

MECANISMOS DE RESISTENCIA AL TRASTUZUMAB

Ernesto Korbenfeld

Servicio de Oncología, Hospital Británico de Buenos Aires

Dirección postal: Dr. Ernesto Korbenfeld, Servicio de Oncología, Hospital Británico de Buenos Aires, Perdriel 74, 1280 Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

e-mail: ekorben@yahoo.com.ar

Resumen

El trastuzumab es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (Her2), el cual se encuentra sobreexpresado en aproximadamente el 20% del cáncer de mama invasivo. El trastuzumab es un claro ejemplo de exitoso desarrollo de terapia “blanco específica” en oncología y actualmente se encuentra aprobado para su uso terapéutico en cáncer de mama Her2+ tanto en enfermedad avanzada como con criterio adyuvante. Sin embargo, alrededor del 50% de las pacientes con cáncer de mama Her2+ no se benefician de las terapias basadas en trastuzumab. El entendimiento de los mecanismos de acción y de resistencia al trastuzumab es crucial para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento. Los mecanismos de resistencia al trastuzumab se pueden agrupar en 4 categorías principales: A. Obstáculos para la unión del trastuzumab al dominio extracelular del Her2. B. Activación de las vías de traducción de señales río abajo del Her2. C. Activación de vías alternativas del Her2. D. Fallas del sistema inmunitario para destruir las células tumorales. Esta revisión resume las evidencias preclínicas y clínicas acerca de los mecanismos de acción y resistencia al trastuzumab y también discute el desarrollo de nuevas drogas antiHer2 y sus posibles implicancias clínicas.

Palabras clave: trastuzumab, cáncer de mama, Her2, mecanismo de acción, resistencia, revisión

Abstract

Trastuzumab is a monoclonal antibody targeted against the human epidermal growth factor receptor (Her2) tyrosine kinase receptor, which is overexpressed in approximately 20% of invasive breast cancer. Trastuzumab is a successful rationally designed Her2-targeted therapy and, at present, is approved for patients whose tumors have this abnormality, in both the metastatic and adjuvant setting. However, about half of individuals with Her2 overexpressing breast cancer do not respond to trastuzumab-based therapies. Understanding the mechanisms of action and resistance to trastuzumab is therefore crucial for development of a new therapeutic strategy. Mechanisms for resistance are grouped into four main categories: A. Obstacles preventing trastuzumab binding to Her2. B. Upregulation of Her2 downstream signaling pathways. C. Signaling through alternative pathways. D. Failure to trigger an immune-mediated mechanism to destroy tumor cells. This review summarizes the current knowledge on the preclinical and clinical evidence about the mechanism

of action of trastuzumab and on the mechanisms underlying the development of resistance and also discusses the development of new drugs antiHer2 and their possible clinical implications.

Key words: trastuzumab, breast cancer, Her2, mechanism of action, resistance, review

Introducción

El trastuzumab (Herceptin®) es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el dominio extracelular del receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (HER2), el cual está amplificado y/o sobreexpresado en alrededor del 15-25 de los cánceres de mama¹⁻³.

La sobreexpresión del HER2+ en pacientes con carcinoma de mama constituye un factor pronóstico adverso y presenta una conducta biológica agresiva que se traduce en un intervalo libre de enfermedad y una supervivencia global menor, tanto en la enfermedad temprana como en la avanzada^{1, 4-6}.

El trastuzumab es un claro ejemplo de exitoso desarrollo de terapia “blanco específica” en oncología. El trastuzumab ha demostrado un claro beneficio clínico como monoterapia en pacientes con cáncer de mama HER2+ avanzado, así como prolongación de la supervivencia asociado a quimioterapia en primera línea⁷⁻⁹. La *Food and Drug Administration* (FDA) aprobó su utilización en pacientes Her2+ con enfermedad avanzada en 1998. Igualmente, el trastuzumab ha demostrado un importante beneficio clínico en la enfermedad temprana. En cuatro grandes ensayos clínicos aleatorios que evaluaron trastuzumab en adyuvancia, se demostró un importante beneficio en supervivencia libre de enfermedad (SLE), con reducción entre el 36% y el 52% de recaídas y en supervivencia global (SG), con reducción de muertes entre el 33% y el 37% (Figura 1)¹⁰⁻¹².

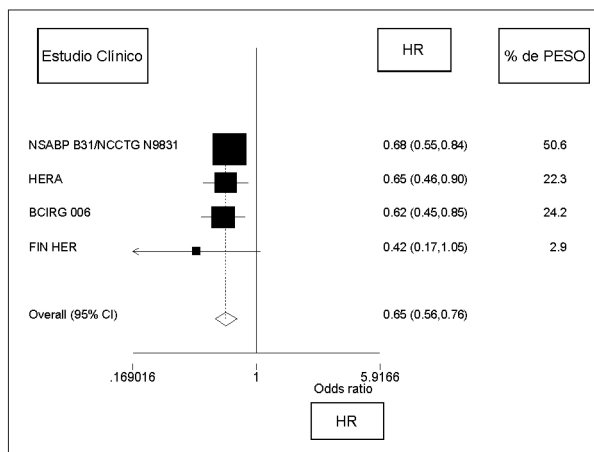


Figura 1. Beneficio del trastuzumab en supervivencia global en cáncer de mama temprano Her2+ en ensayos clínicos fase III

Hoy en día, el tratamiento con trastuzumab durante un año es parte esencial del tratamiento adyuvante del cáncer de mama temprano en pacientes HER2+.

Sin embargo, sólo alrededor del 30% de los pacientes con enfermedad metastásica logran respuestas objetivas con la monoterapia de trastuzumab, y los pacientes respondedores iniciales presentan una duración media de respuesta de 9 meses y luego progresan debido a la presencia de mecanismos de resistencia de *novo* y secundaria respectivamente al anticuerpo monoclonal^{7, 13, 14}. También, una significativa minoría de pacientes con estadios I y II tratados con quimioterapia y trastuzumab con criterio adyuvante recaen (alrededor del 40% en el sistema nervioso central, donde el acceso del trastuzumab es limitado)¹⁰⁻¹².

