de resistencia y la identificación de objetivos terapéuticos potenciales (Dai *et al.*, 2016; Nass & Kalinski, 2015). En efecto, la mayoría de mejoras en rutas terapéuticas y uso de nuevos fármacos para el tratamiento del cáncer comienzan por la experimentación *in vitro*.

Considerando lo anterior, este estudio se enfocó en evaluar los niveles de expresión de tres biomarcadores en las líneas celulares MCF7, KPL4 y MDA-MB468, representativas de los subtipos tumorales de CM Luminal A, HER2+ y Triple Negativo, respectivamente, como también el de establecer su asociación con la respuesta a diversos tratamientos en términos de modificación de la proliferación celular. Lo anterior con la finalidad de determinar fenotipos de resistencia o sensibilidad a los diferentes tratamientos.

2. METODOLOGÍA

2.1 Líneas celulares

Se emplearon tres líneas celulares de CM adquiridas de la ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, USA) que expresan diferencialmente RE y *HER2*. Se trabajó con las líneas celulares MCF7, KPL4 y MDA-MB468 representativas de los subtipos tumorales luminal A (RE+/RP+/HER-), *HER2* enriquecido o positivo (RE-/RP-/HER+) y triple negativo o basal (RE-/RP-/HER-), respectivamente. Para el mantenimiento de las células se empleó medio DMEM (Sigma) con rojo fenol suplementado al 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Sigma), 1% de Penicilina, Estreptomina y Anfotericina B (Sigma) o solución antibiótica/antimicótica y 1% de L-glutamina (2mM) (Invitrogen GmbH, Alemania). Las células fueron cultivadas en frascos de 25cm² e incubadas a 37°C con humedad del 95% en incubadora de CO₂. El medio de cultivo fue renovado cada 48 horas hasta que las células llegaron a una confluencia de entre el 80 y 90% necesaria para aplicar los diferentes tratamientos.

2.2 Tratamientos de las líneas celulares

Los tratamientos utilizados fueron, Tamoxifeno (TAM) como hormonoterapia, Docetaxel (DOC) y Doxorubicina (DOX) como quimioterapia, Herceptin (HT) o Trastuzumab como terapia contra blancos moleculares específicos (Receptor *HER2*) y la combinación de estos en dependencia de la expresión del estado de RE y *HER2* en cada línea celular. Se aplicó TAM a las líneas celulares positivas y negativas para RE y sus combinaciones con quimioterapia, mientras que el HT solo se empleó para la línea que expresaba *HER2* en combinación con quimioterapia y hormonoterapia. La distribución de los tratamientos en las líneas celulares es indicada en la Tabla 1.

Tabla 1. Distribución de tratamientos en las líneas celulares

Línea celular	Expresión de receptor	Tratamientos individuales				Tratamientos combinados				
		TAM	DOC	DOX	HT	TAM+ DOC	TAM+ DOX	TAM+ HT	HT+ DOC	HT+ DOX
MCF-7	RE+/RP+/HER-	X	X	X		X	X			
KPL4	RE-/RP-/HER+	X	X	X	X	X	X	X	X	X
MDA-MB468	RE-/RP-/HER-	X	X	X		X	X			

TAM: Tamoxifeno; DOC: Docetaxel; DOX: Doxorubicina; HT: Herceptin

Una vez las células alcanzaron el 80-90% de confluencia, se realizó cambio de medio a DMEM libre de rojo fenol suplementado con 1% de la solución de antibiótico/antimicótico, 1% de L-glutamina y 10% de SFB *charcoal stripped* (Sigma) con el fin de evitar actividad agonista de andrógenos, estrógenos o progesteronas que pudieran sesgar la respuesta a los fármacos. 48 horas después, se cambió el medio de cultivo y las células fueron tratadas con 1 μ M de TAM (T5648, Sigma) (Sapino *et al.*, 1986), 10nM de DOC (01885, Sigma) (Hartmann *et al.*, 2012), 0.5 μ M de DOX (D1515, Sigma) (Wang *et al.*, 2004), 50 μ g/mL de HT (Roche, Alemania) (C. Ginestier *et al.*, 2007) y sus combinaciones como se muestra en la tabla 1 (se emplearon como controles líneas no tratadas pero bajo las mismas condiciones de cultivo). Los fármacos fueron disueltos en etanol absoluto y añadidos al medio de cultivo a las concentraciones indicadas anteriormente por 24, 48 y 96 horas. También fueron utilizadas como controles células sin tratamiento a 24h, 48h y 96h. Las concentraciones utilizadas fueron estandarizadas en estudios previos, y seleccionadas ya que estas demostraron ser las concentraciones más bajas en las que pudo ser observado un efecto en la morfología celular *in vitro* (C. Ginestier *et al.*, 2007; Hartmann *et al.*, 2012; Sapino *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 2004).

2.3 Proliferación Celular

Al final de cada tratamiento, para cada uno de los fármacos y sus respectivas combinaciones (TAM, DOC, DOX, HT, TAM/DOC, TAM/DOX, TAM/HT, HT/DOC Y HT/DOX), se evaluó la proliferación celular mediante el uso del kit ELISA de proliferación celular BrdU (Roche Diagnostics Deutschland GmbH). La medición de la absorbancia (450nm) se llevó a cabo en un lector Bicromático MultiSkan (Labsystems, Midland, Canadá). Cada tratamiento se realizó en 24 repeticiones y los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar (S.D.).

2.4 Extracción de RNA y RT- qPCR

Se extrajo el RNA total de cada línea celular para cada uno de los tratamientos correspondientes y en los tres tiempos evaluados, mediante el kit de Qiagen RNeasy. Luego de comprobar su integridad con gel de agarosa al 1,5%, se tomaron 980 ug de RNA de cada muestra para sintetizar cDNA utilizando el kit, *Maxima First Strand cDNA Synthesis for RT-qPCR* de Thermofisher siguiendo las indicaciones del proveedor. Los ensayos de qPCR se realizaron por triplicado en el termociclador de tiempo real LightCycler96 (Roche, Alemania) con la enzima recomendada para alcanzar la mayor sensibilidad del equipo FastStart Essential DNA Green Master de Roche, que usa como método de detección al fluoróforo *Syber Green* (416nm/540nm). Se emplearon *primers* dirigidos para amplificar el mRNA de los oncogenes *ZNF127* (154pb), *GLI1* (118pb) y *KI67* (120pb) (secuencias en el Anexo1) con el siguiente programa de PCR: denaturación inicial de 95°C durante 5 minutos seguida de 45 ciclos de 95°C por 10s, 64°C por 20s y 72°C por 15s, y una extensión final de 72°C durante 5 minutos.

La expresión de los genes a evaluar para cada muestra se normalizó utilizando como controles internos los siguientes *housekeeping*: el gen codificante para la hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (*HpT*), gen codificante para la proteína ribosomal rpl0 (*RPL0*) y el gen codificante para la proteína de unión a la caja TATA (*TBP*) (secuencias en el Anexo 1). Para cada línea celular se eligieron dos controles internos con la menor variación entre control y tratamiento. Para analizar la expresión relativa se empleó el método $\Delta\Delta C_t$ de las muestras en función de los controles internos.

2.5 Análisis estadísticos

Se utilizó la prueba t de Student como método de comparación de la proliferación celular y la expresión relativa de los tres genes, entre las células tratadas y controles. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando la versión SPSS 21 y valores de $p < 0,05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

3. RESULTADOS

3.1 Línea Celular MCF-7

En células MCF7 (RE+/RP+/HER2-), se observó una reducción en la proliferación celular en respuesta a todos los tratamientos, tanto individuales como combinados (Figuras 1). Entre las monoterapias, DOC indujo una mayor reducción en la proliferación celular en comparación con la observada en los demás tratamientos individuales (Figura 1). Es de resaltar que el tratamiento con DOC, estimuló la expresión de *KI67* a las 96h en casi 50 veces más que el control (Figura 2A), sin embargo, no generó cambios significativos de la expresión de los otros genes evaluados ni a otros tiempos.

