



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Resistencia a la terapia dirigida contra HER2 en cáncer de mama:
relevancia de la hipoxia tumoral y Rac1 como potencial blanco
terapéutico**

Tesis presentada para optar por el título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires
en el área Ciencias Biológicas

Lic. Virginia Judith Wolos

Director de Tesis: Dr. Gabriel León Fiszman

Consejero de Estudios: Dr. Martín Monte

Lugar de trabajo: Universidad de Buenos Aires, Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo",
Área Investigación, Departamento de Inmunobiología

Buenos Aires, jueves 22 de mayo de 2025

A mi abuela Virginia,
que me hubiese pedido que le leyera estas páginas en voz alta.

una mirada desde la alcantarilla
puede ser una visión del mundo

la rebelión consiste en mirar una rosa
hasta pulverizarse los ojos

ALEJANDRA PIZARNIK

Árbol de Diana, 1962

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se debe a la cercanía de muchas personas.

A Gabriel, gracias por la confianza, por tu comprensión y muy especialmente por haberme alentado a hacer de estos años mi propio derrotero. Gracias por prestarme oídos y por cada uno de tus *sí, no hay problema* que fueron fundamentales.

A Marianela, una compañera fuera de serie, sutil observadora, sensata, ingeniosa y divertida, gracias. Nuestras charlas son siempre un oasis. Te quiero mucho.

A Ivana, gracias por haberme acompañado y ayudado tantas veces.

Elisa, tu sello es de una invaluable lucidez. Gracias por regalarnos tu tiempo y tu magia.

A Mariana, gracias por tu mirada cómplice y tus palabras justas cada vez que las necesito.

Lucas, charlar con vos es una invitación a dar el salto. Gracias. Tengo muy presente tu consejo.

Elsa, a veces pienso qué me dirías si estuviésemos tomando un café a media mañana y te hago caso. Gracias por compartir conmigo tu manera dulce de entender las cosas.

A Denise, gracias por quién sabe cuántos apapachos y por meter vos también las patas en la fuente. A Ana y Andrea, por ser tan cariñosas conmigo. A Catalina, aprecio mucho tu criterio.

Trabajar en el Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo” me da mucho gusto. A mis compañeras y compañeros del Área Investigación, con todo mi afecto, muchas gracias. Es muy grato contar con personas como ustedes.

A Georgina, gracias por tu calidez y tu generosidad. A Marcela y Ezequiel, por la dedicación que han brindado a este trabajo. A Carla, por tu valioso punto de vista.

A Martín, mi consejero de estudios, gracias por tu respuesta ágil y precisa. A Edith y Roxana, por el sostén y sus significativos aportes. También a Edith, Caroline y Abel, por su tiempo, su interés y su cuidado al evaluar este trabajo. Me alegra que haya estado en sus manos.

Giorgio, ti ringrazio per il tuo sostegno, la tua ospitalità e la tua grande puntualità. Mi hanno messa in condizione di vivere un'esperienza senza paragoni, tra le più belle e formative che io abbia mai vissuto. Giulia, grazie anche a te. Sono fortunata di averti avuto come collega. Sei brava ed estremamente generosa. Senza di te non ce l'avrei fatta. Il mio soggiorno in lab con voi è stato davvero un piacere.

Andrea, tu sei una persona gentile. E questo è chiaro perché si può capire anche se ci si trova a un oceano di distanza. Grazie per avermi accolta. Ludovica, dal pomeriggio in cui sono arrivata, anche quando non avevi tempo neanche per te stessa, hai sempre trovato un momento da dedicarmi. Ti ringrazio per ognuno di quei momenti, li porto con me. Alessandro, grazie per avermi ascoltata quando ne ho avuto bisogno. Ho apprezzato ogni chiacchierata, così come i silenzi che non di rado abbiamo condiviso. Con voi mi sono sentita come a casa.

*Lucrezia, ritornerò con te a mi español rioplatense. En vos encontré una amiga, dulce y brillante. Gracias. Argentina te reserva siempre un *posticino*. Ti tengo con me.*

Gracias a Aldana, compañera y compinche en un sinnúmero de confabulaciones, y Marianela, tan resuelta que contagia. Lo logramos. A Macarena, muy especialmente por tu *nos pareció que te lo podíamos adelantar ya que estás en el futuro*. Ese amor todavía lo siento. A Agustina, que las cosas las dice con todas las letras, e Imanol, que las dice con un humor maravilloso. A Lizeth, Andrés y Florencia, que me ayudaron tanto, incluso a veces quizás sin darse mucha cuenta. Que sigan los éxitos y los fracasos.

A Florencia, con quien todo es codo a codo, gracias infinitas. A Victoria, Lucía y Lucila, porque los avatares de esta carrera se vuelven más ligeros y mucho más divertidos con ustedes.

A Iván, Pola, gracias por este nuestro vínculo, digamos cósmico. A Dolores y Sofía, amigas espectaculares, siempre logran que sople un poco de aire fresco. A Santiago, que me lee sin que medie palabra, adoro nuestra amistad. A Tatiana, con quien las horas duran lo que dure la charla. Qué lindo que sean parte de mi vida.

Gracias finalmente a mi familia. A Quijote, un bloque de amor de locura. A Alessandro y Eugenia, que conocen tantas de mis facetas y aun así me hacen sentir que nunca voy a estar sola. Amo compartir los días con ustedes. A Miguel y Ruth, por enseñarnos la simpleza de las cosas que están a nuestro alcance y por construir un refugio en cualquier lugar.

Esta tesis se debe a ustedes. Y también yo.

A la Universidad de Buenos Aires, mi gratitud, mi cariño, mi compromiso. Hay mucho para dar. La comunidad es la trama.

RESISTENCIA A LA TERAPIA DIRIGIDA CONTRA HER2 EN CÁNCER DE MAMA: RELEVANCIA DE LA HIPOXIA TUMORAL Y RAC1 COMO POTENCIAL BLANCO TERAPÉUTICO

Resumen

El desarrollo de terapias dirigidas ha mejorado notablemente la supervivencia de los pacientes con diagnóstico de cáncer de mama HER2-positivo. Sin embargo, la resistencia al tratamiento continúa siendo un desafío en casos de recidiva y enfermedad metastásica. La contribución de la hipoxia tumoral a la progresión de la enfermedad ha sido descrita en distintos tipos de cáncer. En este trabajo, evaluamos su rol en la resistencia a la terapia dirigida contra HER2 en el cáncer de mama. Encontramos que la hipoxia induce la resistencia al tratamiento con los anticuerpos monoclonales trastuzumab y trastuzumab emtansina en un modelo celular de cáncer de mama humano. Dada la necesidad de nuevas estrategias terapéuticas para la prevención y el tratamiento de la recurrencia de la enfermedad y la metástasis, propusimos también la combinación de trastuzumab con un inhibidor de la GTPasa Rac1. Esta proteína ha sido asociada con la resistencia en cáncer y con la progresión tumoral particularmente bajo condiciones de hipoxia. Aquí demostramos que la inhibición de Rac1 aumenta la eficacia del trastuzumab en modelos celulares tanto sensibles como resistentes a la droga. Así, los resultados presentados en esta tesis destacan la relevancia de la hipoxia en la resistencia al tratamiento dirigido contra HER2 y la vía de Rac1 como potencial blanco terapéutico para el cáncer de mama HER2-positivo.

Palabras clave

cáncer de mama HER2-positivo, trastuzumab, resistencia, hipoxia, Rac1

RESISTANCE TO HER2-DIRECTED THERAPY IN BREAST CANCER: RELEVANCE OF TUMOUR HYPOXIA AND RAC1 AS A POTENTIAL THERAPEUTIC TARGET

Abstract

The development of targeted therapies has notably improved the survival of patients diagnosed with HER2-positive breast cancer. However, resistance to treatment continues to be a challenge in cases of relapse and metastatic disease. The contribution of tumour hypoxia to disease progression has been described in different cancer types. In this work, we evaluated its role in HER2-targeted therapy resistance in breast cancer. We found that hypoxia induces treatment resistance to trastuzumab and trastuzumab emtansine monoclonal antibodies in a cellular model of human breast cancer. Since new therapeutic strategies are needed for the prevention and treatment of disease recurrence and metastasis, we also proposed the combination of trastuzumab with a Rac1 GTPase inhibitor. This protein has been associated with cancer resistance and with tumour progression particularly under hypoxic conditions. Here we demonstrated that Rac1 inhibition enhances the efficacy of trastuzumab in both drug-sensitive and resistant cell models. Thus, the results presented in this thesis highlight the relevance of hypoxia in resistance to HER2-directed treatment and the Rac1 pathway as a potential therapeutic target for HER2-positive breast cancer.

Keywords

HER2-positive breast cancer, trastuzumab, resistance, hypoxia, Rac1

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	11
El cáncer de mama HER2-positivo	11
Terapia dirigida con anticuerpos monoclonales	13
Mecanismos de resistencia y nuevas terapias	15
La hipoxia en el cáncer de mama HER2-positivo	17
HIF-1α en la resistencia a la terapia dirigida	19
La GTPasa pequeña Rac1 en el cáncer de mama HER2-positivo	20
Rac1 en la resistencia a la terapia dirigida	22
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	24
RESULTADOS.....	26
Primera parte	27
Segunda parte	42
DISCUSIÓN	56
CONCLUSIONES	62
MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
Drogas y cultivos celulares	63
Cultivo y evaluación del crecimiento de los esferoides tumorales	64
Western blot	65
Inmunofluorescencia	65
RT-qPCR	66
Ensayos de viabilidad celular	66
Ensayos de citometría de flujo	67
Análisis proteómico y fosfoproteómico	67
Determinación de la producción de lactato	69
Análisis estadístico	70
REFERENCIAS	71

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama HER2-positivo

El cáncer de mama es la segunda neoplasia maligna más frecuente en la población mundial y la primera entre las mujeres. En Argentina, es el tipo de cáncer más frecuente, sumando más de 20 mil nuevos casos en 2022, y posee los valores más altos de incidencia y mortalidad asociadas con la patología oncológica (Ferlay et al, 2024).

La glándula mamaria está formada por agrupaciones de pequeños acinos con aspecto de racimo, los lobulillos, inmersas en el estroma intralobulillar. Los ductos que parten de los lobulillos confluyen en seis a diez ductos colectores que finalizan en el pezón. Toda la estructura glandular se encuentra circundada por el estroma interlobulillar. A su vez, la glándula mamaria está revestida en su mayor parte por un epitelio de doble capa, con células epiteliales luminales y células mioepiteliales basales. Este epitelio cambia de forma brusca a un epitelio escamoso queratinizado en la porción más externa de los ductos colectores (**Figura 1**). Casi la totalidad de las neoplasias malignas de mama son adenocarcinomas.

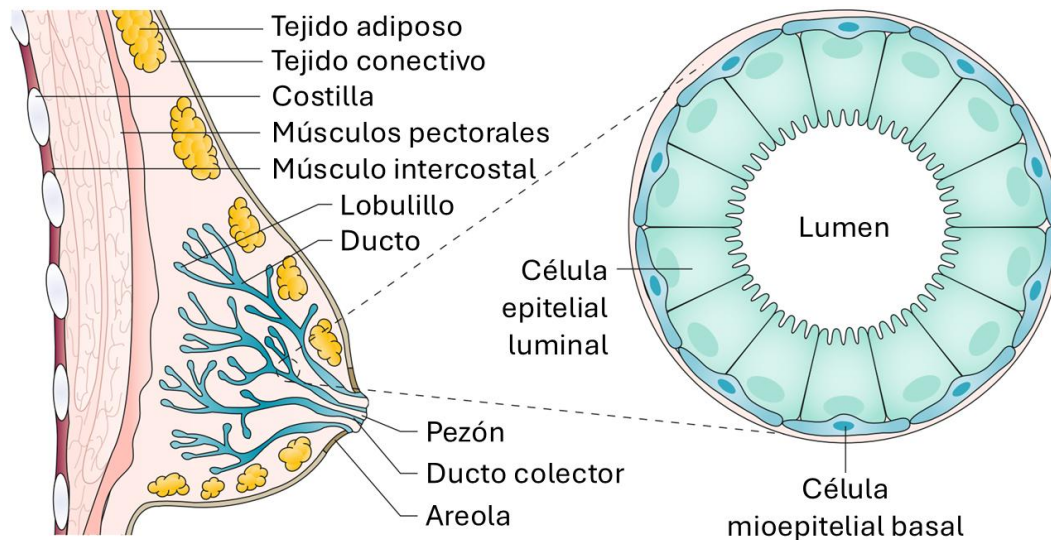


Figura 1. Representación esquemática de la glándula mamaria. Adaptación de Harbeck et al, 2019.

Los adenocarcinomas mamarios se clasifican tradicionalmente en tres subtipos de acuerdo con la expresión del receptor de estrógenos y del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). El cáncer de mama *luminal* expresa receptor de estrógenos, mientras que el carcinoma mamario *HER2-positivo* se define por la sobreexpresión de HER2. Finalmente, el carcinoma de mama *triple negativo* es negativo para ambos receptores y para el receptor de progesterona, cuya expresión se encuentra bajo el control del receptor de estrógenos. Aquí, consideraremos los carcinomas positivos para HER2, que comprenden alrededor del 20 % de los casos. Algunos de ellos son clasificados dentro del grupo luminal debido a la expresión simultánea de receptores hormonales (Lester, 2021).

El receptor HER2 se encuentra codificado en el locus q21 del cromosoma 17 y forma parte de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico humano (HER) (Coussens et al, 1985). Hasta el momento se conocen cuatro receptores miembros de la familia. Su estructura comprende un dominio extracelular de unión a ligando, un dominio transmembrana y un dominio intracelular con función tirosina quinasa, a excepción del dominio intracelular del receptor 3 (HER3) que carece de actividad catalítica. La unión del ligando resulta en la homodimerización o heterodimerización de los receptores, y en la consecuente autofosforilación de residuos de tirosina en el dominio citoplasmático. Luego, se activan cascadas de señalización intracelular, presididas por el eje fosfatidilinositol

3-quinasa (PI3K) / proteína quinasa B (PKB) / mTOR, que promueven el crecimiento y la proliferación de las células. Aunque hasta el momento no existe ligando conocido de HER2, su sobreexpresión conduce a una dimerización independiente de ligando (Swain et al, 2023).

El hallazgo de la amplificación génica de HER2 en tumores mamarios y su asociación con un pronóstico desfavorable marcaron un punto de inflexión en el tratamiento de las pacientes con cáncer de mama HER2-positivo (Slamon et al, 1987). En la actualidad, más de la mitad de las pacientes diagnosticadas con este subtipo de tumores presentan remisiones completas cuando son tratadas con anticuerpos monoclonales terapéuticos que se unen a HER2 y bloquean su actividad. No obstante, la resistencia al tratamiento continúa siendo un desafío en casos de recidiva y enfermedad metastásica. En un intento tanto por mejorar la respuesta de las pacientes como por superar la resistencia, numerosas moléculas potencialmente terapéuticas están siendo estudiadas (Lester, 2021).

Terapia dirigida con anticuerpos monoclonales

El trastuzumab fue el primer anticuerpo monoclonal humanizado desarrollado contra HER2. La unión del anticuerpo al dominio extracelular del receptor bloquea su actividad, disminuyendo la proliferación de las células y promoviendo su arresto en la fase G₁ del ciclo celular. Adicionalmente, el trastuzumab facilita la actividad antitumoral del sistema inmunitario mediada por el mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (Carter et al, 1992; Lane et al, 2000). Pacientes con cáncer de mama HER2-positivo tratadas con trastuzumab como monodroga presentaron una tasa de respuesta de aproximadamente el 30 % (Vogel et al, 2002). En cambio, la respuesta mejoró notablemente adicionando trastuzumab a la quimioterapia (Slamon et al, 2001). La eficacia del trastuzumab en combinación con agentes quimioterapéuticos fue inicialmente demostrada en el tratamiento de pacientes en estadio metastásico y en la terapia adyuvante (Romond et al, 2005; Slamon et al, 2001). Posteriormente, se propuso un doble bloqueo de HER2 mediante la combinación de un segundo anticuerpo monoclonal humanizado, el pertuzumab. Este anticuerpo previene la

dimerización de HER2 por impedimento estérico, aumentando la efectividad del trastuzumab (Agus et al, 2002; Lee-Hoeflich et al, 2008). Actualmente, la combinación de trastuzumab, pertuzumab y quimioterapia constituye el tratamiento de primera línea para pacientes con cáncer de mama HER2-positivo en esquemas de adyuvancia y neoadyuvancia (Gianni et al, 2012; von Minckwitz et al, 2017).

Los conjugados anticuerpo-droga combinan con éxito las características antitumorales de los anticuerpos monoclonales y las drogas quimioterápicas en una única entidad farmacológica. Estos compuestos logran direccionar el efecto citotóxico de la quimioterapia a células tumorales específicas. Consisten en un anticuerpo unido covalentemente a una droga citotóxica mediante un conector sintético. El anticuerpo reconoce su blanco en la superficie de la célula tumoral, es internalizado y libera la carga citotóxica en el interior de la célula. Asimismo, el clivaje del conector posibilita la liberación de la droga a través de la membrana plasmática y su difusión en el espacio extracelular, ejerciendo así su efecto también en células vecinas. Esto aumenta el número de células susceptibles, especialmente en tumores con una expresión baja o heterogénea de la proteína blanco.

El trastuzumab emtansina (T-DM1) fue el primer conjugado anticuerpo-droga desarrollado contra HER2. Su estructura se compone del trastuzumab unido a la emtansina (DM1), un compuesto citotóxico que provoca disrupción mitótica y apoptosis (Lewis Phillips et al, 2008). El T-DM1 se estableció como terapia de primera línea para las pacientes resistentes, con recaída de la enfermedad antes de los 6 meses de finalizado el tratamiento adyuvante con trastuzumab, pertuzumab y quimioterapia (Montemurro et al, 2019). También es indicado como terapia de segunda línea cuando la enfermedad persiste luego de la cirugía posterior al tratamiento neoadyuvante con doble bloqueo de HER2 y quimioterapia (von Minckwitz et al, 2018).

Más recientemente fue desarrollado el trastuzumab deruxtecan, un conjugado anticuerpo-droga que se encuentra formado por la unión del trastuzumab y el deruxtecan, un inhibidor de la topoisomerasa I. El conector consiste en un tetrapéptido selectivamente hidrolizado por las proteasas

lisosomales, generalmente elevadas en el tejido tumoral. Esta característica, sumada a la baja vida media del deruxtecan, limita la exposición sistémica del agente citotóxico. Además, la membrana plasmática es altamente permeable al deruxtecan, lo que facilita su efecto sobre células vecinas (Ogitani et al, 2016). El trastuzumab deruxtecan demostró mejores resultados como tratamiento de segunda línea en comparación con el T-DM1 y una actividad alentadora en el tratamiento de pacientes con metástasis cerebrales (Cortés et al, 2022; Jerusalem et al, 2021). Su uso aún no se encuentra aprobado en Argentina, pero se prevé como alternativa de elección al T-DM1.

Mecanismos de resistencia y nuevas terapias

El desarrollo de alternativas terapéuticas originales y más potentes persigue el objetivo de alcanzar un mayor número de pacientes curadas en estadio temprano, y superar la resistencia en casos de recurrencia y metástasis. Resulta determinante entonces conocer los mecanismos moleculares asociados con la resistencia, de modo tal de posibilitar un diseño racional de nuevos fármacos. Entre los principales mecanismos de resistencia a las terapias dirigidas contra HER2 que han sido descritos se encuentran el enmascaramiento del sitio de unión del trastuzumab, la activación de vías de señalización compensatorias y la heterogeneidad intratumoral en la expresión de HER2 (Fizman y Jasnis, 2011).

El enmascaramiento del sitio de unión del trastuzumab en el dominio extracelular de HER2 puede ser consecuencia de la formación de complejos de membrana. Niveles de expresión elevados de la glicoproteína mucina 4 han sido asociados con este mecanismo. Se ha observado que el incremento de la expresión de esta glicoproteína favorece su interacción con HER2 en la superficie de las células. Luego, la formación de un complejo entre mucina 4 y HER2 reduce la unión entre el receptor y el trastuzumab (Price-Schiavi et al, 2002). Además, se ha demostrado que el factor de necrosis tumoral α (TNF α) media la expresión de mucina 4. En modelos preclínicos, la inhibición de esta citoquina indujo una disminución de la expresión de mucina 4 y restituyó el efecto antitumoral del trastuzumab (Mercogliano et al, 2017).

Otro mecanismo de resistencia a las terapias dirigidas contra HER2 comprende la activación de vías de señalización intracelulares que compensan la inhibición del receptor. Como hemos ya mencionado, la vía de señalización de la quinasa PI3K es una de las principales cascadas moleculares activadas por HER2. Mediante el bloqueo del receptor, el trastuzumab induce una disminución de la actividad de esta vía. Sin embargo, una activación alternativa del eje ha sido descrita como mecanismo de resistencia. Las posibles causas de esta activación incluyen la pérdida de la fosfatasa PTEN, contraparte de la quinasa PI3K, y mutaciones activadoras en el gen *PIK3CA*, que codifica la isoforma α de la subunidad catalítica de PI3K (Chandarlapaty et al, 2012). La adición de un inhibidor de PI3K al tratamiento con trastuzumab y quimioterapia mostró beneficios en pacientes con aberraciones en la vía (André et al, 2016). Otro mecanismo molecular que podría explicar la resistencia al bloqueo de la vía de PI3K involucra el complejo ciclina D1 / quinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4). Ensayos preclínicos evidenciaron que CDK4 podría restituir la actividad de la vía de PI3K actuando sobre tuberina, una proteína cuya fosforilación en sitios específicos incrementa la actividad del complejo 1 de mTOR. La inhibición de CDK4 y HER2 redujo en forma sinérgica la proliferación celular y el tamaño tumoral en modelos *in vitro* e *in vivo* (Goel et al, 2016). Más aún, diversos ensayos clínicos mostraron la eficacia de combinar la inhibición de CDK4 y HER2 en el tratamiento neoadyuvante o en estadios avanzados del cáncer de mama HER2-positivo (Ciruelos et al, 2020; Gianni et al, 2018; Tolaney et al, 2020).

La heterogeneidad intratumoral en la expresión de HER2 es otra potencial fuente de resistencia a la terapia dirigida. Un ensayo clínico prospectivo evaluó la variabilidad en la expresión de HER2 de tumores mamarios y su impacto en la respuesta de las pacientes a la terapia dirigida. La identificación de una fracción de células tumorales sin amplificación de HER2 se encontró fuertemente asociada con la ausencia de respuesta patológica completa (Filho et al, 2021). El trastuzumab deruxtecan demostró ser eficaz en el tratamiento del cáncer de mama metastásico con bajos niveles de expresión de HER2 (Modi et al, 2022). Esto lo posiciona como una posible alternativa terapéutica para las pacientes con tumores con expresión de HER2 heterogénea.

Actualmente están siendo ensayados nuevos conjugados anticuerpo-droga, que difieren en las drogas, los conectores y los sitios de unión a HER2. Entre los fármacos en desarrollo clínico se encuentra el trastuzumab conjugado con duocarmacina, una toxina alquilante del ADN. El trastuzumab duocarmacina presentó una actividad clínica notable en pacientes con cáncer de mama HER2-positivo en estadio metastásico, incluyendo pacientes resistentes al T-DM1 (Banerji et al, 2019). Otras drogas emergentes tienen como objetivo el tratamiento selectivo de células HER2-positivo mediante la conjugación de anticuerpos dirigidos contra HER2 con moléculas degradantes de proteínas de interés. Estas moléculas consisten en dos ligandos unidos por un conector. Uno de los ligandos reconoce la proteína de interés a degradar, mientras que el segundo se une a la proteína ligasa de ubiquitina E3. Así, la proteína de interés resulta blanco del sistema natural de degradación proteica ubiquitina-proteasoma. Al estar conjugada con un anticuerpo dirigido contra HER2, la molécula degradante es conducida específicamente al citosol de las células diana (Maneiro et al, 2020). Esta nueva propuesta terapéutica combinaría la potencia catalítica de las moléculas degradantes con la especificidad tisular de los conjugados anticuerpo-droga. Posibles proteínas blanco se encuentran hoy en evaluación.

La hipoxia en el cáncer de mama HER2-positivo

La expresión proteica de la subunidad α del factor de transcripción inducible por hipoxia 1 (HIF-1) se encuentra frecuentemente incrementada en el cáncer de mama y otros tipos de tumores sólidos, y se correlaciona con la invasión tumoral, la metástasis y una menor supervivencia de los pacientes (Zhong et al, 1999). En efecto, la hipoxia (1 % O_2) es una de las principales características del microambiente tumoral, consecuencia de la alteración del flujo sanguíneo en el tejido neoplásico (Wicks y Semenza, 2022).

