



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**ESTUDIO *IN VITRO* DE INHIBIDORES DE CINASA SOBRE CÉLULAS HER2-
POSITIVOS (BT474 Y SKBR3) RESISTENTES A TRASTUZUMAB**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

JOSÉ ANSELMO LÓPEZ MÉNDEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

COMITÉ TUTORAL: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN".

MÉXICO, CD. MX. DICIEMBRE, 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**ESTUDIO *IN VITRO* DE INHIBIDORES DE CINASA SOBRE CÉLULAS HER2-
POSITIVOS (BT474 Y SKBR3) RESISTENTES A TRASTUZUMAB**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

JOSÉ ANSELMO LÓPEZ MÉNDEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

COMITÉ TUTORAL: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN".

MÉXICO, CD. MX. DICIEMBRE, 2017.

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de septiembre del 2017, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **LÓPEZ MÉNDEZ JOSÉ ANSELMO** con número de cuenta **516011574** con la tesis titulada "**Estudio *In vitro* de inhibidores de cinasa sobre células HER2-positivo (BT-474 y SKBR-3) resistentes a Trastuzumab**", realizada bajo la dirección del **DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA**:

Presidente: DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS
Vocal: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Secretario: DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA
Suplente: DR. MARCO ANTONIO VELASCO VELÁZQUEZ
Suplente: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 14 de noviembre del 2017.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



Agradecimientos.

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por darme la oportunidad de ingresar a tan prestigiado posgrado y permitirme cumplir un objetivo más en mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico recibido durante los dos años de la maestría (CVU 586475).

A mi tutor principal, el Dr. Alejandro Zentella Dehesa, por aceptarme como su alumno, compartir sus conocimientos e introducirme al mundo de la investigación del cáncer.

A los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Mariano Martínez Vázquez y la Dra. Nadia Judith Jacobo Herrera, por sus asesorías, orientación, y sus grandes aportes en el desarrollo de este proyecto.

Agradecimiento personal.

Agradezco infinitamente a los doctores Alejandro Zentella Dehesa, Mariano Martínez Vázquez, y Nadia Judith Jacobo Herrera, por aceptarme como su alumno, por guiarme en la búsqueda de conocimiento y por sus apoyos incondicionales. Pilares en mi formación profesional.

También agradezco enormemente la Dra. Alma Rosa González Esquinca y la Dra. Lorena Mercedes Luna Cázares, por ayudarme a dar ese pequeño pero gran paso en mi vida profesional. Los cimientos en mi formación profesional.

A mis dos grandes amigas y compañeras del laboratorio, Beatriz del Carmen Couder García y Zaira Tarez Santamaría, por brindarme su gran amistad y hacer ameno cada momento de mi estancia en la maestría.

A mi amigo, Luis Robles, por su incondicional ayuda y compartir sus conocimientos durante el tiempo que convivimos.

A mis compañeros de laboratorio Alberto Cabrera, Ernesto Badillo, Sergio Contreras, Martín Gallardo, Alejandro García, Beatriz Mora y Ana Lura Colín por sus enseñanzas y su amistad brindada.

A la Dra. María de Jesús Ibarra Sánchez, por la su generosa donación de anticuerpos.

Al personal administrativo, Tere Zavala, y al personal de mantenimiento, el Sr. José Manuel García, la Srita. Mariana Gpe. Benítez y la Sra. Manuela Gallaga, por su ayuda y facilitación de material de laboratorio.

A mi tía Evelia Trinidad y a su hermosa familia, así como a mis padrinos Aquilio Salinas y Yolanda Vázquez, quienes muy generosamente me abrieron las puertas de su casa y de su amistad.

Dedicatorias

Dedico el presente trabajo al ser máspreciado de mi vida, a mi abuelita Soledad Méndez Álvares, quien me motivó y me impulso a seguir los sueños que juntos nos trazamos desde que era infante.

También se la dedico a mí padre, Gustavo Santos Vázquez, quien con todo su apoyo, esmero y sabios consejos, me ha ayudado a seguir adelante.

A mí madre, Esperanza López Méndez, y a mi tía, Candelaria López Méndez, quienes me han motivado y aconsejado sabiamente en cada decisión de mi vida.

A mis hermanos, Karen, Milton, Ariana, Ramón, Gustavo y Héctor, por no dejarme caer y contar con ellos en cada adversidad.

A mis sobrinos, Kevin y Azul, quienes me motivan a seguir adelante y dar lo mejor de mí.

A mis tíos Juan López y Sandra Argüello, y familia, quienes me apoyan incondicionalmente.

A mis demás familiares, quienes me motivan a seguir sin flanquear.

ÍNDICE

RESUMEN.

ABSTRACT.

1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- MARCO TEÓRICO	4
2.1.- Familia EGFR/ERBB/HER	4
2.1.1.- HER2.....	7
2.2.- Cáncer de mama HER2-positivo.....	8
2.2.1.-Tratamiento contra el cáncer de mama HER2-positivo	9
2.2.2.- Trastuzumab (TTZ)	10
2.2.3.- Mecanismo de resistencia del cáncer de mama HER2-positivo a TTZ	11
2.3.- Familia Src cinasa	12
2.3.1.- Cinasa c-Src.....	13
2.4.- Cinasa PI3.....	15
2.4.1.- PI3K clase IA.....	15
2.5.- AKT	18
3.- ANTECEDENTES	20
4.- HIPÓTESIS	22
5.- OBJETIVO GENERAL	23
5.1.- Objetivos específicos	23
6.- MÉTODO	24
6.1.- Cultivo celular.....	24
6.2.- Generación de células resistentes a TTZ.....	24
6.3.- Viabilidad celular	25
6.4.- Expresión y estado de fosforilación de HER2 y c-Src en BT474 y SKBR3 . .	25
6.5.- Obtención de la concentración media inhibitoria (IC ₅₀)	27
6.6.- Análisis estadístico.....	27
7.- RESULTADOS.....	29
7.1.- Expresión de HER2 y c-Src en líneas celulares no resistente a TTZ.....	29
7.2.- Respuesta antiproliferativa y resistencia a TTZ	30

7.3.- Expresión de HER2 y c-Src durante la inducción de resistencia a TTZ	36
7.4.- Respuesta a la combinación TTZ más inhibidores de cinasa	39
7.4.1.- Valoración individual de los inhibidores de cinasa en células BT474 y BT474-R.....	40
7.4.2.- Valoración de los inhibidores de cinasa combinados con TTZ en células BT474 y BT474-R.....	43
8.- DISCUSIÓN	51
9.- CONCLUSIÓN	55
10.- PERSPECTIVAS.....	56
11.- BIBLIOGRAFÍA	57
12.- ANEXOS	68

RESUMEN.

El cáncer de mama HER2-positivo es una de las principales causas de muerte en mujeres por neoplasias, representa del 20-30% de todos los tipos de cáncer de mama y se caracteriza por ser agresivo y de mal pronóstico. Sin embargo, el desarrollo de terapias blanco como Trastuzumab (TTZ) ha permitido mejorar y prolongar la supervivencia de pacientes con este tipo de padecimiento. A pesar de ello, la tasa de respuesta, como monoterapia, es baja (11-26%) y del grupo con respuesta, la mayoría desarrolla resistencia después de un año de tratamiento. Se han identificado diferentes mecanismos moleculares de resistencia a TTZ entre los que destaca la activación de cinasas citoplásmicas como c-Src.