Se observó una reducción en la proliferación celular en todos los tiempos evaluados después del tratamiento con TAM, así como también se observó una disminución en la expresión del gen *GLII* en los tres tiempos, siendo la más considerable a las 24h (Figura 2B).

Tratamientos	MCF7 (RE+/RP+/HER2-)			MDA MB 468 (RE+/RP+/HER2-)			KPL4 (RE+/RP+/HER2-)		
	24h	48h	96h	24h	48h	96h	24h	48h	96h
	TAM							**	
DOC							**		*
DOX				**		*	**	**	
TAM+DOC	*			**	*	*		**	
TAM+DOX						*			
HT							**	**	**
TAM+HT							**		
HT+DOC							**		
HT+DOX							**	**	

	Aumento proliferación
	Disminución proliferación
	Sin datos

Figura 1. Efectos de los tratamientos individuales (Tamoxifen-TAM, Docetaxel-DOC y Doxorrubicina-DOX), y combinados (TAM+DOC y TAM+DOX) por 24h, 48h, y 96h en la proliferación celular de las líneas celulares A) MCF7, B) MDA-MB468 y C) KLP4 ($p < 0.05^*$ y $p > 0,01^{**}$).

Se observaron efectos opuestos para la expresión de los genes *ZNF217* y *KI67*, en donde el tratamiento con TAM indujo incremento significativo en sus niveles de expresión a las 24h y 48h (Figura 2C), y a 24h y 96h (Figura 2A), respectivamente. El tratamiento con DOX indujo reducción en la proliferación celular (Figura 1), así como también estimuló la expresión de *KI67* y *ZNF217*. Específicamente, la expresión de *KI67* se incrementó significativamente a las 48h y 96h en casi el doble en comparación con el control (Figura 2A), mientras que la expresión de *ZNF217* aumentó significativamente (60 veces más frente al control) a las 96h, y sin cambios evidentes a las 24h y 48h.

Contrario a lo observado en los genes *KI67* y *ZNF217*, el tratamiento con DOX indujo una reducción significativa en los niveles de expresión del gen *GLII* a las 24 y 96 horas, mientras que a las 48h se observó un incremento significativo en su expresión (Figura 2B).

En cuanto a las terapias combinadas, ambas terapias TAM+DOC y TAM+DOX, inhibieron la proliferación celular, con un efecto más marcado cuando TAM se combinó con DOX (TAM+DOX) (Figura 1B). En particular, la combinación de TAM+DOC estimuló la expresión de *KI67* a las 48h en casi 20 veces más frente al control (Figura 2A), este comportamiento parece invertirse a las 96h, pero no es concluyente ya que no alcanza significancia estadística. Adicionalmente esta combinación de fármacos (TAM+DOC) indujo reducción significativa en la expresión de los genes, *GLII* (sólo a las 24h) (Figura 2B) y *ZNF217* a las 24h y 48h postratamiento (Figura 2C).

En cuanto a la combinación de TAM+DOX, el efecto en *ZNF217* fue más evidente a las 96h al reducir significativamente su expresión (Figura 2C) al igual que con *GLII* a las 48h (Figura 2B). Además, esta combinación de fármacos elevó la expresión de *KI67* a las 48h en casi 16 veces más frente al control (Figura 2A), sin embargo, el efecto no se mantiene a largo plazo ya que a 96h es evidente una reducción en sus niveles de expresión.

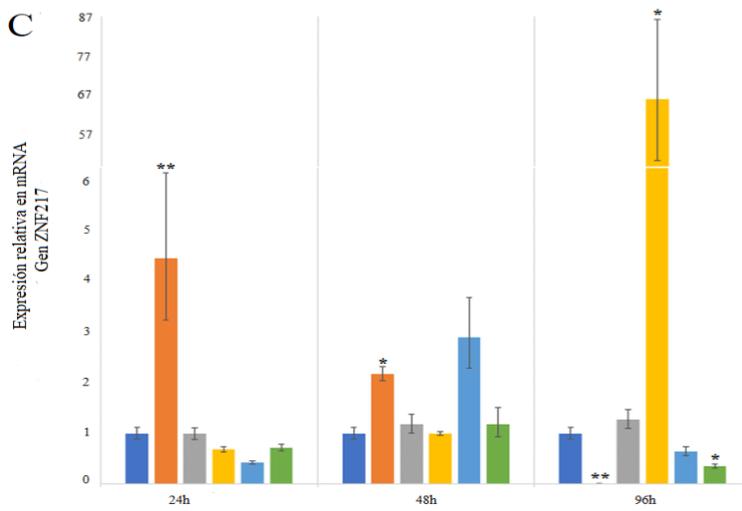
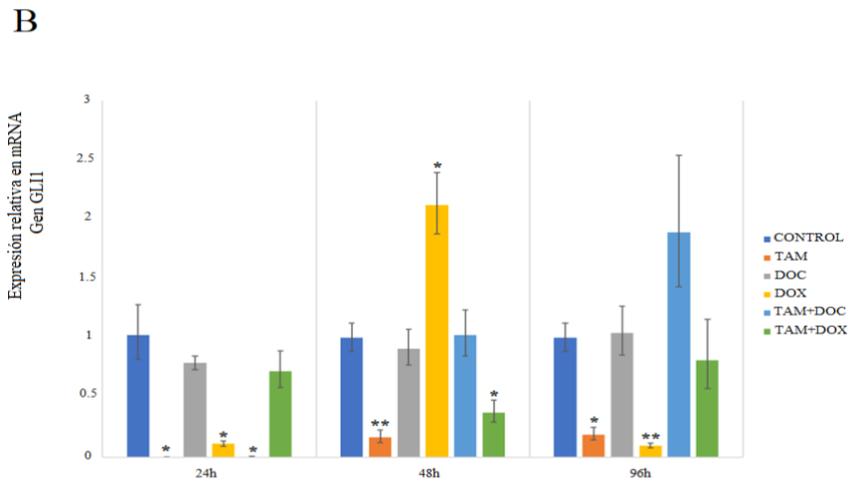
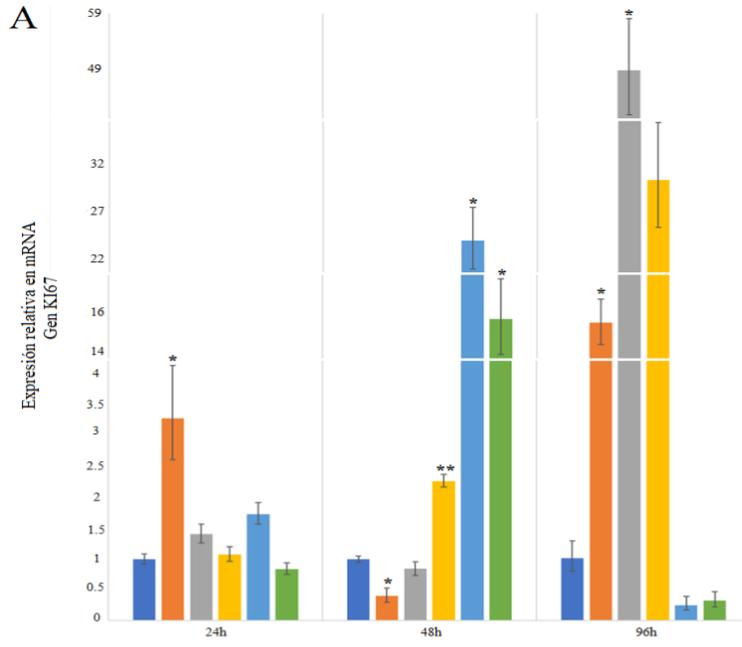


Figura 2. Modificación de la expresión génica en la línea celular MCF7 control y tratada con diversos fármacos por 24h, 48h y 96h. A) *KI67*, B) *GLII* y C) *ZNF217* ($p < 0.05^*$ y $p < 0.01^{**}$).