El factor de transcripción HIF-1, principal regulador de la respuesta celular de adaptación a la hipoxia, es una proteína heterodimérica conformada por una subunidad α (HIF-1 α), antes mencionada, y una subunidad β (HIF-1 β). La actividad transcripcional de HIF-1 depende de la regulación postraducciona de su subunidad

HIF-1 α , que a su vez obedece a la disponibilidad de oxígeno. Bajo condiciones de oxígeno normal, las proteínas con dominio prolin hidroxilasa hidroxilan HIF-1 α . Esta modificación funciona como señal para su degradación en el citoplasma de las células mediante el sistema ubiquitina-proteasoma. En cambio, la hidroxilación se encuentra inhibida en condiciones de hipoxia, lo que posibilita la acumulación de la subunidad HIF-1 α y su heterodimerización con la subunidad HIF-1 β . Luego, HIF-1 activa la transcripción de numerosos genes, algunos de los cuales codifican factores de crecimiento angiogénico, transportadores de glucosa y enzimas glicolíticas, y enzimas de remodelación de la matriz extracelular. El producto de la actividad de HIF-1 se encuentra involucrado en dos procesos fundamentales: la angiogénesis y la reprogramación del metabolismo celular (Semenza, 2004).

La acumulación de HIF-1 α en el tejido tumoral puede ocurrir también por mecanismos independientes de las condiciones de hipoxia. En el adenocarcinoma mamario humano HER2-positivo, HIF-1 α puede acumularse y ser detectado como consecuencia de la propia actividad del receptor HER2. Ha sido descrito que la señalización de HER2 vía PI3K/PKB/mTOR induce la síntesis proteica de HIF-1 α , de modo que la maquinaria celular resulta incapaz de degradar la totalidad de la proteína aún bajo condiciones de oxígeno normal. Consecuentemente, la sobreexpresión de HER2 activa la transcripción génica dependiente de HIF-1 (Laughner et al, 2001). Esto fue confirmado en muestras clínicas de tumores mamarios, donde mayores niveles de expresión proteica de HIF-1 α se encontraron significativamente asociados con mayores niveles de expresión de HER2 (Bos et al, 2003).

La expresión del conjunto de genes blanco de HIF-1 colabora en aspectos críticos de la progresión del cáncer, incluyendo la vascularización tumoral, la reprogramación metabólica, la motilidad celular y la invasión, y la resistencia a la terapia (Wicks y Semenza, 2022). El análisis de muestras de tejido mamario de distintos estadios de la tumorigénesis reveló que el nivel de expresión de la proteína HIF-1 α se incrementa a medida que se incrementa el estadio patológico, y es mayor en lesiones pobremente diferenciadas que en lesiones bien diferenciadas del mismo tipo tumoral (Bos et al, 2001). Particularmente, la expresión de HIF-1 α en tumores mamarios HER2-positivo está asociada con un mayor riesgo de metástasis

y una menor supervivencia de las pacientes (Giatromanolaki et al, 2004). Estudios realizados con modelos celulares sugieren que la expresión de HIF-1 α inducida por HER2 media la resistencia al anoikis y facilita el crecimiento celular tridimensional independiente de anclaje. Esto ocurriría a través de la regulación del metabolismo energético y la homeostasis oxidativa dependientes de HIF-1, favoreciendo la progresión tumoral (Whelan et al, 2013).

HIF-1 α en la resistencia a la terapia dirigida

HIF-1 α ha sido propuesta como potencial biomarcador de resistencia al trastuzumab. En pacientes con adenocarcinoma mamario HER2-positivo, la sobreexpresión de HIF-1 α se encontró significativamente asociada con una menor reducción del tamaño tumoral posterior al tratamiento (Koukourakis et al, 2014). Sin embargo, los mecanismos asociados con la resistencia al trastuzumab inducida por HIF-1 α han sido escasamente explorados.

Estudios realizados en líneas celulares mamarias resistentes al trastuzumab sugieren que HIF-1 α coopera con el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) en la modulación de la expresión de la fosfatasa PTEN. Un aumento de la expresión de STAT3 en células resistentes induciría la expresión de HIF-1 α que, por su parte, induciría la expresión del factor represor de la transcripción HES-1. Finalmente, HES-1 funcionaría como un regulador negativo del promotor de PTEN, disminuyendo su expresión (Aghazadeh y Yazdanparast, 2017). Menores niveles de expresión de la fosfatasa PTEN compensarían la inhibición de la vía de PI3K mediada por el trastuzumab.

Otro posible factor que contribuiría a la resistencia al trastuzumab inducida por HIF-1 α es el receptor de quemoquina C-X-C de tipo 4 (CXCR4). Se trata de un receptor acoplado a proteína G cuya expresión es inducida por HIF-1 α y que gobierna diversos procesos oncogénicos que incluyen la vascularización y la migración celular. Un estudio realizado en pacientes con cáncer de mama HER2-positivo halló una asociación significativa entre la expresión tumoral de CXCR4 y la recurrencia de la enfermedad luego del tratamiento adyuvante con

trastuzumab. Se encontró también una clara asociación entre mayores niveles de expresión de CXCR4 y la expresión de HIF-1 α (Kotb et al, 2022).

Las condiciones de hipoxia podrían también modular la eficacia de los conjugados anticuerpo-droga. Al respecto, ensayos realizados en líneas celulares sugieren una internalización deficiente del T-DM1 como potencial mecanismo de resistencia en un contexto de hipoxia tumoral. Las condiciones de hipoxia favorecerían la redistribución de la proteína caveolina-1 desde la membrana de vesículas citoplasmáticas hacia la membrana celular. Dado que la endocitosis de HER2 depende de caveolina-1, su redistribución bajo condiciones de hipoxia alteraría la endocitosis del receptor y, en consecuencia, también la internalización y la citotoxicidad del T-DM1 (Indira Chandran et al, 2020). Más aún, un estudio reciente de lesiones metastásicas de pacientes con cáncer de mama HER2-positivo mostró una correlación entre la ausencia de respuesta al tratamiento con T-DM1 y la expresión de genes asociados con la hipoxia (Rediti et al, 2025).

Diversos marcadores tisulares angiogénicos y metabólicos regulados por el factor de transcripción HIF-1 fueron propuestos como blancos terapéuticos para el cáncer de mama. No obstante, los resultados de los ensayos clínicos han sido, hasta el momento, desalentadores (de Heer et al, 2020).

La GTPasa pequeña Rac1 en el cáncer de mama HER2-positivo

Las proteínas G pequeñas son enzimas monoméricas de bajo peso molecular con actividad GTPasa. Estas proteínas funcionan como interruptores moleculares que transducen señales desde el exterior hacia el interior de las células, alternando entre una conformación activa unida a GTP y una conformación inactiva unida a GDP. Dos tipos de proteínas regulatorias controlan este ciclo. Los factores intercambiadores del nucleótido de guanina (GEF) funcionan como activadores, facilitando la disociación del GDP y posibilitando la unión del GTP. Por su parte, las proteínas activadoras de GTPasas (GAP) estimulan la actividad GTPasa intrínseca de la proteína G, que adopta así su estado inactivo. Aquí nos referiremos

a la proteína G pequeña Rac1, miembro de la familia de GTPasas homólogas de Ras (Rho) (**Figura 2**).

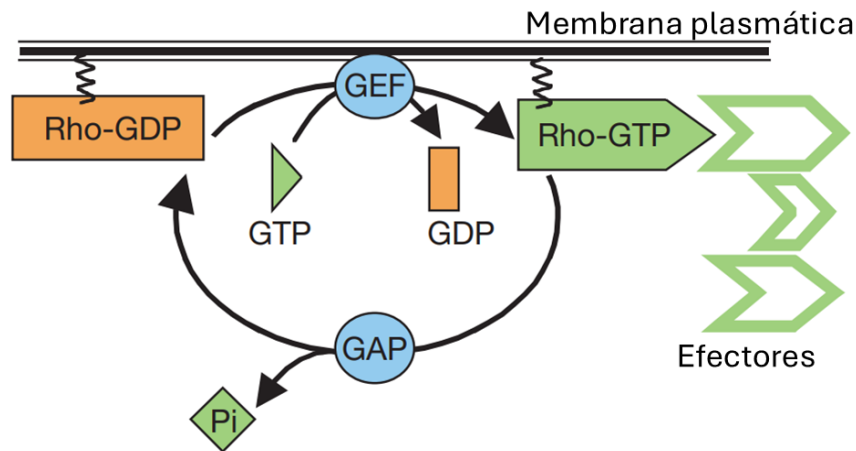


Figura 2. El ciclo de las GTPasas Rho. Adaptación de Etienne-Manneville y Hall, 2002.

Una de las principales funciones atribuidas a Rac1 y extensiva a la familia de GTPasas Rho es la reorganización del citoesqueleto de actina, determinante de la adhesión y la motilidad de las células (Etienne-Manneville y Hall, 2002). La GTPasa Rac1 interviene también en la modulación transcripcional de la expresión génica, cumpliendo un rol esencial en la progresión del ciclo celular a través de la fase G₁ (Olson et al, 1995). Se ha demostrado que la actividad de Rac1 regula la expresión de ciclina D1 (Westwick et al, 1997). No sorprenderá entonces que el malfuncionamiento de las vías de señalización gobernadas por Rac1 esté vinculado con diferentes patologías, siendo el cáncer una de ellas. En efecto, la desregulación de la actividad de Rac1 es frecuente en distintos tipos de tumores (Marei y Malliri, 2017). En particular, su hiperactivación en el adenocarcinoma mamario ha sido vinculada con un fenotipo agresivo (Schnelzer et al, 2000).

Rac1 fue identificada como una proteína mediadora clave de la señalización a través de la familia de receptores HER (Yang et al, 2006). Particularmente, la expresión de HER2 y la actividad de la proteína quinasa de serina-treonina PAK1, uno de los principales efectores de Rac1, presentaron una correlación significativa en muestras humanas de tumores mamarios. Más aún, la actividad de HER2 condujo a la activación del eje Rac1/PAK1 y a la consecuente disrupción de la morfología acinar en un modelo 3D de células epiteliales de mama. El aumento de

la proliferación y la pérdida de la polaridad de estas células evidenciaron la relevancia de la vía de Rac1/PAK1 en la transformación celular inducida por HER2 (Arias-Romero et al, 2010). En células tumorales mamarias, la amplificación de HER2 se encontró asociada con una mayor sensibilidad a la inhibición de Rac1 (Hampsch et al, 2017).

Distintos mecanismos moleculares podrían conducir a la activación de Rac1 en el cáncer de mama HER2-positivo. Uno de los mecanismos propuestos involucra el GEF P-Rex1, cuya sobreexpresión es frecuente en los tumores mamarios, especialmente aquellos con alta expresión de HER2 y receptor de estrógenos. Una notable asociación funcional entre HER2 y el receptor acoplado a proteína G CXCR4 condujo a la activación de P-Rex1 en células tumorales de mama (Sosa et al, 2010). Además, la actividad de P-Rex1 estaría también regulada por PI3K (Ebi et al, 2013). Otro mecanismo descrito sugiere dos vías de señalización dependientes del complejo 2 de mTOR. La vía de PKB activaría Rac1 a través del GEF TIAM1, mientras que la cascada de señalización de la proteína quinasa C disminuiría la expresión del inhibidor endógeno de Rac1, Rho GDI 2. Ambas vías convergerían en Rac1, activándola (Morrison Joly et al, 2017). Creciente evidencia demuestra que la señalización de HER2 a través de Rac1 resulta en una mayor capacidad migratoria e invasiva de las células tanto *in vitro* como *in vivo* (Johnson et al, 2010; Morrison Joly et al, 2017; Srijakotre et al, 2020; Wang et al, 2006).

Rac1 en la resistencia a la terapia dirigida

Además de haber sido asociada con la tumorigénesis y la progresión del cáncer, la GTPasa Rac1 ha sido también vinculada con la resistencia a diferentes opciones de tratamiento, desde los compuestos quimioterápicos y la radioterapia hasta la terapia dirigida (Cardama et al, 2018). En particular, estudios realizados con modelos celulares de cáncer de mama HER2-positivo sugieren una asociación entre la expresión de Rac1 y la resistencia a la terapia dirigida con trastuzumab (Dokmanovic et al, 2009; Velázquez-Vega et al, 2024; Zhao et al, 2011). Más aún, la expresión de Rac1 en tumores de pacientes con adenocarcinoma mamario HER2-positivo ha sido asociada con un mal pronóstico (Kato et al, 2024). Sobre la

base de estos hallazgos, la GTPasa pequeña Rac1 ha sido propuesta como blanco terapéutico asequible para el cáncer de mama HER2-positivo.

La identificación de los residuos aminoacídicos responsables de la interacción entre Rac1 y sus proteínas activadoras permitió desarrollar distintos inhibidores específicos. Entre ellos, ZINC69391 bloquea el sitio de interacción entre Rac1 y su GEF TIAM1. Un diseño racional derivado de ZINC69391 posibilitó el desarrollo de un segundo inhibidor, la molécula 1A-116. Este nuevo compuesto modula los niveles de Rac1-GTP interfiriendo en la interacción entre Rac1 y diferentes GEF como P-Rex1, el protooncogén vav, TIAM1 y el protooncogén DBL, y presenta una mayor potencia que el compuesto parental. Estudios preclínicos realizados en líneas celulares mamarias agresivas mostraron resultados alentadores en cuanto a la aplicabilidad clínica de estos inhibidores (Cardama et al, 2014; González et al, 2020).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La resistencia a la terapia dirigida en el cáncer de mama HER2-positivo continúa siendo un desafío principalmente en casos de recidiva y enfermedad metastásica. Aquí, abordamos esta problemática centrándonos en la relevancia de la hipoxia tumoral. La hipoxia es una característica distintiva de los tumores sólidos asociada con aspectos críticos de la progresión del cáncer. Particularmente, la subunidad HIF-1 α del factor de transcripción inducible por hipoxia ha sido propuesta como biomarcador de resistencia de los tumores mamarios HER2-positivo a la terapia dirigida con trastuzumab. Sin embargo, los mecanismos que explicarían esta resistencia han sido escasamente explorados. Por lo tanto, nuestra primera hipótesis de trabajo es que **la identificación de proteínas y cascadas de señalización asociadas con la hipoxia en células de cáncer de mama HER2-positivo permite la determinación de mecanismos de resistencia a la terapia dirigida contra HER2.**

La prevención y el tratamiento de la recurrencia de la enfermedad y la metástasis en el cáncer de mama HER2-positivo requiere de nuevos abordajes clínicos. En este trabajo, evaluamos la proteína G pequeña Rac1 como potencial blanco terapéutico. Esta proteína es una de las enzimas más estudiadas de la familia de las GTPasas Rho. El aumento de su actividad es frecuente en distintos tipos de cáncer y se correlaciona con un mal pronóstico. En particular, se ha sugerido una asociación entre la expresión de Rac1 y la resistencia a la terapia dirigida con trastuzumab. Entonces, proponemos como siguiente hipótesis de trabajo que **el bloqueo simultáneo de HER2 y Rac1 constituye una estrategia alternativa para el tratamiento del cáncer de mama HER2-positivo.**

Dadas nuestras hipótesis, nos propusimos:

- 1 Identificar vías funcionales potencialmente involucradas en la resistencia a la terapia dirigida del cáncer de mama HER2-positivo mediante la caracterización de un modelo celular de hipoxia tumoral.
 - a. Evaluar el efecto de la hipoxia sobre la respuesta de células tumorales mamarias humanas HER2-positivo al tratamiento con los anticuerpos monoclonales trastuzumab y T-DM1.
 - b. Estudiar las firmas proteómica y fosfoproteómica del modelo celular de hipoxia tumoral para el cáncer de mama humano HER2-positivo.
- 2 Estudiar la combinación de trastuzumab con un inhibidor específico de Rac1 como potencial alternativa terapéutica para el cáncer de mama HER2-positivo.
 - a. Estudiar el efecto de los tratamientos con trastuzumab y el inhibidor de Rac1 1A-116 utilizando modelos celulares de adenocarcinoma mamario humano HER2-positivo sensible y resistente al trastuzumab.
 - b. Analizar la modulación proteómica inducida por la inhibición dual de HER2 y Rac1 en células tumorales mamarias humanas HER2-positivo.

RESULTADOS

Primera parte

Relevancia de la hipoxia tumoral

Hemos ya señalado que la hipoxia tumoral se encuentra asociada con la progresión de la enfermedad y la resistencia al tratamiento en el cáncer de mama. Con el objetivo de estudiar su contribución a la resistencia a la terapia dirigida contra HER2, utilizamos la línea celular de adenocarcinoma mamario humano HER2-positivo BT-474 y cloruro de cobalto como inductor de la respuesta celular a la hipoxia. Bajo condiciones de oxígeno normal, las proteínas con dominio proлил hidroxilasa hidroxilan la subunidad HIF-1 α del factor de transcripción inducible por hipoxia, modificación que funciona como señal para su degradación en el citoplasma de las células. En cambio, estas enzimas se encuentran inactivas bajo condiciones de hipoxia, lo que previene la degradación de HIF-1 α (Semenza, 2004). Emulando lo que ocurre en este segundo caso, el cloruro de cobalto inhibe la actividad de las proteínas con dominio proлил hidroxilasa. Entonces, con el propósito de validar nuestro modelo de hipoxia, en primer lugar evaluamos la expresión proteica de HIF-1 α en células BT-474 tratadas con cloruro de cobalto. Como resultado, confirmamos una tendencia al incremento de la expresión de esta proteína con el tratamiento (**Figura 3a**). Cabe destacar que la proteína HIF-1 α es frecuentemente detectada en células tumorales como consecuencia de distintas alteraciones genéticas, entre ellas la sobreexpresión de HER2, independientemente de la disponibilidad de oxígeno (Laughner et al, 2001). Aquí, en efecto, una expresión basal de HIF-1 α pudo ser detectada tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células, sugiriendo la actividad de la vía aún en ausencia de cloruro de cobalto (**Figura 3b**). Posteriormente, la funcionalidad de HIF-1 α fue estudiada midiendo la expresión del ARN mensajero de *VEGF*, gen diana del factor

de transcripción. En paralelo con el aumento de la expresión de HIF-1 α , confirmamos también una expresión significativamente mayor de *VEGF* en nuestro modelo (**Figura 3c**). Así, demostramos tanto la acumulación como la actividad de HIF-1 α en células BT-474 tratadas con cloruro de cobalto.

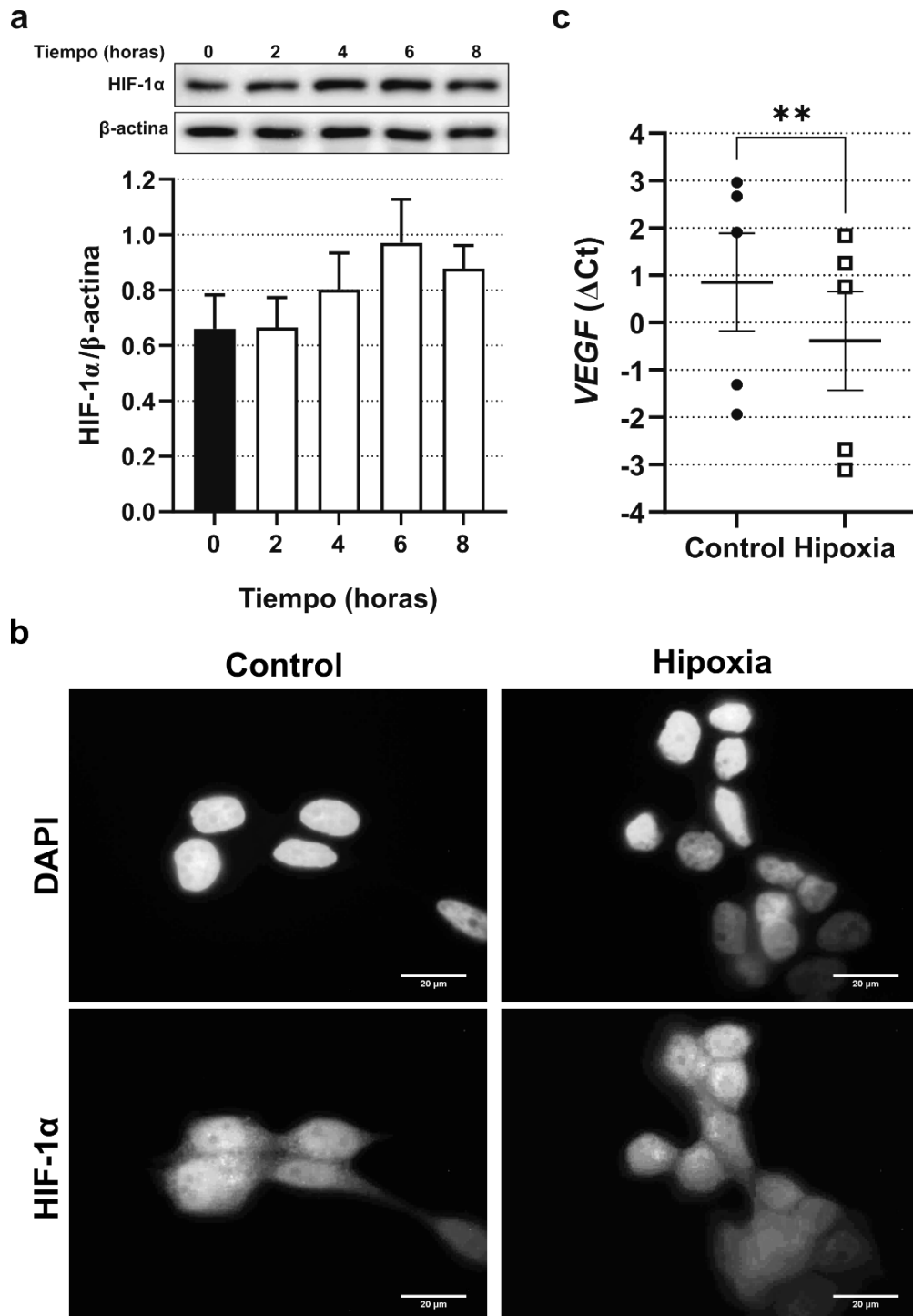


Figura 3. Incremento de la expresión de HIF-1 α y *VEGF* inducido por el cloruro de cobalto en células de cáncer de mama HER2-positivo. a-c, Células BT-474 fueron

tratadas con 100 μ M de cloruro de cobalto durante (**a**) los tiempos indicados o (**b-c**) 6 horas. **a-b**, HIF-1 α fue detectada por (**a**) Western blot (media \pm EEM, n=2) y (**b**) inmunofluorescencia. **c**, VEGF fue detectado por RT-qPCR (media \pm EEM, n=5; prueba de t, ** p<0.01).

Utilizando el modelo descripto, inicialmente estudiamos el efecto de la hipoxia sobre la respuesta de las células al tratamiento dirigido contra HER2 con los anticuerpos trastuzumab y T-DM1. Células BT-474 fueron expuestas a cloruro de cobalto y simultáneamente tratadas con concentraciones crecientes de las drogas. La viabilidad celular fue medida después de 72 horas mediante el ensayo de cristal violeta. Notablemente, encontramos que las células bajo condiciones de hipoxia presentaban una viabilidad celular significativamente mayor en comparación con las células de control (**Figura 4a**). Resultados similares fueron obtenidos midiendo la viabilidad celular por el método de exclusión de azul de tripán (**Figura 4b**).