Para probar la importancia de c-Src en esta resistencia a TTZ se diseñó un modelo *In vitro* de inducción de resistencia a TTZ en células HER2-positivos (BT474 y SKBR3). Nuestros resultados muestran que las células resistentes a TTZ (BT474-R) presentan disminución en el estado de fosforilación de c-Src. Sin embargo, el nivel de expresión del receptor de progesterona beta ($PR\beta$) se incrementa significativamente. Por otra parte, los estudios dosis respuestas de los inhibidores de cinasa probados (dasatinib, lapatinib, nintedanib y sorafenib) muestran que las células resistentes a TTZ son sensibles a lapatinib pero que la combinación con TTZ no aumenta su toxicidad significativamente. Sin embargo, la mejor combinación para vencer la resistencia fue dasatinib con bajas dosis de TTZ (5 y 10 $\mu\text{g/ml}$).

ABSTRACT.

The HER2-positive breast cancer is one of the main causes of death in women due to neoplasia. It represents around 20-30% of all breast cancer types and is characterized by being aggressive and of bad prognosis. However, the development of target therapy such as Trastuzumab (TTZ) has allowed to improve and prolong the survival of patients with this type of disease. Nonetheless, the response rate, as monotherapy, is low (11-26%). From the patients that respond, the majority develop resistance after one year of treatment. Different molecular mechanisms of resistance to TTZ have been identified, among them, the activation of cytoplasmic kinases such as c-Src.

To test the importance of c-Src in this resistance to TTZ, an in vitro model of induction of resistance to TTZ in HER2-positive cells (BT474 and SKBR3) was designed. Our results show that TTZ-resistant cell (BT474-R) exhibit a decrease in the state of c-Src phosphorylation. However, the expression level of progesterone beta (PR β) receptor is significantly increased. On the other hand, the dose-response studies of the tested kinase inhibitors (dasatinib, lapatinib, nintedanib and sorafenib) show that TTZ-resistant cells are sensitive to lapatinib but that the combination with TTZ does not increase its cytotoxicity. However, the best combination to overcome the resistance was dasatinib with low doses of TTZ (5 y 10 μ g/ml).

1.- INTRODUCCIÓN.

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por neoplasia en la mujer a nivel mundial con 571,000 decesos en el 2015, de los cuales el 70% ocurrieron en países en desarrollo (WHO. 2017). En México, a partir del 2006, esta neoplasia ocupa el primer lugar de mortalidad en mujeres mayores de 25 años, por encima del cáncer cervicouterino; su incidencia ha ido en aumento, en el año 2001 se reportaron 3,971 casos y para el 2012 el número se elevó a 20,444 casos (GLOBOCAN, 2012; Cárdenas-Sánchez, *et al.*, 2015) siendo los 50 años la edad media de diagnóstico (Chávarri-Guerra, *et al.* 2012).

Este tipo de cáncer exhibe un amplio rango de fenotipos morfológicos y tipos histológicos con características clínicas y pronóstico particulares que hoy en día se reconocen como subgrupos diferentes con diferente pronóstico y tratamiento (González-Niño, *et al.*, 2007). La clasificación histológica ha permitido clasificar a la mayoría como carcinomas invasivos derivados del epitelio ductal (75%), mientras que los carcinomas derivados del epitelio lobulillar son menos frecuentes (cerca del 25%), adicionalmente, se han identificado formas histopatológicas o clínicas como el cáncer de mama inflamatorio o el medular que representan menos del 5% de todas las formas de cáncer de mama (Sandhu, *et al.*, 2010).

El pronóstico, tratamiento y consecuentemente la sobrevida han mejorado con el advenimiento de una clasificación molecular que se basa en perfiles de expresión génica derivados de microarreglos, que distinguen cuatro formas: i) lumbinales A y B (55%) que expresan receptor de estrógeno y progesterona pero difieren en la expresión del receptor al factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER2), ii) la forma HER2-positiva (20%) que sobreexpresa HER2 y carece de la expresión de receptores para estrógenos y progesteronas, iii) la forma triple negativa (20%) que no expresa ninguno de estos tres receptores y iv) cáncer de mama hereditario (5%) que presenta mutaciones en *BRCA-1*, *BRCA-2* y en otros genes de reparación (Sorlie, *et al.*, 2001; Sandhu, *et al.*, 2010).

El receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER2) se homodimeriza o heterodimeriza con otros miembros de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico. La importancia en la señalización de estos heterodímeros queda demostrada ya que los heterodímeros HER2-HER1; HER2-HER3; y HER2-HER4 activan la vía PI3K dando como resultado una cascada de señalización proliferativa en las células tumorales que sobreexpresan HER2 (Nahta, *et al.*, 2004a; Razumienko, *et al.*, 2012; Wu, *et al.*, 2012). La sobreexpresión de HER2 y la activación de PI3K se asocia a un fenotipo más agresivo y de peor pronóstico (Razumienko, *et al.*, 2012; Wu, *et al.*, 2012).

La posibilidad de interferir con la señalización de estos receptores en las células que sobreexpresan HER2 ha llevado al desarrollo de inhibidores como lapatinib y de anticuerpos como Trastuzumab o Pertuzumab (Moy y Goss, 2006; Bilancia, *et al.*, 2007).

El tratamiento con Trastuzumab (TTZ), un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado dirigido contra la región IV del dominio extracelular que corresponde al tallo anterior a la hélice transmembranal, se convirtió en la primera inmunoterapia con beneficio en la supervivencia global en pacientes con cáncer de mama con sobreexpresión de HER2 (Nahta, *et al.*, 2004a; Nahta y Esteva, 2006). Sin embargo, al cabo de un año de tratamiento la mayoría de estas pacientes desarrollan resistencia a este anticuerpo (Nahta y Esteva, 2006; Shah y Osipo, 2016).

Los tumores resistentes a TTZ presentan alteraciones en el estado de fosforilación de c-Src, una cinasa de residuos de tirosina asociada a proliferación y motilidad celular, misma que ha sido detectada en el carcinoma de mama y asociado con el tumor metastásico (Formisano, *et al.*, 2014, Peiró, *et al.*, 2014). Se ha propuesto que esta enzima se activa durante los procesos oncogénicos y conduce a progresión tumoral (Peiró, *et al.*, 2014). Los eventos moleculares que han sido propuestos para explicar la activación de esta enzima incluyen a los receptores con

actividad de cinasas de residuos de tirosina incluyendo a HER2 (Formisano, *et al.*, 2014).

La guía médica de la Red Nacional Integral del Cáncer (NCCN, 2015) recomienda la combinación de TTZ y agentes convencionales quimioterapéuticos durante los primeros meses de tratamiento en terapias adyuvantes, neoadyuvantes y metastásico (Du, *et al.*, 2014). Por tanto, y dado al incremento de la actividad de c-Src en el cáncer de mama HER2-positivo con resistencia a TTZ, este trabajo tiene como objetivo determinar si inhibidores de cinasa de residuos de tirosina (TKI's) (lapatinib; GSK-DB02584, dasatinib; BMS354825, nintedanib; BIBF 1120, sorafenib; BAY 545-9085) permiten vencer la resistencia a TTZ.

2.- MARCO TEÓRICO.

2.1.- Familia EGFR/ERBB/HER.

En el humano la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o ERBB posee cuatro miembros de receptores de tirosina cinasa (RTK) transmembranales: el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR/ERBB1/HER1), HER2 (ERBB2), HER3 (ERBB3) y HER4 (ERBB4) (Fig. 1) (Hynes, *et al.*, 2001; Citri y Yarden, 2006; Arteaga y Engelman, 2014). Estos receptores son expresado en una gran variedad de células de tipo epitelial, mesenquimal, neuronal y células progenitoras, donde desempeñan un papel fundamental en el desarrollo, proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Hynes, *et al.*, 2001; Zaczek, *et al.*, 2005; Roskoski, 2014).