3.2 Línea Celular MDA-MB468

En células triple negativas (RE-/RP-/HER2-), todos los tratamientos individuales y combinados indujeron incremento en la proliferación celular. Específicamente, el TAM no sólo estimuló la proliferación celular (Figura 1), sino que indujo un incremento significativo en la expresión de los genes *ZNF217* y *GLII* después de tratamiento a 96h (Figuras 3BC y 3B), y del gen *KI67* después de 24h y 48h de tratamiento (Figura 3A).

Entre los tratamientos individuales, DOX y DOC mostraron los peores efectos, ya que no sólo estimularon significativamente la proliferación celular ($p \leq 0,02$, *Test T de Student*) (Figura 1), sino que incrementaron la expresión de los genes *ZNF217* (Figura 3C), *GLII* (Figura 3B) y *KI67* (Figura 3A) principalmente a 24h y 48h postratamiento.

Se observaron resultados similares en los tratamientos combinados, en donde el tratamiento con TAM+DOC estimuló significativamente la proliferación celular ($p \leq 0,02$) (Figura 1) e incrementó la expresión de los genes *KI67*, *GLII* y *ZNF2167* (Figuras 3A, 3B y 3C) principalmente después de 96h de tratamiento. El tratamiento con TAM+DOX, arrojó resultados similares a los observados para TAM+DOC, donde se observó un incremento significativo en la proliferación celular ($p \leq 0,01$) (Figura 1) y en la expresión de los genes *ZNF217* (Figura 3C) y *GLII* (Figura 3B). Sin embargo, esta combinación (TAM+DOX) no generó cambios significativos en los niveles de expresión del gen *KI67* frente a los controles en ningún tiempo de exposición (Figura 3A).

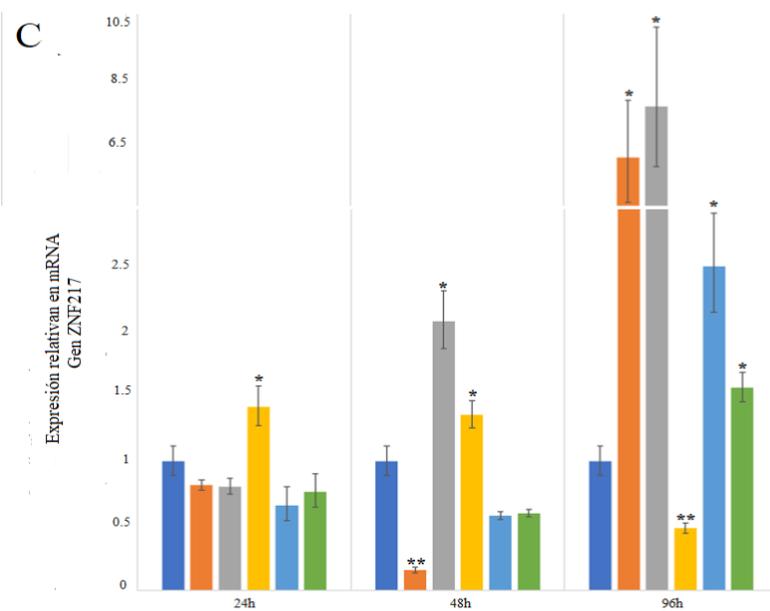
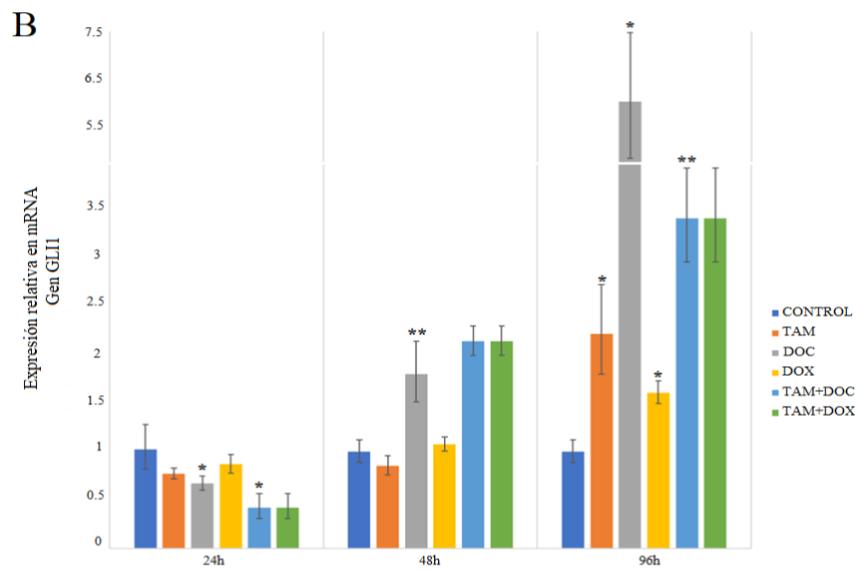
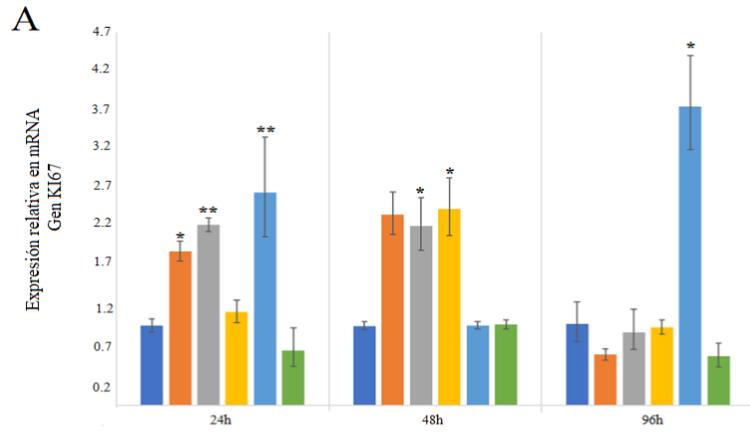


Figura 3. Modificación de la expresión génica en la línea celular MDA-MB468 control y tratada con diversos fármacos por 24h, 48h y 96h. A) *KI67*, B) *GLII* y C) *ZNF217* ($p < 0.05^*$ y $p < 0.01^{**}$).

3.3 Línea Celular KPL4

En las células RE-/RP-/HER2+, todos los tratamientos individuales mostraron los mayores incrementos en la proliferación celular ($p \leq 0,0037^{**}$, Figura 1). En particular el TAM indujo aumento en la proliferación celular y reducción en la expresión de los genes *GLII* (Figura 4B) y *KI67* (Figura 4A) principalmente a 48h y 96h. En lo que respecta al gen *ZNF217*, el TAM no generó efectos significativos en su expresión.

En cuanto al tratamiento con DOC, este fármaco elevó la expresión de los genes *ZNF217*, *GLII* y *KI67*, en todos los tiempos evaluados, siendo la expresión del gen *ZNF217* casi el triple frente al control a 96h de tratamiento (Figura 4C).

El HT no generó efectos en la expresión del gen *ZNF217* (Figura 4C), pero sí en los genes, *GLII* y *KI67*, donde su expresión es reducida a medida que aumenta el tiempo de exposición al tratamiento, siendo tal reducción más evidente a las 96h (Figuras 4B y 4A).

Por último, mientras que la DOX indujo expresión reducida de los genes *ZNF217* y *GLII* principalmente a 24h y 48h (Figuras 4C y 4B), en el gen *KI67* indujo una respuesta opuesta, con elevada expresión a las 24h (Figura 4A), sin embargo, a medida que aumenta el tiempo de exposición, parece que esta expresión disminuye, sin embargo, esto no es concluyente ya que no hay significancia estadística.