Por lo tanto, la comprensión de los mecanismos de acción y los mecanismos moleculares de resistencia al trastuzumab son indispensables para el desarrollo de nuevas terapias antiHER2, necesarias para mejorar los resultados clínicos y el pronóstico de este subgrupo de tumores de mama¹⁵. Los objetivos de la presente revisión bibliográfica son la descripción de los mecanismos de resistencia al trastuzumab y las potenciales terapias antiHER2 que contrarresten la resistencia.

Familia HER

El HER2 es un receptor transmembrana con actividad de tirosinquinasa de 185-kDa, cuyo gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 y es miembro de la familia de receptores de factores de crecimiento HER (o Erb B)¹⁶. Esta

familia de receptores comprende 4 subtipos: el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR o HER1), el HER2, el HER3 (único sin actividad de tirosinquinasa) y el HER4. Todos los receptores de la familia Her comparten una estructura similar: un dominio extracelular de unión al ligando, una corta región hidrofóbica transmembrana y un dominio citoplasmático con actividad de tirosinquinasa (excepto Her3). El Her2 es considerado un receptor huérfano debido a que no se le conocen ligandos de unión específicos. El HER2 forma homodímeros (asociación de 2 moléculas del receptor HER2) o heterodímeros (unión con otros miembros de la familia) inducido por otros ligandos de la familia HER. La dimerización en la superficie celular determina la fosforilación del dominio intracitoplasmático del receptor y el inicio de cascadas de señales intracelulares que gatillan procesos biológicos en las células que incluyen el crecimiento celular, el incremento de la proliferación, la supervivencia y motilidad celular así como la resistencia a la apoptosis (Figura 2)¹⁷⁻¹⁹.

Las dos principales vías de señales intracelulares activadas son la vía del fosfatidilinositol3 quinasa (PI3K)/AKT que determina la supervivencia celular e inhibición de la apoptosis y la vía RAS/Raf/MAP quinasa cuya activación estimula el crecimiento y proliferación celular (Figura 3)²⁰.

La activación de la vía PI3K/AKT comienza con la activación de la PI3K clase I que se encuentra constituida por una subunidad regulatoria (p85) y una subunidad catalítica (p110) unidas entre sí e inactivas en las células quiescentes. La dimerización del receptor Her2 determina la separación de ambas subunidades y la relocalización de la p110 en la membrana plasmática. La unidad catalítica

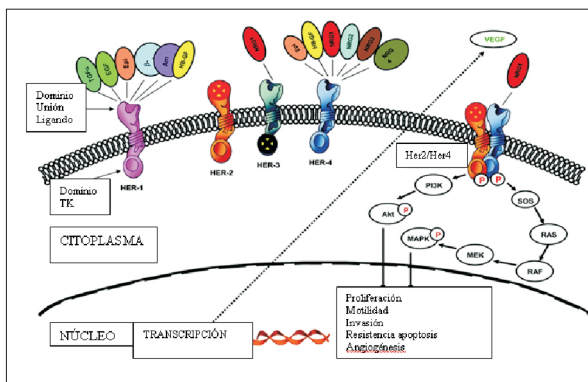


Figura 2. Familia Her2

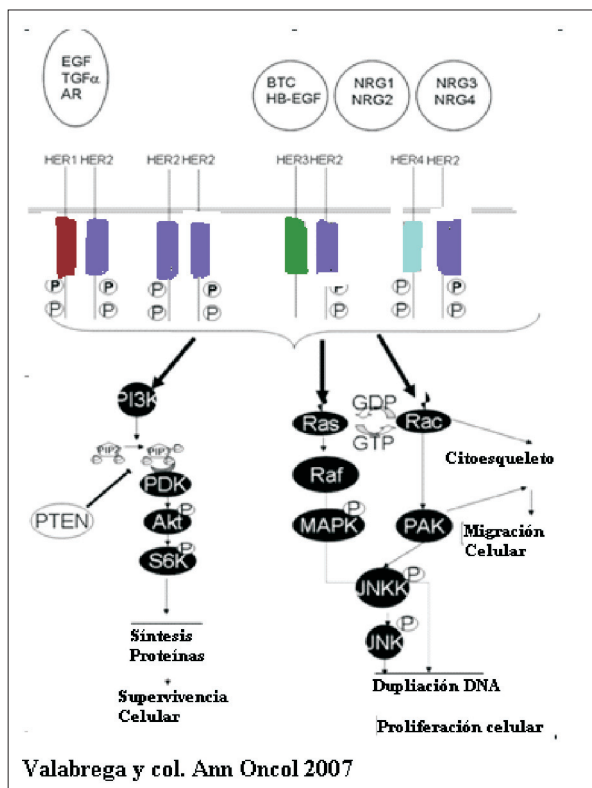


Figura 3. Cascada de señales intracelulares por activación de receptores de familia HER

p110 fosforila y convierte el fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) en fosfatidilinositol trifosfato (PIP₃). El PIP₃ es un segundo mensajero, el cual activa a la fosfatidilinositol dependiente de quinasa tipo I (PDK) que a su vez activa a la seronin-treonin quinasa AKT. La quinasa AKT es capaz de activar al complejo de la mTOR que interacciona con factores de transcripción regulando el metabolismo celular, estimulando la angiogénesis y la celular (por la inhibición de la apoptosis). La fosfatasa PTEN es un gen supresor de tumores que regula negativamente la vía PI3K/AKT por desfosforilación del PIP₃ a PIP₂²¹⁻²³.

La vía RAS/Raf/MAP quinasa es también activada por el reconocimiento de la proteína Src de los residuos fosforilados de tirosina del dominio intracitoplasmático del HER2, tras su dimerización. La proteína Src activa a RAS por el intercambio de GDP forma inactiva a forma activa. La proteína RAS activa a Raf-1 que sucesivamente fosforila y activa a MEK1 y ésta a ERK1 y ERK2. Dichas quinasas regulan diversos factores de transcripción que interactúan con el DNA estimulando el crecimiento y la motilidad celular, la angiogénesis y la división celular²⁴.

Además, existen interrelaciones (*cross-talk*) entre las vías del Her2 y otras vías. Las de mayor relevancia clínica incluyen la vía del receptor estrogénico (involucrada en la resistencia al tratamiento hormonal)²⁵⁻²⁷ y del proceso angiogénico²⁸.