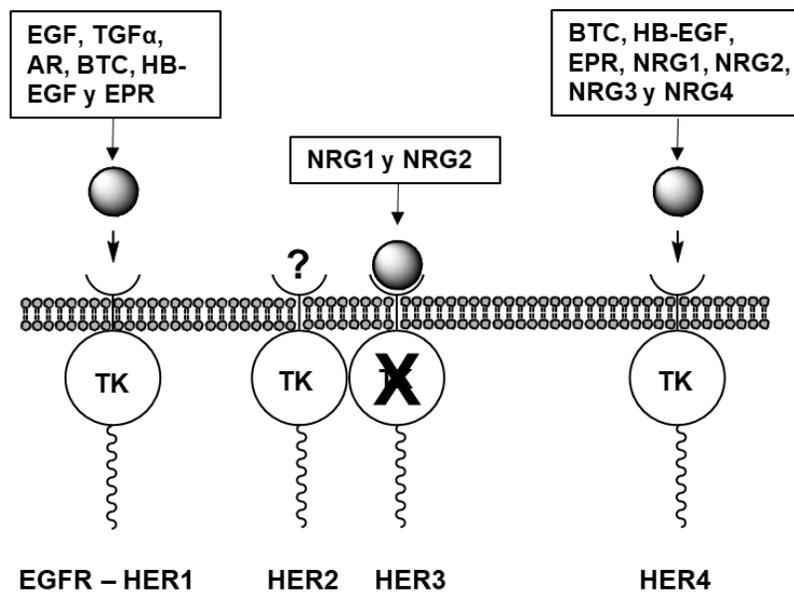


Fig. 1. Esquema de la familia EGFR. Nomenclatura de ligandos: AR - anfiregulina; BTC - betacelulina; EGF - factor de crecimiento epidérmico; EPR - epiregulina; HB-EGF - EGF unido a heparina; NRG 1-4 - neurogulina 1-4 y TGF- α - factor de crecimiento transformante alfa; TK – dominio de tirosina cinasa, X – sin actividad, ? – sin ligando (Modificado de Citri y Yarden, 2006).

Cada RTK de esta familia está formado por una dominio extracelular, un segmento transmembranal de 19 a 25 amino ácidos y un dominio intracelular de cerca de 550 aminoácidos (Holbro y Hynes, 2004; Ishikawa, *et al.*, 2011; Roskoski, 2014). A su vez, el dominio extracelular es dividido en cuatro subdominios: los subdominios I y III, ricos en leucina y participan en la unión al ligando, y los subdominios II y IV, contienen numerosos residuos de cisteínas y participan en la formación de enlaces disulfuros (Fig. 2) (Holbro y Hynes, 2004; Roskoski, 2014). La porción intracelular contiene un segmento de unión al segmento transmembranal, un dominio proteína cinasa y un extremo carboxilo terminal de 220 a 350 amino ácidos (Fig. 2) (Qiu, *et al.*, 2008; Roskoski, 2014).

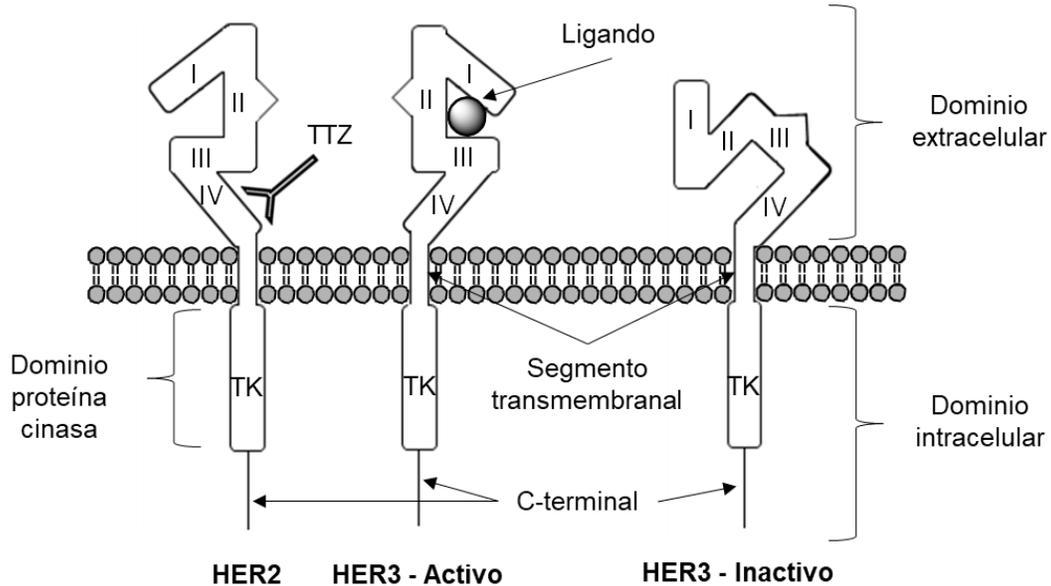


Fig. 2. Estructura general de la familia EGFR. TK – dominio de tirosina cinasa, TTZ – Trastuzumab (Modificado de Hynes y Lane, 2005).

Se conocen 13 ligandos polipeptídicos extracelulares los cuales contienen un dominio del factor de crecimiento epidérmico (EGF) conservado (Citri y Yarden, 2006). Estos ligandos se unen a los receptores de la familia EGFR con parcial especificidad y redundancia hacia ciertos receptores (Stamos, *et al.*, 2002; Citri y Yarden, 2006) lo que permite dividirlos en tres grupos: El primero incluye a EGF, TGF- α y anfiregulina (AR), los cuales son específicos para HER1 (EGFR); el

segundo grupo incluye betacelulina (BTC), EGF unido a heparina (HB-EGF) y epiregulina (EPR), los cuales se unen a HER1 y HER4; y el tercer grupo, compuesto de neurogulinas (NRGs), forma dos subgrupos basado sobre su capacidad de unirse a HER3 y HER4 (NRG-1 y NRG-2) o solo a HER4 (NRG-3 y NRG-4) (Prenzel, *et al.*, 2001; Holbro y Hynes, 2004; Hynes y MacDonald, 2009). Sin embargo, a pesar del gran número de ligandos identificados, no se ha descrito y/o identificado un ligando para HER2 (Fig. 1).

La transducción de señal de estos receptores se inicia con la unión del ligando al dominio extracelular seguido por la dimerización y trans-autofosforilación de residuos específicos de tirosina dentro del dominio citoplasmático de los receptores (Fig. 2 y 3) (Holbro y Hynes, 2004).

Los receptores activos fosforilados reclutan río abajo proteínas de señalización que contienen un sitio homólogo a SH2 de c-Src (Shc) y dominios de enlace a fosfotirosina (PTB) los cuales tienen alta afinidad por estos residuos (Holbro y Hynes, 2004; Duru, *et al.*, 2014). A niveles normales de receptor, la familia EGFR activa las vías de señalización Ras/Raf-1/MAPK, PI3K/Akt/mTOR, Src/NF κ B, catenina/citoesqueleto, PAK-1/Rac, PKC, STAT y Wnt, con efectos en el desarrollo, supervivencia, proliferación y diferenciación celular (Burgess, 2008).

En muchos tipos de cáncer, la familia EGFR se encuentra en un estado hiperactivo como resultado de diversos mecanismos que incluyen la sobreproducción de ligandos, así como la sobreproducción o activación de receptores constitutivos (Yarden y Sliwkowski, 2001). En particular, EGFR y HER2 están implicados en el desarrollo de muchos tipos de cáncer, principalmente cáncer de pulmón para EGFR o HER1 y cáncer de mama para HER2 (Belsches-Jablonski, *et al.*, 2001; Prenzel, *et al.* 2001; Hynes y Lane, 2005).

2.1.1.- HER2.

HER2 es una glicoproteína transmembranal de 185 kDa codificada por el proto-oncogén *ERBB2* localizado en el brazo largo del cromosoma humano 17 en los tejidos de tipo epitelial, mesenquimal y de origen neuronal (Duru, *et al.*, 2014). Se identificó en la década de 1980 como un gen relacionado a EGFR que fue amplificado en células de cáncer de mama (Kruser y Wheeler, 2010).