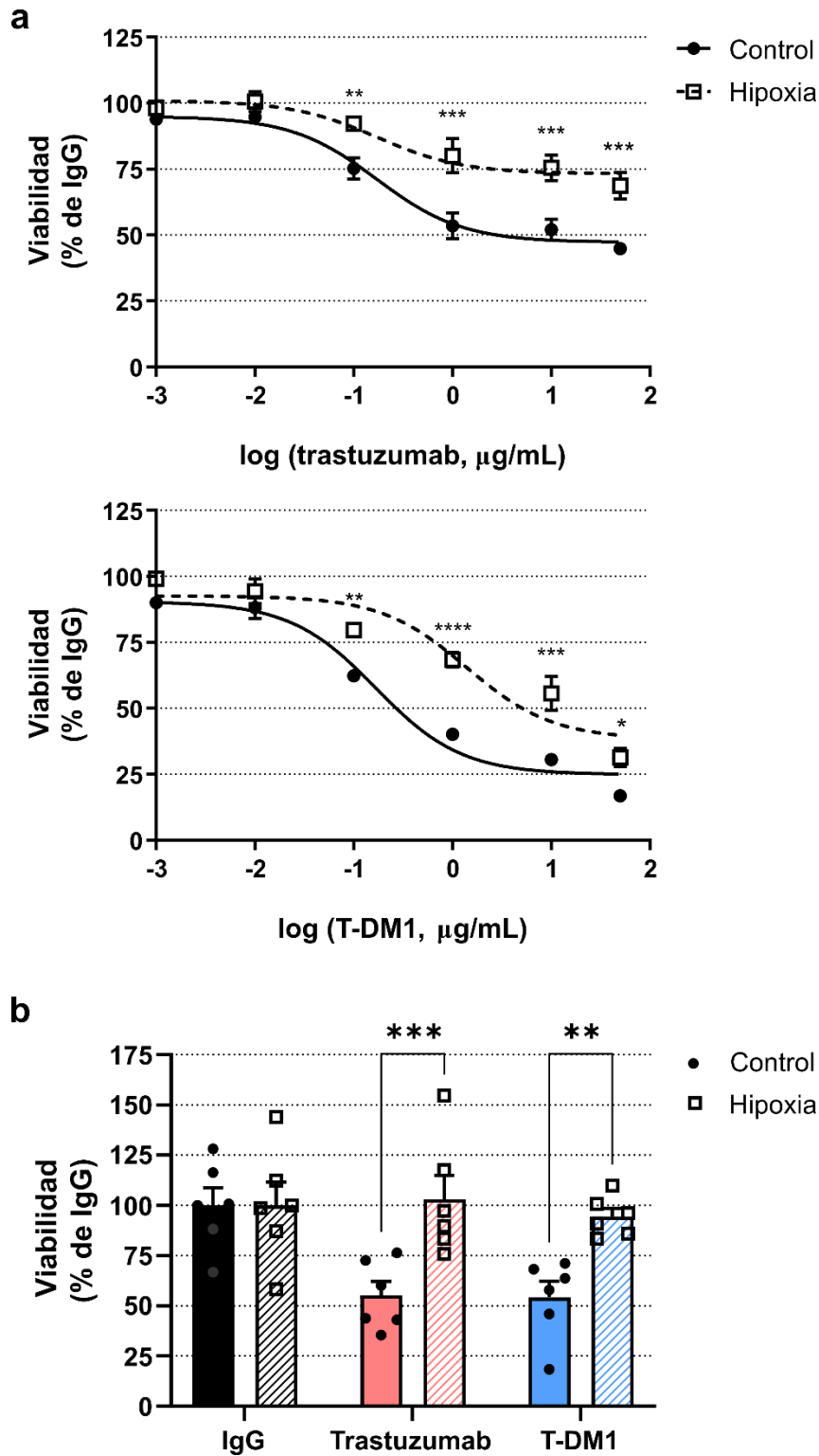


Figura 4. Resistencia al tratamiento con trastuzumab y T-DM1 inducida por la hipoxia en células de cáncer de mama HER2-positivo. a-b, Células BT-474 fueron tratadas con (a) 0.001 $\mu\text{g/mL}$ a 50 $\mu\text{g/mL}$ de trastuzumab o T-DM1, y (b) 10 $\mu\text{g/mL}$ de trastuzumab o 1 $\mu\text{g/mL}$ de T-DM1 por 72 horas. Las condiciones de hipoxia fueron inducidas por el tratamiento simultáneo con 100 μM de cloruro de cobalto. La viabilidad celular fue evaluada por (a) el ensayo de cristal violeta y (b) el método de exclusión de azul de tripán. Los resultados se expresan como porcentaje del tratamiento de control con (a) 50 $\mu\text{g/mL}$ y

(b) 10 µg/mL de IgG (media±EEM, n=3 en a y n=6 en b; ANOVA de dos vías y prueba de Bonferroni, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001).

Como ha sido previamente descrito, el tratamiento de células tumorales de mama HER2-positivo con T-DM1 resulta en una rápida muerte de las células por apoptosis y en la lisis celular debido a la acción citotóxica de la emtansina liberada en el interior de las células (Lewis Phillips et al, 2008). Entonces, estudiamos también el efecto de las condiciones de hipoxia sobre la apoptosis inducida por el T-DM1 en células BT-474 luego de 72 horas de tratamiento. Conforme a lo observado al evaluar la viabilidad celular, encontramos que el tratamiento con T-DM1 causaba una menor muerte celular por apoptosis bajo condiciones de hipoxia que bajo condiciones de control (**Figura 5**).

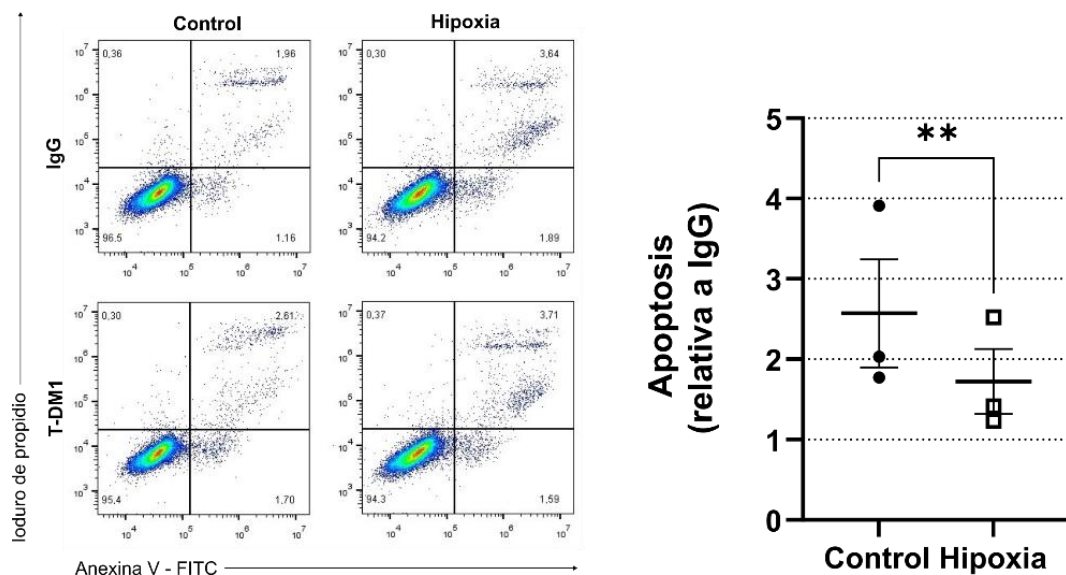


Figura 5. Disminución de la apoptosis inducida por el T-DM1 en células de cáncer de mama HER2-positivo bajo condiciones de hipoxia. Células BT-474 fueron tratadas con 1 µg/mL de T-DM1 por 72 horas. Las condiciones de hipoxia fueron inducidas por el tratamiento simultáneo con 100 µM de cloruro de cobalto. La muerte celular por apoptosis fue evaluada mediante marcación con anexina V-FITC y ioduro de propidio, seguida de citometría de flujo. Los resultados fueron normalizados al tratamiento de control con 1 µg/mL de IgG (media±EEM, n=3; prueba de t, ** p<0.01).

Nuestros resultados hasta aquí muestran que las condiciones de hipoxia inducen la resistencia de las células al tratamiento dirigido. Con el fin de identificar los procesos celulares subyacentes y potenciales mecanismos asociados con el fenotipo resistente, realizamos una caracterización más profunda de nuestro

modelo de hipoxia tumoral a través del estudio de sus firmas proteómica y fosfoproteómica por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (LC-MS/MS). Para el análisis proteómico fueron comparados los extractos proteicos totales de células BT-474 bajo condiciones de hipoxia y de control. Identificamos un total de 1071 proteínas, entre las cuales 61 proteínas presentaron abundancias significativamente diferentes entre las condiciones estudiadas. Específicamente, encontramos 25 proteínas reguladas negativamente y 36 proteínas reguladas positivamente en células BT-474 bajo condiciones de hipoxia en comparación con células de control (**Figura 6**).

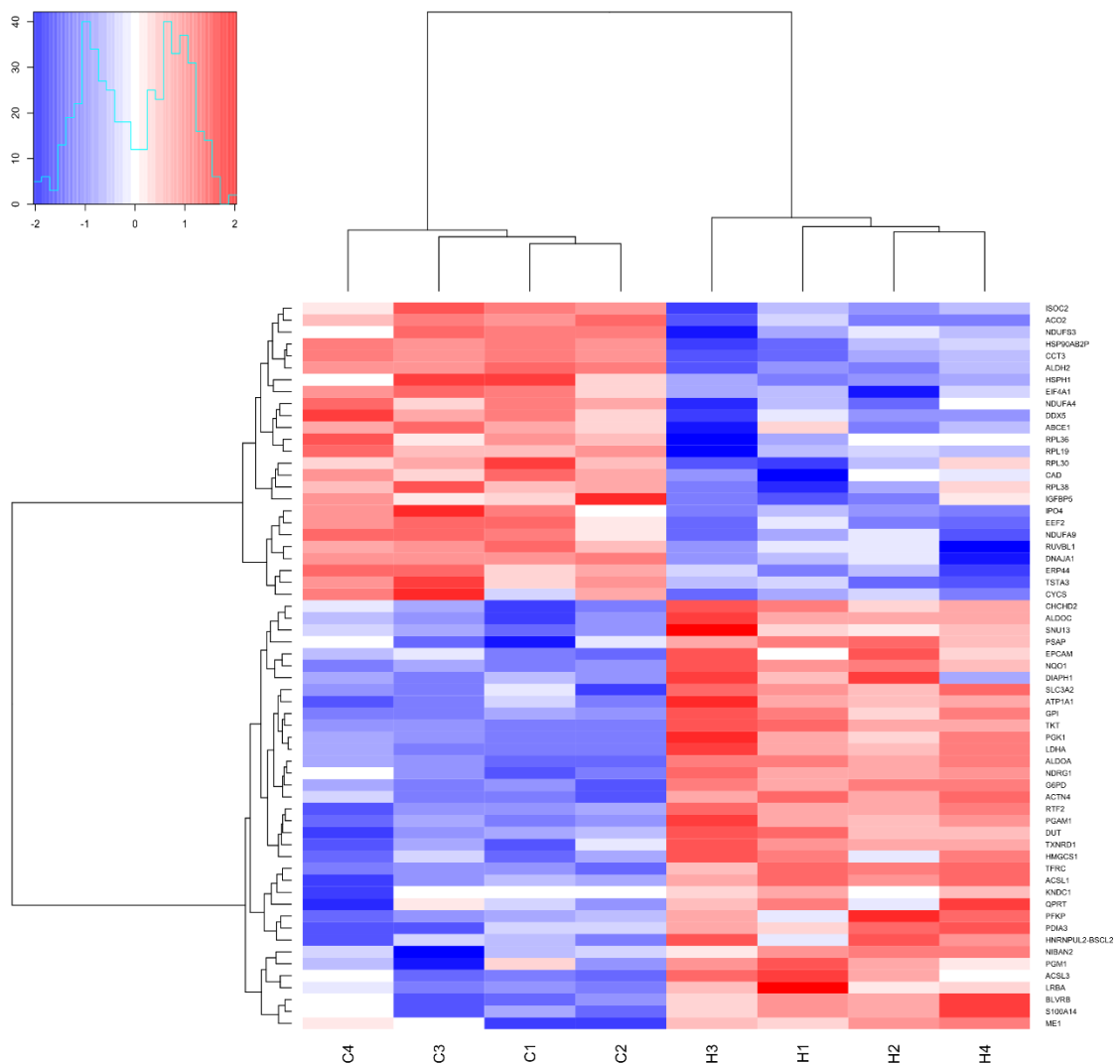


Figura 6. Caracterización proteómica del modelo de hipoxia tumoral para el cáncer de mama HER2-positivo. Células BT-474 fueron tratadas con 100 μ M de cloruro de cobalto por 72 horas para la inducción de la hipoxia y sus extractos proteicos fueron analizados por LC-MS/MS. Se muestran las proteínas reguladas negativamente (azul) o positivamente

(rojo) bajo condiciones de hipoxia (H) en comparación con condiciones de control (C) (n=4; p valor ajustado por el método de Benjamini-Hochberg <0.05 , veces de cambio ≥ 1.2 o ≤ -1.2). Los datos fueron analizados con el paquete Limma (Smyth, 2004) del programa R y el agrupamiento jerárquico fue realizado utilizando la medida de distancia euclidiana y el método de Ward.

Entre las 61 proteínas identificadas por el análisis de abundancia diferencial, NDRG1, una proteína sensible al estrés, fue aquella que presentó la mayor diferencia entre las condiciones estudiadas, con una abundancia más de 17 veces superior en el modelo de hipoxia (**Figura 7a**). Ha sido descrito que la expresión de esta proteína es inducida por la hipoxia en células de cáncer de mama, con un consecuente aumento de su proliferación y migración (Li et al, 2016). El incremento de su abundancia en nuestro modelo fue confirmado por Western blot (**Figura 7b**).

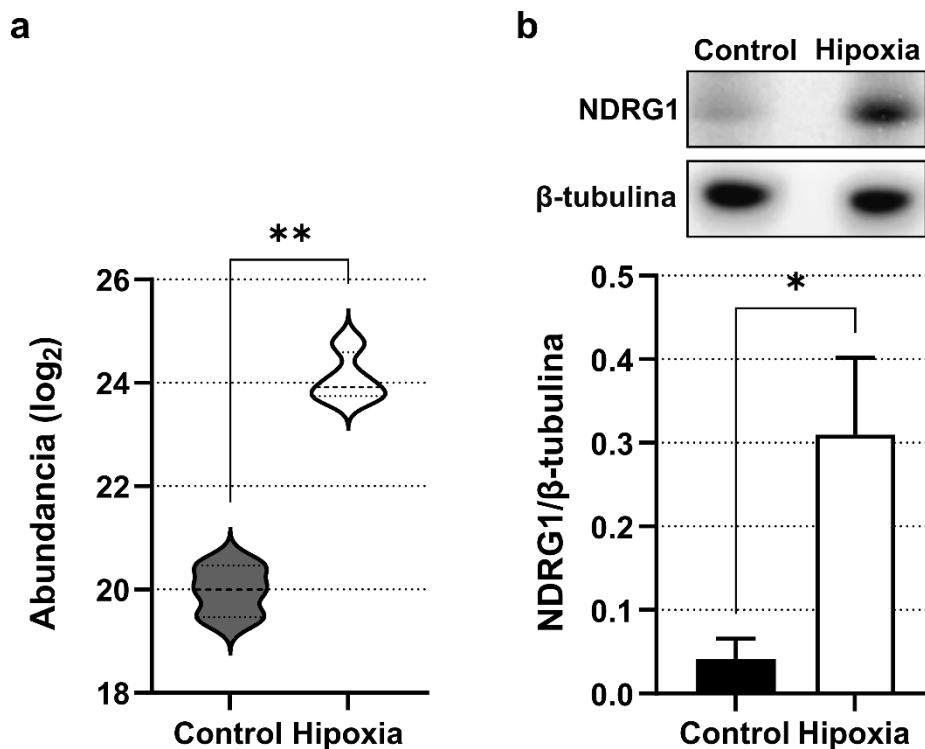


Figura 7. Incremento de la expresión de NDRG1 en células de cáncer de mama HER2-positivo bajo condiciones de hipoxia. a-b, Células BT-474 fueron tratadas con 100 μ M de cloruro de cobalto por 72 horas para la inducción de la hipoxia. NDRG1 fue detectada por (a) LC-MS/MS y (b) Western blot (media \pm EEM, n=4; prueba de t, * p <0.05 , ** p <0.01).

Dado que el blanco molecular del trastuzumab y el T-DM1 es el receptor HER2, nos preguntamos si su expresión era modulada por las condiciones de

hipoxia. De acuerdo con los resultados del análisis proteómico, la abundancia total de HER2 no mostró cambios en el modelo de hipoxia en comparación con las condiciones de control (**Figura 8a**). Este dato fue validado por un ensayo de Western blot (**Figura 8b**). Particularmente, la expresión de HER2 en la membrana plasmática tampoco fue modulada por las condiciones de hipoxia, a pesar de disminuir significativamente en respuesta al tratamiento con trastuzumab o T-DM1 (**Figura 8c**).

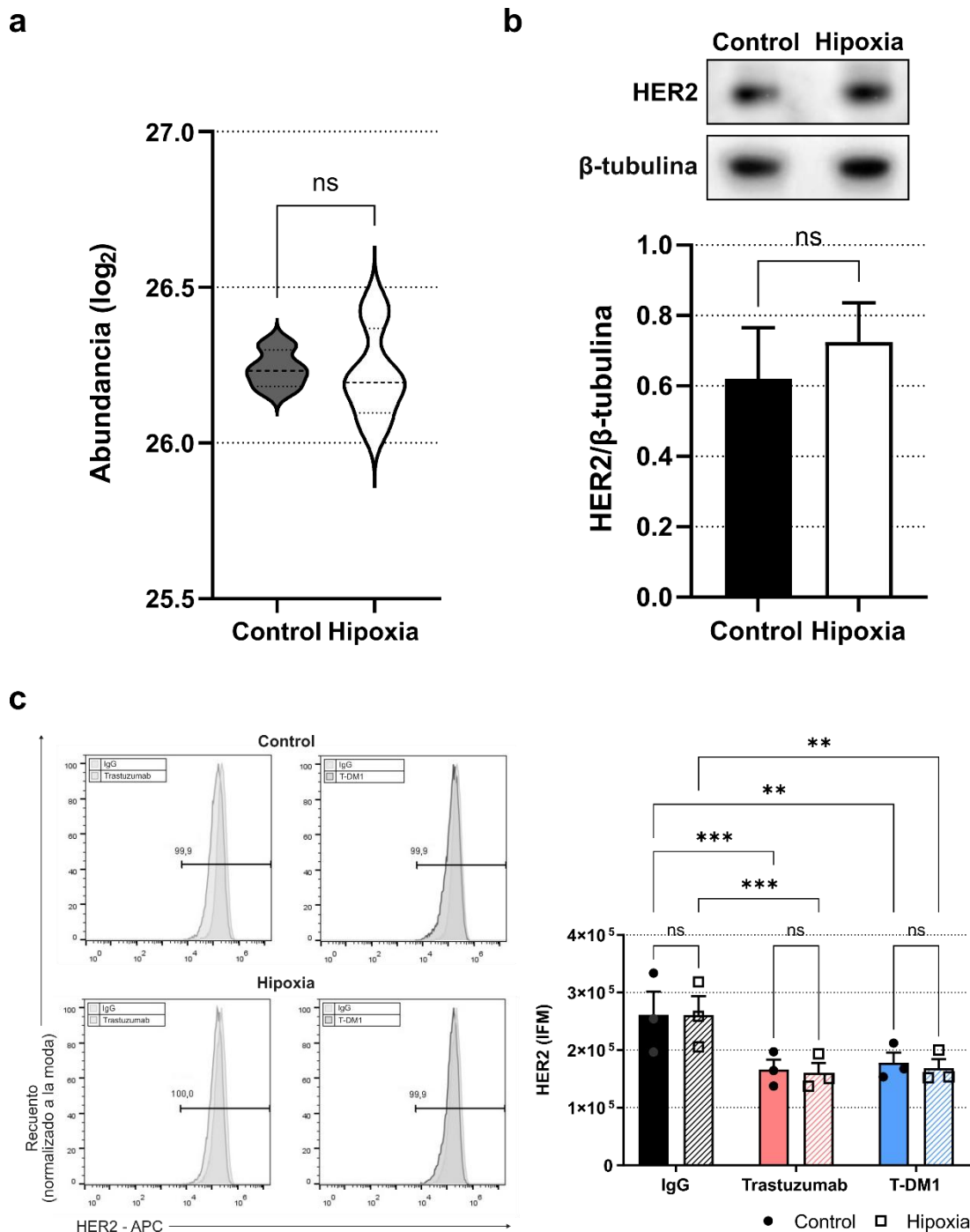


Figura 8. Expresión de HER2 en células de cáncer de mama HER2-positivo bajo condiciones de hipoxia. a-c, Células BT-474 fueron tratadas con 100 μ M de cloruro de cobalto por 72 horas para la inducción de la hipoxia. (c) Simultáneamente, fueron tratadas con 10 μ g/mL de IgG, 10 μ g/mL de trastuzumab o 1 μ g/mL de T-DM1. a-b, HER2 total fue detectada por (a) LC-MS/MS y (b) Western blot (media \pm EEM, n=4; prueba de t, ns no significativo). c, La expresión de HER2 en membrana fue detectada por citometría de flujo (media \pm EEM, n=3; ANOVA de dos vías y prueba de Tukey, ** p<0.01, *** p<0.001, ns no significativo). IFM, intensidad de fluorescencia media.

Luego, los procesos celulares asociados con el modelo de hipoxia fueron determinados mediante un análisis de enriquecimiento funcional realizado con la lista de 61 proteínas con abundancias diferenciales. Entre las vías metabólicas y de señalización identificadas, destacamos la vía de la glicólisis/gluconeogénesis, la vía de las pentosas fosfato y la vía de señalización de HIF-1 (**Figura 9**). Estos hallazgos sugieren una reprogramación metabólica de las células expuestas a cloruro de cobalto hacia un fenotipo anaeróbico. Más aún, evaluamos también las causas químicas atribuibles a los cambios en el perfil proteico inducidos en nuestro modelo de hipoxia. La deficiencia de oxígeno fue identificada como principal potencial causa (**Figura 10**). Para validar estos resultados, evaluamos la producción celular de lactato, característica del metabolismo anaeróbico. Medimos su concentración en el medio condicionado de células BT-474 y verificamos un aumento significativo luego del tratamiento con cloruro de cobalto (**Figura 11**). Así, demostramos cambios metabólicos propios de la respuesta celular de adaptación a la hipoxia en nuestro modelo de hipoxia tumoral.

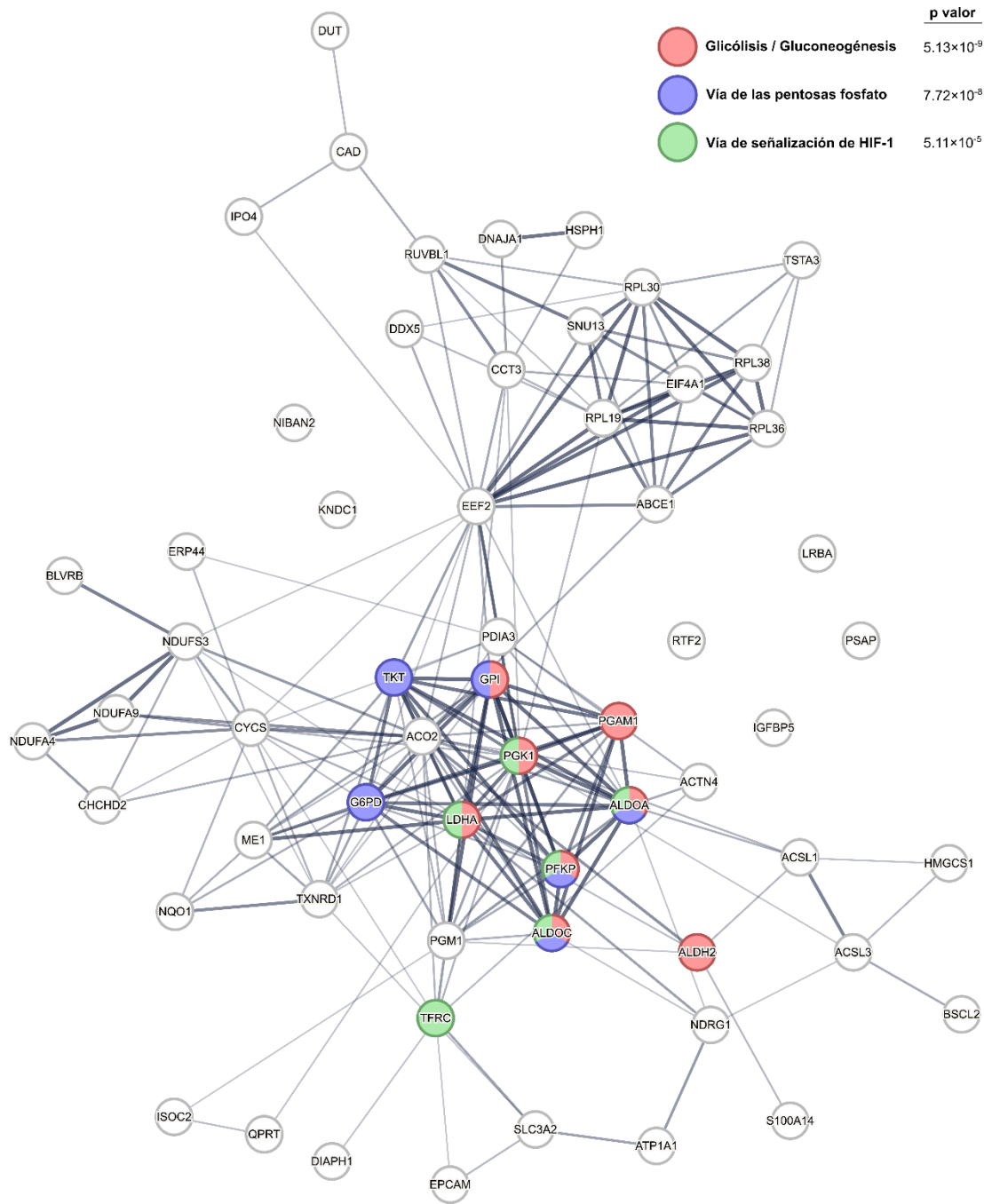


Figura 9. Red de interacción y análisis de enriquecimiento funcional de las proteínas moduladas por la hipoxia en células de cáncer de mama HER2-positivo. Se muestra una red de asociaciones funcionales y físicas construida con la base de datos STRING (Szklarczyk et al, 2023). El grosor de las líneas indica la fuerza de la evidencia disponible. Las vías fueron identificadas utilizando la base de datos Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Kanehisa et al, 2025) (p valor ajustado por el método de Benjamini-Hochberg).