En cuanto a los tratamientos combinados, solo los tratamientos entre TAM+DOC y TAM+HT mostraron reducción en la proliferación celular, observándose una mayor reducción cuando TAM se combinó con DOC ($p \leq 0,0005^*$, Figura 1). El tratamiento con TAM+DOC indujo reducción en la expresión de *ZNF217* en todos los tiempos de exposición, aunque a las 96h no hay significancia estadística. Resultados contrarios se observaron en la expresión del gen *GLII*, donde esta combinación de fármacos indujo a un aumento de expresión, siendo esta mayor a las 24h postratamiento (Figura 4B). En lo que respecta a *KI67*, el tratamiento con TAM+DOC indujo reducción en su expresión a 48h y 96h, mostrando diferencias significativas frente al control a las 96h. Mientras que el HT administrado como agente único o en combinación con

quimioterapia (antraciclinas o taxanos) indujo un aumento en la proliferación celular ($p \leq 0,0003$ *, Figura 1).

Por otra parte, mientras el tratamiento combinado con TAM+DOX no indujo alteración en la expresión del gen *ZNF217* (Figura 4C), si alteró la expresión del gen *GLII*, donde una reducción significativa en sus niveles de expresión fue evidente a las 48h y 96h después de tratamiento (Figura 4B). Efectos opuestos fueron observados para el gen *KI67*, donde esta combinación de fármacos indujo un incremento significativo en su expresión después de 24h y 48h de tratamiento (Figura 4A). Finalmente, los tratamientos combinados con HT solo pudieron ser efectuados por 24h y 48h de exposición debido a problemas en el traslado del fármaco a causa de la pandemia protagonizada por el virus Sars-Cov-2. TAM+HT eleva la expresión de *ZNF217* hasta tres veces más que el control en todos los tiempos evaluados (Figura 4C), y reduce la expresión de *GLII* a las 24h y 48h de exposición, observándose diferencias significativas a las 48h postratamiento (Figura 4B).

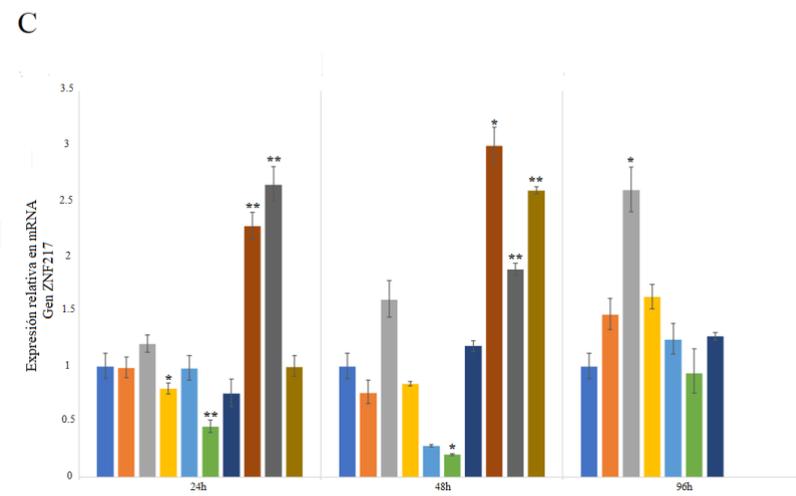
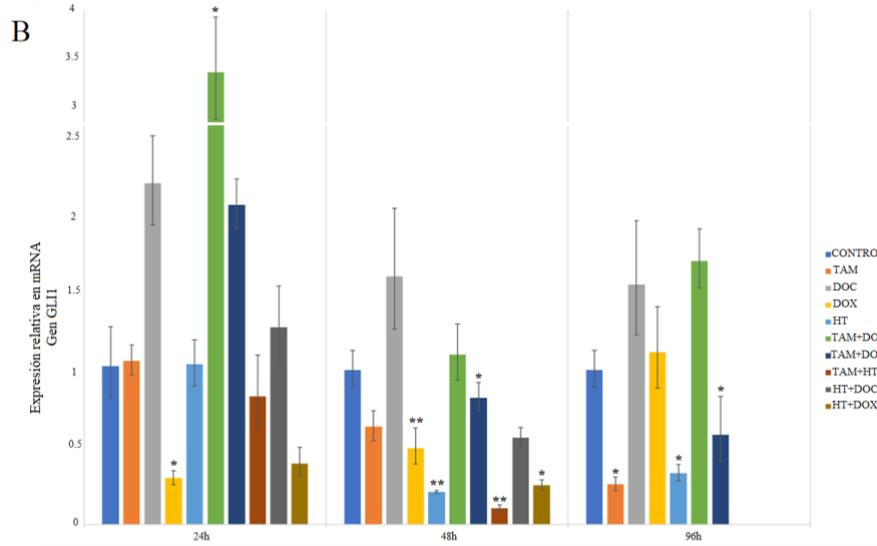
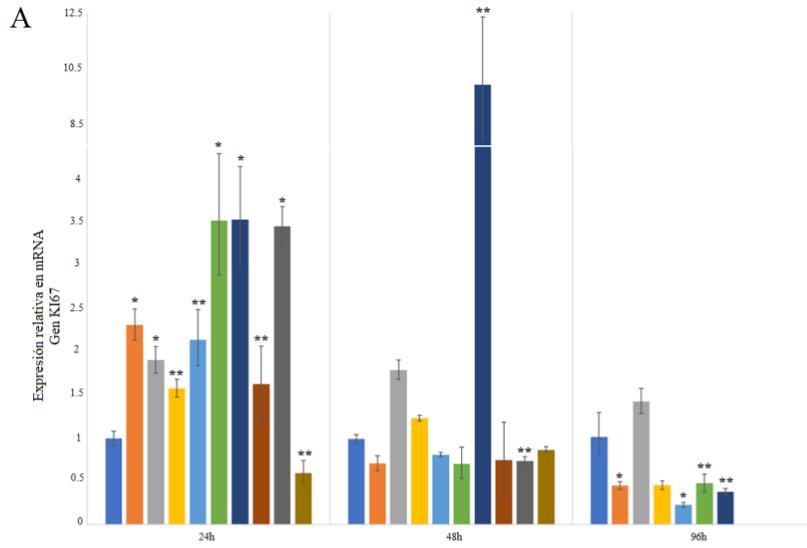


Figura 4. Modificación de la expresión génica en la línea celular KPL4 control y tratada con diversos fármacos por 24h, 48h y 96h. A) *KI67*, B) *GLI1* y C) *ZNF21767* ($p < 0.05^*$ y $p < 0.01^{**}$).

La expresión del gen *KI67* se ve modificada sólo a las 24h de tratamiento con TAM+HT, donde se puede observar un incremento significativo en sus niveles de expresión (Figura 4A).

La combinación de HT+DOC, condujo a una significativa expresión incrementada de los genes *ZNF217* a los dos tiempos evaluados (Figura 4C), y del gen *GLI1* sólo a 24h. El efecto de esta combinación de fármacos para los genes *GLI1* y *KI67* fue contrario a las 24h y 48h, ya que mientras que a 24h se observó un incremento en sus niveles de expresión, a 48h una disminución en su expresión fue evidente, sin embargo, en ninguno de los dos casos se observaron diferencias significativas (Figuras 4B y 4A). Por último, el tratamiento combinado con HT+DOX elevó gradualmente la expresión de *ZNF217* (Figura 4C), y redujo la expresión de los otros dos genes (*GLI1* y *KI67*) de forma constante en los tiempos evaluados (Figuras 4B y 4A).