La estructura de la región extracelular de HER2 revela una mayor diferencia en comparación a la secuencia de aminoácidos de los receptores HER1 y HER3. HER2 presenta una estructura similar a la estructura activa de HER1 y HER3, es decir, la interacción de los dominios II y IV está ausente y el brazo de dimerización está expuesto (Fig. 2) (Holbro y Hynes, 2004; Pareja, *et al.*, 2015). A pesar de presentar esta configuración, HER2 es incapaz de formar homodímeros, esto posiblemente se deba a la repulsión electrostática en contraste entre los puntos de unión del subdominio II (Holbro y Hynes, 2004). Por tanto, una heterodimerización con un segundo receptor-ligando y la sobreexpresión son necesarios para su activación (Holbro y Hynes, 2004; Wang, *et al.*, 2011). Los residuos importantes de fosforilación de HER2 son Y1005, Y1023, Y1139, Y1196, Y1221/2 y Y1248, el primero y los últimos tres sirven de unión para proteínas con sitios Shc (Fig. 3) (Pareja, *et al.*, 2015).

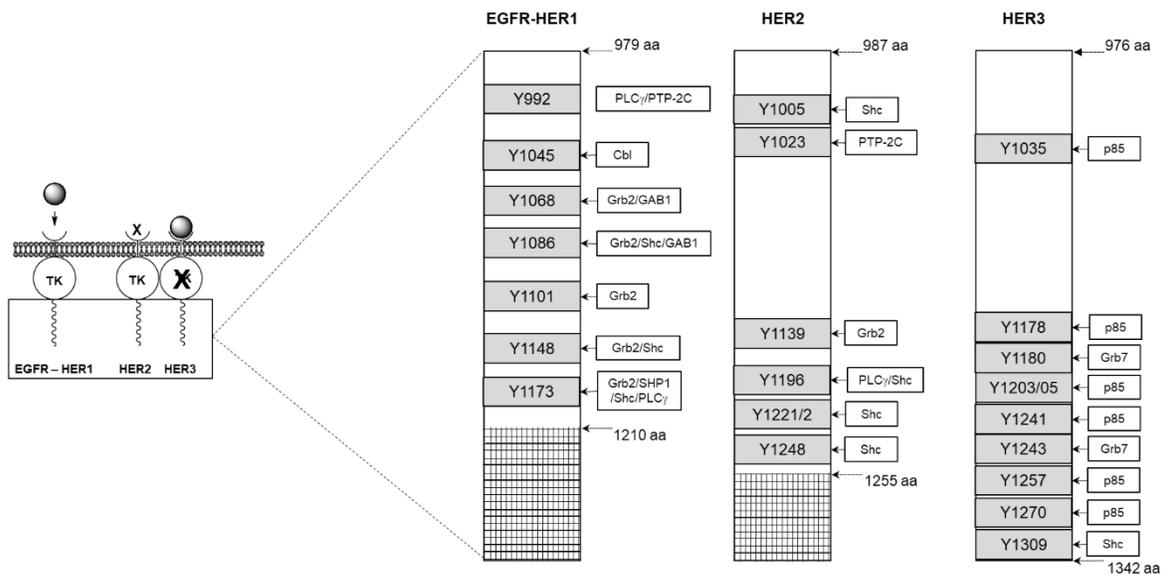


Fig. 3. Residuos de tirosinas fosforilables del extremo C-terminal de HER1, HER2 y HER3, capaces de activar y/o reclutar proteínas señalizadoras rio abajo. Cbl – sitio de unión de la proteína linfoma de linaje B (Cbl); GAB1 - sitio de unión de la proteína de unión asociado a Grb2 (GAB1); Grb2 - sitio de unión de la proteína 2 de unión al receptor del factor de crecimiento (Grb2); Grb7 - sitio de unión de la proteína 7 de unión al receptor del factor de crecimiento (Grb7); p85 – sitio de unión de la subunidad p85 de la cinasa PI3K; PLC γ – sitio de unión de la proteína fosfolipasa C gamma (PLC γ); PTP-2C – sitio de unión de la proteína fosfatasa de tirosina 2C (PTP-2c); Shc – sitio de unión de proteínas que contienen el sitio homólogo a SH2 de c-Src (Shc); SHP1 – sitio de unión de la proteína fosfatasa de tirosina de tipo no receptora que contiene el sitio homologo a SH2 (SHP1) (Modificado de Roskoski, 2014).

2.2.- Cáncer de mama HER2-positivo.

La sobreexpresión de HER2 en el cáncer de mama representa del 20% al 30% de todos los tipos de cáncer de mama en todo el mundo (Atalay, *et al.*, 2003; Toss y Cristofanilli, 2015). Se asocia con tumores agresivos de rápido crecimiento, que si bien responden al tratamiento en primera línea presentan resistencia y recurrencia asociada a metástasis, resultando en pacientes crónicos con un pobre pronóstico (Atalay, *et al.*, 2003; Duru, *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que HER2 se amplifica entre 5 y hasta 20 veces resultando en una sobreexpresión proteica que puede ser hasta de 100 veces la expresión normal (Roskoski, 2004a). Esta sobreexpresión puede resultar en una mayor frecuencia de formación de dímeros (homo-heterodímeros) conduciendo a una amplificación exagerada de una señal proliferativa fisiológica que favorece la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células tumorales (Holbro y Hynes, 2004; Roskoski, 2004a). Sin embargo, no todos los pacientes con sobreexpresión del receptor presentan amplificación génica, en estos casos la sobreexpresión de HER2 ocurre por cambios epigenéticos o mutaciones con ganancia de función en la región reguladora, alteraciones en la región UTR-5' o UTR-3' que favorecen la traducción o estabilidad del mensajero, respectivamente (Pareja, *et al.*, 2015). Las líneas de células tumorales humanas que sobreexpresan HER2 (BT474 y SKBR3) empleadas como modelo en esta tesis presentan amplificación génica de HER2 (Wang, *et al.*, 2011).

Estudios epidemiológicos muestran que pacientes con cáncer de mama que sobreexpresan HER2 viven un tercio menos que pacientes con tumores HER2-negativo (Duru, *et al.*, 2014).

2.2.1.- Tratamiento contra el cáncer de mama HER2-positivo.

Los inhibidores de cinasa de residuos de tirosina de HER2, como lapatinib, son capaces de inhibir otras cinasas como EGFR (HER1) (Burriss, 2004; Burriss, *et al.*, 2005; Chen, *et al.*, 2015). Esta falta de especificidad se traduce en toxicidad al usar estos inhibidores. Por tanto, se buscaron alternativas terapéuticas específicas para HER2.

El desarrollo del anticuerpo monoclonal humanizado TTZ (Herceptin; Genentech, rhMAB4D5) generó el primer agente de inmunoterapia dirigida específicamente contra HER2, aprobado en 1998 para el tratamiento del cáncer de mama HER2-positivo (Carter, *et al.*, 1992; Howe y Brown, 2011; Yarden y Pines, 2012). El uso de TTZ mejoró notablemente el tratamiento de las mujeres con este

tipo de cáncer, mostrando eficacia incluso en el tratamiento metastásico y en las primeras etapas del cáncer de mama HER2-positivo (Howe y Brown, 2011). Sin embargo, dado que también interfiere con el receptor HER2 de las células normales su uso presenta efectos secundarios indeseables, entre los que destaca su efecto cardiopático, por lo que no puede emplearse en pacientes con antecedentes de disfunción cardíaca o riesgo de infarto (Vogel, *et al.*, 2002; Force, *et al.*, 2007; Jain, *et al.*, 2017).