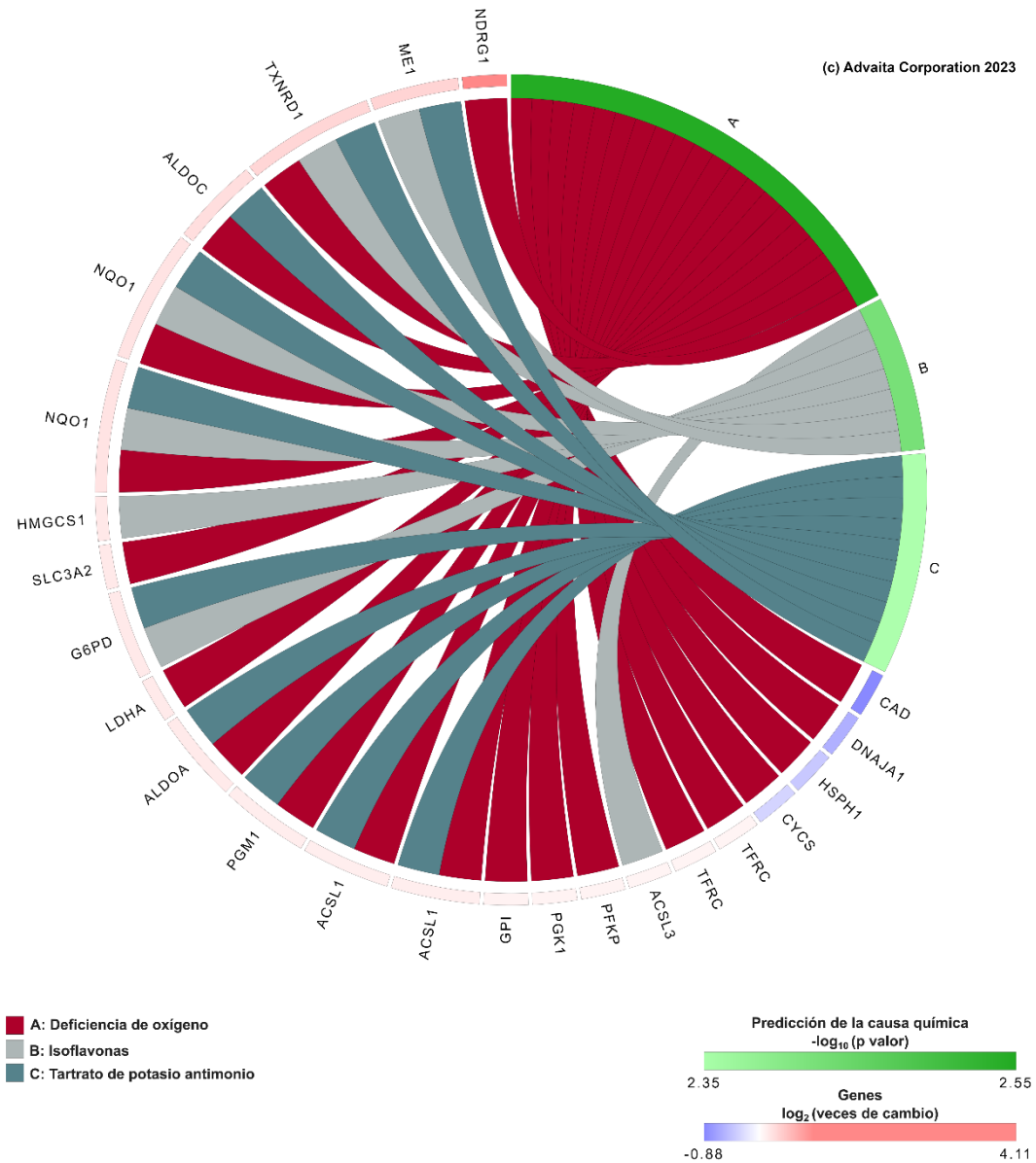


Figura 10. Predicción de los reguladores químicos causantes de los cambios en el perfil proteico inducidos por la hipoxia en células de cáncer de mama HER2-positivo. Las proteínas reguladas negativamente (azul) o positivamente (rojo) fueron asociadas con potenciales reguladores río arriba (verde, p valor ajustado por el método de Benjamini-Hochberg). El análisis fue realizado utilizando la plataforma iPathwayGuide (AdvaitaBio Corporation) (Donato et al, 2013; Draghici et al, 2007).

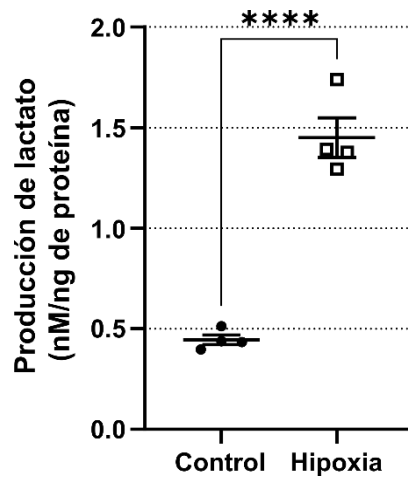


Figura 11. Incremento de la producción de lactato inducido por la hipoxia en células de cáncer de mama HER2-positivo. Células BT-474 fueron tratadas con 100 μ M de cloruro de cobalto por 72 horas para la inducción de la hipoxia. La producción de lactato fue determinada en los medios condicionados y los resultados fueron normalizados a la masa proteica total de los cultivos celulares (media \pm EEM, n=4; prueba de t, **** p<0.0001).

El estudio del fosfoproteoma de las células por LC-MS/MS provee un entendimiento global de las vías de señalización activas. Con el objeto de identificar potenciales mecanismos celulares asociados con la resistencia inducida por la hipoxia, evaluamos muestras enriquecidas en péptidos fosforilados de células BT-474 bajo condiciones de hipoxia y de control. El análisis de los datos fue realizado considerando los péptidos con una única fosforilación y utilizando el paquete Limma (Smyth, 2004) del programa R. Como resultado, identificamos un total de 80 fosfoproteínas con abundancias significativamente diferentes entre condiciones (n=4; p valor ajustado por el método de Benjamini-Hochberg <0.05, veces de cambio ≥ 1.2 o ≤ -1.2). Seguidamente, aplicamos sobre estos datos un método de puntuación de relaciones quinasa-sustrato que pondera quinasas potencialmente involucradas en los cambios observados en el fosfoproteoma. Así, precisamos 20 quinasas relacionadas con fosfoproteínas disminuidas o aumentadas bajo condiciones de hipoxia en comparación con condiciones de control (**Figura 12a**). Luego, realizamos un análisis de enriquecimiento funcional sobre la lista de las 20 quinasas y sus fosfoproteínas asociadas. En la **Figura 12b** se presentan vías funcionales identificadas utilizando las bases de datos Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Kanehisa et al, 2025), Reactome (Milacic et al, 2024) y WikiPathways (Agrawal et al, 2024). La identificación de las vías de

señalización de VEGF y de HER, junto con la resistencia a inhibidores de la tirosina quinasa HER1, apoya la asociación entre el fenotipo hipóxico y la condición de resistencia. Por su parte, emergieron del análisis los efectores de las proteínas GTPasas Rho, particularmente Rac1 asociada con la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) p38 y con la metaloproteinasa de matriz 2 (MMP2), y los circuitos reguladores de la vía de señalización del factor de transcripción STAT3.

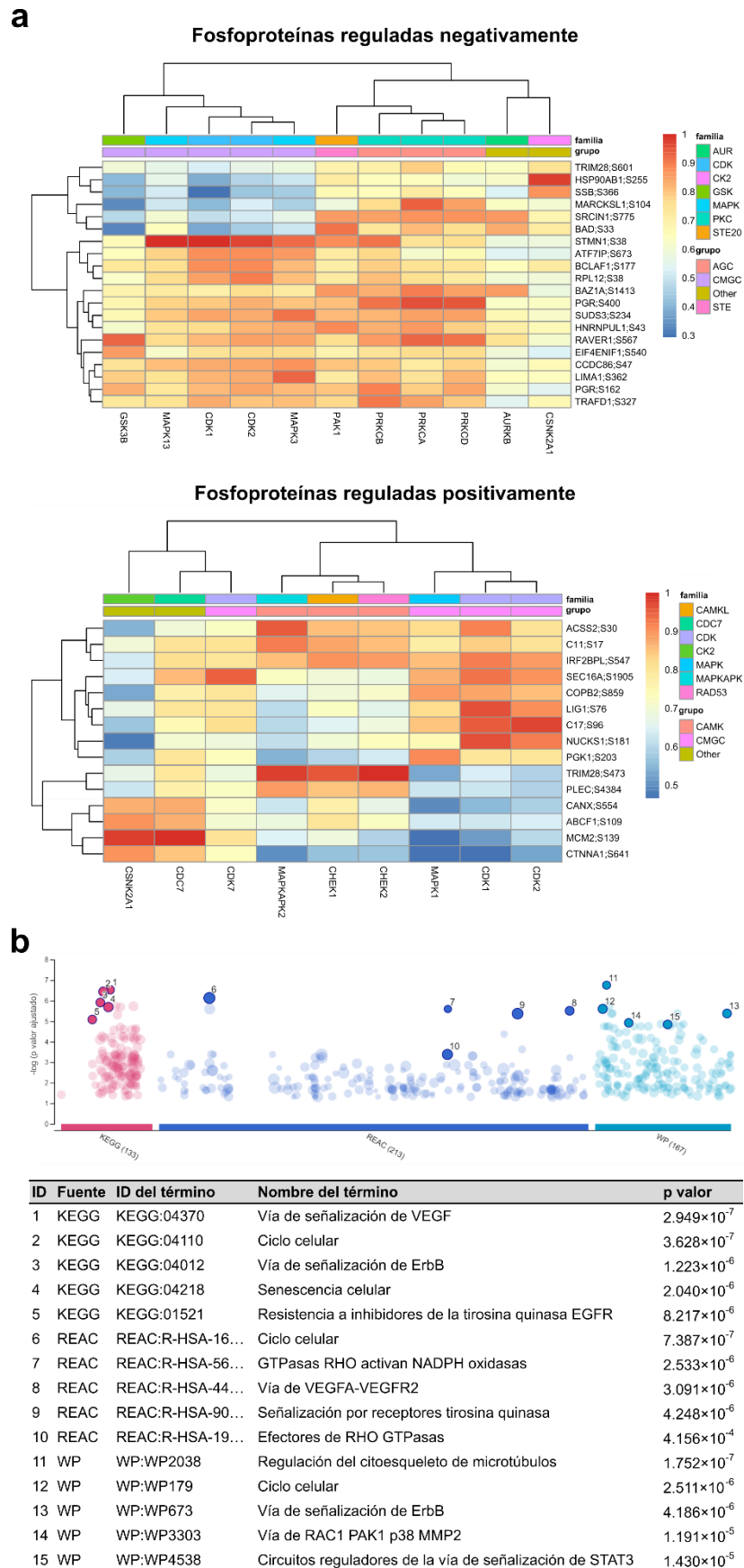


Figura 12. Cambios en el perfil fosfoproteico inducidos por la hipoxia en células de cáncer de mama HER2-positivo, proteínas quinasas asociadas y análisis de

enriquecimiento funcional. **a,** Relaciones quinasa-sustrato potencialmente responsables de los cambios en el perfil fosfoproteico fueron determinadas realizando un análisis funcional con el paquete PhosR (Kim et al, 2021) del programa R. Un puntaje mayor indica un mejor ajuste. **b,** Los resultados en **a** fueron interpretados mediante un análisis de enriquecimiento estadístico utilizando la herramienta g:GOST del servidor g:Profiler (Kolberg et al, 2023) (p valor ajustado por el método de Benjamini-Hochberg). KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Kanehisa et al, 2025); REAC, Reactome (Milacic et al, 2024); WP, WikiPathways (Agrawal et al, 2024).

Segunda parte

Rac1 como potencial blanco terapéutico

La terapia dirigida contra HER2 es el estándar clínico actual para las pacientes con tumores de mama HER2-positivo. En aquellas pacientes cuya enfermedad progresa después de varias líneas de tratamiento con un agente anti-HER2, se recomienda mantener el bloqueo de HER2 con trastuzumab y combinar otros agentes citotóxicos no usados anteriormente.

Antes mostramos que las condiciones de hipoxia asociadas con el incremento de la actividad de HIF-1 α inducen la resistencia al tratamiento con trastuzumab y T-DM1 en células de cáncer de mama humano HER2-positivo. La señalización vía proteínas GTPasas Rho, particularmente Rac1, emergió como proceso diferencial de la condición resistente (**Figura 12b**). Ha sido previamente descrito que la señalización de HER2 resulta en un incremento de la proteína HIF-1 α y de la expresión del ARN mensajero de VEGF en células de cáncer de mama, independientemente de la disponibilidad de oxígeno (Laughner et al, 2001). Específicamente, aquí nosotros detectamos la expresión proteica de HIF-1 α y su localización nuclear en células BT-474 no hipóxicas (**Figuras 1a y 1b**). Por todo esto, nos preguntamos si la inhibición de Rac1 modularía esta expresión basal de HIF-1 α . Para responder esta pregunta utilizamos un inhibidor específico desarrollado en Argentina, la molécula 1A-116 (Cardama et al, 2014). Encontramos que el tratamiento con 1A-116 disminuía significativamente la expresión de la proteína HIF-1 α en células BT-474 (**Figura 13**). Este resultado, junto con la asociación conocida entre la proteína Rac1 y la resistencia a la terapia dirigida con trastuzumab (Dokmanovic et al, 2009; Velázquez-Vega et al, 2024; Zhao et al, 2011),

nos impulsó a evaluar el potencial terapéutico de combinar el bloqueo de HER2 con la inhibición de Rac1.

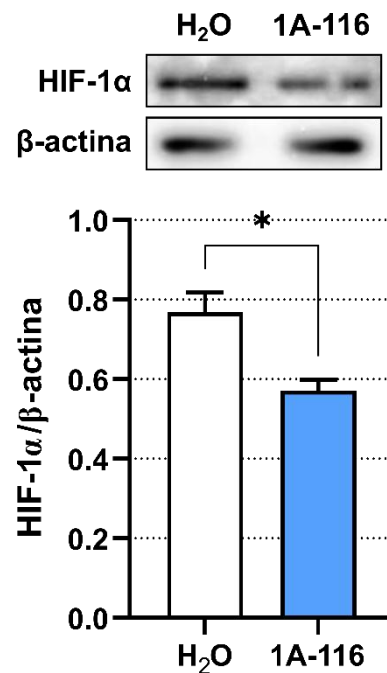


Figura 13. Disminución de la expresión de HIF-1 α en células de cáncer de mama HER2-positivo luego de la inhibición de Rac1 por 1A-116. Células BT-474 fueron tratadas con 25 μ M de 1A-116 por 24 horas. Como control se utilizó agua a pH 5.5. HIF-1 α fue detectada por Western blot (media \pm EEM, n=3; prueba de t, * p<0.05).

En primer lugar, estudiamos el efecto de los tratamientos con trastuzumab y 1A-116 sobre la viabilidad de cultivos celulares en monocapa. Células de adenocarcinoma de mama humano HER2-positivo BT-474 y SK-BR-3 fueron tratadas con 0.01 μ g/mL a 50 μ g/mL de trastuzumab o 2.5 μ M a 100 μ M de 1A-116 por 72 horas. Ambas líneas celulares mostraron sensibilidad a los tratamientos con ambas drogas (**Figuras 14a y 14b**). Seguidamente, evaluamos la combinación de trastuzumab y 1A-116 con el objetivo de identificar una posible interacción. Las células fueron tratadas simultáneamente con trastuzumab y 1A-116 en las concentraciones arriba mencionadas por 72 horas. El análisis de los datos fue realizado utilizando el programa Combenefit 2.021 (Di Veroli et al, 2016). Los resultados sugieren una interacción sinérgica entre las drogas en el rango de concentraciones de 1 μ g/mL a 50 μ g/mL de trastuzumab y de 15 μ M a 25 μ M de 1A-116 (**Figura 14c**). En la **Figura 14d**, destacamos la disminución significativa de

la viabilidad de células BT-474 y SK-BR-3 tratadas con la combinación de 10 µg/mL de trastuzumab y 25 µM de 1A-116 por 72 horas, en comparación con el tratamiento con trastuzumab como agente único.

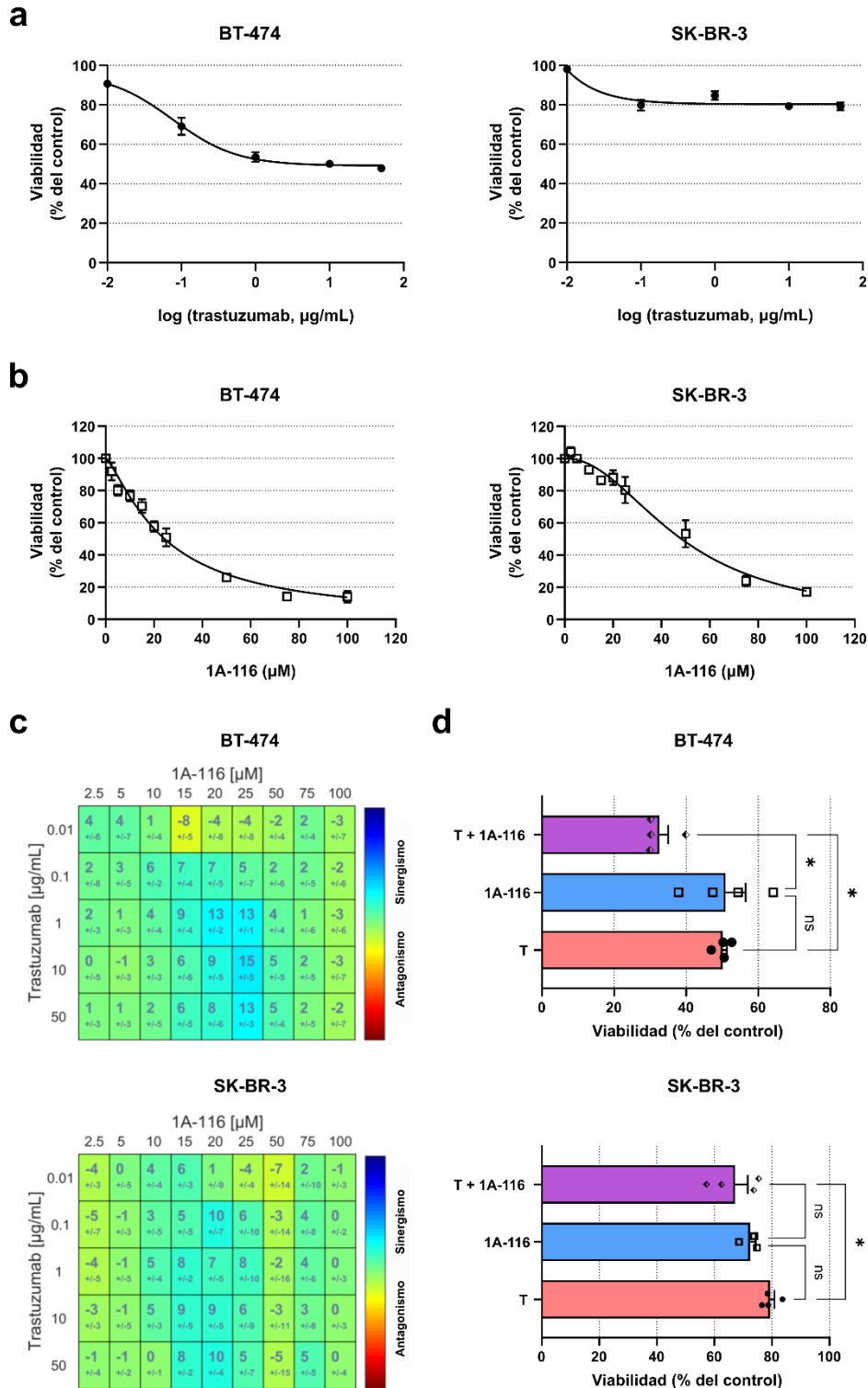


Figura 14. Efecto de la combinación de trastuzumab y 1A-116 sobre la viabilidad de monocapas de células de cáncer de mama HER2-positivo. a-d, Células BT-474 y

SK-BR-3 fueron tratadas con (a) 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de trastuzumab, (b) 2.5 μM a 100 μM de 1A-116, (c) la combinación de ambas drogas, o (d) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de trastuzumab y/o 25 μM de 1A-116 por 72 horas. La viabilidad celular fue evaluada por el ensayo de cristal violeta. **a-b y d**, Los resultados se expresan como porcentaje del tratamiento de control con (a) 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y (d) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IgG para el trastuzumab, o (b y d) agua a pH 5.5 para el 1A-116 (media \pm EEM, n=4; ANOVA de una vía y prueba de Tukey en d, * p<0.05, ns no significativo). **c**, Se muestran los niveles de sinergismo o antagonismo entre las drogas. El análisis de los datos fue realizado con el programa Combenefit 2.021 (Di Veroli et al, 2016) aplicando el modelo Highest Single Agent. T, trastuzumab.

Resultados similares fueron obtenidos utilizando un modelo de cultivo 3D, donde la distribución espacial de las células emula la arquitectura de un tumor pequeño avascular. Esferoides de células BT-474 fueron tratados con trastuzumab, 1A-116 o la combinación de ambas drogas durante 14 días. Evaluamos su cinética de crecimiento estimando su volumen a distintos tiempos. Notablemente, mientras los tratamientos con trastuzumab y 1A-116 inhibieron el crecimiento de los esferoides en comparación con los esferoides de control, la combinación de ambas drogas fue capaz de disminuir su tamaño (**Figura 15a**). La **Figura 15b** ilustra la disminución significativa del volumen de los esferoides finalizado el tratamiento simultáneo con trastuzumab y 1A-116, en comparación con los esferoides tratados con cada droga por separado. Luego de 14 días, el volumen de los esferoides tratados con la combinación de ambas drogas se redujo un 88 % \pm 3 % comparado con su volumen inicial, mientras que aquellos tratados con cada droga por separado prácticamente conservaron su tamaño. Los cortes histológicos evidencian la arquitectura de los esferoides, formada por un anillo de células viables que rodea un centro de apariencia necrótica. La transición abrupta entre las células viables y el área central sugiere un patrón de necrosis coagulativa. En los esferoides de control, la playa de necrosis presenta siluetas citoplasmáticas difusas, núcleos hipercromáticos y pleomórficos, y detritus celulares. En lo que respecta a los esferoides tratados, se diferencian por presentar en su foco de necrosis detritus nucleares más evidentes y un material amorfo eosinófilo de aspecto fibrinoide atribuible a desnaturalización proteica. Estas características podrían denotar un proceso de necrosis más avanzado, especialmente en los esferoides tratados con trastuzumab. Por su parte, la periferia de los esferoides tratados con 1A-116 muestra células con citoplasmas menos acidófilos y detritus

celulares, sugiriendo un proceso de muerte celular también en esta zona. Para nuestra sorpresa, la combinación de las drogas disminuyó el tamaño de los esferoides hasta su completa desagregación.