4. DISCUSIÓN

El Cáncer de Mama (CM) es una enfermedad de comportamiento heterogéneo en donde cada tumor muestra características individuales. Esta característica ha dado lugar a dirigir la investigación hacia la búsqueda de nuevos marcadores para mejorar los métodos de diagnóstico como también la respuesta a la terapia. Las estrategias para los tratamientos en CM dependen del subtipo tumoral, con el cual la terapia es elegida con base a marcadores específicos. Por ejemplo, para los tumores positivos para receptores hormonales (RE y RP) como Luminal A y Luminal B, se emplea la terapia endocrina (TAM) (Parisot JP, 1999; Berry D, 2000), a la cual responden un gran porcentaje de pacientes. En el caso de los tumores HER2+, como Luminal B y HER2+, el tratamiento consiste en el uso de anticuerpos monoclonales (HT), que reconocen el dominio extracelular de HER2, así mismo se usan inhibidores de la tirosina quinasa del dominio del receptor HER2 (como lapatinib) (Tai W, 2010), en adición a la terapia endocrina (TAM) si los receptores hormonales son también positivos. Para el subtipo triple negativo, solamente se aplica quimioterapia. La quimioterapia es la única terapia que es eficaz en cáncer triple negativo y un complemento importante de la terapia endocrina y la terapia dirigida a HER2 en pacientes positivos para receptores hormonales (RE y RP) (Waks A, 2019).

Nuestros resultados destacan el alto grado de heterogeneidad que presentan los subtipos moleculares para el CM en la expresión de diferentes oncogenes y su respuesta a diferentes tratamientos (Figura 5). Tal heterogeneidad en términos de fenotipo, genotipo, microambiente, variabilidad celular, etc., ha sido también observada mediante enfoques que emplean técnicas más robustas como la secuenciación llegando a la conclusión de que cada tumor es prácticamente único (Kalinowski *et al.*, 2019). De hecho, la clasificación para esta enfermedad se hace con el fin de identificar las mejores rutas terapéuticas para las pacientes, sin embargo, el nivel de heterogeneidad intra e inter tumoral incide en la respuesta terapéutica, posible desarrollo de resistencia y que las terapias se dirijan a un enfoque más bien personalizado (Kalinowski *et al.*, 2019).

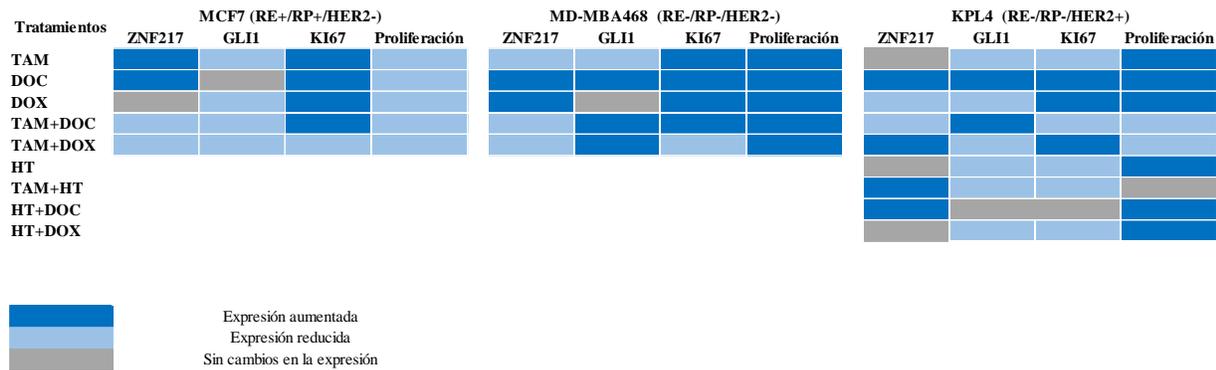


Figura 5. Efectos de los tratamientos individuales y combinados en la proliferación celular y en la expresión de los genes *ZNF217*, *GLI1* y *KI67* en líneas celulares MCF7, MDA-MB468 y KPL4.

4.1 Expresión de *KI67* y *GLI1* como marcadores pronósticos de respuesta a los tratamientos en la línea celular MCF7

En la línea celular MCF7 (RE+/RP+/HER2-), representativa del subtipo tumoral Luminal A, los tratamientos tanto individuales (terapia hormonal y quimioterapia) como combinados (terapia hormonal + quimioterapia) condujeron a un incremento en los niveles de expresión de los genes *KI67* y *GLI1*, incremento asociado con reducción en la proliferación celular (sensibilidad al tratamiento, Figura 5).

Los resultados observados para el gen *KI67* concuerdan con estudios previos realizados en pacientes con CM RE+ los cuales han mostrado que niveles más altos de Ki67, se asocian con una respuesta favorable a la terapia, mientras que niveles más bajos de Ki67 se asocian con una respuesta pobre (Burcombe *et al.*, 2006). Más aún, niveles altos de Ki67 en pacientes RE+ sometidos a terapia adyuvante, fueron además asociados con mayor supervivencia global en comparación con pacientes con bajos niveles de expresión del gen (Niikura *et al.*, 2012). Estudios adicionales, mostraron que niveles de expresión tanto del gen como de la proteína Ki67 son proporcionales, en donde los tumores con altos niveles de expresión de Ki67 podrían responder favorablemente a quimioterapia con Docetaxel (Prihantono *et al.*, 2017).

Una de las hipótesis postuladas para explicar el comportamiento de *KI67* observado después de cada tratamiento, podría deberse a fallas en los procesos de replicación de células tumorales asociado a altas tasas de proliferación que darían origen a fenómenos de inestabilidad cromosómica (IC). En efecto, ha sido indicado que altos niveles en la expresión de factores de proliferación podrían estar asociados con altos niveles de IC, los que al superar el nivel de tolerancia de la célula, conducen a citotoxicidad (Vargas-Rondón *et al.*, 2017). En CM, la expresión del factor de proliferación Ki67 ha sido ampliamente usado a nivel clínico para predecir el éxito de la terapia en términos de supervivencia libre de enfermedad o probabilidad de recaída. Aun así, su uso como factor pronóstico sigue siendo controversial ya que, si bien un aumento en su expresión conduce al incremento en la tasa de proliferación, y por consiguiente en mayor agresividad tumoral, tal comportamiento es variable y al parecer dependiente del subtipo tumoral. Considerando lo anterior, es necesario confirmar la asociación entre altos niveles de expresión de *KI67* con sensibilidad a la respuesta a los tratamientos terapéuticos en CM RE+, mediante la realización de estudios en pacientes, en donde los niveles de expresión de este oncogén sean comparados con las características clínico patológicas, niveles de IC y respuesta a los tratamientos.

En lo que respecta al gen *GLI1*, se observó una asociación entre disminución en sus niveles de expresión con disminución en la proliferación celular en células MCF7 (Figura 5), por lo que este gen podría considerarse como factor pronóstico de respuesta (sensibilidad) a las terapias. Resultados similares han sido previamente indicados en otros estudios, en donde fue observada una relación indirecta entre la vía SHH, a la cual pertenece GLI1, y los RE. Por ejemplo, Koga y colaboradores (2008) informaron que la activación de los RE precedía la expresión de la vía

SHH, no solo en células RE+ si no también en líneas celulares triple negativas (Koga *et al.*, 2008). Estudios adicionales han reportado esta misma asociación, argumentando que la activación de los RE estimula la transcripción de *GLII* y, por ende, aumenta los niveles de proliferación celular (Benvenuto *et al.*, 2016; Ramaswamy *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2014; J. Xu *et al.*, 2015). Además, cabe resaltar que la vía SHH hace parte de los muchos factores que contribuyen en los procesos de resistencia por parte de las células tumorales al tratamiento hormonal (Bhateja *et al.*, 2019; Diao *et al.*, 2016; Ramaswamy *et al.*, 2012). Nuestros resultados postulan a *GLII* como un factor pronóstico de respuesta (sensibilidad) a los tratamientos terapéuticos (hormonal y quimioterapia) en CM positivo para el RE (RE+).