Mecanismo de acción del trastuzumab

El trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado IgG1. Su mecanismo de acción es multifacético y no totalmente comprendido. Puede ser dividido por su acción mediada a través de su componente Fc (fracción cristalizante) que media los efectos inmunológicos y la mediada por la acción del fragmento Fab (fragmento de unión al antígeno) inhibiendo la traducción de señales²⁹.

Las funciones del fragmento Fc del trastuzumab se relacionan con la activación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA)^{30,31} y, en forma menos clara, con la activación del complemento³². La importancia de la CCDA ha sido demostrada en modelos animales, donde ratones deficientes en FcγR muestran una reducida respuesta antitumoral al trastuzumab³³, y en modelos clínicos³⁴.

La fracción Fab del trastuzumab se une al dominio IV extracelular del HER2 no involucrado en la dimerización (existen aproximadamente 500 000 receptores en la membrana plasmática de las células tumorales Her2+ vs 20 000 en las células normales) y por lo tanto bloquea la de señales río abajo mediada por el HER2. Se inhibe la vía PI3K/AKT (por activación de PTEN) y la vía RAS/Raf/MAP quinasa. Además, se induce a la proteína p27 que disminuye la actividad de la quinasa dependiente de la ciclina tipo2 (CDK2) frenando la progresión del ciclo celular y la reducción de la angiogénesis por inhibición del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)^{15, 24, 29}.

Igualmente, la unión del trastuzumab al Her2 impide o retrasa el *clivage* por proteólisis del dominio extracelular y por lo tanto la aparición del activo receptor truncado p95Her2³⁵. La endocitosis del Her2 ha sido otro de los mecanismos propuestos del trastuzumab basados en estudios preclínicos³⁶. Finalmente, el sinergismo entre el trastuzumab con agentes quimioterápicos y la radiación se explican por la inhibición de la reparación del DNA^{37, 38}.

Mecanismos de resistencia al trastuzumab

Los mecanismos de resistencia al trastuzumab se pueden clasificar en:

1. Obstáculos para la unión del trastuzumab al dominio extracelular del Her2.
2. Activación de las vías de traducción de señales río abajo del Her2.
3. Activación de vías alternativas del Her2.
4. Fallas del sistema inmunitario para destruir las células tumorales.

A su vez, la resistencia puede ser *de novo* o resistencia secundaria, que se desarrolla luego de una respuesta inicial al trastuzumab²⁹.

Muchos de los mecanismos de resistencia estudiados se han descrito *in vitro* y en modelos animales y su relevancia clínica es desconocida²⁹. Por otra parte, es probable que múltiples mecanismos de resistencia coexistan en pacientes con enfermedad heterogénea de estadios avanzados³⁹.

1. Obstáculos para la unión del trastuzumab al dominio extracelular del Her2

No se han descrito mutaciones somáticas en el dominio extracelular del receptor Her2 que impida su unión al trastuzumab¹⁵.

a. Mucina 4

La glicoproteína mucina-4 asociada a la membrana (MUC4) puede ocultar al receptor Her2 previniendo la efectiva unión al trastuzumab. La MUC4 consiste en dos glicoproteínas: la ascitis sialoproteína (ASGP-1) y la (ASGP-2) son miembros de la familia de mucina, que conforman varias glicoproteínas que constituyen barreras protectoras en los epitelios, incluyendo al mamario^{40,41}. La MUC4 puede contribuir a la progresión tumoral por su habilidad de inhibir el reconocimiento de las células cancerosas por el sistema inmune y la capacidad de activar al Her2 por interacción del dominio similar al EGF de la ASGP-2 (ligando del Her2)^{40, 42}.

Nagy y col. demostraron en la línea celular JIMT-1 establecida de una paciente con cáncer de mama, amplificación del Her2 y resistencia primaria al trastuzumab. Utilizando este modelo, los autores demostraron que el nivel de la proteína MUC4 se correlaciona inversamente con la capacidad de unión al trastuzumab y que el *knock-down* de la MUC4 utilizando un RNA de interferencia, incrementa la sensibilidad de las células JIMT-1 al trastuzumab⁴¹.

b. p95Her

Un subgrupo de tumores Her2+ (aproximadamente el 30%) pueden también coexpresar formas

truncadas del Her2 llamadas colectivamente p95Her2 y varían en peso molecular de 90 a 115 kDa. Se caracterizan por perder el dominio extracelular de unión al trastuzumab y conservar la actividad tirosinquinasa y su función oncogénica (no todas las isoformas son activas)^{43,44}. Las formas truncadas del receptor pueden formar heterodímeros con Her3, pero no con EGFR y pueden ser activadas por el ligando Heregulina, pero no por EGF⁴⁵.

Comparados con los tumores que sólo expresan el Her2 íntegro, los tumores p95Her2+ tiene peor pronóstico, mayor capacidad de metastatizar y son resistentes al trastuzumab⁴⁴.

Las formas p95Her2 se forman al menos por 2 mecanismos:

1. Por proteólisis a través de una metaloproteínasa que cliva el dominio extracelular⁴³.
2. Por iniciación alternativa de la traslación desde codones AUG internos (611 y 687)⁴⁶.

La isoforma p95/611-CTF (carboxy-terminal fragment f Her2), generada por iniciación alternativa desde el codón AUG de la posición 611 es una forma oncogénica relacionada con la progresión tumoral en cáncer de mama y la resistencia al tratamiento antiestrogénico a través de una modulación en menos del receptor estrogénico⁴⁷.

La expresión de p95Her2 se determinó en 337 muestras de tumores primarios de mama y en 81 muestras de metástasis axilares. Utilizando la técnica de Western blot que permite discriminar las formas p95Her2 y p185Her2, el 60% de los casos con fuerte positividad de p185Her2 (receptor íntegro) también expresaban p95Her2. Por el contrario, sólo el 2.1% de muestras p185Her2 negativas resultaron positivas para p95Her2 ($p < 0.001$). A diferencia de lo que ocurre con p185Her2 que se sobreexpresa en similares porcentajes en el tumor de mama primario y en las metástasis axilares, la p95Her2 se detecta en mayor porcentaje en las metástasis axilares⁴⁸.

Las formas p95Her2 también se informaron como factor pronóstico adverso en pacientes con cáncer de mama. Sáez R y col. concluyeron que la expresión de p95Her2 en tumores primarios de mama de 483 pacientes se asocia con una menor supervivencia libre de enfermedad (32 meses *vs* 139 meses en casos p95Her2 negativos; HR 2.55; $p < 0.0001$) y constituye un factor pronóstico adverso independiente según el análisis multivariado⁴⁴.