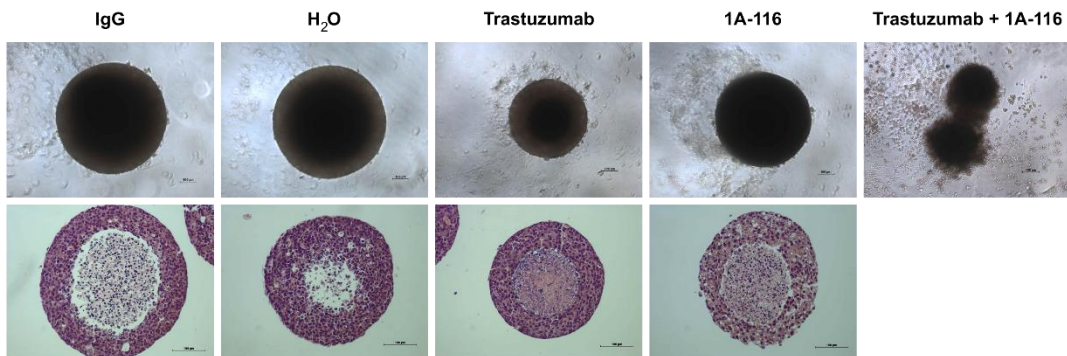
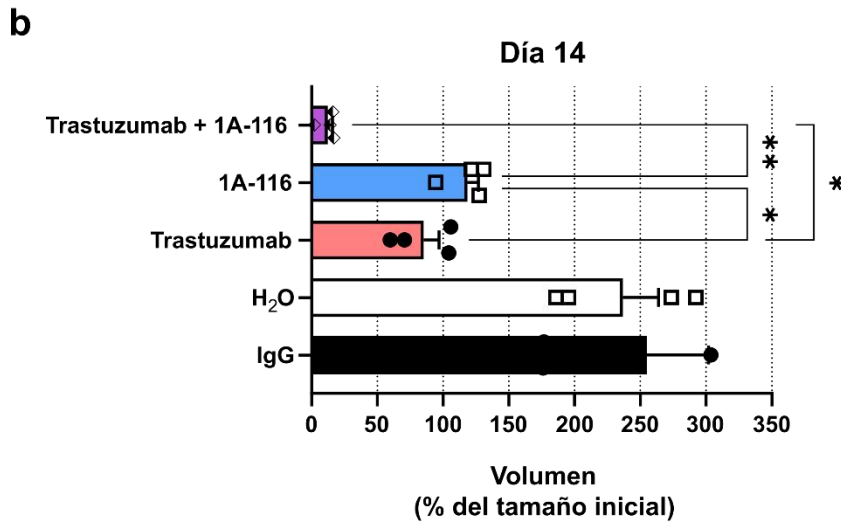
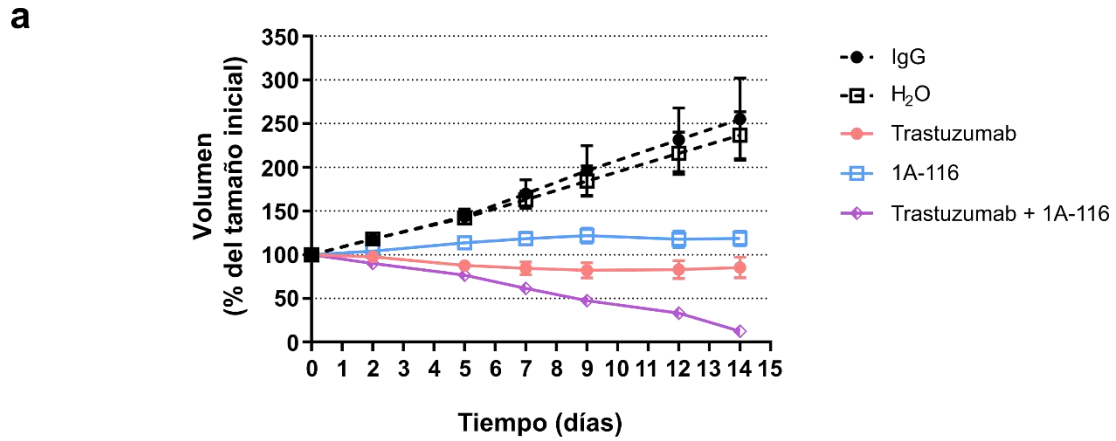


Figura 15. Efecto de la combinación de trastuzumab y 1A-116 sobre el crecimiento de esferoides tumorales mamarios HER2-positivo. a-b, Esferoides de células BT-474 fueron tratados con 50 µg/mL de trastuzumab, 25 µM de 1A-116 o la combinación de ambas drogas por 14 días. Se utilizaron 50 µg/mL de IgG o agua a pH 5.5 como controles del trastuzumab y el 1A-116, respectivamente. El volumen de los esferoides fue estimado a partir de la medición de su diámetro con el programa Image-Pro Plus 6. Los resultados se expresan

como porcentaje del volumen inicial considerado 100 % (media±EEM, n=4; ANOVA de una vía y prueba de Bonferroni en **b**, * p<0.05, ** p<0.01). **b**, Adicionalmente, se muestran micrografías representativas de los esferoides y de sus respectivos cortes histológicos coloreados con hematoxilina y eosina.

Posteriormente, estudiamos la combinación de las drogas en un modelo de resistencia al trastuzumab. La línea celular BT-474-R fue establecida en nuestro laboratorio a partir de células BT-474 expuestas en forma continua a 10 µg/mL de trastuzumab durante 6 meses. Con el fin de valorar la resistencia, las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de trastuzumab y su viabilidad fue evaluada mediante el ensayo de cristal violeta después de 72 horas. Los datos mostraron una caída de la viabilidad celular un 32 % ± 9 % menor en las células BT-474-R en comparación con la línea celular parental (**Figura 16a**). Por su parte, si bien la línea celular resistente al trastuzumab es sensible al inhibidor de Rac1, encontramos que el tratamiento con concentraciones de 1A-116 entre 20 µM y 25 µM producía una disminución de la viabilidad celular menor de 40 % (**Figura 16b**), mientras que en células BT-474 la caída en la viabilidad superaba ese umbral (**Figura 14b**). Notablemente, sin embargo, tal como había sido demostrado en células sensibles al trastuzumab, la combinación de 10 µg/mL de trastuzumab y 25 µM de 1A-116 produjo una disminución de la viabilidad de monocapas de células BT-474-R significativamente mayor que el trastuzumab como agente único (**Figura 16c**).

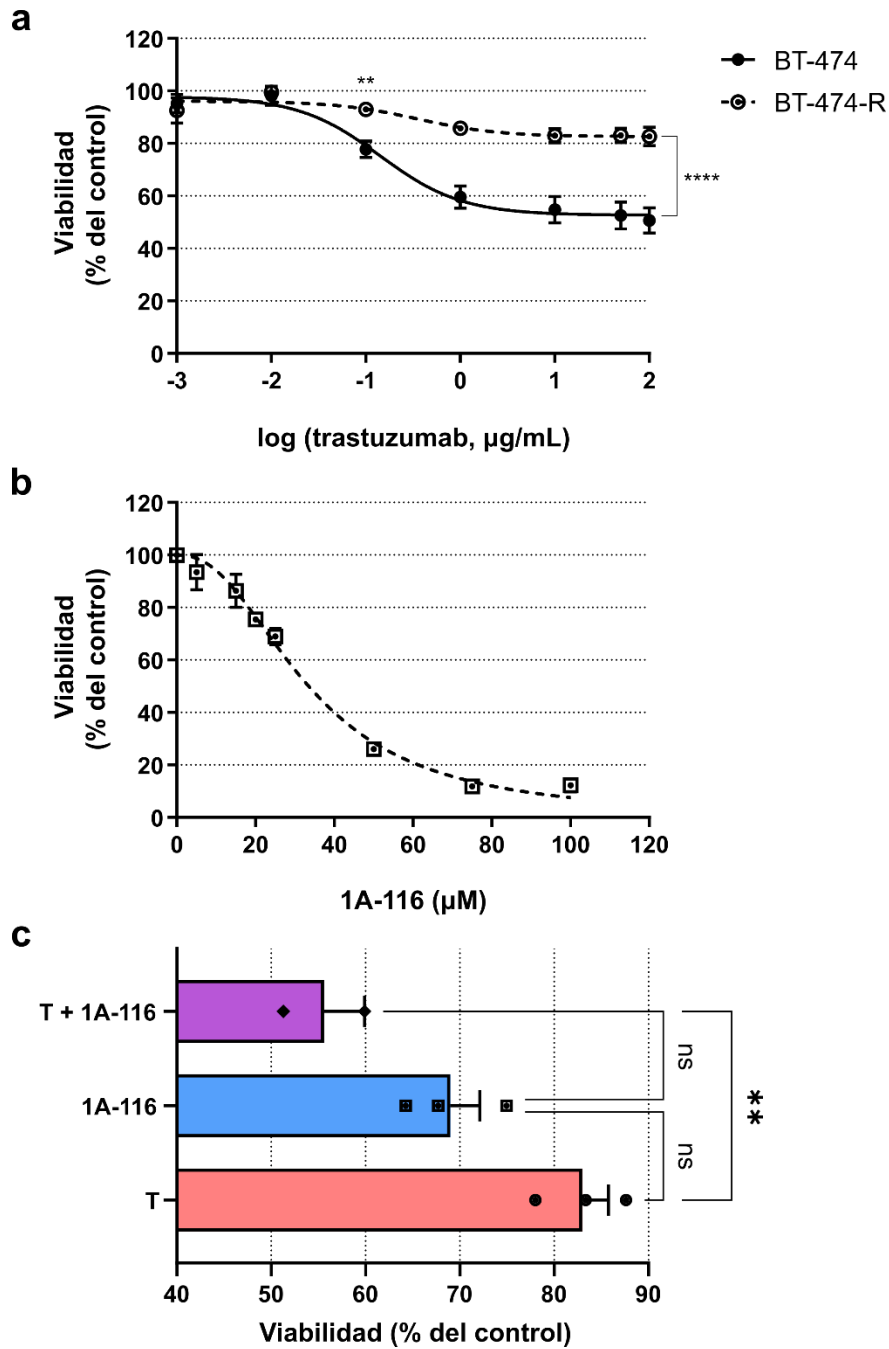


Figura 16. Efecto de la combinación de trastuzumab y 1A-116 sobre la viabilidad de monocapas de células de cáncer de mama HER2-positivo resistentes al trastuzumab. **a**, Células BT-474 y BT-474-R fueron tratadas con 0.001 $\mu\text{g/mL}$ a 100 $\mu\text{g/mL}$ de trastuzumab por 72 horas. **b-c**, Células BT-474-R fueron tratadas con **(b)** 2.5 μM a 100 μM de 1A-116, o **(c)** 10 $\mu\text{g/mL}$ de trastuzumab y/o 25 μM de 1A-116. La viabilidad celular fue evaluada por el ensayo de cristal violeta. Los resultados se expresan como porcentaje del tratamiento de control con **(a)** 100 $\mu\text{g/mL}$ y **(c)** 10 $\mu\text{g/mL}$ de IgG para el trastuzumab, o **(b-c)** agua a pH 5.5 para el 1A-116 (media \pm EEM, n=3; ANOVA de dos vías y prueba de Bonferroni en **d** y ANOVA de una vía y prueba de Tukey en **c**, ** p<0.01, **** p<0.0001, ns no significativo). T, trastuzumab.

Para completar nuestro análisis, evaluamos el efecto de la combinación de las drogas sobre cultivos 3D de células BT-474-R. Los esferoides fueron tratados con trastuzumab, 1A-116 o su combinación durante 9 días. Estimamos el cambio en su volumen a partir de la medición del diámetro a distintos tiempos. De manera notable, encontramos que mientras el trastuzumab y el inhibidor de Rac1 provocaron una disminución del crecimiento de los esferoides en comparación con los esferoides de control, el tratamiento simultáneo con ambas drogas redujo su volumen (**Figura 17a**). En la **Figura 17b** destacamos la disminución significativa del volumen de los esferoides tratados con la combinación de trastuzumab y 1A-116 en comparación con los esferoides tratados con cada droga por separado. Luego de 9 días, el volumen de los esferoides tratados con la combinación de ambas drogas se redujo un $21 \% \pm 8 \%$ comparado con su volumen inicial, mientras que aquellos tratados con cada droga por separado aumentaron su tamaño. Los cortes histológicos presentan características comparables con las de los esferoides de las células BT-474 parentales (**Figura 15b**), un área central de necrosis rodeada por un anillo de células viables. En este caso, no obstante, la apariencia del centro de los esferoides tratados con trastuzumab es similar a la de los esferoides de control, lo que podría ser explicado por la condición de resistencia de las células BT-474-R. Por su parte, nuevamente encontramos un material acidófilo fibrinoide en el centro de los esferoides tratados con 1A-116 y con la combinación de las drogas. Como mencionamos antes, esto podría vincularse con desnaturalización proteica asociada con un proceso avanzado de necrosis. También en este caso, en la periferia de los esferoides tratados con 1A-116 se observan células con citoplasmas más claros y detritus.

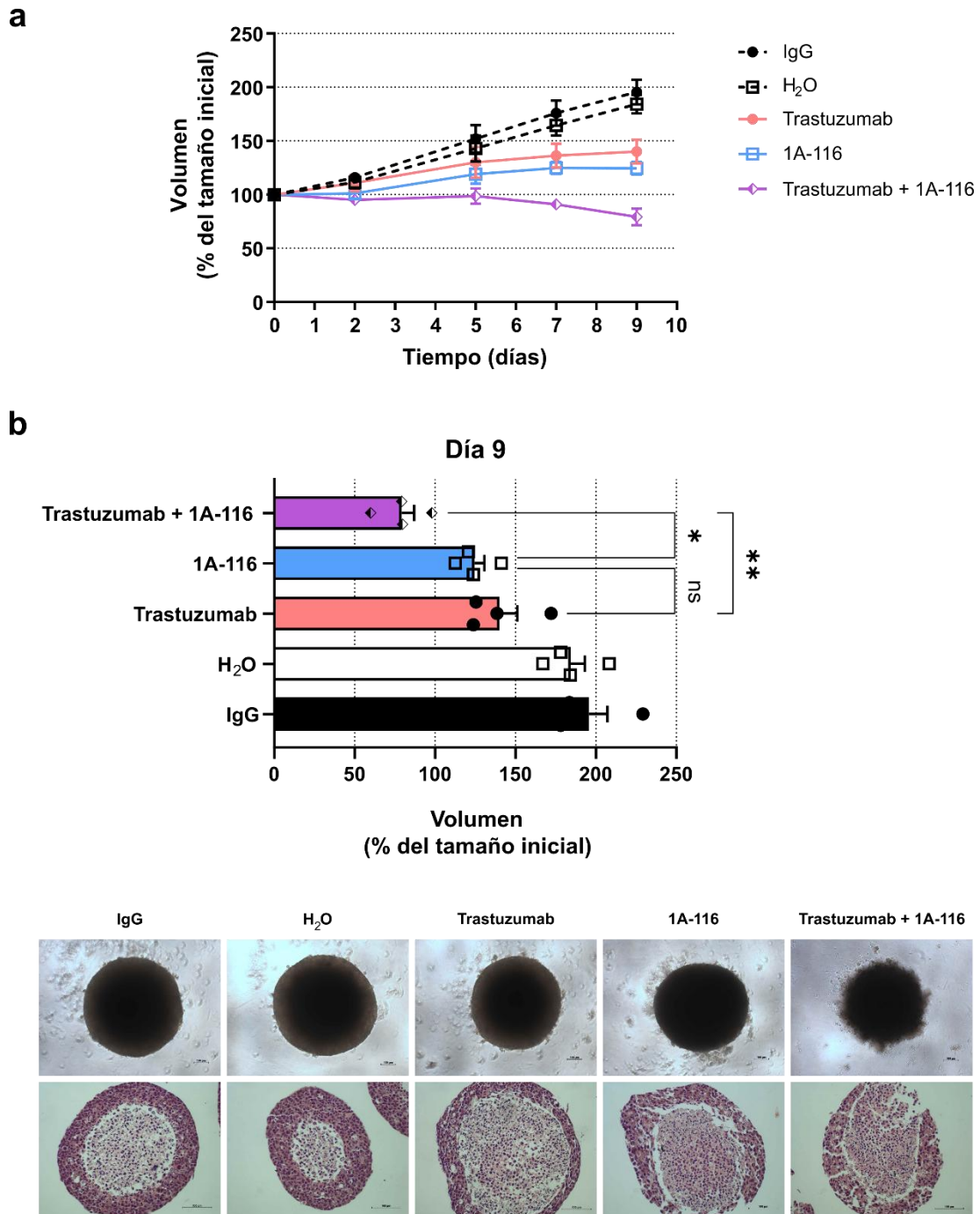


Figura 17. Efecto de la combinación de trastuzumab y 1A-116 sobre el crecimiento de esferoides de células de cáncer de mama HER2-positivo resistentes al trastuzumab. **a-b**, Esferoides de células BT-474-R fueron tratados con 50 µg/mL de trastuzumab, 25 µM de 1A-116 o la combinación de ambas drogas por 9 días. Se utilizaron 50 µg/mL de IgG o agua a pH 5.5 como controles del trastuzumab y el 1A-116, respectivamente. El volumen de los esferoides fue estimado a partir de la medición de su diámetro con el programa Image-Pro Plus 6. Los resultados se expresan como porcentaje del volumen inicial considerado 100 % (media±EEM, n=4; ANOVA de una vía y prueba de Bonferroni en **b**, * p<0.05, ** p<0.01, ns no significativo). **b**, Adicionalmente, se muestran micrografías representativas de los esferoides y de sus respectivos cortes histológicos coloreados con hematoxilina y eosina.

Nuestros resultados sugieren que la inhibición de Rac1 potencia los efectos del bloqueo de HER2 con trastuzumab. Con el objetivo de entender los mecanismos celulares involucrados, realizamos un estudio proteómico cuantitativo seguido de un análisis de enriquecimiento funcional. Extractos proteicos de células BT-474 tratadas con la combinación de trastuzumab y 1A-116 por 24 horas fueron comparados con los de células tratadas únicamente con trastuzumab. Mediante LC-MS/MS, encontramos un total de 1761 proteínas, entre las cuales 57 proteínas poseían abundancias significativamente diferentes entre condiciones. Específicamente, identificamos 44 proteínas disminuidas y 13 proteínas incrementadas en las células tratadas con la combinación de ambas drogas en comparación con aquellas tratadas con trastuzumab como agente único (**Figura 18**). La actividad de estas proteínas contribuye a procesos celulares y vías de señalización que fueron determinados mediante un análisis realizado utilizando la base de datos Gene Ontology (Ashburner et al, 2000; Gene Ontology Consortium, 2023) (**Figura 19**). Las proteínas bajo regulación negativa y positiva fueron analizadas de manera independiente, resultando notable la distinción entre las categorías funcionales emergidas en cada caso. El ciclo celular y, particularmente, la regulación de la transición G₁/S se encontraron asociados con la actividad de las proteínas reguladas negativamente (**Figura 19a**). Paralelamente, el análisis realizado con la lista de las 13 proteínas incrementadas, entre las que predominan miembros de la familia de las queratinas, arrojó procesos asociados con la diferenciación de las células epiteliales y la organización de los filamentos intermedios (**Figura 19b**). Estos últimos resultados podrían ser explicados considerando el rol de Rac1 como regulador de la cicatrización de heridas cutáneas, proceso en el que la proliferación y la migración de las células epidérmicas es esencial (DiPersio, 2007).

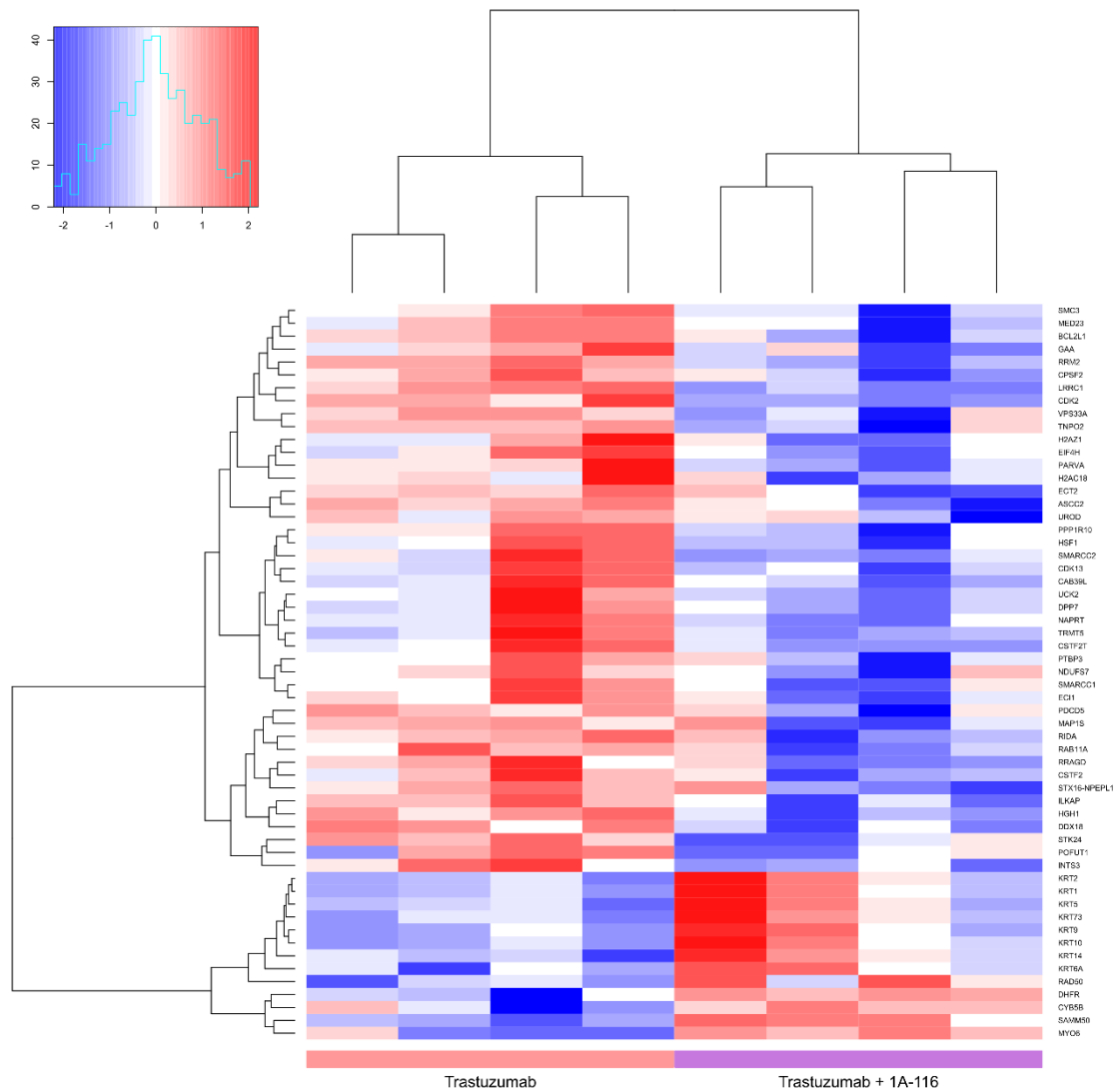


Figura 18. Modulación de la abundancia proteica por efecto de la inhibición de Rac1 en células de cáncer de mama HER2-positivo tratadas con trastuzumab. Células BT-474 fueron tratadas con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de trastuzumab solo o en combinación con 25 μM de 1A-116 por 24 horas, y sus extractos proteicos fueron analizados por LC-MS/MS. Se muestran las proteínas reguladas negativamente (azul) o positivamente (rojo) entre condiciones ($n=4$; p valor <0.05 , veces de cambio ≥ 2 o ≤ -2). Los datos fueron analizados con el paquete DEqMS (Zhu et al, 2020) del programa R y el agrupamiento jerárquico fue realizado utilizando la medida de distancia euclidiana y el método de Ward.