TTZ actúa por desregulación del receptor HER2, bloqueando la homo- y hetero-dimerización (Fig. 2) (Junttila, *et al.*, 2009; Harbeck y Wuerstlein, 2013). Su adición resulta en una reducción del estado de fosforilación de los residuos de tirosina del extremo carboxilo de los posibles heterodímeros (Hynes, *et al.*, 2001; Junttila, *et al.*, 2009; Roskoski, 2014). La falta de señalización promueve la apoptosis, inhibe la diferenciación y la proliferación celular (Fig. 6) (Hynes, *et al.*, 2001; Atalay, *et al.*, 2003).

Sin embargo, a medida que más pacientes con cáncer de mama son sometidos a tratamiento se ha comprendido que la eficacia clínica varía entre los pacientes y que el desarrollo de resistencia es inevitable (Yarden y Pines, 2012). Los informes sobre los mecanismos subyacentes de resistencia marcan la notable plasticidad biológica del cáncer de mama, pero también ofrece la oportunidad de desarrollar terapias de combinación que sean capaces de mejorar la eficacia del tratamiento y retrasar la aparición de resistencia (Wang, *et al.*, 2011; Zhang, *et al.*, 2011).

2.2.2.- Trastuzumab (TTZ).

TTZ es un anticuerpo monoclonal en el que la porción Fab conserva los dominios variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo monoclonal murino 4D5, mientras que la porción Fc murina ha sido sustituida por la porción FC de una IgG humana (Carter, *et al.*, 1992; Atalay, *et al.*, 2003). Su actividad se desarrolla a partir de la unión de su fragmento Fab a la porción del carboxilo terminal del subdominio

IV de la región extracelular de HER2 (Fig. 2) (Roskoski, 2004a). Algunos estudios han sugerido que TTZ promueve una internalización y degradación del receptor HER2, en tanto otros, demuestran que TTZ selectivamente bloquea la heterodimerización HER2-HER3 (Puglisi, *et al.*, 2012; Vu y Claret, 2012).

TTZ detiene el crecimiento tumoral al frenar la progresión del ciclo celular en la fase G1, eso va acompañado por un decremento de los niveles de la ciclina D y de un incremento de p27, un inhibidor de complejos Ciclina-CDK p27 (Bilancia, *et al.*, 2007; Vu y Claret, 2012). El tratamiento con TTZ muestra una tasa de respuesta global del 26% que aumenta cuando se combina con agentes quimioterapéuticos llegando al 80% (Vogel, *et al.*, 2002). Sin embargo, uno de los mayores problemas, particularmente en tumores metastásicos, es la aparición de resistencia al anticuerpo. Entre el 60% y 88% de los tumores de cáncer de mama HER2 positivos que presentan metástasis son resistentes a TTZ como un solo agente terapéutico (Esteva, *et al.*, 2002; Nahta, *et al.*, 2005; Cordo-Russo, *et al.*, 2015).

2.2.3.- Mecanismos de resistencia del cáncer de mama HER2-positivo a TTZ.

Durante el proceso de desarrollo de cáncer, las células adquieren múltiples mutaciones, cada una de las cuales contribuyen y son necesarias para la malignidad (Hynes y Lane, 2005). En la clínica, la resistencia a TTZ se define como la falta de respuesta de un tumor HER2-positivo que inicialmente si respondía al anticuerpo (Eliyatkin, *et al.*, 2016). En cáncer de mama HER2-positivo con metástasis se considera que hay progresión tumoral (resistencia contra el anticuerpo) si hay crecimiento detectable después de 8 a 12 semanas de tratamiento, y se considera que hay recurrencia si hay crecimiento detectable después de 12 meses de tratamiento (Wong, *et al.*, 2011; Eliyatkin, *et al.*, 2016).

Ensayos clínicos han mostrado bajas tasas de respuestas al tratamiento con TTZ que van del 11% al 26%, lo que indica que la gran mayoría de los pacientes con cáncer de mama y sobreexpresión de HER2 muestran resistencia intrínseca (Kruser y Wheeler, 2010).

Se han sugerido diferentes mecanismos para explicar la resistencia a TTZ entre los que destacan: i) la expresión de una forma truncada del receptor p95 HER2, ii) La expresión de isoformas de HER2 como $\Delta 16$ -HER2, iii) la activación del receptor c-MET y/o de IGF-IR, iv) la expresión de Muc4, v) la falta de expresión de la fosfatasa PTEN, vi) activación de vías de señalización río abajo (PI3K/AKT, MEK, MAPK, mTOR y c-Src) y vii) un bloqueo parcial de la formación de homo y heterodímeros (Wang, *et al.*, 2011; Zhang, *et al.*, 2011; Vu y Claret, 2012; Peiró, *et al.*, 2014; Toss y Cristofanilli, 2015).

2.3.- Familia Src cinasa.

La familia Src (SFK) consta de 11 cinasas citoplásmicas y unidas a membranas de aproximadamente 60 kDa: Src, Fyn y Yes, expresados en todos los tipos celulares; Srm en queratinocitos; Blk, Fgr, Hck, Lck y Lyn, en células hematopoyéticas; Frk en células de la vejiga, cerebro, mama, colon y linfoides; Brk, en células del colon, próstata, intestino delgado y mama (Roskoski, 2004b; Alvarez, *et al.*, 2006; Le y Bast, 2011; Chojnacka y Mruk, 2015). Se activan por vías de señalización dependientes de RTK's, receptores de integrinas, receptores acoplados a proteínas G, receptores acoplados a Fc y antígenos, receptores de citosina y receptores de hormonas esteroides (Roskoski, 2004b; Chojnacka y Mruk, 2015).

Cada uno de los miembros exhibe una estructura similar compuesta de un N-terminal corto también denominado dominio SH4 que en algunos casos presenta una secuencia hidrofóbica o un sitio de acilación que unen la enzima a membranas, un dominio único (UD) característico de cada SFK (40 a 70 residuos), un dominio SH3 (50 residuos) que se enlaza a secuencias específicas de prolina, un dominio SH2 (100 residuos) que se une a un residuo específicos de tirosina fosforilado dentro de motivos de 4 aminoácidos, un dominio catalítico de cinasa de residuos de tirosina (250 residuos) o SH1, y un extremo carboxilo terminal (CT) que contiene un residuo conservado de tirosina con un efecto regulador, por lo general inhibitorio (Fig. 4) (Brown y Cooper, 1996; Le y Bast, 2011).

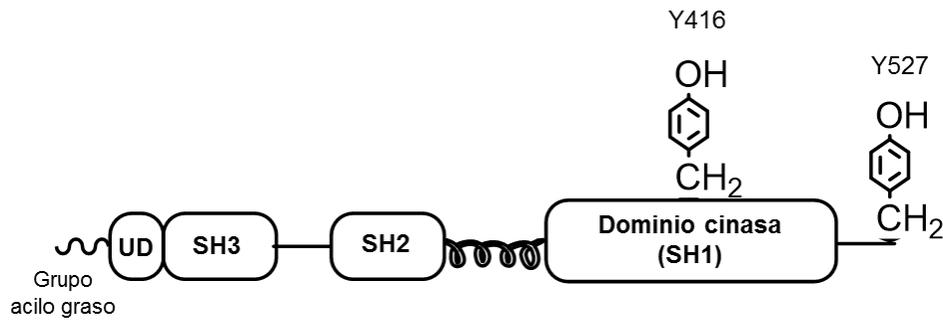


Fig. 4. Estructura de c-Src. SH1-3 – dominios conservados entre los miembros de SFK; UD - dominio único característico de cada miembro de SFK; Y – residuo de tirosina (Modificado de Chojnacka y Mruk, 2015).

Para prevenir una activación aberrante en células normales, estas cinasa se encuentran en un estado inactivo por inhibidores endógenos, como la cinasa C-terminal de Src (CSK) o la cinasa homóloga a CSK (SHK) quienes se encargan de fosforilar la tirosina 527 (Y527) de c-Src (Fig. 4) (Chong, *et al.*, 2005).