El dominio extracelular sérico es capaz de unirse al trastuzumab y acelerar su eliminación.

La determinación sérica del dominio extracelular del Her2 se ha correlacionado con recurrencia en pacientes con cáncer de mama Her2+ avanzado y la utilización como factor predictivo en el monitoreo de respuesta al trastuzumab ha tenido un bajo valor predictivo⁴⁹.

La determinación de la p95Her2 puede tener utilidad clínica como factor predictivo de respuesta a diversos fármacos antiHer2. Recientemente, se ha podido determinar la expresión de p95Her2 utilizando técnica de inmunofluorescencia en tumores embebidos en parafina (el análisis por Western blot no es factible para uso clínico)⁵⁰.

Scaltriti y col. utilizando líneas celulares MCF-7 p95Her2+ han demostrado la inhibición de la fosforilación de la p95Her2+, la reducción de la fosforilación de AKT y MAPK y la detención del crecimiento celular mediante la utilización de lapatinib (Tykerb®), una molécula de bajo peso molecular que es capaz de inhibir en forma reversible la actividad de tirosinquinasa de p95Her2, p185Her2 y EGFR (Figura 4). En contraste, el trastuzumab no tuvo efecto en este modelo.

En un ensayo clínico con 46 pacientes Her2+ metastáticos, sólo 1 de 9 pacientes (11.1%) p95 Her2+ respondió *vs* el 51% de pacientes que respondieron con p95Her2 negativo ($p = 0.029$)⁵⁰. Actualmente, el lapatinib se encuentra aprobado para su utilización en la práctica clínica en pacientes con cáncer de mama Her2+ metastático asociado a capecitabine (en pacientes progresados a antraciclinas, taxanos y trastuzumab)⁵¹ o con letrozol en pacientes Her2+ y receptores estrogénicos+⁵². Además, el sinergismo entre trastuzumab y lapatinib asociado a quimioterapia ha sido demostrado en el estudio NEOALTO de

neoadyuvancia, aumentando la tasa de respuestas completas patológicas⁵³. Otras drogas en desarrollo clínico tales como el neratinib o el axitinib, ambos inhibidores irreversibles de la actividad de tirosinquinasa de HER1/HER2, han demostrado eficacia terapéutica en pacientes progresados a trastuzumab^{54,55}.

2. Activación de las vías de traducción de señales río abajo del Her2

a. PTEN

La fosfatasa y homólogo a tensina PTEN es un gen supresor de tumores que inhibe la activación de la vía PI3K. Por lo tanto, la pérdida de la función de PTEN resulta en la sobreactivación de la vía PI3K/AKT⁵⁶. La mutación en la línea germinal de PTEN se asocia en mayor o menor grado con diversos síndromes genéticos. En el síndrome de Cowden, el 80% de los afectados tiene inactivo al PTEN. Se caracteriza por la presencia de hamartomas y predisposición a la aparición de diferentes tumores como mama (en el 30%-50% de los casos), tiroides y carcinoma de endometrio⁵⁷. La pérdida de función de PTEN ha sido comunicada en hasta el 50% de los tumores de mama y los mecanismos de disfunción son debido a mutaciones, modificaciones epigenéticas y pérdida de la heterogocidad²³.

Nagata y col. han demostrado en células de carcinoma de mama que el tratamiento con trastuzumab activa al PTEN a través de la inhibición de la proteína tirosina quinasa Src (capaz de unirse al Her2). El trastuzumab inhibe la actividad de Src por la inhibición de su unión al Her2. También se ha demostrado en estudios *in vivo* que la activación del PTEN contribuye a la función antiproliferativa del trastuzumab y que células deficientes en PTEN contribuyen a la resistencia del trastuzumab. La utilización de fármacos inhibidores de la PI3K como el LY294002 puede revertir la resistencia al trastuzumab en células deficientes de PTEN⁵⁸.

La significancia clínica de la deficiencia de PTEN ha sido evaluada en un estudio clínico retrospectivo. En 47 pacientes con cáncer de mama metastático Her2+, se determinó por técnica de inmohistoquímica la expresión de PTEN, hallándose un 36% de pacientes con negatividad en la expresión de PTEN. En dichos pacientes, la tasa de respuesta objetiva a paclitaxel + trastuzumab fue sólo del 11.1% *vs* el 65.8% de aquellos pacientes

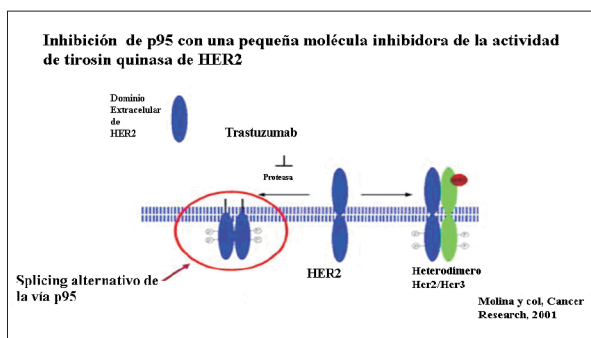


Figura 4. Mecanismo de acción del lapatinib

con sobreexpresión de PTEN ($p < 0.01$). Basado en estos resultados, se ha postulado que la determinación de PTEN puede ser un factor predictivo de respuesta al trastuzumab en la clínica, y que fármacos inhibidores de PI3K podrían utilizarse en pacientes con disfunción de PTEN para revertir la resistencia⁵⁸.

b. PI3K

La vía PI3K es la vía más frecuentemente mutada en cáncer humano, luego de las mutaciones de la proteína p53²³. El gen PI3KCA que codifica la unidad catalítica p110 α está frecuentemente mutado en diversos tumores como de mama (entre 25-30% de los casos), colon, endometrio y hepatocelular^{59,60}. Aproximadamente en el 85% de los casos se presentan 3 mutaciones en "hot spots" que resultan en la sustitución de un aminoácido, E545K y E542K en el exón 9 (dominio helicoidal) y H1047R (dominio quinasa).