4.2 Expresión de *KI67* y *GLII* como marcadores pronósticos de resistencia a los tratamientos en la línea celular MDA-MB468

Los resultados de proliferación observados en la línea celular MDA-MB468, representativa del subtipo tumoral triple negativo (RE-/RP-/HER2-) fueron en dirección opuesta a los observados en MCF-7, en donde las células mostraron resistencia a todos los tratamientos aplicados (Figura 5). Estos resultados confirman que el subtipo tumoral triple negativo, tiene los niveles de agresividad más altos en CM y, por consiguiente, el peor pronóstico. Tal resistencia a los tratamientos terapéuticos estuvo asociada con variaciones en los niveles de expresión de los genes *KI67* y *GLII*. Los niveles de expresión de estos genes presentan una tendencia de asociación directa con los niveles de proliferación, por lo que podrían ser postulados como factores predictores de resistencia a los tratamientos para este subtipo tumoral. Estos resultados son prometedores, ya que variaciones en la expresión de estos genes podría permitir predecir la respuesta a la terapia, considerando que hasta la fecha no existen terapias blanco específicas para el tratamiento del CM triple negativo, y en donde la resistencia los tratamientos es frecuente. Considerando lo anterior, los genes *KI67* y *GLII*, podrían ser postulados como biomarcadores de mal pronóstico y predictores de respuesta a la quimioterapia, con importantes implicaciones en la focalización terapéutica de pacientes con CM.

Este subtipo tumoral sigue siendo un desafío para los clínicos e investigadores que desarrollan fármacos ya que el 15% de mujeres con CM desarrollan este subtipo tumoral (Foulkes *et al.*, 2010) y la mitad de quienes reciben terapia, generan resistencia (Foulkes *et al.*,

2010; Liedtke *et al.*, 2008). Adicionalmente observamos resistencia a los tratamientos de manera temprana (24 h), lo que sugiere la existencia de una resistencia inherente en células triple negativas. El anterior supuesto fue corroborado por Kim y colaboradores (2018) quienes determinaron que células de pacientes con CM triple negativo resistente a la terapia neoadyuvante, presentaban algunos genotipos quimio resistentes expresados incluso antes de aplicar dicha terapia. Es decir, los genotipos resistentes o propensos a la resistencia fueron seleccionados de forma adaptativa y preexistente a la terapia (Kim *et al.*, 2018).

4.3 Expresión de *ZNF217* como marcador pronóstico de respuesta a los tratamientos en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB468

El gen *ZNF217* se comportó de manera similar en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB468, sometidas a tratamientos combinados con TAM+DOC y TAM+DOX. La expresión de este gen fue proporcional al incremento o disminución en la proliferación celular, por lo que podría ser postulado como un marcador de respuesta a estos tratamientos. Este gen, ubicado en el brazo largo del cromosoma 20 (20q13.2), ha sido asociado con progresión tumoral, con mal pronóstico, con resistencia a la terapia y con el desarrollo de metástasis. De hecho, investigaciones recientes han reportado que el gen *ZNF217* se encuentra amplificado en varios tumores (Plevova, Cerna *et al.* 2010) siendo tal amplificación asociada con mal pronóstico en varios tipos de cáncer (Peiro, Diebold *et al.* 2002, Rooney, Boonsong *et al.* 2004). Sin embargo, es importante resaltar que si bien la amplificación de *ZNF217* conduce a un incremento en los niveles de expresión de *ZNF217* en Cáncer de Mama (Collins, Rommens *et al.* 1998, Collins, Volik *et al.* 2001), no siempre es este el caso, de tal manera que ha sido reportado un incremento en los niveles de expresión de *ZNF217* sin amplificación del gen (Collins, Rommens *et al.* 1998, Collins, Volik *et al.* 2001, Ginestier, Cervera *et al.* 2006). Lo anterior evidencia los complejos eventos moleculares que esta proteína puede orquestar, aparte de la amplificación genómica de *ZNF217*. De hecho, debido a los altos niveles de expresión de mRNA de *ZNF217* en tumores de mama primarios, *ZNF217* fue postulado como un potente biomarcador de mal pronóstico en CM (Vendrell, Thollet *et al.* 2012, Nguyen, Vendrell *et al.* 2014). Estos datos sugieren que, en CM, la expresión de mRNA de *ZNF217* es un biomarcador novedoso y poderoso de mal pronóstico y un predictor pronóstico de respuesta a la quimioterapia. Juntos, estos hallazgos

indican que *ZNF217* puede representar un nuevo biomarcador pronóstico en CM con importantes implicaciones en la focalización terapéutica de pacientes cuyos tumores expresan altos niveles de *ZNF217*.

Los resultados observados en células MDA-MB468 sugieren que células triple negativas son resistentes a la quimioterapia (taxanos y antraciclinas), a la terapia hormonal y a los tratamientos combinados, donde tal resistencia (incremento en la proliferación celular) podría estar asociada a un incremento en los niveles de expresión de los genes *ZNF217*, *GLII* y *KI67*.

4.4 Expresión de *KI67*, *GLII* y *ZNF217* como marcadores pronósticos de respuesta a los tratamientos en la línea celular KPL4

La línea celular KPL4 (RE-/RP-/HER2+), representativa del subtipo tumoral HER2+ o HER2-enriched, no presentó una relación muy evidente con respecto a los genes evaluados, ya que no se observaron asociaciones claras entre los niveles de proliferación celular y la expresión de los genes *Ki67*, *GLII* y *ZNF217*. Si bien KPL4 es una línea celular con amplificación del gen *HER2*, se espera que la terapia dirigida al bloqueo de dicho receptor, como con Herceptin, disminuya los niveles de proliferación. Sin embargo, el comportamiento obtenido fue diferente, en donde fue evidente resistencia al Herceptin y sensibilidad a la hormonoterapia (TAM+DOC y TAM+DOX), a pesar de que estas células son negativas para los receptores hormonales. Estos resultados sugieren una posible resistencia al tratamiento blanco específico con Herceptin, posiblemente debida a comunicación cruzada entre vías de señalización HER2 con otras vías de señalización incluyendo RAS/RAF/MEK, PI3K/AKT (Baker *et al.*, 2014), Notch-EGFR/HER2 (Yamaguchi *et al.*, 2014) y vías asociadas a proteínas G (Hsu *et al.*, 2019; Pohlmann *et al.*, 2009). Una de las posibles razones por las que una línea celular negativa para los RE responda a terapias hormonales está relacionada con la presencia de RE acoplados a proteínas G (GPER) (Hsu *et al.*, 2019). Los receptores GPER hacen parte de una variante de RE que no son el tipo alfa, quienes se miden convencionalmente en la clasificación molecular de CM. De hecho, aunque controversial, varios estudios han propuesto la transactivación del factor de crecimiento epidérmico por estrógenos a través de GPER lo que explicaría en cierta forma que subtipos moleculares HER2 respondan a terapias hormonales (Filardo, 2002; Filardo & Thomas, 2005; Levin, 2003).

En general, nuestros resultados evidencian la dinámica inestable del CM expresada a través de su heterogeneidad y la necesidad inminente de seguir evaluando la respuesta de los diferentes subtipos moleculares a regímenes de terapias completas. Los hallazgos aquí observados, después de ser corroborados en pacientes con CM, podrían permitir predecir los beneficios de la quimioterapia, terapia hormonal y de terapias combinadas en pacientes con CM, así como podrían permitir el desarrollo de nuevas estrategias personalizadas para mejorar la respuesta a los tratamientos.

5. CONCLUSIONES

Nuestros resultados dieron evidencia del alto grado de heterogeneidad del CM en términos de expresión diferencial de los genes *ZNF217*, *KI67* y *GLI1* para cada línea celular evaluada y en cada uno de los tratamientos aplicados. Además, cada gen de manera individual se presenta como candidato para el monitoreo de la respuesta a diferentes tratamientos en dependencia de la línea celular. Entre los más importantes está *GLI1* para el monitoreo de la terapia con TAM en células Luminal A, *KI67* y *ZNF217* para monitorear la terapia individual DOC y la combinada de TAM+DOC en células triple negativas y *GLI1* en el monitoreo de la terapia individual DOX y combinada HT+DOX en células *HER2* positivo.

6. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Doctora Victoria Villegas y a la Doctora Milena Rondón por el compromiso en la dirección de este proyecto, a la Universidad del Rosario y a la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC) por el préstamo de sus instalaciones y por el financiamiento otorgado.

7. REFERENCIAS

Baker, A. T., Zlobin, A., & Osipo, C. (2014). Notch-EGFR/HER2 Bidirectional Crosstalk in

Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00360>

Benvenuto, M., Masuelli, L., De Smaele, E., Fantini, M., Mattera, R., Cucchi, D., Bonanno,

E., Di Stefano, E., Frajese, G. V., Orlandi, A., Screpanti, I., Gulino, A., Modesti, A., &

- Bei, R. (2016). In vitro and in vivo inhibition of breast cancer cell growth by targeting the Hedgehog/GLI pathway with SMO (GDC-0449) or GLI (GANT-61) inhibitors. *Oncotarget*, 7(8), 9250–9270. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7062>
- Berry, D. A., Muss, H. B., Thor, A. D., Dressler, L., Liu, E. T., Broadwater, G., Budman, D. R., Henderson, I. C., Barcos, M., Hayes, D., & Norton, L. (2000). HER-2/neu and p53 Expression Versus Tamoxifen Resistance in Estrogen Receptor–Positive, Node-Positive Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 18(20), 3471–3479. <https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.20.3471>
- Bhateja, P., Cherian, M., Majumder, S., & Ramaswamy, B. (2019). The Hedgehog Signaling Pathway: A Viable Target in Breast Cancer? *Cancers*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/cancers11081126>
- Burcombe, R., Wilson, G. D., Dowsett, M., Khan, I., Richman, P. I., Daley, F., Detre, S., & Makris, A. (2006). Evaluation of Ki-67 proliferation and apoptotic index before, during and after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. *Breast Cancer Research*, 8(3), R31. <https://doi.org/10.1186/bcr1508>
- Collins, C., Rommens, J. M., Kowbel, D., Godfrey, T., Tanner, M., Hwang, S., Polikoff, D., Nonet, G., Cochran, J., Myambo, K., Jay, K. E., Froula, J., Cloutier, T., Kuo, W.-L., Yaswen, P., Dairkee, S., Giovanola, J., Hutchinson, G. B., Isola, J., ... Gray, J. W. (1998). Positional cloning of ZNF217 and NABC1: Genes amplified at 20q13.2 and overexpressed in breast carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(15), 8703–8708. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.8703>
- Collins, C., Volik, S., Kowbel, D., Ginzinger, D., Ylstra, B., Cloutier, T., Hawkins, T., Predki, P., Martin, C., Wernick, M., Kuo, W.-L., Alberts, A., & Gray, J. W. (2001).

- Comprehensive Genome Sequence Analysis of a Breast Cancer Amplicon. *Genome Research*, 11(6), 1034–1042. <https://doi.org/10.1101/gr.174301>
- Cortese, G., Itala, J., Lange, D., & Provenzano, S. (2014). *Enfermedades de la glándula mamaria Manejo integral de la patología benigna y maligna* (1ra edición en formato digital). Editorial Médica Panamericana.
- Dai, X., Xiang, L., Li, T., & Bai, Z. (2016). Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *Journal of Cancer*, 7(10), 1281–1294. <https://doi.org/10.7150/jca.13141>
- Davis, T., van Niekerk, G., Peres, J., Prince, S., Loos, B., & Engelbrecht, A.-M. (2018). Doxorubicin resistance in breast cancer: A novel role for the human protein AHNAK. *Biochemical Pharmacology*, 148, 174–183. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.01.012>
- Diao, Y., Azatyan, A., Rahman, M. F.-U., Zhao, C., Zhu, J., Dahlman-Wright, K., & Zaphiropoulos, P. G. (2016). Blockade of the Hedgehog pathway downregulates estrogen receptor alpha signaling in breast cancer cells. *Oncotarget*, 7(44), 71580–71593. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12259>
- Filardo, E. J. (2002). Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: A novel signaling pathway with potential significance for breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 80(2), 231–238. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(01\)00190-X](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(01)00190-X)
- Filardo, E. J., & Thomas, P. (2005). GPR30: A seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 16(8), 362–367. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2005.08.005>

Foulkes, W. D., Smith, I. E., & Reis-Filho, J. S. (2010). Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 363(20), 1938–1948.

<https://doi.org/10.1056/NEJMra1001389>

Ginestier, C., Adélaïde, J., Gonçalves, A., Repellini, L., Sircoulomb, F., Letessier, A., Finetti, P., Geneix, J., Charafe-Jauffret, E., Bertucci, F., Jacquemier, J., Viens, P., & Birnbaum, D. (2007). ERBB2 phosphorylation and trastuzumab sensitivity of breast cancer cell lines. *Oncogene*, 26(50), 7163–7169.

<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210528>

Ginestier, Christophe, Cervera, N., Finetti, P., Esteyries, S., Esterni, B., Adélaïde, J., Xerri, L., Viens, P., Jacquemier, J., Charafe-Jauffret, E., Chaffanet, M., Birnbaum, D., & Bertucci, F. (2006). Prognosis and gene expression profiling of 20q13-amplified breast cancers. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 12(15), 4533–4544. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2339>

Gonzalez-Angulo, A. M., Morales-Vasquez, F., & Hortobagyi, G. N. (2013). Overview of Resistance to Systemic Therapy in Patients with Breast Cancer. En *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*. Landes Bioscience.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6306/>

Hartmann, K., Becker-Putsche, M., Bocklitz, T., Pachmann, K., Niendorf, A., Rösch, P., & Popp, J. (2012). A study of Docetaxel-induced effects in MCF-7 cells by means of Raman microspectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(3), 745–753.

<https://doi.org/10.1007/s00216-012-5887-9>

- Hsu, L.-H., Chu, N.-M., Lin, Y.-F., & Kao, S.-H. (2019). G-Protein Coupled Estrogen Receptor in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2).
<https://doi.org/10.3390/ijms20020306>
- Kalinowski, L., Saunus, J. M., McCart Reed, A. E., & Lakhani, S. R. (2019). Breast Cancer Heterogeneity in Primary and Metastatic Disease. En A. Ahmad (Ed.), *Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance: Challenges and Progress* (pp. 75–104). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6_6
- Kelderman, S., Schumacher, T. N. M., & Haanen, J. B. A. G. (2014a). Acquired and intrinsic resistance in cancer immunotherapy. *Molecular Oncology*, 8(6), 1132–1139.
<https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.07.011>
- Kelderman, S., Schumacher, T. N. M., & Haanen, J. B. A. G. (2014b). Acquired and intrinsic resistance in cancer immunotherapy. *Molecular Oncology*, 8(6), 1132–1139.
<https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.07.011>
- Kim, C., Gao, R., Sei, E., Brandt, R., Hartman, J., Hatschek, T., Crosetto, N., Foukakis, T., & Navin, N. E. (2018). Chemoresistance Evolution in Triple-Negative Breast Cancer Delineated by Single-Cell Sequencing. *Cell*, 173(4), 879-893.e13.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.041>
- Koga, K., Nakamura, M., Nakashima, H., Akiyoshi, T., Kubo, M., Sato, N., Kuroki, S., Nomura, M., Tanaka, M., & Katano, M. (2008). Novel Link between Estrogen Receptor α and Hedgehog Pathway in Breast Cancer. *Anticancer Research*, 28(2A), 731–739.
- Levin, E. R. (2003). Bidirectional Signaling between the Estrogen Receptor and the Epidermal Growth Factor Receptor. *Molecular Endocrinology*, 17(3), 309–317.
<https://doi.org/10.1210/me.2002-0368>