La conformación inactiva o cerrada, en el caso de c-Src, se establece por el enlace de la pY527 del extremo C-terminal con el dominio SH2, así como también por la unión de los dominios SH2 y SH3 que evita la interacción proteína-proteína por asociación con otros dominios Src (Chojnacka y Mruk, 2015). En tanto, la activación se da por desfosforilación de pY527 (exclusiva de proteínas fosfatasas como PTP α , PTP1, SHP1 y SHP2) y por el desplazamiento de los dominios SH2 y SH3 a una conformación abierta lo que permite que el dominio SH2 se una a los motivos fosforilados de receptores activados como: RTK, PDGFR, FGFR, factor estimulante 1 de colonias y HGF (Hilbig, 2008).

2.3.1.- Cinasa c-Src.

c-Src también conocida como p60^{c-src}, el primero de los proto-oncogenes clonado por DeClue y Verderame (Martin, 2004), es una cinasa de residuos de tirosina no receptora que se activa durante la transición celular G2/M, así como en procesos

de división celular, adhesión, cambios en morfología, inducción de angiogénesis y reabsorción ósea (Roskoski, 2004b; Chojnacka y Mruk, 2015). Esta cinasa se localiza en el citoplasma, asociada indirectamente a la membrana plasmática, en región núcleo/perinuclear (principalmente en células tumorales), asociado al retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias, endosomas, gránulos secretoras/fagosomas y aparato de Golgi (Chojnacka y Mruk, 2015). c-Src es el centro de una enorme red de señalización, activa una serie de vías asociados a la tumorigénesis incluyendo cinasas de adhesión focal (FAK), PI3K y la proteína STAT (Fig. 5) (Roskoski, 2004b; Zhang, *et al.*, 2011).

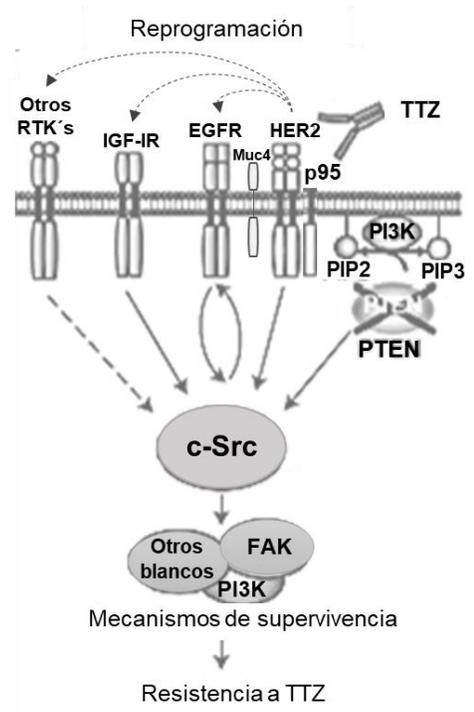


Fig. 5. c-Src como centro de las vías de señalización en los mecanismos de resistencia a TTZ. c-Src – cinasa c-Src; EGFR – receptor del factor de crecimiento epidérmico; FAK – cinasa de adhesión focal; HER2 – receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2; IGF-IR – receptor del factor de crecimiento similar a insulina; Muc4 – mucina 4; p95 – forma trunca de HER2; PI3K - cinasa 3-fosfatidilinositol; PIP2 - fosfatidilinositol-4, 5 bifosfato; PIP3 - fosfatidilinositol-3, 4, 5 trifosfato; PTEN – homólogo de fosfatasa y tensina; TTZ – Trastuzumab (Modificado de Zhang, *et al.*, 2011).

Se ha reportado que en tumores de tipo epitelial c-Src presenta elevada expresión y/o actividad (Frame, 2002). En el cáncer de mama, miembros de la familia EGFR, principalmente HER2, conducen a su activación, lo que se asocia al desarrollo de neoplasias, invasión y metástasis (Fig. 5) (Wilson, *et al.*, 2006). También se ha involucrado en cáncer colorectal, gástrico, de pulmón, glioblastomas y cáncer de ovario (Ishizawa y Parsons, 2004; Roskoski, 2004b).

La sobreexpresión de c-Src está presente en el 70% de los tumores de mama y su actividad es de 2 a 50 veces mayor que la del epitelio normal (Irby y Yeatman, 2000; Parsons, *et al.*, 2012). La sobreactividad es relacionada con la acción de fosfatasa sobre la pY527 (Irby y Yeatman, 2000).

2.4.- Cinasa PI3.

La familia de cinasas 3-fosfatidilinositol (PI3K) catalizan la fosforilación del fosfatidilinositol y sus derivados fosforilados sobre la posición 3' del anillo inositol (Bader, *et al.*, 2005; Falasca, *et al.*, 2017). Es dividida en tres clases; clase I (IA y IB), II y III (Vps34), que difieren en estructura, preferencia hacia el sustrato, distribución tisular, mecanismo de activación y función (Bader, *et al.*, 2005; Carracedo y Pandolfi, 2008). En particular los miembros de la clase I están formadas por una subunidad catalítica (p110) y una subunidad reguladora (p85) y son relevantes en la regulación del metabolismo, proliferación y supervivencia celular, los cuales son activados por RTK's, GPCRs, y ciertos oncogenes como la proteína RAS (Bader, *et al.*, 2005; Jiang y Liu, 2008; Liu, *et al.*, 2009; Vanhaesebroeck, *et al.*, 2012; Shah y Osipo, 2016)

2.4.1.- PI3K clase IA.

Las cinasas de fosfatidilinositol-3 (PI3K) se activan cuando la subunidad p85 se une, a través de su dominio SH3 a dominios ricos en prolina, o bien, por sus dos dominios SH2, a residuos de tirosina fosforilados de receptores como EGFR e IGF-IR, a receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) o bien por integración de proteínas señalizadoras incluyendo PKC (proteína cinasa C), SHP1 (proteína

tirosina fosfatasa 1 que contiene el dominio SH2), RAC, Rho, receptores hormonales, RAS y c-Src, esto genera una superficie de unión para la activación de la subunidad p110 (Fig. 6) (Hennessy, *et al.*, 2005; Cidado y Park, 2012; Pal y Mandal, 2012; Vanhaesebroeck, *et al.*, 2012; Abraham y O'Neill, 2014; Shah y Osipo, 2016).

PI3K cataliza la transformación de fosfatidilinositol-4, 5 bifosfato (PIP2) a fosfatidilinositol-3, 4, 5 trifosfato (PIP3), un segundo mensajero que une un subconjunto de dominios de homología a pleckstrin (PH), FYVE, Phox (PX) C1, C2 y otros dominios de unión a lípidos (Hennessy, *et al.*, 2005; Jiang y Liu, 2008; Shah y Osipo, 2016). El blanco primario en esta vía de señalización incluye la cinasa PDK-1 (cinasa de residuos de serina o treonina dependiente de 3 fosfoinositol tipo 1) y a su sustrato, la cinasa AKT/PKB (Fig. 6) (Abraham y O'Neill, 2014). Sin embargo, la presencia de un gran número de proteínas con dominios de unión a PH, FYVE, y otros dominios de unión a lípidos que interactúan con PIP3 sugieren blancos adicionales (Hennessy, *et al.*, 2005; Cidado y Park, 2012; Vanhaesebroeck, *et al.* 2012; Abraham y O'Neill, 2014).