El resultante de las mutaciones es un incremento en la actividad enzimática que resulta en un incremento de la actividad de AKT y promoción de la transformación oncogénica *in vitro* e *in vivo*^{61,62}. Mutaciones en el gen PI3KR1, que codifica para la subunidad p85 regulatoria y funciona como gen supresor de tumor, son muy infrecuentes en carcinoma de mama.

Las mutaciones activantes en PI3K han sido implicadas en la resistencia al trastuzumab, y promisorias drogas inhibidoras de PI3K han demostrado revertir la resistencia en modelos preclínicos. Ensayos clínicos con diversas moléculas inhibidoras de PI3K y/o inhibidores de la mTOR (enzima río abajo de PI3K/AKT) se encuentran en marcha en cáncer de mama Her2+²³.

El análisis combinado de baja expresión de PTEN y mutaciones activantes de PI3KCA (raramente observadas concomitantemente) han sido postulados como biomarcadores de resistencia al trastuzumab por Berns y col.⁶³.

c. AKT y PDK1

Células BT474 resistentes a trastuzumab, inicialmente sensibles y generadas por continua exposición a trastuzumab, tienen altos niveles de AKT fosforilado, actividad quinasa de AKT y son sensibles a inhibidores de PI3K⁶⁴. A su vez, se han descripto mutaciones activantes de AKT1 en cáncer de mama (8% de los casos)⁶⁵, pero no en tumores mamarios que sobreexpresan HER2+ (0 casos de 75 estudiados)⁶⁶. En un

estudio clínico con 45 pacientes con cáncer de mama avanzado Her2+, la sobreexpresión de AKT determinada por inmunohistoquímica no se correlacionó con respuesta a trastuzumab ni supervivencia libre de progresión. Sin embargo, en los 23 pacientes (51% de los casos) con AKT+ hubo una tendencia a menor supervivencia (69 meses *vs* 131 meses, $p = 0.091$) comparados con aquellos pacientes AKT- determinados por técnica de inmunohistoquímica⁶⁷.

La fosfatidilinosítido dependiente de quinasa tipo I (PDK-1) se sobreexpresa (por amplificación génica) en aproximadamente el 20% de los tumores de mama⁶⁸. En un estudio preclínico de Tseng y col., se logró revertir la resistencia al trastuzumab mediante la utilización de un derivado del celecoxib inhibidor de la PDK-1 en células SKBR3 resistentes a trastuzumab, línea celular que sobreexpresa el receptor de crecimiento insulino-símil tipo I (IGF-IR)⁶⁹ (Figura 5).

3. Activación de vías alternativas del Her2

La utilización por parte de las células tumorales Her2+ de vías de escape independientes de la activación del Her2 ha sido vinculada con resistencia al trastuzumab en modelos preclínicos y clínicos²⁹ (Figura 6).

a. Receptor del factor de crecimiento insulino-símil tipo I (IGF-IR)

El IGF-IR es un receptor transmembrana con actividad de tirosinkinasa frecuentemente expresado en cáncer de mama y su activación por los ligandos IGF, promueve proliferación, proliferación celular y activa la cascada metastásica²⁴.

Lu y col. publicaron por primera vez, en un estudio *in vitro*, que la activación del IGF-IR interfiere con la acción del trastuzumab. En células MCF-7/HER-18 que sobreexpresan Her2 y expresan IGF-IR, el trastuzumab inhibe la proliferación de las células tumorales sólo en un medio libre del ligando IGF-I. En células SKBR3 que sobreexpresan Her2 pero poco IGF-IR, el trastuzumab inhibe la proliferación celular en un 42% aun en un medio con IGF-I. Si se modifican genéticamente las células SKBR3 para expresar IGF-IR, el trastuzumab no tiene efecto inhibitorio sobre la proliferación en un medio con IGF-I. Dicha resistencia logró demostrarse que es reversible utilizando la proteína 3 de unión al IGF, molécula que inhibe la señalización del IGF-IR⁷⁰.

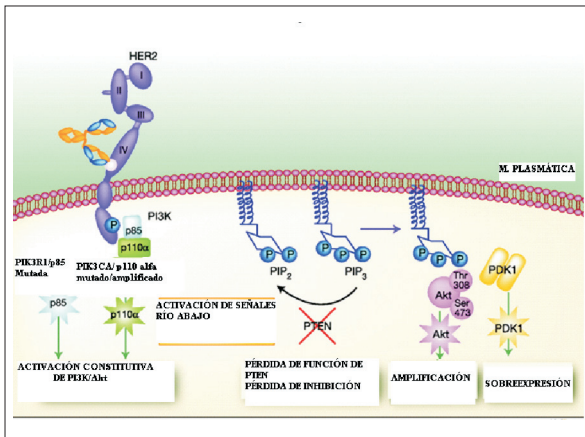


Figura 5. Activación de las vías de traducción de señales río abajo del Her2

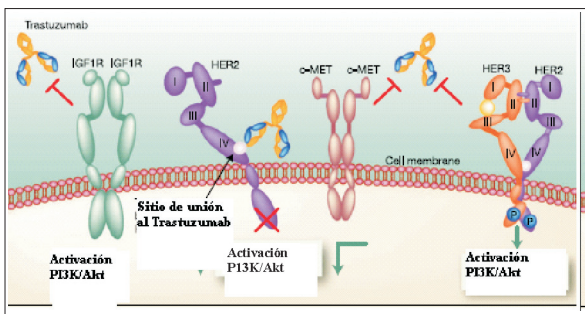


Figura 6. Activación de vías alternativas del Her2

Nahta y col. demostraron la presencia de una interacción (“cross talk”) entre IGF-IR y Her2 en células resistentes a trastuzumab. La activación de IGF-IR/Her2 disminuye los niveles de p27kip1, un crítico regulador que frena la progresión del ciclo celular. En células SKBR3 estimuladas con IGF-1 se observa una marcada fosforilación del Her2 en células resistentes a trastuzumab y no en las células sensibles. La utilización de un anticuerpo monoclonal contra el IGF-IR, el anticuerpo α -IR3, disrumpe la interacción física entre IGF-IR y Her2 restaurando dramáticamente la sensibilidad al trastuzumab. El pertuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado que presenta sinergismo clínico con trastuzumab y que impide la dimerización del Her2 con otros receptores de la familia Her (EGFR y Her3), también demostró revertir parcialmente la resistencia al trastuzumab generada por el *cross talk* entre IGF-IR y Her2⁷¹.