- Liedtke, C., Mazouni, C., Hess, K. R., André, F., Tordai, A., Mejia, J. A., Symmans, W. F., Gonzalez-Angulo, A. M., Hennessy, B., Green, M., Cristofanilli, M., Hortobagyi, G. N., & Pusztai, L. (2008). Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, *26*(8), 1275–1281. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.4147>
- Nass, N., & Kalinski, T. (2015). Tamoxifen resistance: From cell culture experiments towards novel biomarkers. *Pathology - Research and Practice*, *211*(3), 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2015.01.004>
- Nguyen, N. T., Vendrell, J. A., Poulard, C., Győrffy, B., Goddard-Léon, S., Bièche, I., Corbo, L., Romancer, M. L., Bachelot, T., Treilleux, I., & Cohen, P. A. (2014). A functional interplay between ZNF217 and Estrogen Receptor alpha exists in luminal breast cancers. *Molecular Oncology*, *8*(8), 1441–1457. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.05.013>
- Niikura, N., Iwamoto, T., Masuda, S., Kumaki, N., Xiaoyan, T., Shirane, M., Mori, K., Tsuda, B., Okamura, T., Saito, Y., Suzuki, Y., & Tokuda, Y. (2012). Immunohistochemical Ki67 labeling index has similar proliferation predictive power to various gene signatures in breast cancer. *Cancer Science*, *103*(8), 1508–1512. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2012.02319.x>
- Parisot, J. P., Hu, X. F., DeLuise, M., & Zalcberg, J. R. (1999). Altered expression of the IGF-1 receptor in a tamoxifen-resistant human breast cancer cell line. *British Journal of Cancer*, *79*(5–6), 693–700. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690112>
- Peiró, G., Diebold, J., & Löhrs, U. (2002). CAS (Cellular Apoptosis Susceptibility) Gene Expression in Ovarian Carcinoma Correlation With 20q13.2 Copy Number and Cyclin

- D1, p53, and Rb Protein Expression. *American Journal of Clinical Pathology*, 118(6), 922–929. <https://doi.org/10.1309/XYCB-UW8U-5541-U4QD>
- Plevova, P., Cerna, D., Balcar, A., Foretova, L., Zapletalova, J., Silhanova, E., Curik, R., & Dvorackova, J. (2010). CCND1 and ZNF217 gene amplification is equally frequent in BRCA1 and BRCA2 associated and non-BRCA breast cancer. *Neoplasma*, 57(4), 325–332. https://doi.org/10.4149/neo_2010_04_325
- Pohlmann, P. R., Mayer, I. A., & Mernaugh, R. (2009). Resistance to Trastuzumab in Breast Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(24), 7479–7491. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0636>
- Prihantono, P., Hatta, M., Binekada, C., Sampepajung, D., Haryasena, H., Nelwan, B., Asadul Islam, A., & Nilawati Usman, A. (2017). Ki-67 Expression by Immunohistochemistry and Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction as Predictor of Clinical Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Locally Advanced Breast Cancer. *Journal of Oncology*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6209849>
- Ramaswamy, B., Lu, Y., Teng, K., Nuovo, G., Li, X., Shapiro, C. L., & Majumder, S. (2012). Hedgehog Signaling Is a Novel Therapeutic Target in Tamoxifen-Resistant Breast Cancer Aberrantly Activated by PI3K/AKT Pathway. *Cancer Research*, 72(19), 5048–5059. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1248>
- Rooney, P. H., Boonsong, A., McFadyen, M. C., McLeod, H. L., Cassidy, J., Curran, S., & Murray, G. I. (2004). The candidate oncogene ZNF217 is frequently amplified in colon cancer. *The Journal of Pathology*, 204(3), 282–288. <https://doi.org/10.1002/path.1632>

- Sapino, A., Pietribiasi, F., Bussolati, G., & Marchisio, P. C. (1986). Estrogen- and tamoxifen-induced rearrangement of cytoskeletal and adhesion structures in breast cancer MCF-7 cells. *Cancer Research*, *46*(5), 2526–2531.
- Sun, Y., Wang, Y., Fan, C., Gao, P., Wang, X., Wei, G., & Wei, J. (2014). Estrogen promotes stemness and invasiveness of ER-positive breast cancer cells through Gli1 activation. *Molecular Cancer*, *13*(1), 137. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-137>
- Szostakowska, M., Trębińska-Stryjewska, A., Grzybowska, E. A., & Fabisiewicz, A. (2019). Resistance to endocrine therapy in breast cancer: Molecular mechanisms and future goals. *Breast Cancer Research and Treatment*, *173*(3), 489–497. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-5023-4>
- Tai, W., Mahato, R., & Cheng, K. (2010). The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, *146*(3), 264–275. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.04.009>
- Vargas-Rondón, N., Villegas, V. E., & Rondón-Lagos, M. (2017). The Role of Chromosomal Instability in Cancer and Therapeutic Responses. *Cancers*, *10*(1). <https://doi.org/10.3390/cancers10010004>
- Vendrell, J. A., Solassol, J., Gyórfy, B., Vilquin, P., Jarlier, M., Donini, C. F., Gamba, L., Maudelonde, T., Rouanet, P., & Cohen, P. A. (2019). Evaluating ZNF217 mRNA Expression Levels as a Predictor of Response to Endocrine Therapy in ER+ Breast Cancer. *Frontiers in Pharmacology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01581>
- Vendrell, J. A., Thollet, A., Nguyen, N. T., Ghayad, S. E., Vinot, S., Bièche, I., Grisard, E., Jossierand, V., Coll, J.-L., Roux, P., Corbo, L., Treilleux, I., Rimokh, R., & Cohen, P. A. (2012). ZNF217 Is a Marker of Poor Prognosis in Breast Cancer That Drives

- Epithelial–Mesenchymal Transition and Invasion. *Cancer Research*, 72(14), 3593–3606. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3095>
- Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA*, 321(3), 288–300. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>
- Wang, S., Konorev, E. A., Kotamraju, S., Joseph, J., Kalivendi, S., & Kalyanaraman, B. (2004). Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. Intermediacy of H₂O₂- and p53-dependent pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25535–25543. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400944200>
- Xu, J., Huang, G., Zhang, Z., Zhao, J., Zhang, M., Wang, Y., Liu, Z., & Lu, J. (2015). Up-Regulation of Glioma-Associated Oncogene Homolog 1 Expression by Serum Starvation Promotes Cell Survival in ER-Positive Breast Cancer Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 36(5), 1862–1876. <https://doi.org/10.1159/000430156>
- Xu, L., Kwon, Y.-J., Frolova, N., Steg, A. D., Yuan, K., Johnson, M. R., Grizzle, W. E., Desmond, R. A., & Frost, A. R. (2010). Gli1 promotes cell survival and is predictive of a poor outcome in ER α -negative breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 123(1), 59–71. <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0617-5>
- Yamaguchi, H., Chang, S.-S., Hsu, J. L., & Hung, M.-C. (2014). Signaling cross-talk in the resistance to HER family receptor targeted therapy. *Oncogene*, 33(9), 1073–1081. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.74>

ANEXOS

Anexo1. Primers de los oncogenes evaluados y los controles internos empleados para la qPCR.

Gen	Primer	Secuencia (5'-3')
ZNF217	F	GCGCTGTCCTCTCACCAG
	R	CCAGGTAAGCAGGGGTAGGG
GLI1	F	CAGCTACATCAACTCCGGCCAATAGGG
	R	TGCTGCGGCGTTCAAGAGAGACTG
KI67	F	TGACCCTGATGAGAAAGCTCAA
	R	GAGTCATCTGCGGTACTGTCT
HpT	F	TGCAGACTTTGCTTTCCTTGGTCAGG
	R	CCAACACTTCGTGGGGTCCTTTTCA
RPL0	F	CCTTCTCCTTTGGGCTGGTCATCCA
	R	CAGACACTGGCAACATTGCGGACA
TBP	F	GCCAGCTTCGGAGAGTTCTGGGATT
	R	CGGGCACGAAGTGCAATGGTCTTTA