La vía PI3K/AKT actúa sobre los sustratos CDC42, FOXO, Bad, GSK y mTOR1, y es un regulador crucial de supervivencia durante periodos de estrés celular (Fig. 6) (Hennessy, *et al.*, 2005; Abraham y O'Neill, 2014). En el cáncer de mama, la sobreexpresión, amplificación o mutación con ganancia de función de un RTK puede activar constitutivamente la vía de señalización (Cidado y Park, 2012). De hecho, cerca del 25% de este tipo de cáncer exhiben mutaciones en la subunidad catalítica alfa de PI3K (Cidado y Park, 2012; Carmona, *et al.*, 2016). Dos de las más frecuentes mutaciones en esta subunidad, E545K (exón 9 del dominio hélice) y H1047R (exón 20 del dominio catalítico), están relacionados con el incremento en los niveles de PI(3,4,5)P3, incremento de la actividad de señalización dependiente de AKT e inducción de la transformación celular, además de estar relacionados con mecanismos de resistencia a terapias anti-HER2 (Liu, *et al.*, 2009; Cidado y Park, 2012; Carmona, *et al.*, 2016).

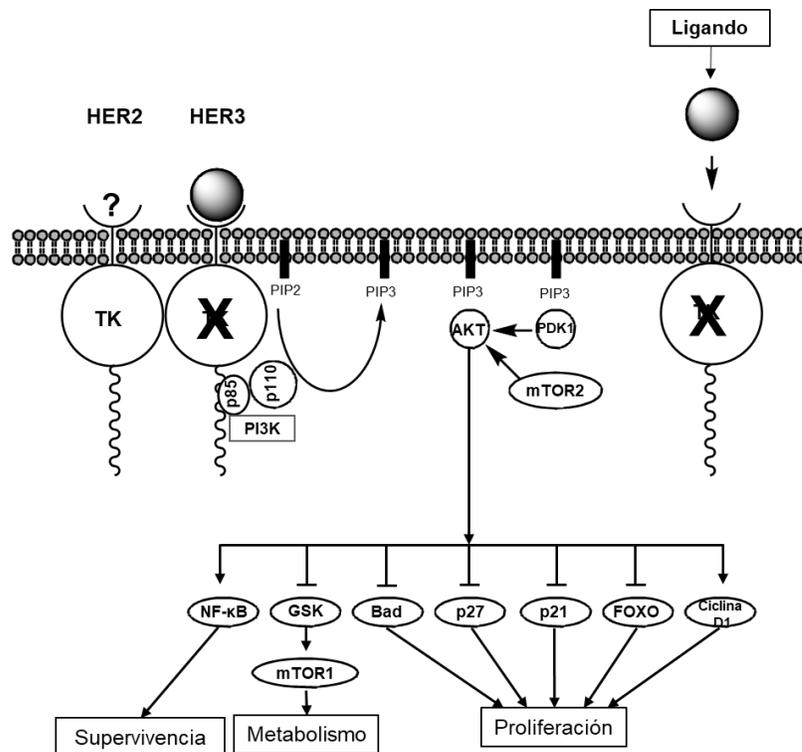


Fig. 6. Vía de señalización PI3K/AKT. AKT – proteína cinasa B (PKB); Bad – proteína agonista de muerte celular asociado a Bcl2; FOXO – factor de transcripción con dominio de unión FOX; GSK – glucógeno cinasa sintasa; mTOR1/2 – proteína cinasa diana de rapamicina en células de mamífero 1/2; NF-κB – factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B; p21 – inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 1; p27 - inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 1B; p85 – subunidad reguladora de PI3K; p100 – subunidad catalítica de PI3K; PDK1 – proteína cinasa dependiente 3 fosfoinositol tipo 1; PI3K - cinasa 3-fosfatidilinositol; PIP2 - fosfatidilinositol-4, 5 bifosfato; PIP3 - fosfatidilinositol-3, 4, 5 trifosfato; TK – dominio de tirosina cinasa; X – sin actividad; ? – sin ligando (Modificado de Vanhaesebroeck, *et al.*, 2012).

Se ha reportado que en células que sobreexpresan HER2, la formación de heterodímeros HER2-HER3 conduce a la fosforilación de 7 residuos de tirosina (Y1035, Y1178, Y1203/1205, Y1241, Y1257 y Y1270-p85) que actúan como sitios de unión para el dominio SH2 de la subunidad reguladora de PI3K, p85 (Fig. 3 y 6) (Pal y Mandal, 2012).

2.5.- AKT.

AKT (también referido como PKB) es una proteína cinasa serina – treonina (Ser/Thr) altamente conservada cuya activación requiere de su fosforilación por PDK1 (Liu, *et al.* 2009). AKT actúa como integrador de numerosas entradas de señales celulares y controla efectores río abajo que mantienen la homeostasis celular (Carmona, *et al.*, 2016). Se conocen tres isoformas: AKT1 (PKB α), AKT2 (PKB β) y AKT3 (PKB γ), codificados por tres distintos genes que comparten una homología mayor al 80% (Hennessy, *et al.*, 2005; Liu, *et al.*, 2009; Cidado y Park, 2012). Consisten de tres dominios altamente conservados entre las 3 isoformas, un dominio N-terminal de homología a pleckstrin (PH) conectado a través de una región enlazadora con un dominio cinasa central y un corto extremo C-terminal que contiene un motivo hidrofóbico regulatorio (HM) (Fig. 7) (Liu, *et al.*, 2009; Carmona, *et al.*, 2016).

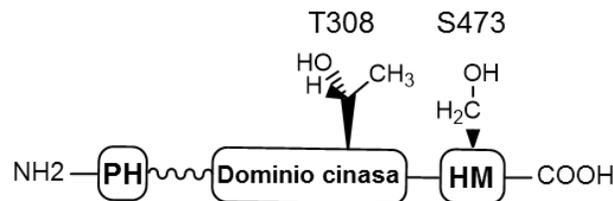


Fig. 7. Estructura general de AKT. HM - motivo hidrofóbico; PH – dominio de homología a pleckstrina; S – residuo de serina; T – residuo de treonina; (Modificado de Franke, 2008).

La acumulación de PIP3 sobre la membrana por PI3K induce el reclutamiento de AKT a través del dominio PH y estimula su actividad catalítica a través de la activación de dos sitios reguladores: una treonina (Thr308) localizado en el asa-T de activación (dominio cinasa) fosforilada por PDK1 y una serina (Ser473) en el motivo hidrofóbico C-terminal fosforilada por el complejo mTORC2 (Fig. 7) (Hennessy, *et al.*, 2005; Pal y Mandal, 2012; Vanhaesebroeck, *et al.*, 2012). La forma activa de AKT se localiza en distintas áreas del citosol o del núcleo donde fosforila sustratos de manera directa e indirecta (Dillon, *et al.*, 2007; Jiang y Liu, 2008; Cidado y Park, 2012).

La mutación más frecuente en AKT se encuentra en el dominio PH donde un ácido glutámico es sustituido por un residuo de lisina sobre el aminoácido 17 (E17K) alterando la conformación del sitio de unión al fosfatidilinositol, esto resulta en una actividad potencializada de la cinasa por un incremento de afinidad por PIP2 y PIP3 (Cidado y Park, 2012; Carmona, *et al.*, 2016).

La fosforilación de AKT promueve la proliferación por medio de la inactivación de inhibidores de los complejos ciclina/CDK como p27 y p21, así como por la activación de estimuladores como c-Myc y la ciclina D1 (Dillon, *et al.*, 2007; Pal y Mandal, 2012). Además, AKT promueve la activación de mTORC1 activando la traducción de proteínas necesarias para mantener la progresión del ciclo celular y de la maquinaria proteica que permite la expresión de enzimas lipogénicas involucradas en la síntesis de esteroides y ácidos grasos (Pal y Mandal, 2012; Carmona, *et al.*, 2016). AKT activa la vía de las pentosas y así la producción de ribosa-5-fosfato requerida para la generación de desoxirribonucleótidos (Carmona, *et al.*, 2016). También regula negativamente la apoptosis por bloqueo de la actividad de factores pro-apoptóticos como Bax, Bad y del factor de transcripción FOXO, y por incremento de la transcripción de genes de supervivencia dependientes de los factores de transcripción NF- κ B y CREB (Fig. 6) (Dillon, *et al.*, 2007; Franke, 2008; Pal y Mandal, 2012; Vanhaesebroeck, *et al.*, 2012).