En un estudio clínico de neoadyuvancia se incluyeron 45 pacientes con cáncer de mama Her2+ estadios II/III y se trataron con trastuzumab y vinorelbine. La expresión de IGF-IR en la

membrana celular, se asoció con menor tasa de respuesta (50% vs. 97%, $p = 0.001$), sugiriendo cierta resistencia relativa a la combinación de trastuzumab y vinorelbine⁷².

El IGF-1 es un potencial blanco terapéutico que se encuentra en evaluación clínica en tumores resistentes al trastuzumab.

b. Familia Her: EGFr y Her3

La dimerización de los otros miembros de la familia Her como el homodímero EGFr/EGFr o el heterodímero EGFr/Her3 podrían reemplazar las funciones resultantes de la activación del Her2²⁹. En células tumorales en cultivo Her2+, la exposición crónica a trastuzumab resultó en resistencia y en aumento de la expresión de EGFr/Her3, y la utilización de inhibidores de EGFr revirtió la resistencia⁷³. Sin embargo, la investigación clínica en un estudio fase I/II combinando trastuzumab con gefitinib (un inhibidor de EGFr) no resultó en actividad sinérgica e improbablemente supere la actividad del trastuzumab utilizada como monodrogas⁷⁴.

El factor de crecimiento transformante α (TGF- α) es un ligando del EGFr. Valabrega y col. comunicaron la expresión de TGF- α (en biopsias de metástasis) en pacientes que adquieren resistencia secundaria al trastuzumab (sin expresión de TGF- α en la metástasis previo al tratamiento con trastuzumab). Los mismos investigadores posteriormente diseñaron un estudio *in vitro* con líneas celulares Her2+, sensibles a trastuzumab y productoras de TGF- α .

En dichas células, el trastuzumab fue incapaz de inhibir la proliferación. Se concluye que el TGF α puede ser uno de los mecanismos de escape a la inhibición del Her2 por parte del trastuzumab⁷⁵.

El Her3 es el acompañante preferido del Her2 en la dimerización. El trastuzumab es incapaz de bloquear el dímero Her2/Her3; en cambio, el pertuzumab se une a un bolsillo del dominio extracelular del Her2 necesario para la dimerización, impidiéndola y reduciendo la activación de la vía PI3K/AKT. Se ha demostrado sinergismo con el trastuzumab tanto en ensayos preclínicos como clínicos^{76,77}.

c. c-Met

El receptor de tirosinquinasa c-Met y su ligando, el factor de crecimiento hepatocítico (HGF), está frecuentemente sobreexpresado en cáncer

de mama y su sobreexpresión se asocia a menor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. Aproximadamente el 25% de los tumores de mama Her2+ pueden marcar positivamente para c-Met por técnicas de inmunohistoquímica y la coexpresión de ambos receptores se asocia a mayor capacidad invasiva^{78,79}.

La amplificación de c-Met ha sido implicada en la resistencia adquirida al gefinitib en pacientes con carcinoma de pulmón de células no pequeñas con mutación del EGF⁸⁰.

Shattuck y col. demostraron en estudios *in vitro* que la expresión de c-Met en células Her2+ impide la acción inhibitoria del trastuzumab por disminución de los niveles de p27 y que dicha resistencia puede revertirse utilizando RNA de interferencia contra c-Met por la utilización de inhibidores de tirosinquinasa contra c-Met. Se encuentran en desarrollo fármacos inhibidores de c-Met⁷⁸.

d. p27

La proteína p27 es un inhibidor del ciclo celular por su capacidad de bloquear a la quinasa dependiente de ciclina tipo 2 (CDK-2). El trastuzumab incrementa la vida media de p27 y favorece la unión a los complejos de CDK2, deteniendo el ciclo celular en G1. La p27 es un regulador distal de la convergencia de diversas vías que incluyen EGFR, Her2 y IGF-IR²⁹.

Nahta y col. demostraron en líneas celulares SKBR3 resistentes a trastuzumab, bajos niveles de p27 y elevada actividad de CDK2. La inducción farmacológica de p27 por un inhibidor del proteosoma (MG132) restauró la sensibilidad de las células al trastuzumab confirmando que la p27 es un crítico mediador de la respuesta al trastuzumab y potencial marcador predictor de respuesta al anticuerpo⁸¹.

e. SRC

La proteína citoplasmática SRC con actividad de tirosinquinasa se encuentra hiperactivada en varios modelos de resistencia al trastuzumab. Interactúa con múltiples receptores de tirosinquinasa y facilita la traducción de señales al interior celular. Ha sido identificada como componente común de diferentes mecanismos de resistencia de *novο* y adquirida, incluyendo la activación alternativa de otros receptores tirosinquinas y deficiencia de PTEN. Por dicho motivo, la proteína SRC se considera un atractivo blanco terapéutico para vencer las

diversas resistencias que coexisten en tumores avanzados Her2+. Zhang y col. recientemente publicaron un experimento en el que se demuestra que SRC se encuentra activado en células con resistencia adquirida y de *novο* al trastuzumab y que la inhibición de la SRC por saracatinib revierte la resistencia al trastuzumab *in vitro* e *in vivo*. Los mismos autores también comunicaron que en 57 pacientes la expresión de SRC (determinada por inmunohistoquímica) se correlaciona con pobre respuesta al trastuzumab. El inhibidor de SRC saracatinib asociado a trastuzumab se encuentra en etapa de investigación clínica³⁹.

4. Fallas del sistema inmunitario para destruir las células tumorales

Ciertos polimorfismos de nucleótido simple (SNP) del receptor γ del Fc localizados en las células del sistema inmune, se asocian con mayor capacidad de CCDA y con mayores tasas de respuestas objetivas y supervivencia libre de progresión¹⁵.

Tamura y col. han publicado recientemente que el polimorfismo Fc γ R2A-131 H/H en la población asiática predice mayor tasa de respuesta completa patológica en neoadyuvancia, y mayores respuestas objetivas en pacientes con enfermedad metastásica⁸².