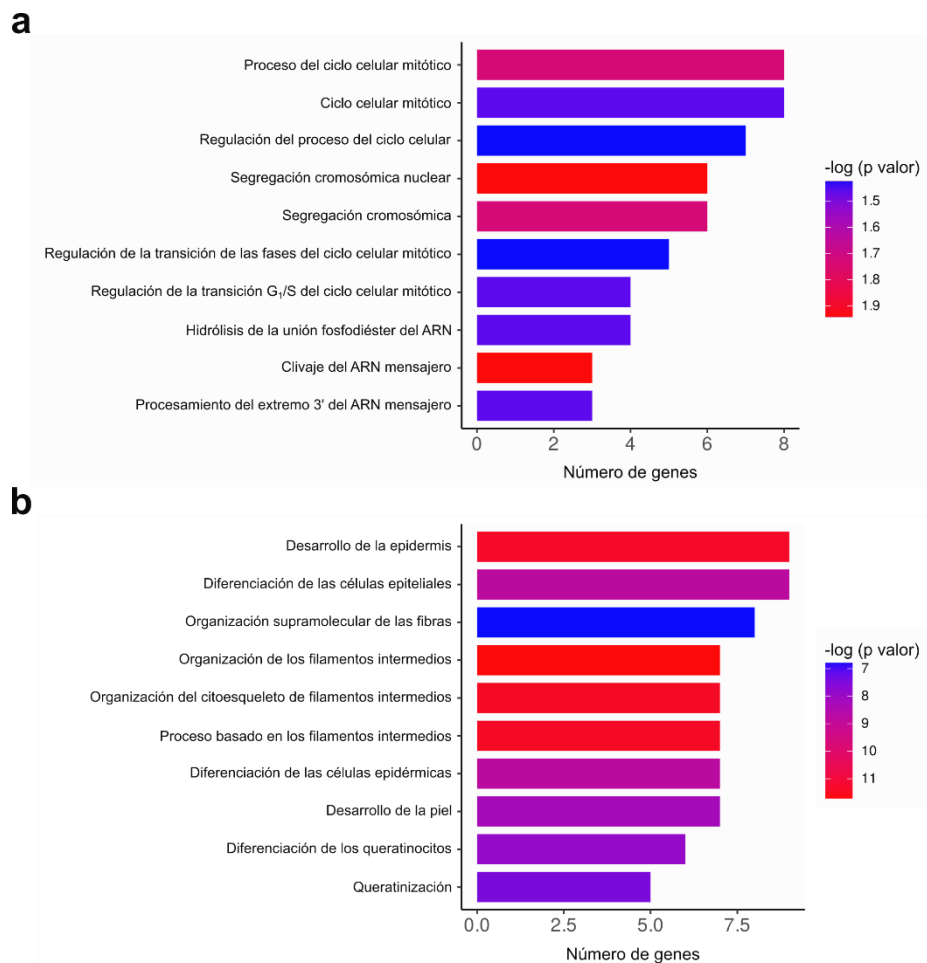


Figura 19. Análisis de enriquecimiento funcional de las proteínas moduladas por efecto de la inhibición de Rac1 en células de cáncer de mama HER2-positivo tratadas con trastuzumab. Un análisis de enriquecimiento estadístico fue realizado sobre las proteínas reguladas (a) negativamente y (b) positivamente, utilizando la aplicación ShinyGO (Ge et al, 2020). Las categorías funcionales pertenecen a la base de datos Gene Ontology (Ashburner et al, 2000; Gene Ontology Consortium, 2023) (p valor ajustado por el método de Benjamini-Hochberg).

Entre sus mecanismos de acción, es bien conocido que el trastuzumab provoca el arresto de las células en la fase G₁ del ciclo celular (Lane et al, 2000). Asimismo, se encuentra descrito que la actividad de Rac1 es necesaria para la progresión del ciclo celular a través de esta fase (Olson et al, 1995) y se ha demostrado que induce la expresión de ciclina D1 (Westwick et al, 1997). Más aún, aquí determinamos un grupo de proteínas disminuidas por efecto de la inhibición de Rac1, que contribuirían a la transición G₁/S (**Figuras 18 y 19a**). Esto nos condujo a estudiar el ciclo celular y la expresión de ciclina D1 en nuestro modelo. Células BT-474 fueron tratadas con trastuzumab, 1A-116 o su combinación durante

24 horas, y su distribución en las fases del ciclo celular finalizado el tratamiento fue determinada por citometría de flujo. En efecto, tanto el tratamiento con trastuzumab como la inhibición de Rac1 provocaron un arresto significativo de las células en la fase G₀/G₁. Además, observamos una tendencia a un mayor arresto en este sentido al combinar ambas drogas (**Figura 20a**). En línea con este hallazgo, células BT-474 tratadas con trastuzumab y 1A-116 presentaron una reducción significativa de la expresión proteica de ciclina D1 en comparación con células tratadas con trastuzumab solo (**Figura 20b**). Estos resultados sugieren que la inhibición de Rac1 con 1A-116 contribuye al arresto del ciclo celular inducido por el trastuzumab en la fase G₀/G₁ mediante la disminución de la expresión de ciclina D1.

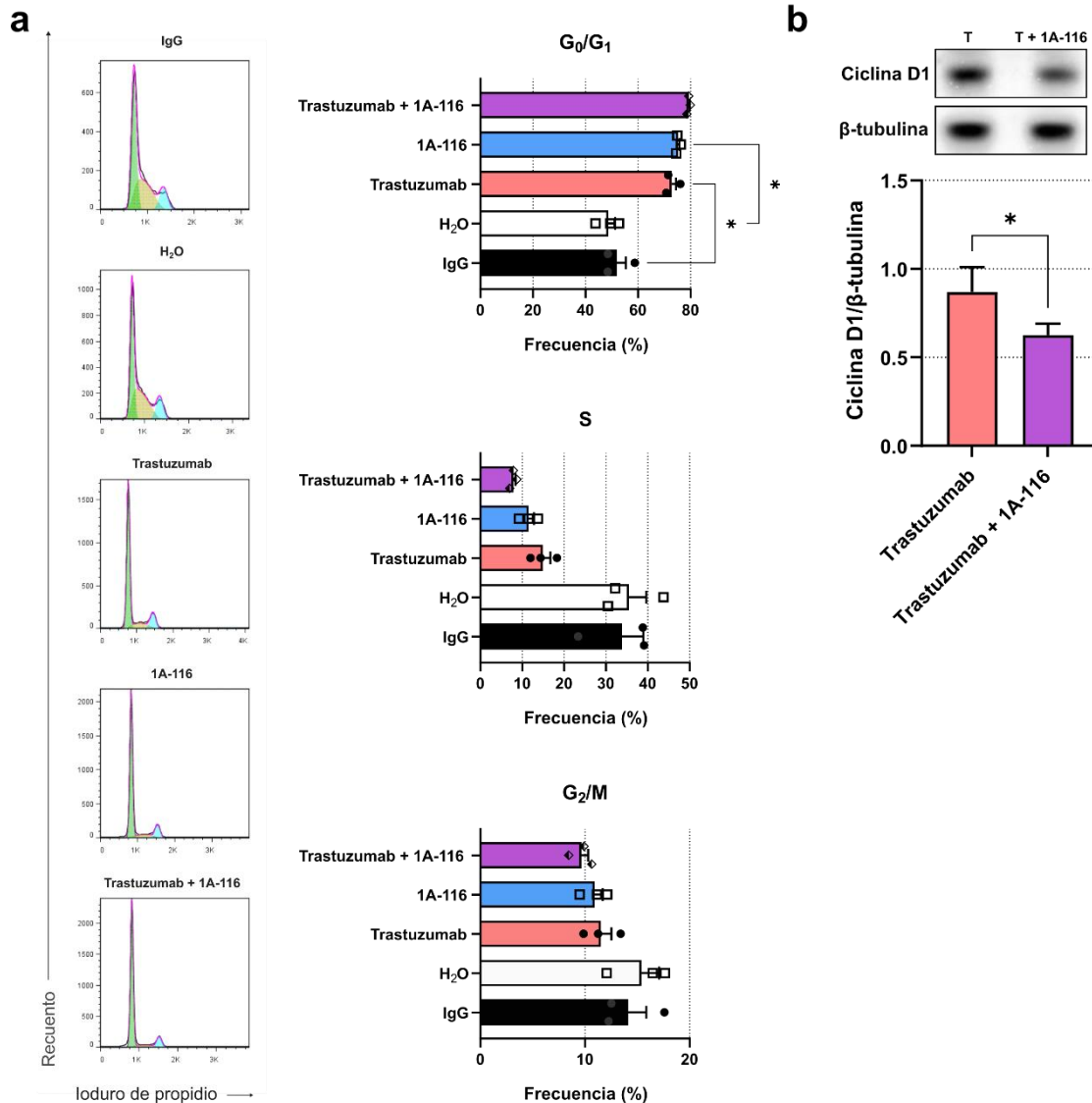


Figura 20. Arresto del ciclo celular y disminución de la expresión de ciclina D1 por efecto de la inhibición de Rac1 en células de cáncer de mama HER2-positivo tratadas con trastuzumab. a-b, Células BT-474 fueron tratadas con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de trastuzumab, 25 μM de 1A-116 o la combinación de ambas drogas por 24 horas. **a,** El análisis del ciclo celular fue realizado mediante marcación con yoduro de propidio seguida de citometría de flujo. Se utilizaron 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IgG o agua a pH 5.5 como controles del trastuzumab y el 1A-116, respectivamente. Los resultados se expresan como porcentaje del total de células (media \pm EEM, n=3; ANOVA de una vía y prueba de Bonferroni, * $p<0.05$). **b,** Ciclina D1 fue detectada por Western blot (media \pm EEM, n=3; prueba de t, * $p<0.05$).

DISCUSIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente entre las mujeres y la enfermedad metastásica permanece hoy como la principal causa de muerte. Aunque los avances en el tratamiento de las pacientes con cáncer de mama HER2-positivo han sido significativos desde la introducción del trastuzumab hace más de 20 años, la resistencia a la terapia es aún un desafío en la práctica clínica (Lester, 2021). Por lo tanto, el estudio de los mecanismos de resistencia continúa siendo necesario para optimizar las estrategias terapéuticas.

La expresión proteica de la subunidad HIF-1 α del factor de transcripción inducible por hipoxia 1 se encuentra frecuentemente incrementada en el cáncer de mama y otros tipos de tumores sólidos (Zhong et al, 1999), y ha sido propuesta como potencial biomarcador de resistencia al trastuzumab (Koukourakis et al, 2014). Las opciones terapéuticas disponibles son usualmente más efectivas contra las células proliferantes de la periferia del tumor, mientras que es mayor la probabilidad de que las células hipóxicas más internas sobrevivan a la terapia, invadan y metastaticen (Wicks y Semenza, 2022). En este trabajo, nosotros demostramos que las condiciones de hipoxia inducen la resistencia de células de cáncer de mama HER2-positivo al tratamiento dirigido independientemente de la expresión de HER2, apoyando la evidencia preexistente tanto para el trastuzumab (Aghazadeh y Yazdanparast, 2017; Kotb et al, 2022; Koukourakis et al, 2014) como para el T-DM1 (Indira Chandran et al, 2020; Rediti et al, 2025).

La caracterización proteómica funcional de nuestro modelo de hipoxia tumoral mostró una clara reprogramación metabólica de las células hacia un fenotipo anaeróbico. Identificamos la vía de la glicólisis/gluconeogénesis, la vía de

las pentosas fosfato y la vía de señalización de HIF-1, así como la deficiencia de oxígeno como causa probable del fenotipo observado. Es de destacar la elevada abundancia relativa de la proteína NDRG1 bajo condiciones de hipoxia como resultado del análisis proteómico. A pesar de su rol controversial en la metástasis, esta proteína ha sido previamente asociada con la migración celular (Li et al, 2016), y con la promoción tumoral y el desarrollo de metástasis cerebrales en el cáncer de mama (Villodre et al, 2022). Además, NDRG1 resultó ser un inductor clave de la invasión de células tumorales de mama mediante la modulación de genes relacionados con la reorganización de la matriz extracelular (Saponaro et al, 2024).

Mediante el análisis funcional del fosfoproteoma pudimos respaldar la asociación entre el fenotipo hipóxico y la condición de resistencia. Las vías de señalización de VEGF y de HER, junto con la resistencia a inhibidores de la tirosina quinasa HER1, se encontraron asociadas con el modelo de hipoxia. Entre los mecanismos celulares de resistencia al tratamiento más estudiados se encuentra la regulación positiva de vías alternativas de escape. En este trabajo, emergieron del análisis los circuitos reguladores de la vía de señalización del factor de transcripción STAT3. A este respecto, ha sido previamente descrito que la activación del eje STAT3/HIF-1 α /HES-1 induce la resistencia al trastuzumab en células de cáncer de mama HER2-positivo (Aghazadeh y Yazdanparast, 2017). Asimismo, fueron identificados los efectores de las proteínas GTPasas Rho, particularmente la proteína G pequeña Rac1 asociada con MAPK p38 y con MMP2. La GTPasa Rac1 modula la reorganización del citoesqueleto de actina, determinante de la adhesión y la motilidad de las células (Etienne-Manneville y Hall, 2002). Esta proteína puede ser activada bajo diversas formas de estrés celular, incluida la hipoxia. El aumento de la actividad de Rac1 bajo condiciones de hipoxia depende de la producción de especies reactivas de oxígeno (Turcotte et al, 2003), y de la actividad de PI3K y de MAPK (Du et al, 2011). A su vez, la activación de la proteína MAPK p38 en respuesta a la hipoxia es regulada por Rac1 (Hirota y Semenza, 2001). En efecto, como respuesta integrada al daño celular provocado por agentes genotóxicos, la GTPasa pequeña Rac1 induce la rápida activación de diferentes proteínas quinasas activadas por estrés como JNK y MAPK p38. Estas enzimas cumplen un rol central en la reparación del daño al ADN y la supervivencia

celular (Fritz y Henninger, 2015). Notablemente, un estudio del suero de pacientes con cáncer de mama en estadio metastásico mostró una correlación entre mayores niveles séricos de Rac1 y de MAPK p38 α , y la sobreexpresión de HER2 en el tejido tumoral (Singh et al, 2022).

La actividad de Rac1 es necesaria para la inducción de la expresión proteica y la actividad transcripcional de HIF-1 α (Hirota y Semenza, 2001). Esto ha sido confirmado por nuestros resultados con la línea celular BT-474. Concretamente, la acumulación de la proteína HIF-1 α en el tejido tumoral puede ocurrir por mecanismos independientes de la disponibilidad de oxígeno. En particular, existen evidencias de que la señalización vía el receptor HER2 conduce a un incremento de la expresión proteica de HIF-1 α (Laughner et al, 2001). En este trabajo, nosotros detectamos la expresión de HIF-1 α y su localización nuclear en células BT-474 no hipóxicas. Luego, esta expresión basal de HIF-1 α disminuyó como resultado de la inhibición de Rac1 con el inhibidor específico 1A-116.

De lo dicho hasta aquí, una terapia efectiva contra tumores de mama HER2-positivo con expresión de HIF-1 α podría requerir un abordaje complementario con nuevos tratamientos diseñados contra las células tumorales hipóxicas. La inhibición de la GTPasa Rac1 aparece como una alternativa más conveniente que el propio bloqueo de HIF-1 α con el fin de modular el potencial metastásico del tumor hipóxico. Algunos estudios recientes vinculan la hipoxia tumoral y la actividad de la GTPasa Rac1. Específicamente, la activación de Rac1 en un modelo de carcinoma hepatocelular bajo condiciones de hipoxia indujo un aumento de la expresión proteica de HIF-1 α , llevando a una mayor expresión de vimentina fosforilada en Ser56 y Ser72, y un consecuente incremento de la secreción de cadherina-5, que indujo el desarrollo de mimetismo vascular (Zhang et al, 2020). Asimismo, se ha reportado que el eje de señalización Rac1 / MAPK / proteína activadora 1 (AP1) / HIF-1 α promueve la angiogénesis en el cáncer de mama triple negativo (Ren et al, 2024). En células tumorales pancreáticas, las condiciones de hipoxia indujeron resistencia a la gemcitabina a través de la activación del eje Rac1/HIF-1 α (Zhu et al, 2023). Finalmente, en un modelo de cáncer de mama triple negativo, la sobreexpresión del factor de transcripción

SOX-2 inducida por la hipoxia provocó un incremento de la migración celular mediante la activación de la GTPasa Rac1 (Wang et al, 2019).

Existe evidencia de que la expresión de Rac1 en tumores de pacientes con adenocarcinoma mamario HER2-positivo está asociada con un mal pronóstico (Kato et al, 2024). En este trabajo, estudiamos el bloqueo simultáneo de HER2 y Rac1 utilizando modelos celulares de cáncer de mama humano sensible y resistente al trastuzumab. La inhibición de Rac1 con la molécula 1A-116 aumentó significativamente la eficacia del trastuzumab tanto en la condición sensible como en la resistente. Los resultados obtenidos al evaluar la combinación de las drogas en el modelo de esferoides tumorales son de particular interés. Este modelo emula la distribución 3D de las células de un pequeño tumor avascular, con una población celular proliferante en la periferia y células necróticas localizadas hacia el centro. Además, previamente nuestro grupo de trabajo describió una expresión mayoritaria de HIF-1 α en las células que rodean el centro necrótico de los esferoides (Rodríguez et al, 2015). Mientras que los tratamientos con trastuzumab y 1A-116 previnieron el crecimiento de los esferoides sensibles al trastuzumab, la combinación de las drogas condujo a su completa desagregación. Más aún, el bloqueo simultáneo de HER2 y Rac1 indujo una disminución significativa del tamaño de los esferoides resistentes. Por el contrario, aquellos esferoides resistentes tratados separadamente con trastuzumab o 1A-116 mostraron solo una disminución de su crecimiento. Así, nuestros resultados proveen evidencia clara de la asociación entre la expresión de Rac1 y la resistencia a la terapia dirigida con trastuzumab, previamente sugerida por otros autores (Dokmanovic et al, 2009; Velázquez-Vega et al, 2024; Zhao et al, 2011). Además, nuestros hallazgos hasta aquí sugieren que la inhibición de Rac1 con 1A-116 contribuiría al arresto del ciclo celular inducido por el trastuzumab en la fase G_0/G_1 , inhibiendo la transición G_1/S mediante la disminución de la expresión de ciclina D1. Al respecto, ha sido previamente demostrado que la expresión de ciclina D1 contribuye a la supervivencia celular posterior al bloqueo de HER2 (Goel et al, 2016).

En los últimos años, el desarrollo de nuevas drogas para el tratamiento del cáncer ha evolucionado notablemente. En particular, la estrategia ha virado desde la evaluación empírica de compuestos citotóxicos hacia el diseño racional de

drogas dirigidas contra blancos moleculares específicos, relevantes en la progresión tumoral y la metástasis. El efecto antitumoral del inhibidor de Rac1 1A-116, desarrollado en Argentina, ha sido previamente reportado en distintos tipos de cáncer. Particularmente, la evaluación preclínica de la eficacia y la toxicidad de la molécula 1A-116 en modelos de glioblastoma humano demostró un fuerte potencial traslacional (Cardama et al, 2022). El inhibidor 1A-116 modula los niveles de Rac1-GTP interfiriendo en la interacción entre Rac1 y diferentes GEF, entre ellos P-Rex1 (Cardama et al, 2014).

La GTPasa Rac1 es una proteína mediadora clave de la señalización a través de la familia de receptores HER (Yang et al, 2006). Específicamente, la señalización de HER2 a través de Rac1 se ha asociado con una mayor capacidad migratoria e invasiva de las células tanto *in vitro* como *in vivo* (Johnson et al, 2010; Morrison Joly et al, 2017; Srijakotre et al, 2020; Wang et al, 2006). Han sido descritos distintos mecanismos moleculares que conducirían a la activación de Rac1 en el cáncer de mama HER2-positivo. Uno de ellos propone una asociación funcional entre HER2 y el receptor acoplado a proteína G CXCR4, que indujo la activación de P-Rex1 en células tumorales de mama (Sosa et al, 2010). Por su parte, se ha descrito también la inducción de CXCR4 bajo condiciones de hipoxia, asociada con la angiogénesis tumoral y una migración trasendotelial activa, fase temprana de la metástasis (Jin et al, 2012). Más aún, en modelos murinos, el aumento de la expresión del GEF P-Rex1 indujo un incremento de la capacidad metastásica de tumores mamarios con sobreexpresión del oncogén Neu, homólogo de HER2 (Srijakotre et al, 2020). Dado su potencial metastásico, la inhibición del eje P-Rex1/Rac1 parece una estrategia terapéutica atractiva.

En este trabajo, demostramos que las condiciones de hipoxia inducen la resistencia de células de cáncer de mama HER2-positivo al tratamiento dirigido con los anticuerpos monoclonales terapéuticos trastuzumab y T-DM1. Nuestros resultados sugieren una asociación entre el fenotipo hipóxico y la actividad de la GTPasa Rac1, cuya inhibición disminuye la expresión de la subunidad HIF-1 α en nuestro modelo. La inhibición de la GTPasa Rac1 con la molécula 1A-116, que bloquea su sitio de unión con el GEF P-Rex1, aumentó significativamente la eficacia del trastuzumab en modelos de cáncer de mama sensible y resistente al

tratamiento dirigido. Así, la inhibición de Rac1 surge como una alternativa prometedora para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama HER2-positivo, particularmente en casos de resistencia a la terapia.

CONCLUSIONES

Las terapias oncológicas requieren frecuentemente estrategias que combinen múltiples drogas, dado que el bloqueo simultáneo de más de un blanco biológico generalmente alcanza una eficacia mayor. El diseño racional de drogas dirigidas contra blancos moleculares con una distribución tisular limitada contribuye a la reducción de los efectos adversos del tratamiento en comparación con los compuestos quimioterápicos tradicionales.

En conjunto, nuestros datos sugieren por primera vez la combinación de trastuzumab con el inhibidor específico de la GTPasa Rac1 1A-116 como oportunidad terapéutica para pacientes con cáncer de mama HER2-positivo. El estudio de la vía de Rac1 en el contexto del microambiente tumoral hipóxico y el proceso metastásico parece un siguiente paso razonable. Asimismo, ensayos preclínicos utilizando xenoinjertos derivados de pacientes con cáncer de mama HER2-positivo nos permitirían evaluar la toxicidad y la eficacia de la combinación de trastuzumab y 1A-116 *in vivo*, así como determinar posibles ventanas y esquemas de tratamiento, con el fin de definir qué grupo de pacientes podrían beneficiarse con este abordaje terapéutico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Drogas y cultivos celulares

Con el objeto de inducir la respuesta celular a la hipoxia, las células fueron tratadas con cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; Cicarelli, Argentina). La droga sólida fue disuelta en agua destilada a una concentración final de 25 mM. La solución fue posteriormente filtrada y conservada a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Se utilizaron los anticuerpos monoclonales humanizados trastuzumab (Herceptin IV, F. Hoffmann-La Roche, Suiza) y trastuzumab emtansina (Kadcyla, F. Hoffmann-La Roche, Suiza), reconstituidos según las indicaciones del fabricante, e IgG humana inespecífica (Hemoderivados, UNC, Argentina) como control. Los anticuerpos fueron conservados a $4\text{ }^\circ\text{C}$ por hasta tres meses. El inhibidor 1A-116 (**Figura 21**) fue sintetizado como describieron Lorenzano Menna y colaboradores (Cardama et al, 2014). La droga sólida fue disuelta en agua (pH 5.5) a una concentración final de 4.5 mM y conservada a $4\text{ }^\circ\text{C}$ por hasta un mes. Como tratamiento de control para el 1A-116 se utilizó agua a pH 5.5. Todos los tratamientos fueron preparados utilizando el medio de cultivo de las células.

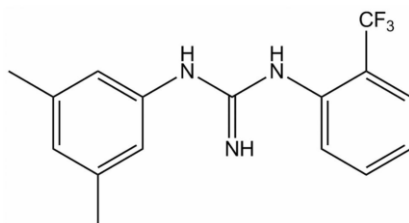


Figura 21. Estructura química del inhibidor 1A-116 ($\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_3$).

Las líneas celulares de adenocarcinoma mamario humano BT-474 y SK-BR-3 (ATCC, Estados Unidos de América) fueron cultivadas en medio

DMEM/F-12 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos de América) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Natocor, Argentina) y 40 µg/mL de gentamicina, en incubadora de CO₂ al 5 % y a 37 °C. La línea celular BT-474-R fue obtenida en nuestro laboratorio mediante el tratamiento de células BT-474 con 10 µg/mL de trastuzumab en el medio de cultivo en forma continua durante 6 meses. Posteriormente, fue mantenida en presencia de la droga bajo las condiciones de cultivo antes descritas. Los pasajes celulares seriados fueron realizados mediante el tratamiento de las monocapas de células con una solución de 0.25 % de tripsina y 0.02 % de EDTA (Sigma-Aldrich, Merck, Alemania). Las células BT-474 y SK-BR-3 fueron sembradas en densidades de mantenimiento de 3×10^4 células/cm² y 1.5×10^4 células/cm², respectivamente. Para la realización de experimentos con cultivos celulares en monocapa, las correspondientes densidades de siembra fueron de 2×10^4 células/cm² y 1.5×10^4 células/cm². Antes del agregado de los tratamientos, las células fueron incubadas durante 48 h o 24 h, respectivamente. Las condiciones de siembra para la línea celular BT-474-R fueron idénticas a las de la línea celular parental. Todos los experimentos fueron realizados con células libres de micoplasma.

Cultivo y evaluación del crecimiento de los esferoides tumorales

Para el cultivo de los esferoides tumorales, adaptamos el método de la gota pendiente (Del Duca et al, 2004). Brevemente, sembramos 1×10^4 células en gotas de 20 µL de medio de cultivo completo sobre el interior de las tapas de placas de cultivo celular de 100 mm. Luego, las tapas fueron invertidas sobre sus respectivas placas, que contenían 5 mL de medio de cultivo para la generación de una atmósfera húmeda. A continuación, las células fueron incubadas por 72 h hasta la completa formación de los esferoides, que fueron transferidos individualmente a placas de 96 pozos cubiertos con 1.5 % de agarosa y 200 µL de medio de cultivo completo. Los tratamientos fueron iniciados luego de 48 h y renovados cada dos días hasta la finalización del experimento, retirando cuidadosamente 100 µL de medio de cultivo y reemplazándolo con el mismo volumen de medio fresco.