Contrariamente, el polimorfismo Fc γ RIIIa V/F (se reemplaza fenilalanina por valina en el aminoácido 158) interfiere con la capacidad de generar CCDA en estudios *in vitro*, y en la clínica en pacientes metastásicos se observa menor tasa de respuesta y supervivencia libre de progresión (Figura 6)³⁴. Utilizando una compleja tecnología basada en las estructuras tridimensionales de proteínas, se intenta modificar en laboratorio la región Fc de los anticuerpos monoclonales “adaptándola” al polimorfismo del receptor γ del Fc del paciente a ser tratado con el anticuerpo monoclonal, para lograr una alta afinidad de unión y por lo tanto una eficaz CCDA⁸³.

En conclusión, el desarrollo preclínico y clínico del trastuzumab es un exitoso modelo de terapia blanco específica en cáncer de mama. El beneficio demostrado del trastuzumab con criterio adyuvante en el cáncer de mama temprano Her2+, ha sido uno de los mayores logros en los últimos años de la investigación en oncología. Sin embargo, la presencia de resistencia primaria y adquirida al trastuzumab limita la utilidad clínica del anticuerpo.

Elucidar los mecanismos moleculares generadores de resistencia es de enorme importancia para el diseño de nuevas drogas antiHer2 que permitan mejorar las tasas de curación y supervivencia de los pacientes. La identificación de biomarcadores moleculares predictivos de respuesta a los diversos fármacos antiHer2 en desarrollo permitirá personalizar y optimizar las nuevas terapias.

Conflictos de interés: El autor declara no tener conflictos de interés.

Bibliografía

- 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; 235: 177-82.
- Kaufman B, Mackey J, Clemens M, et al: Trastuzumab plus anastrozole prolongs progression free survival in postmenopausal women with HER-positive, hormone-dependent metastatic breast cancer (MBC). Presented at the 31st European Society for Medical Oncology Congress, Istanbul, Turkey, September 29-October 3, 2006
- Pritchard KL, Shepherd LE, O'Malley FP, et al. HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006; 354: 2103-11.
- Ross JS, Fletcher JA, Linette GP. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist* 2003; 8: 307-25.
- Paik S, Hazan R, Fisher ER, et al. Pathologic finding from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project: prognostic significance of erbB-2 protein expression in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1990; 8: 103-12.
- Kallioniemi OP, Holli K, Visakorpi T, Koivula T, Helin HH, Isola JJ. Association of c-erbB-2 protein over-expression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer. *Int J Cancer* 1991; 49: 650-5.
- Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2639-48.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001; 344: 783-92.
- Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4265-74.
- Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 1673-84.
- Slamon D, Eiersmann W, Robert N, et al. BCIRG 006 phase III trial comparing AC→T with AC→TH and with TCH in the adjuvant treatment of HER2-amplified early breast cancer patients: third planned efficacy analysis. Presented at the 32nd Annual San Antonio Breast Cancer Symposium. December 9-13, 2009.
- Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 1659-72.
- Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, et al. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14: 737-44.
- Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 719-26.
- Nahta R, Yu D, Hung MC, Hortobagyi GN, Esteva FJ. Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2006; 3: 269-80.
- Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, et al. Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3: 379-98.
- Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signaling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 127-37.
- Tzahar E, Waterman H, Chen X, et al. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 5276-87.
- Roskoski R Jr. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 319: 1-11.
- Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist* 2009; 14: 320-68.
- Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 481-507.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005; 307: 1098-101.
- Markman B, Atzori F, Pérez-García J, Tabernero J, Baselga J. Status of PI3K inhibition and biomarker development in cancer therapeutics. *Ann Oncol* 2010; 21: 683-91.
- Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncol* 2007; 18: 977-84.
- Pérez-Tenorio G, Stål O; Southeast Sweden Breast Cancer Group. Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients. *Br J Cancer* 2002; 86: 540-5.
- Stål O, Pérez-Tenorio G, Akerberg L, et al. Akt kinases in breast cancer and the results of adjuvant therapy. *Breast Cancer Res* 2003; 5: R37-R44.
- Tokunaga E, Kataoka A, Kimura Y, et al: The association between Akt activation and resistance to hormone therapy in metastatic breast cancer. *Eur J Cancer* 42: 629-635, 2006
- Press MF, Lenz HJ. EGFR, HER2 and VEGF pathways: validated targets for cancer treatment. *Drugs* 2007; 67: 2045-75.
- Pohlman PR, Mayer IA, Mernaugh R. Resistance to trastuzumab in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 7479-91.

30. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 2000; 6: 443-6.
31. Barok M, Isola J, Pályi-Krekk Z, et al. Trastuzumab causes antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated growth inhibition of submacroscopic JIMT-1 breast cancer xenografts despite intrinsic drug resistance. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 2065-72.
32. Spiridon CI, Guinn S, Vitetta ES. A comparison of the in vitro and in vivo activities of IgG and F(ab')₂ fragments of a mixture of three monoclonal anti-Her-2 antibodies. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3542-51.
33. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 2000; 6: 443-6.
34. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, et al. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RIIII, FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem* 2001; 276:6591-604.
35. Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61: 4744-9.
36. Hommelgaard AM, Lerdrup M, van Deurs B. Association with membrane protrusions makes ErbB2 an internalization-resistant receptor. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 1557-67.
37. Pietras RJ, Fendly BM, Chazin VR, Pegram MD, Howell SB, Slamon DJ. Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene* 1994; 9: 1829-38.
38. Pietras RJ, Poen JC, Gallardo D, Wongvipat PN, Lee HJ, Slamon DJ. Monoclonal antibody to HER-2/neu receptor modulates repair of radiation-induced DNA damage and enhances radiosensitivity of human breast cancer cell over-expressing this oncogene. *Cancer Res* 1999; 59: 1347-55.
39. Zhang S, Huang WC, Li P, et al. Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways. *Nat Med* 2011; 17: 461-9.
40. Price-Schiavi SA, Jepson S, Li P, et al. Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance. *Int J Cancer* 2002; 99: 783-91.
41. Nagy P, Friedländer E, Tanner M, et al. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res* 2005; 65: 473-82.
42. Carraway KL, Price-Schiavi SA, Komatsu M, Jepson S, Perez A, Carraway CA. Muc4/sialomucin complex in the mammary gland and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001; 6: 323-37.
43. Christianson TA, Doherty JK, Lin YJ, et al. NH2-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and prognostic factors in breast cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5123-9.
44. Sáez R, Molina MA, Ramsey EE, et al. p95HER-2 predicts worse outcome in patients with HER-2 positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 424-31.
45. Xia W, Liu LH, Ho P, Spector NL. Truncated ErbB2 receptor (p95ErbB2) is regulated by heregulin through heterodimer formation with ErbB3 yet remains sensitive to the dual EGFR/ErbB2 kinase inhibitor GW572016. *Oncogene* 2004; 23: 646-53.
46. Anido J, Scaltriti M, Bech Serra JJ, et al. Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation. *EMBO J* 2006; 25: 3234-44.
47. Parra-Palau JL, Pedersen K, Peg V, et al. A major role of p95/611-CTF, a carboxy-terminal fragment of HER2, in the down-modulation of the estrogen receptor in HER2-positive breast cancers. *Cancer Res* 2010; 70: 8537-46.
48. Molina MA, Sáez R, Ramsey EE, et al. NH(2)-terminal truncated HER-2 protein but not full-length receptor is associated with nodal metastasis in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 347-53.
49. Lennon S, Barton C, Banken L, et al. Utility of serum HER2 extracellular domain assessment in clinical decision making: pooled analysis of four trials of trastuzumab in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1685-93.
50. Scaltriti M, Rojo F, Ocaña A, et al. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 628-38.
51. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2006; 355: 2733-43.
52. Johnston S, Pippin J Jr, Pivov X, et al. Lapatinib combined with letrozole versus letrozole and placebo as first-line therapy for postmenopausal hormone receptor-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5538-46.
53. Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H, et al. First results of the NeoALTTO trial (BIG 01-06 / EGF 106903): a phase III, randomized, open label, neoadjuvant study of lapatinib, trastuzumab, and their combination plus paclitaxel in women with HER2-positive primary breast cancer. San Antonio Breast Cancer Symposium, 2010.
54. Burstein HJ, Sun Y, Dirix LY, et al. Neratinib, an irreversible ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced ErbB2-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1301-7.
55. Rugo HS, Stopeck AT, Joy AA, et al. Randomized, placebo-controlled, double-blind, phase II study of axitinib plus docetaxel versus docetaxel plus placebo in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2459-65.
56. Simpson L, Parson R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res* 2001; 264: 29-41.
57. Liaw D, Marsh DJ, Li J, et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, as inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet* 1997; 16: 64-7.
58. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 2004; 6: 117-27.
59. Campbell IG, Russell SE, Choong DY, et al. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 7678-81.
60. Lee JW, Soung YH, Kim SY. PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinoma and hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 2005; 24: 1477-80.
61. Kang S, Bader AG, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 802-7.
62. Samuels Y, Diaz LA Jr, Schmidt-Kittler O, et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* 2005; 7: 561-73.
63. Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, et al. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major

- determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell* 2007; 12: 395-402.
64. Chan CT, Metz MZ, Kane SE. Differential sensitivities of trastuzumab (Herceptin)-resistant human breast cancer cells to phosphoinositide-3 kinase (PI-3K) and epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase inhibitors. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 91: 187-201.
 65. Dunlap J, Le C, Shukla A, et al. Phosphatidylinositol-3-kinase and AKT1 mutations occur early in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 120: 409-18.
 66. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, et al. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 6084-91.
 67. Gori S, Sidoni A, Colozza M, et al. EGFR, pMAPK, pAKT and PTEN status by immunohistochemistry: correlation with clinical outcome in HER2-positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab. *Ann Oncol* 2009; 20: 648-54.
 68. Brugge J, Hung MC, Mills GG. A new mutational activation in the PI3K pathway. *Cancer Cell* 2007; 12: 104-7.
 69. Tseng PH, Wang YC, Weng SC, et al. Overcoming trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancer cells by using a novel celecoxib-derived phosphoinositide-dependent kinase-1 inhibitor. *Mol Pharmacol* 2006; 70: 1534-41.
 70. Lu Y, Zi X, Zhao Y, Mascarenhas D, Pollak M. Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1852-7.
 71. Nahta R, Yuan LX, Zhang B, Kobashayi R, Esteva FJ. Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65: 1118-28.
 72. Harris LN, You F, Schnitt SJ, et al. Predictors of resistance to preoperative trastuzumab and vinorelbine for HER-2 positive early breast cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1198-207.
 73. Narayan M, Wilken JA, Harris LN, Baron AT, Kimbler KD, Maihle NJ. Trastuzumab-induced HER reprogramming in "resistant" breast carcinoma cells. *Cancer Res* 2009; 69: 2191-4.
 74. Arteaga CL, O'Neil A, Moulder SL, et al. A phase I-II study of combined blockade of the ErbB receptor network with trastuzumab and gefitinib in patients with HER2 (ErbB)-overexpressing metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 6277-83.
 75. Valabrega G, Montemurro F, Giordano S, et al. TGF α expression impairs trastuzumab-induced Her2 downregulation. *Oncogene* 2005; 24: 3002-10.
 76. Nahta R, Hung MC, Esteva FJ. The HER-2 targeting antibodies trastuzumab and pertuzumab synergistically inhibit the survival of breast cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64: 2343-6.
 77. Muñoz-Mateu M, Urriticoechea A, Separovic R, et al. Trastuzumab plus capecitabine with or without pertuzumab in patients with HER2-positive MBC whose disease has progressed during or following trastuzumab-based therapy for first-line metastatic disease: A multicenter, randomized, two-arm, phase II study (PHEREXA). Presented at ASCO 2011.
 78. Shattuck D, Miller JK, Carraway KL 3rd, Sweeney C. Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68: 1471-7.
 79. Camp RL, Rimm EB, Rimm DL. Met expression is associated with poor outcome in patients with axillary lymph node negative breast carcinoma. *Cancer* 1999; 86: 2259-65.
 80. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007; 316: 1039-43.
 81. Nahta R, Takahashi T, Ueno NT, Hung MC, Esteva FJ. P27(kip1) down-regulation is associated with trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64: 3981-6.
 82. Tamura K, Shimizu C, Hojo T, et al. Fc γ R2A and 3A polymorphisms predict clinical outcome of trastuzumab in both neoadjuvant and metastatic settings in patients with HER2-positive breast cancer. *Ann Oncol* 2011; 22: 1302-7.
 83. Lazar G, Dang W, Karki S, et al. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 4005-10.