El crecimiento de los esferoides fue evaluado mediante micrografías. Su volumen fue estimado a partir de la medición del diámetro con el programa Image-Pro Plus 6, utilizando la fórmula del volumen de la esfera. Para el estudio histológico de los esferoides, los mismos fueron colectados y fijados con 4 % de formaldehído por 30 min. Luego, fueron deshidratados con un gradiente de alcohol, incubados con xileno, embebidos en parafina y cortados. A continuación, los cortes fueron desparafinados con xileno, rehidratados con un gradiente de alcohol, y finalmente coloreados con hematoxilina y eosina.

Western blot

Los extractos proteicos fueron preparados mediante la homogeneización de monocapas de células con la solución tampón RIPA (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % SDS, 1 % NP-40, 0.5 % desoxicolato de sodio y 1 mM EDTA) suplementada con cócteles de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma-Aldrich, Merck, Alemania). La cuantificación de las proteínas fue realizada empleando el método de Bradford (Supelco, Merck, Alemania). Utilizamos anticuerpos primarios anti-HIF-1 α (ab216842; Abcam, Gran Bretaña), anti- β -actina (8H10D10) (#3700; Cell Signaling Technology, Estados Unidos de América), anti-NDRG1 (B-5) (sc-398291; Santa Cruz Biotechnology, Estados Unidos de América), anti- β -tubulina (#2146; Cell Signaling Technology, Estados Unidos de América), anti-HER2 (29D8) (#2165; Cell Signaling Technology, Estados Unidos de América) y anti-ciclina D1 (CD1.1) (ab6152; Abcam, Gran Bretaña). Las bandas inmunorreactivas fueron detectadas mediante electroquimioluminiscencia (1 M Tris Base pH 8, 30 % H₂O₂, 0.2 M luminol, 46 mM ácido p-cumárico) y cuantificadas con el programa ImageJ 1.46r (Schneider et al, 2012).

Inmunofluorescencia

Las células fueron sembradas y tratadas adecuadamente sobre cubreobjetos. Luego, fueron fijadas con 4 % de formaldehído por 10 min y permeabilizadas con 0.3 % de Tritón X-100 a 4 °C durante 10 min. La marcación

inespecífica fue bloqueada con una solución de 3 % de BSA y 0.1 % de Tween-20 durante 1 h. Utilizamos anticuerpo primario anti-HIF-1 α (ab216842; Abcam, Gran Bretaña), incubado a 4 °C por una noche, y anticuerpo secundario anti-IgG H&L de conejo conjugado a Alexa Fluor 488 (ab150077; Abcam, Gran Bretaña), incubado en oscuridad por 1 h. Se realizó una incubación con DAPI para la detección nuclear. Las micrografías fueron obtenidas utilizando el microscopio invertido de epifluorescencia Eclipse TE2000 (Nikon Instruments, Japón).

RT-qPCR

Los extractos de ARN fueron preparados a partir de monocapas celulares utilizando TRI Reagent RT (Molecular Research Center, Estados Unidos de América). Para la reacción de retrotranscripción se utilizó la transcriptasa reversa RevertAid (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos de América) siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, la PCR cuantitativa fue realizada empleando el sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos de América). Empleamos el cóctel TransStart Green qPCR SuperMix UDG (TransGen Biotech, China) siguiendo el protocolo del fabricante, y cebadores específicos para *VEGF* (Medford et al, 2009) y *GAPDH* (5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3', directo; 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3', inverso), que utilizamos como gen de referencia.

Ensayos de viabilidad celular

Con el objeto de evaluar la viabilidad celular, realizamos el ensayo de cristal violeta. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos y tratadas adecuadamente. Luego del tratamiento, fueron fijadas con una solución 3:1 de metanol y ácido acético durante 10 min. Posteriormente, fueron coloreadas con solución de cristal violeta (0.5 % cristal violeta y 2 % etanol) por 5 min. La solución fue retirada y el excedente fue removido con agua corriente. Una vez las placas estuvieron secas, el colorante fue eluido con una solución 3:1 de etanol y ácido acético. La absorbancia de la solución coloreada fue medida a 550 nm.

Alternativamente, la viabilidad celular fue evaluada por el método de exclusión de azul de tripán.

Ensayos de citometría de flujo

Brevemente, para estudiar la muerte celular por apoptosis, las células adheridas fueron cosechadas con una solución de 0.25 % de tripsina y 0.02 % de EDTA (Sigma-Aldrich, Merck, Alemania) y colectadas junto con aquellas presentes en el sobrenadante del cultivo celular. Posteriormente, fueron marcadas con anexina V-FITC y ioduro de propidio, utilizando el kit comercial FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II (BD Pharmingen, BD Biosciences, Estados Unidos de América). Con el fin de detectar la expresión de HER2 en membrana, las células fueron cosechadas y luego incubadas en suspensión en medio de cultivo completo a 37 °C durante una 1 h para permitir la recuperación celular. Seguidamente, la marcación fue realizada utilizando anticuerpo primario anti-HER2 conjugado a APC (#324408; Biolegend, Estados Unidos de América) a 4 °C y en oscuridad por 1 h. Finalmente, el estudio del ciclo celular fue realizado a partir de monocapas de células cosechadas y fijadas con 70 % de etanol frío durante 2 h. El ADN fue marcado con una solución de 0.1 % de Tritón X-100, 50 µg/mL de ioduro de propidio y 100 µg/mL de ribonucleasa A (Sigma-Aldrich, Merck, Alemania) en oscuridad durante 30 min. En todos los casos, las células fueron analizadas con el citómetro de flujo BD Accuri C6 Plus (BD Biosciences, Estados Unidos de América). El programa FlowJo 10.0.7 fue empleado para el análisis de los datos.

Análisis proteómico y fosfoproteómico

La preparación de las muestras peptídicas comenzó con la obtención de extractos proteicos mediante la homogeneización de monocapas de células como fue explicado antes para el ensayo de Western blot. Luego, 200 µg de cada extracto fueron liofilizados y posteriormente diluidos en 200 µL de solución de lavado (8 M urea y 100 mM Tris-HCl pH 8.5). El volumen total fue cargado en filtros Vivacon 500 (Sartorius, Alemania) con un límite molecular de 10 kDa, para realizar el protocolo de FASP (del inglés *Filter Aided Sample Preparation*) para la digestión de proteínas.

A continuación, fueron realizados tres lavados con la solución correspondiente. Las proteínas retenidas en el filtro fueron reducidas con 50 mM de ditioneitol (Fluka, Honeywell, Estados Unidos de América) en solución de lavado a 55 °C por 30 min, y alquiladas con 50 mM de iodoacetamida (Sigma-Aldrich, Merck, Alemania) en solución de lavado a temperatura ambiente y en oscuridad por 20 min. Posteriormente, las proteínas fueron lavadas cuatro veces: dos veces con la solución de lavado, una vez con 100 mM de bicarbonato de amonio y una vez con 50 mM de bicarbonato de amonio. La digestión proteica fue realizada en dos pasos: un primer paso con 100 µL de una solución de 20 ng/µL de tripsina modificada de grado de secuenciación (Promega, Estados Unidos de América) y 50 mM de bicarbonato de amonio, a 37 °C por una noche; y un segundo paso con la adición de 25 µL de la misma solución a 37 °C por 6 h. Luego, fueron realizados dos pasos de extracción con 50 mM de bicarbonato de amonio para coleccionar los péptidos, que finalmente fueron acidificados a pH 3 con ácido fórmico, secados al vacío y conservados a -20 °C.

Una parte de las muestras peptídicas fue enriquecida en fosfopéptidos con el objetivo de desarrollar el análisis fosfoproteómico. El enriquecimiento en fosfopéptidos fue realizado con microcolumnas cromatográficas de afinidad preparadas en forma casera introduciendo 1.2 mg de TiO₂ en StageTips de C18 (Proxeon Biosystems, Dinamarca). Las columnas fueron condicionadas dos veces con 50 µL de acetonitrilo y posteriormente dos veces con 50 µL de solución de carga (80 % acetonitrilo y 6 % ácido trifluoroacético). Luego, 190 µg de las muestras peptídicas fueron disueltos en 60 µL de solución de carga e introducidos lentamente en las microcolumnas. A continuación, la resina fue lavada cuatro veces con 50 µL de solución de carga y dos veces con 50 µL de una solución de 0.1 % de ácido trifluoroacético. Finalmente, los fosfopéptidos fueron eluidos dos veces con 50 µL de una solución de 15 % de hidróxido de amonio (pH > 10) y nuevamente dos veces con 50 µL de una solución de 50 % de acetonitrilo y 0.1 % de ácido fórmico. Las muestras fueron secadas al vacío y conservadas a -20 °C.

Los análisis proteómico y fosfoproteómico presentados en la primera parte de los resultados fueron desarrollados mediante LC-MS/MS con un espectrómetro de masa LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos de América)

acoplado en línea con el equipo de nano-HPLC UltiMate 3000 (Dionex, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos de América). Por cada muestra fueron obtenidas dos réplicas técnicas en orden aleatorio. El análisis proteómico de la segunda parte de los resultados fue llevado a cabo también mediante LC-MS/MS con un espectrómetro de masa Q Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos de América) acoplado en línea con el equipo de nano-UHPLC EASY-nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos de América). Se utilizó una estrategia de tipo *label-free* según el protocolo descrito por Arrigoni y colaboradores (Aita et al, 2022).

Los archivos crudos fueron analizados con el motor de búsqueda Andromeda de la plataforma MaxQuant (Tyanova et al, 2016) contra la sección *Homo sapiens* de la base de datos UniProt (UniProt Consortium, 2025), como también detallan Arrigoni y colaboradores (Aita et al, 2022). Las intensidades de las proteínas y de las fosfoproteínas resultantes del análisis fueron utilizadas para destacar las diferencias significativas entre los grupos comparados. Con el fin de determinar posibles interacciones físicas y funcionales entre las proteínas identificadas, y vías de señalización y funciones biológicas enriquecidas, utilizamos la base de datos STRING (Szklarczyk et al, 2023), la plataforma iPathwayGuide (AdvaitaBio Corporation) (Donato et al, 2013; Draghici et al, 2007), la herramienta g:GOST del servidor g:Profiler (Kolberg et al, 2023), el paquete PhosR (Kim et al, 2021) del programa R y la aplicación ShinyGO (Ge et al, 2020).

Determinación de la producción de lactato

La producción de lactato fue determinada a partir de los sobrenadantes de los cultivos de células. Su concentración fue estimada utilizando el kit comercial LACT2 (Cobas, F. Hoffmann-La Roche, Suiza). Los resultados fueron normalizados a la masa proteica total de los cultivos celulares medida por el método de Bradford (Supelco, Merck, Alemania).

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos indicados fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prism 9.3.1. Un p valor inferior a 0.05 fue considerado significativo.

REFERENCIAS

Aghazadeh S, Yazdanparast R. Activation of STAT3/HIF-1 α /Hes-1 axis promotes trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancer cells via down-regulation of PTEN. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2017 Aug;1861(8):1970-1980. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.05.009. Epub 2017 May 9. PMID: 28499822.

Agrawal A, Balci H, Hanspers K, Coort SL, Martens M, Slenter DN, Ehrhart F, Digles D, Waagmeester A, Wassink I, Abbassi-Daloui T, Lopes EN, Iyer A, Acosta JM, Willighagen LG, Nishida K, Riutta A, Basaric H, Evelo CT, Willighagen EL, Kutmon M, Pico AR. WikiPathways 2024: next generation pathway database. *Nucleic Acids Res*. 2024 Jan 5;52(D1):D679-D689. doi: 10.1093/nar/gkad960. PMID: 37941138; PMCID: PMC10767877.

Agus DB, Akita RW, Fox WD, Lewis GD, Higgins B, Pisacane PI, Lofgren JA, Tindell C, Evans DP, Maiese K, Scher HI, Sliwkowski MX. Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer Cell*. 2002 Aug;2(2):127-37. doi: 10.1016/s1535-6108(02)00097-1. PMID: 12204533.

Aita A, Battisti I, Contran N, Furlan S, Padoan A, Franchin C, Barbaro F, Cattelan AM, Zambon CF, Plebani M, Basso D, Arrigoni G. Salivary proteomic analysis in asymptomatic and symptomatic SARS-CoV-2 infection: Innate immunity, taste perception and FABP5 proteins make the difference. *Clin Chim Acta*. 2022 Dec 1;537:26-37. doi: 10.1016/j.cca.2022.09.023. Epub 2022 Oct 10. PMID: 36228679; PMCID: PMC9549389.

André F, Hurvitz S, Fasolo A, Tseng LM, Jerusalem G, Wilks S, O'Regan R, Isaacs C, Toi M, Burris H, He W, Robinson D, Riestler M, Taran T, Chen D, Slamon D. Molecular Alterations and Everolimus Efficacy in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Overexpressing Metastatic Breast Cancers: Combined Exploratory Biomarker Analysis From BOLERO-1 and BOLERO-3. *J Clin Oncol*. 2016 Jun 20;34(18):2115-24. doi: 10.1200/JCO.2015.63.9161. Epub 2016 Apr 18. Erratum in: *J Clin Oncol*. 2019 Feb 1;37(4):357. doi: 10.1200/JCO.18.02261. PMID: 27091708.

Arias-Romero LE, Villamar-Cruz O, Pacheco A, Kosoff R, Huang M, Muthuswamy SK, Chernoff J. A Rac-Pak signaling pathway is essential for ErbB2-mediated transformation of human breast epithelial cancer cells. *Oncogene*. 2010 Oct 28;29(43):5839-49. doi: 10.1038/onc.2010.318. Epub 2010 Aug 16. PMID: 20711231; PMCID: PMC2965784.

Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*. 2000 May;25(1):25-9. doi: 10.1038/75556. PMID: 10802651; PMCID: PMC3037419.

Banerji U, van Herpen CML, Saura C, Thistlethwaite F, Lord S, Moreno V, Macpherson IR, Boni V, Rolfo C, de Vries EGE, Rottey S, Geenen J, Eskens F, Gil-Martin M, Mommers EC, Koper NP, Aftimos P. Trastuzumab duocarmazine in locally advanced and metastatic solid tumours and HER2-expressing

- breast cancer: a phase 1 dose-escalation and dose-expansion study. *Lancet Oncol.* 2019 Aug;20(8):1124-1135. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30328-6. Epub 2019 Jun 27. PMID: 31257177.
- Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers EC, Semenza GL, Pinedo HM, Abeloff MD, Simons JW, van Diest PJ, van der Wall E. Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Feb 21;93(4):309-14. doi: 10.1093/jnci/93.4.309. PMID: 11181778.
- Bos R, van der Groep P, Greijer AE, Shvarts A, Meijer S, Pinedo HM, Semenza GL, van Diest PJ, van der Wall E. Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer.* 2003 Mar 15;97(6):1573-81. doi: 10.1002/cncr.11246. PMID: 12627523.
- Cardama GA, Comin MJ, Hornos L, Gonzalez N, Defelipe L, Turjanski AG, Alonso DF, Gomez DE, Menna PL. Preclinical development of novel Rac1-GEF signaling inhibitors using a rational design approach in highly aggressive breast cancer cell lines. *Anticancer Agents Med Chem.* 2014;14(6):840-51. doi: 10.2174/18715206113136660334. PMID: 24066799; PMCID: PMC4104455.
- Cardama GA, Alonso DF, Gonzalez N, Maggio J, Gomez DE, Rolfo C, Menna PL. Relevance of small GTPase Rac1 pathway in drug and radio-resistance mechanisms: Opportunities in cancer therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018 Apr;124:29-36. doi: 10.1016/j.critrevonc.2018.01.012. Epub 2018 Feb 4. PMID: 29548483.
- Cardama GA, Maggio J, Valdez Capuccino L, Gonzalez N, Matiller V, Ortega HH, Perez GR, Demarco IA, Spitzer E, Gomez DE, Lorenzano Menna P, Alonso DF. Preclinical Efficacy and Toxicology Evaluation of RAC1 Inhibitor 1A-116 in Human Glioblastoma Models. *Cancers (Basel).* 2022 Sep 30;14(19):4810. doi: 10.3390/cancers14194810. PMID: 36230732; PMCID: PMC9562863.
- Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 May 15;89(10):4285-9. doi: 10.1073/pnas.89.10.4285. PMID: 1350088; PMCID: PMC49066.
- Chandarlapaty S, Sakr RA, Giri D, Patil S, Heguy A, Morrow M, Modi S, Norton L, Rosen N, Hudis C, King TA. Frequent mutational activation of the PI3K-AKT pathway in trastuzumab-resistant breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2012 Dec 15;18(24):6784-91. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1785. Epub 2012 Oct 23. PMID: 23092874; PMCID: PMC3525734.
- Ciruelos E, Villagrasa P, Pascual T, Oliveira M, Pernas S, Paré L, Escrivá-de-Romaní S, Manso L, Adamo B, Martínez E, Cortés J, Vazquez S, Perelló A, Garau I, Melé M, Martínez N, Montaña A, Bermejo B, Morales S, Echarri MJ, Vega E, González-Farré B, Martínez D, Galván P, Canes J, Nuciforo P, Gonzalez X, Prat A. Palbociclib and Trastuzumab in HER2-Positive Advanced Breast Cancer: Results from the Phase II SOLTI-1303 PATRICIA Trial. *Clin Cancer Res.* 2020 Nov 15;26(22):5820-5829. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-0844. Epub 2020 Sep 16. PMID: 32938620.
- Cortés J, Kim SB, Chung WP, Im SA, Park YH, Hegg R, Kim MH, Tseng LM, Petry V, Chung CF, Iwata H, Hamilton E, Curigliano G, Xu B, Huang CS, Kim JH, Chiu JWY, Pedrini JL, Lee C, Liu Y, Cathcart J, Bako E, Verma S, Hurvitz SA; DESTINY-Breast03 Trial Investigators. Trastuzumab Deruxtecan versus Trastuzumab Emtansine for Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2022 Mar 24;386(12):1143-1154. doi: 10.1056/NEJMoa2115022. PMID: 35320644.
- Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science.* 1985 Dec 6;230(4730):1132-9. doi: 10.1126/science.2999974. PMID: 2999974.
- de Heer EC, Jalving M, Harris AL. HIFs, angiogenesis, and metabolism: elusive enemies in breast cancer. *J Clin Invest.* 2020 Oct 1;130(10):5074-5087. doi: 10.1172/JCI137552. PMID: 32870818; PMCID: PMC7524491.

- Del Duca D, Werbowetski T, Del Maestro RF. Spheroid preparation from hanging drops: characterization of a model of brain tumor invasion. *J Neurooncol.* 2004 May;67(3):295-303. doi: 10.1023/b:neon.0000024220.07063.70. PMID: 15164985.
- DiPersio CM. Double duty for Rac1 in epidermal wound healing. *Sci STKE.* 2007 Jun 19;2007(391):pe33. doi: 10.1126/stke.3912007pe33. PMID: 17579242.
- Di Veroli GY, Fornari C, Wang D, Mollard S, Bramhall JL, Richards FM, Jodrell DI. Combenefit: an interactive platform for the analysis and visualization of drug combinations. *Bioinformatics.* 2016 Sep 15;32(18):2866-8. doi: 10.1093/bioinformatics/btw230. Epub 2016 Apr 25. PMID: 27153664; PMCID: PMC5018366.
- Dokmanovic M, Hirsch DS, Shen Y, Wu WJ. Rac1 contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells: Rac1 as a potential therapeutic target for the treatment of trastuzumab-resistant breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 2009 Jun;8(6):1557-69. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0140. Epub 2009 Jun 9. PMID: 19509242.
- Donato M, Xu Z, Tomoiaga A, Granneman JG, Mackenzie RG, Bao R, Than NG, Westfall PH, Romero R, Draghici S. Analysis and correction of crosstalk effects in pathway analysis. *Genome Res.* 2013 Nov;23(11):1885-93. doi: 10.1101/gr.153551.112. Epub 2013 Aug 9. PMID: 23934932; PMCID: PMC3814888.
- Draghici S, Khatri P, Tarca AL, Amin K, Done A, Voichita C, Georgescu C, Romero R. A systems biology approach for pathway level analysis. *Genome Res.* 2007 Oct;17(10):1537-45. doi: 10.1101/gr.6202607. Epub 2007 Sep 4. PMID: 17785539; PMCID: PMC1987343.
- Du J, Xu R, Hu Z, Tian Y, Zhu Y, Gu L, Zhou L. PI3K and ERK-induced Rac1 activation mediates hypoxia-induced HIF-1 α expression in MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One.* 2011;6(9):e25213. doi: 10.1371/journal.pone.0025213. Epub 2011 Sep 27. PMID: 21980400; PMCID: PMC3181265.
- Ebi H, Costa C, Faber AC, Nishtala M, Kotani H, Juric D, Della Pelle P, Song Y, Yano S, Mino-Kenudson M, Benes CH, Engelman JA. PI3K regulates MEK/ERK signaling in breast cancer via the Rac-GEF, P-Rex1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Dec 24;110(52):21124-9. doi: 10.1073/pnas.1314124110. Epub 2013 Dec 10. PMID: 24327733; PMCID: PMC3876254.
- Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 2002 Dec 12;420(6916):629-35. doi: 10.1038/nature01148. PMID: 12478284.
- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2024. Disponible en: <https://gco.iarc.who.int/today>, visitada 07/12/2024.
- Filho OM, Viale G, Stein S, Trippa L, Yardley DA, Mayer IA, Abramson VG, Arteaga CL, Spring LM, Waks AG, Wrabel E, DeMeo MK, Bardia A, Dell'Orto P, Russo L, King TA, Polyak K, Michor F, Winer EP, Krop IE. Impact of HER2 Heterogeneity on Treatment Response of Early-Stage HER2-Positive Breast Cancer: Phase II Neoadjuvant Clinical Trial of T-DM1 Combined with Pertuzumab. *Cancer Discov.* 2021 Oct;11(10):2474-2487. doi: 10.1158/2159-8290.CD-20-1557. Epub 2021 May 3. PMID: 33941592; PMCID: PMC8598376.
- Fizman GL, Jasnis MA. Molecular Mechanisms of Trastuzumab Resistance in HER2 Overexpressing Breast Cancer. *Int J Breast Cancer.* 2011;2011:352182. doi: 10.4061/2011/352182. Epub 2011 Sep 6. PMID: 22295219; PMCID: PMC3262573.
- Fritz G, Henninger C. Rho GTPases: Novel Players in the Regulation of the DNA Damage Response? *Biomolecules.* 2015 Sep 30;5(4):2417-34. doi: 10.3390/biom5042417. PMID: 26437439; PMCID: PMC4693241.
- Ge SX, Jung D, Yao R. ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics.* 2020 Apr 15;36(8):2628-2629. doi: 10.1093/bioinformatics/btz931. PMID: 31882993; PMCID: PMC7178415.

- Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology knowledgebase in 2023. *Genetics*. 2023 May 4;224(1):iyad031. doi: 10.1093/genetics/iyad031. PMID: 36866529; PMCID: PMC10158837.
- Gianni L, Bisagni G, Colleoni M, Del Mastro L, Zamagni C, Mansutti M, Zambetti M, Frassoldati A, De Fato R, Valagussa P, Viale G. Neoadjuvant treatment with trastuzumab and pertuzumab plus palbociclib and fulvestrant in HER2-positive, ER-positive breast cancer (NA-PHER2): an exploratory, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2018 Feb;19(2):249-256. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30001-9. Epub 2018 Jan 8. PMID: 29326029.
- Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Simopoulos C, Polychronidis A, Gatter KC, Harris AL, Sivridis E. c-erbB-2 related aggressiveness in breast cancer is hypoxia inducible factor-1alpha dependent. *Clin Cancer Res*. 2004 Dec 1;10(23):7972-7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1068. PMID: 15585632.
- Goel S, Wang Q, Watt AC, Tolaney SM, Dillon DA, Li W, Ramm S, Palmer AC, Yuzugullu H, Varadan V, Tuck D, Harris LN, Wong KK, Liu XS, Sicinski P, Winer EP, Krop IE, Zhao JJ. Overcoming Therapeutic Resistance in HER2-Positive Breast Cancers with CDK4/6 Inhibitors. *Cancer Cell*. 2016 Mar 14;29(3):255-269. doi: 10.1016/j.ccell.2016.02.006. PMID: 26977878; PMCID: PMC4794996.
- González N, Cardama GA, Chinestrada P, Robles-Valero J, Rodríguez-Fdez S, Lorenzo-Martín LF, Bustelo XR, Lorenzano Menna P, Gomez DE. Computational and *in vitro* Pharmacodynamics Characterization of 1A-116 Rac1 Inhibitor: Relevance of Trp56 in Its Biological Activity. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Apr 15;8:240. doi: 10.3389/fcell.2020.00240. PMID: 32351958; PMCID: PMC7174510.
- Hampsch RA, Shee K, Bates D, Lewis LD, Désiré L, Leblond B, Demidenko E, Stefan K, Huang YH, Miller TW. Therapeutic sensitivity to Rac GTPase inhibition requires consequential suppression of mTORC1, AKT, and MEK signaling in breast cancer. *Oncotarget*. 2017 Mar 28;8(13):21806-21817. doi: 10.18632/oncotarget.15586. PMID: 28423521; PMCID: PMC5400625.
- Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, Ruddy K, Tsang J, Cardoso F. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2019 Sep 23;5(1):66. doi: 10.1038/s41572-019-0111-2. PMID: 31548545.
- Hirota K, Semenza GL. Rac1 activity is required for the activation of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 2001 Jun 15;276(24):21166-72. doi: 10.1074/jbc.M100677200. Epub 2001 Mar 30. PMID: 11283021.
- Indira Chandran V, Månsson AS, Barbachowska M, Cerezo-Magaña M, Nodin B, Joshi B, Koppada N, Saad OM, Gluz O, Isaksson K, Borgquist S, Jirström K, Nabi IR, Jernström H, Belting M. Hypoxia Attenuates Trastuzumab Uptake and Trastuzumab-Emtansine (T-DM1) Cytotoxicity through Redistribution of Phosphorylated Caveolin-1. *Mol Cancer Res*. 2020 Apr;18(4):644-656. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-19-0856. Epub 2020 Jan 3. PMID: 31900313.
- Jerusalem G, Park YH, Yamashita T, Hurvitz SA, Modi S, Andre F, Krop IE, González Farré X, You B, Saura C, Kim SB, Osborne CR, Murthy RK, Gianni L, Takano T, Liu Y, Cathcart J, Lee C, Perrin C. Trastuzumab Deruxtecan in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer Patients with Brain Metastases: A DESTINY-Breast01 Subgroup Analysis. *Cancer Discov*. 2022 Dec 2;12(12):2754-2762. doi: 10.1158/2159-8290.CD-22-0837. PMID: 36255231; PMCID: PMC9716244.
- Jin F, Brockmeier U, Otterbach F, Metzen E. New insight into the SDF-1/CXCR4 axis in a breast carcinoma model: hypoxia-induced endothelial SDF-1 and tumor cell CXCR4 are required for tumor cell intravasation. *Mol Cancer Res*. 2012 Aug;10(8):1021-31. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0498. Epub 2012 Jul 5. PMID: 22767589.
- Johnson E, Seachrist DD, DeLeon-Rodriguez CM, Lozada KL, Miedler J, Abdul-Karim FW, Keri RA. HER2/ErbB2-induced breast cancer cell migration and invasion require p120 catenin activation of Rac1 and Cdc42. *J Biol Chem*. 2010 Sep 17;285(38):29491-501. doi: 10.1074/jbc.M110.136770. Epub 2010 Jul 1. PMID: 20595387; PMCID: PMC2937981.
- Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, Matsuura Y, Ishiguro-Watanabe M. KEGG: biological systems database as a model of the real world. *Nucleic Acids Res*. 2025 Jan 6;53(D1):D672-D677. doi: 10.1093/nar/gkae909. PMID: 39417505; PMCID: PMC11701520.

- Kato C, Iizuka-Ohashi M, Honda M, Konishi E, Yokota I, Boku S, Mizuta N, Morita M, Sakaguchi K, Taguchi T, Watanabe M, Naoi Y. Additional statin treatment enhances the efficacy of HER2 blockade and improves prognosis in Rac1-high/HER2-positive breast cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2024 Dec;1870(8):167458. doi: 10.1016/j.bbadis.2024.167458. Epub 2024 Aug 10. PMID: 39128642.
- Kim HJ, Kim T, Hoffman NJ, Xiao D, James DE, Humphrey SJ, Yang P. PhosR enables processing and functional analysis of phosphoproteomic data. *Cell Rep.* 2021 Feb 23;34(8):108771. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108771. PMID: 33626354.
- Kolberg L, Raudvere U, Kuzmin I, Adler P, Vilo J, Peterson H. g:Profiler-interoperable web service for functional enrichment analysis and gene identifier mapping (2023 update). *Nucleic Acids Res.* 2023 Jul 5;51(W1):W207-W212. doi: 10.1093/nar/gkad347. PMID: 37144459; PMCID: PMC10320099.
- Kotb RM, Ibrahim SS, Mostafa OM, Shahin NN. Potential role of CXCR4 in trastuzumab resistance in breast cancer patients. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2022 Nov 1;1868(11):166520. doi: 10.1016/j.bbadis.2022.166520. Epub 2022 Aug 18. PMID: 35985446.
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Bottini A, Cappelletti MR, Zanotti L, Allevi G, Strina C, Ardine M, Milani M, Brugnoli G, Martinotti M, Ferrero G, Bertoni R, Ferrozzi F, Harris AL, Generali D. Prospective neoadjuvant analysis of PET imaging and mechanisms of resistance to Trastuzumab shows role of HIF1 and autophagy. *Br J Cancer.* 2014 Apr 29;110(9):2209-16. doi: 10.1038/bjc.2014.196. Epub 2014 Apr 10. PMID: 24722179; PMCID: PMC4007245.
- Lane HA, Beuvink I, Motoyama AB, Daly JM, Neve RM, Hynes NE. ErbB2 potentiates breast tumor proliferation through modulation of p27(Kip1)-Cdk2 complex formation: receptor overexpression does not determine growth dependency. *Mol Cell Biol.* 2000 May;20(9):3210-23. doi: 10.1128/MCB.20.9.3210-3223.2000. PMID: 10757805; PMCID: PMC85615.
- Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol.* 2001 Jun;21(12):3995-4004. doi: 10.1128/MCB.21.12.3995-4004.2001. PMID: 11359907; PMCID: PMC87062.
- Lee-Hoeflich ST, Crocker L, Yao E, Pham T, Munroe X, Hoeflich KP, Sliwkowski MX, Stern HM. A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy. *Cancer Res.* 2008 Jul 15;68(14):5878-87. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0380. PMID: 18632642.
- Lester SC. The breast. En: Abbas AK, Aster JC, Kumar VK. Robbins & Cotran Pathologic basis of disease. 10 ed. Philadelphia: Elsevier; 2021. p. 1037-1064.
- Lewis Phillips GD, Li G, Dugger DL, Crocker LM, Parsons KL, Mai E, Blättler WA, Lambert JM, Chari RV, Lutz RJ, Wong WL, Jacobson FS, Koeppen H, Schwall RH, Kenkare-Mitra SR, Spencer SD, Sliwkowski MX. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res.* 2008 Nov 15;68(22):9280-90. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1776. PMID: 19010901.
- Li EY, Huang WY, Chang YC, Tsai MH, Chuang EY, Kuok QY, Bai ST, Chao LY, Sher YP, Lai LC. Aryl Hydrocarbon Receptor Activates NDRG1 Transcription under Hypoxia in Breast Cancer Cells. *Sci Rep.* 2016 Feb 8;6:20808. doi: 10.1038/srep20808. PMID: 26852918; PMCID: PMC4745107.
- Maneiro MA, Forte N, Shchepinova MM, Kounde CS, Chudasama V, Baker JR, Tate EW. Antibody-PROTAC Conjugates Enable HER2-Dependent Targeted Protein Degradation of BRD4. *ACS Chem Biol.* 2020 Jun 19;15(6):1306-1312. doi: 10.1021/acscchembio.0c00285. Epub 2020 Apr 30. PMID: 32338867; PMCID: PMC7309268.
- Marei H, Malliri A. Rac1 in human diseases: The therapeutic potential of targeting Rac1 signaling regulatory mechanisms. *Small GTPases.* 2017 Jul 3;8(3):139-163. doi: 10.1080/21541248.2016.1211398. Epub 2016 Jul 21. PMID: 27442895; PMCID: PMC5584733.

- Medford AR, Douglas SK, Godinho SI, Uppington KM, Armstrong L, Gillespie KM, van Zyl B, Tetley TD, Ibrahim NB, Millar AB. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) isoform expression and activity in human and murine lung injury. *Respir Res.* 2009 Apr 9;10(1):27. doi: 10.1186/1465-9921-10-27. PMID: 19358726; PMCID: PMC2674417.
- Mercogliano MF, De Martino M, Venturutti L, Rivas MA, Proietti CJ, Inurrigarro G, Frahm I, Allemand DH, Deza EG, Ares S, Gercovich FG, Guzmán P, Roa JC, Elizalde PV, Schillaci R. TNF α -Induced Mucin 4 Expression Elicits Trastuzumab Resistance in HER2-Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2017 Feb 1;23(3):636-648. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0970. Epub 2016 Oct 3. PMID: 27698002.
- Milacic M, Beavers D, Conley P, Gong C, Gillespie M, Griss J, Haw R, Jassal B, Matthews L, May B, Petryszak R, Ragueneau E, Rothfels K, Sevilla C, Shamovsky V, Stephan R, Tiwari K, Varusai T, Weiser J, Wright A, Wu G, Stein L, Hermjakob H, D'Eustachio P. The Reactome Pathway Knowledgebase 2024. *Nucleic Acids Res.* 2024 Jan 5;52(D1):D672-D678. doi: 10.1093/nar/gkad1025. PMID: 37941124; PMCID: PMC10767911.
- Modi S, Jacot W, Yamashita T, Sohn J, Vidal M, Tokunaga E, Tsurutani J, Ueno NT, Prat A, Chae YS, Lee KS, Niikura N, Park YH, Xu B, Wang X, Gil-Gil M, Li W, Pierga JY, Im SA, Moore HCF, Rugo HS, Yerushalmi R, Zagouri F, Gombos A, Kim SB, Liu Q, Luo T, Saura C, Schmid P, Sun T, Gambhire D, Yung L, Wang Y, Singh J, Vitazka P, Meinhardt G, Harbeck N, Cameron DA; DESTINY-Breast04 Trial Investigators. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2022 Jul 7;387(1):9-20. doi: 10.1056/NEJMoa2203690. Epub 2022 Jun 5. PMID: 35665782; PMCID: PMC10561652.
- Morrison Joly M, Williams MM, Hicks DJ, Jones B, Sanchez V, Young CD, Sarbassov DD, Muller WJ, Brantley-Sieders D, Cook RS. Two distinct mTORC2-dependent pathways converge on Rac1 to drive breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res.* 2017 Jun 30;19(1):74. doi: 10.1186/s13058-017-0868-8. PMID: 28666462; PMCID: PMC5493112.
- Montemurro F, Ellis P, Anton A, Wuerstlein R, Delalogue S, Bonnetterre J, Quenel-Tueux N, Linn SC, Irahara N, Donica M, Lindegger N, Barrios CH. Safety of trastuzumab emtansine (T-DM1) in patients with HER2-positive advanced breast cancer: Primary results from the KAMILLA study cohort 1. *Eur J Cancer.* 2019 Mar;109:92-102. doi: 10.1016/j.ejca.2018.12.022. Epub 2019 Jan 29. PMID: 30708264.
- Ogitani Y, Aida T, Hagihara K, Yamaguchi J, Ishii C, Harada N, Soma M, Okamoto H, Oitate M, Arakawa S, Hirai T, Atsumi R, Nakada T, Hayakawa I, Abe Y, Agatsuma T. DS-8201a, A Novel HER2-Targeting ADC with a Novel DNA Topoisomerase I Inhibitor, Demonstrates a Promising Antitumor Efficacy with Differentiation from T-DM1. *Clin Cancer Res.* 2016 Oct 15;22(20):5097-5108. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2822. Epub 2016 Mar 29. PMID: 27026201.
- Olson MF, Ashworth A, Hall A. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G₁. *Science.* 1995 Sep 1;269(5228):1270-2. doi: 10.1126/science.7652575. PMID: 7652575.
- Price-Schiavi SA, Jepson S, Li P, Arango M, Rudland PS, Yee L, Carraway KL. Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance. *Int J Cancer.* 2002 Jun 20;99(6):783-91. doi: 10.1002/ijc.10410. PMID: 12115478.
- Rediti M, Fimereli D, Mileva M, Wimana Z, Venet D, Flamen P, Guiot T, de Vries EGE, Schröder CP, Menke-van der Houven van Oordt CW, Maetens M, Majjaj S, Larsimont D, Rothé F, Sotiriou C, Gebhart G. Integrating Molecular Imaging and Transcriptomic Profiling in Advanced HER2-Positive Breast Cancer Receiving Trastuzumab Emtansine: An Analysis of the ZEPHIR Clinical Trial. *Clin Cancer Res.* 2025 Jan 6;31(1):110-121. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-24-1007. PMID: 39470686.
- Ren W, Liang H, Sun J, Cheng Z, Liu W, Wu Y, Shi Y, Zhou Z, Chen C. TNFAIP2 promotes HIF1 α transcription and breast cancer angiogenesis by activating the Rac1-ERK-AP1 signaling axis. *Cell Death Dis.* 2024 Nov 13;15(11):821. doi: 10.1038/s41419-024-07223-2. PMID: 39532855; PMCID: PMC11557851.

- Rodríguez CE, Reidel SI, Bal de Kier Joffé ED, Jasnis MA, Fiszman GL. Autophagy Protects from Trastuzumab-Induced Cytotoxicity in HER2 Overexpressing Breast Tumor Spheroids. *PLoS One*. 2015 Sep 11;10(9):e0137920. doi: 10.1371/journal.pone.0137920. PMID: 26360292; PMCID: PMC4567133.
- Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolmark N. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005 Oct 20;353(16):1673-84. doi: 10.1056/NEJMoa052122. PMID: 16236738.
- Saponaro C, Damato M, Stanca E, Aboulouard S, Zito FA, De Summa S, Traversa D, Schirosi L, Bravaccini S, Pirini F, Fonzi E, Tebaldi M, Puccetti M, Gaballo A, Pantalone L, Ronci M, Magnani L, Sergi D, Tinelli A, Tacconi S, Siculella L, Giudetti AM, Fournier I, Salzet M, Trerotola M, Vergara D. Unraveling the protein kinase C/NDRG1 signaling network in breast cancer. *Cell Biosci*. 2024 Dec 30;14(1):156. doi: 10.1186/s13578-024-01336-z. PMID: 39736699; PMCID: PMC11686873.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jul;9(7):671-5. doi: 10.1038/nmeth.2089. PMID: 22930834; PMCID: PMC5554542.
- Schnelzer A, Prechtel D, Knaus U, Dehne K, Gerhard M, Graeff H, Harbeck N, Schmitt M, Lengyel E. Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b. *Oncogene*. 2000 Jun 15;19(26):3013-20. doi: 10.1038/sj.onc.1203621. PMID: 10871853.
- Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)*. 2004 Aug;19:176-82. doi: 10.1152/physiol.00001.2004. PMID: 15304631.
- Singh AK, Batra A, Upadhaya AD, Gupta S, KP H, Dey S. Circulatory Level of Inflammatory Cytoskeleton Signaling Regime Proteins in Cancer Invasion and Metastasis. *Front Oncol*. 2022 Jul 7;12:851807. doi: 10.3389/fonc.2022.851807. PMID: 35875090; PMCID: PMC9300851.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987 Jan 9;235(4785):177-82. doi: 10.1126/science.3798106. PMID: 3798106.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001 Mar 15;344(11):783-92. doi: 10.1056/NEJM200103153441101. PMID: 11248153.
- Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2004;3:Article3. doi: 10.2202/1544-6115.1027. Epub 2004 Feb 12. PMID: 16646809.
- Sosa MS, Lopez-Haber C, Yang C, Wang H, Lemmon MA, Busillo JM, Luo J, Benovic JL, Klein-Szanto A, Yagi H, Gutkind JS, Parsons RE, Kazanietz MG. Identification of the Rac-GEF P-Rex1 as an essential mediator of ErbB signaling in breast cancer. *Mol Cell*. 2010 Dec 22;40(6):877-92. doi: 10.1016/j.molcel.2010.11.029. PMID: 21172654; PMCID: PMC3038344.
- Srijakotre N, Liu HJ, Nobis M, Man J, Yip HYK, Papa A, Abud HE, Anderson KI, Welch HCE, Tiganis T, Timpson P, McLean CA, Ooms LM, Mitchell CA. PtdIns(3,4,5)P₃-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex1) promotes mammary tumor initiation and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Nov 10;117(45):28056-28067. doi: 10.1073/pnas.2006445117. Epub 2020 Oct 23. PMID: 33097662; PMCID: PMC7668035.
- Swain SM, Shastry M, Hamilton E. Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions. *Nat Rev Drug Discov*. 2023 Feb;22(2):101-126. doi: 10.1038/s41573-022-00579-0. Epub 2022 Nov 7. PMID: 36344672; PMCID: PMC9640784.

Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, Nastou K, Mehryary F, Hachilif R, Gable AL, Fang T, Doncheva NT, Pyysalo S, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res.* 2023 Jan 6;51(D1):D638-D646. doi: 10.1093/nar/gkac1000. PMID: 36370105; PMCID: PMC9825434.

Tolaney SM, Wardley AM, Zambelli S, Hilton JF, Troso-Sandoval TA, Ricci F, Im SA, Kim SB, Johnston SR, Chan A, Goel S, Catron K, Chapman SC, Price GL, Yang Z, Gainford MC, André F. Abemaciclib plus trastuzumab with or without fulvestrant versus trastuzumab plus standard-of-care chemotherapy in women with hormone receptor-positive, HER2-positive advanced breast cancer (monarchHER): a randomised, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2020 Jun;21(6):763-775. doi: 10.1016/S1470-2045(20)30112-1. Epub 2020 Apr 27. Erratum in: *Lancet Oncol.* 2021 Mar;22(3):e92. doi: 10.1016/S1470-2045(21)00032-2. Erratum in: *Lancet Oncol.* 2021 Nov;22(11):e472. doi: 10.1016/S1470-2045(21)00587-8. PMID: 32353342.

Turcotte S, Desrosiers RR, Béliveau R. HIF-1alpha mRNA and protein upregulation involves Rho GTPase expression during hypoxia in renal cell carcinoma. *J Cell Sci.* 2003 Jun 1;116(Pt 11):2247-60. doi: 10.1242/jcs.00427. Epub 2003 Apr 15. PMID: 12697836.

Tyanova S, Temu T, Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc.* 2016 Dec;11(12):2301-2319. doi: 10.1038/nprot.2016.136. Epub 2016 Oct 27. PMID: 27809316.

UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Res.* 2025 Jan 6;53(D1):D609-D617. doi: 10.1093/nar/gkae1010. PMID: 39552041; PMCID: PMC11701636.

Velázquez-Vega LE, Rivera-Robles M, Sánchez-Álvarez AO, Vivas-Mejía PE, Aponte-Reyes M, Cruz-Collazo AM, Grafals-Ruiz N, Dorta-Estremera S, Hernández-O'Farrill E, Vlaar CP, Dharmawardhane S. Efficacy and delivery strategies of the dual Rac/Cdc42 inhibitor MBQ-167 in HER2 overexpressing breast cancer. *Transl Oncol.* 2024 Jun;44:101928. doi: 10.1016/j.tranon.2024.101928. Epub 2024 Mar 15. PMID: 38489873; PMCID: PMC10956050.

Villore ES, Hu X, Eckhardt BL, Larson R, Huo L, Yoon EC, Gong Y, Song J, Liu S, Ueno NT, Krishnamurthy S, Pusch S, Tripathy D, Woodward WA, Debeb BG. NDRG1 in Aggressive Breast Cancer Progression and Brain Metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 2022 Apr 11;114(4):579-591. doi: 10.1093/jnci/djab222. PMID: 34893874; PMCID: PMC9002276.

Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, Press M. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2002 Feb 1;20(3):719-26. doi: 10.1200/JCO.2002.20.3.719. PMID: 11821453.

von Minckwitz G, Procter M, de Azambuja E, Zardavas D, Benyunes M, Viale G, Suter T, Arahmani A, Rouchet N, Clark E, Knott A, Lang I, Levy C, Yardley DA, Bines J, Gelber RD, Piccart M, Baselga J; APHINITY Steering Committee and Investigators. Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2017 Jul 13;377(2):122-131. doi: 10.1056/NEJMoa1703643. Epub 2017 Jun 5. Erratum in: *N Engl J Med.* 2017 Aug 17;377(7):702. doi: 10.1056/NEJMx170011. Erratum in: *N Engl J Med.* 2018 Oct 18;379(16):1585. PMID: 28581356; PMCID: PMC5538020.

von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, Loibl S, Mamounas EP, Untch M, Wolmark N, Rastogi P, Schneeweiss A, Redondo A, Fischer HH, Jacot W, Conlin AK, Arce-Salinas C, Wapnir IL, Jackisch C, DiGiovanna MP, Fasching PA, Crown JP, Wülfing P, Shao Z, Rota Caremoli E, Wu H, Lam LH, Tesarowski D, Smitt M, Douthwaite H, Singel SM, Geyer CE Jr; KATHERINE Investigators. Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2019 Feb 14;380(7):617-628. doi: 10.1056/NEJMoa1814017. Epub 2018 Dec 5. PMID: 30516102.

Wang SE, Shin I, Wu FY, Friedman DB, Arteaga CL. HER2/Neu (ErbB2) signaling to Rac1-Pak1 is temporally and spatially modulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res.* 2006 Oct 1;66(19):9591-600. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2071. PMID: 17018616.

- Wang Y, Bibi M, Min P, Deng W, Zhang Y, Du J. SOX2 promotes hypoxia-induced breast cancer cell migration by inducing NEDD9 expression and subsequent activation of Rac1/HIF-1 α signaling. *Cell Mol Biol Lett.* 2019 Aug 22;24:55. doi: 10.1186/s11658-019-0180-y. PMID: 31462898; PMCID: PMC6704701.
- Westwick JK, Lambert QT, Clark GJ, Symons M, Van Aelst L, Pestell RG, Der CJ. Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways. *Mol Cell Biol.* 1997 Mar;17(3):1324-35. doi: 10.1128/MCB.17.3.1324. PMID: 9032259; PMCID: PMC231857.
- Whelan KA, Schwab LP, Karakashev SV, Franchetti L, Johannes GJ, Seagroves TN, Reginato MJ. The oncogene HER2/neu (ERBB2) requires the hypoxia-inducible factor HIF-1 for mammary tumor growth and anoikis resistance. *J Biol Chem.* 2013 May 31;288(22):15865-77. doi: 10.1074/jbc.M112.426999. Epub 2013 Apr 12. PMID: 23585570; PMCID: PMC3668743.
- Wicks EE, Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: cancer progression and clinical translation. *J Clin Invest.* 2022 Jun 1;132(11):e159839. doi: 10.1172/JCI159839. PMID: 35642641; PMCID: PMC9151701.
- Yang C, Liu Y, Lemmon MA, Kazanietz MG. Essential role for Rac in heregulin beta1 mitogenic signaling: a mechanism that involves epidermal growth factor receptor and is independent of ErbB4. *Mol Cell Biol.* 2006 Feb;26(3):831-42. doi: 10.1128/MCB.26.3.831-842.2006. PMID: 16428439; PMCID: PMC1347034.
- Zhang JG, Zhou HM, Zhang X, Mu W, Hu JN, Liu GL, Li Q. Hypoxic induction of vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma: role of HIF-1 α , RhoA/ROCK and Rac1/PAK signaling. *BMC Cancer.* 2020 Jan 13;20(1):32. doi: 10.1186/s12885-019-6501-8. PMID: 31931758; PMCID: PMC6958789.
- Zhao Y, Wang Z, Jiang Y, Yang C. Inactivation of Rac1 reduces Trastuzumab resistance in PTEN deficient and insulin-like growth factor I receptor overexpressing human breast cancer SKBR3 cells. *Cancer Lett.* 2011 Dec 26;313(1):54-63. doi: 10.1016/j.canlet.2011.08.023. Epub 2011 Sep 3. PMID: 21943825.
- Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* 1999 Nov 15;59(22):5830-5. PMID: 10582706.
- Zhu Y, Orre LM, Zhou Tran Y, Mermelekas G, Johansson HJ, Malyutina A, Anders S, Lehtiö J. DEqMS: A Method for Accurate Variance Estimation in Differential Protein Expression Analysis. *Mol Cell Proteomics.* 2020 Jun;19(6):1047-1057. doi: 10.1074/mcp.TIR119.001646. Epub 2020 Mar 23. PMID: 32205417; PMCID: PMC7261819.
- Zhu C, Hu H, Ma Y, Xiong S, Zhu D. Vav1-dependent Rac1 activation mediates hypoxia-induced gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma cells through upregulation of HIF-1 α expression. *Cell Biol Int.* 2023 Nov;47(11):1835-1842. doi: 10.1002/cbin.12074. Epub 2023 Aug 6. PMID: 37545183.