3.- ANTECEDENTES.

El reconocimiento de un subgrupo de pacientes con cáncer de mama que sobreexpresan HER2 llevo al desarrollo de dos anticuerpos que interfieren con la señalización (TTZ y Pertuzumab), desafortunadamente al cabo de un año de tratamiento se generan tumores resistentes al tratamiento con estos anticuerpos. En un estudio diseñado para entender los mecanismos que inducen resistencia *de novo* y adquirida a través de perfiles de expresión, Wang y colaboradores (2011) analizaron 13 líneas celulares de cáncer de mama que sobreexpresan HER2 (HER2-positivo). Señalan que EGFR, HER3 y ER pueden funcionar como mecanismos de resistencia *de novo* a la combinación de TTZ y Lapatinib. Dependiendo de la línea celular se requirieron de 3 a 12 meses de tratamiento a dosis crecientes de TTZ (1 - 50 µg/ml) para generar células resistentes (Wang, *et al.*, 2011). En la línea celular BT474 resistente a TTZ se observa un incremento en el estado de fosforilación del EGFR en el residuo Y1173, algo semejante se observó para HER2 (Y877 y Y1221), y HER3 (Y1289) (Wang, *et al.*, 2011). La resistencia se puede vencer al combinar TTZ y lapatinib, este tratamiento elimina todas las fosforilaciones anteriores por lo que propone que estos receptores podrían ser los responsables de la resistencia adquirida (Wang, *et al.*, 2011). En un estudio similar, Wu y colaboradores (2012), indujeron resistencia a TTZ en las líneas celulares BT474 y SKBR3 con concentraciones continuas y crecientes de TTZ (10 – 100 µg/ml) durante 1 y 2 años, respectivamente. Indican no haber encontrado cambios en la concentración de HER2 entre las células resistentes y sensibles a TTZ, sin embargo, muestran un incremento de EGFR en ambas líneas celulares resistentes y de la dimerización HER2/HER3 en SKBR3 resistente (Wu, *et al.*, 2012).

Como parte de los mecanismos de resistencia a TTZ, se ha señalado que c-Src desempeña un papel importante en los mecanismos de respuesta. Zhang y colaboradores (2011) a través de la generación de líneas celulares resistentes a TTZ (BT474 y SKBR3) mediante exposición continua e incrementada (5 - 10 µg/ml) durante seis meses observan un aumento en EGFR (Y1068) y c-Src fosforilado en el residuo Y416. Posteriormente por medio de silenciamiento de EGFR demuestran

que las células resistentes presentan una disminución en los niveles de fosforilación de c-Src (Y416), con lo que concluyen que la activación de c-Src (Y416) es un evento crítico que contribuye a la resistencia de TTZ (Zhang, *et al.*, 2011). Por otro lado, Peiró y colaboradores (2014) en un análisis del estado de fosforilación de c-Src en carcinoma de mama HER2-positivos y líneas celulares (BT474 y SKBR3) señalan que el estado de activación de c-Src (Y416) *in situ* es asociado con mecanismos dependientes IGF-IR y la alteración de las vías MAPK y PI3K/AKT lo que conduce a un estado de resistencia a TTZ y con ello una baja tasa de supervivencia en estados tempranos del tumor y en metástasis, baja respuesta clínica, alta progresión y baja supervivencia global (Peiró, *et al.*, 2014). En las líneas celulares resistentes a TTZ corroboran que la activación de c-Src (Y416) es dependiente del estado resistente a TTZ (Peiró, *et al.*, 2014).

4.- HIPÓTESIS.

La adición de inhibidores de cinasa de residuos de tirosina a cultivos de células de cáncer de mama HER2-positivo (BT474 y SKBR3) resistentes a TTZ y que presentan la cinasa c-Src en su forma activa permitirán inhibir la proliferación celular.

5.- OBJETIVO GENERAL.

Determinar la eficiencia de inhibidores de cinasa de residuos de tirosina (dasatinib, lapatinib, nintedanib y sorafenib) en células de cáncer de mama BT474 y SKBR3 HER2-positivo y resistentes a TTZ.

5.1.- Objetivos específicos.

- Establecer cultivo de células HER2-positivos resistentes a TTZ empleando las líneas celulares BT474 y SKBR3.
- Evaluar el nivel de expresión de c-Src en células resistentes a TTZ.
- Evaluar el estado de fosforilación de la Y416 de c-Src en células de cáncer de mama HER2-positivos antes y después de inducir resistencia a TTZ.
- Analizar los patrones de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina de la vía HER2 (Y1221/Y1222-HER2; Y416-Src y S473-AKT).
- Buscar alternativas farmacológicas para vencer la resistencia a TTZ empleando 4 diferentes inhibidores de cinasa de residuos de tirosina (Dasatinib, Lapatinib, Nintedanib y Sorafenib) evaluando sus IC50s sobre las líneas celulares BT474 y SKBR3 HER2-positivo resistente a TTZ.

6.- MÉTODO.

6.1.- Cultivo celular.

Las líneas BT474 y SKBR3 con sobreexpresión de HER2 se obtuvieron del ATCC (Manassas, VA, USA) y se mantuvieron en la Unidad de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco, Bartlesville, OK, USA. No de Cat. 31800-014) y McCoy's (Caisson Labs, Smithfield, UT, USA. No de Cat. MCP01-10X1LT), respectivamente, suplementado con 10% de suero fetal bovino (By products, Guadalajara, Jal. Mex. No de Cat. 90020), penicilina (100 µg/ml) y estreptomina (100 µg/ml) (Gibco, Bartlesville, OK, USA. No de Cat. 15240-062). Se mantuvieron a 37 °C en un ambiente húmedo y 5% de CO₂ en una incubadora modelo 4110 (Thermo, Bartlesville, OK, USA) con cambio de medio de forma periódica cada 48 h. Las células se despegaron con una solución de Verseno (140 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 10 mM de EDTA, 25 mM de Tris-HCl, pH 7.7) más Tripsina al 0.05% (Gibco, Bartlesville, OK, USA. No de Cat. 25200-056). Una vez que las células se despegaron de la placa se agregó medio de crecimiento con 10% de suero fetal bovino. Después de centrifugar las células se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo. Se tomaron 100 µl de la suspensión celular al que se le agregaron 100 µl al 0.25% (p/v) de azul de tripán en PBS (140 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 8 mM de Na₂HPO₄, 1.5 mM de KH₂PO₄, pH 7.4) 0.15 M pH 7.2. Se utilizó una cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad para estimar su número (No. de células x 10³/mL) mediante la fórmula: No. de células / No. de cuadrantes contados x 10,000 (factor de conversión) x (dilución) (Louis y Siegel, 2011).

6.2.- Generación de células resistentes a TTZ.

Las líneas celulares BT474 y SKBR3 se sembraron a 80-100% de confluencia en medio completo de crecimiento suplementado con 4 µg/ml de TTZ que se cambió tres veces por semana. El TTZ (Herceptin; Genetech, Inc, South San Francisco, CA. USA. Lot. N7101B03 B3018) se disolvió en medio de cultivo RPMI 1640 y se filtró en membranas de acetato de celulosa libre de surfactantes de 0.20 µm (Corning,

Corning, NY. USA. No. de Cat. 431219) para cada adición. Las células se mantuvieron en presencia de TTZ hasta obtener su fenotipo resistente el cual se evaluó mediante una curva de toxicidad (2.5, 5, 10, 20, 40, 80 y 160 µg/ml) comparada con la muerte inducida por el TTZ en cultivos no resistentes (Nahta, *et al.*, 2004b; Wang, *et al.*, 2011). Para verificar si se alcanzó el máximo de resistencia se repitió el procedimiento de selección en presencia de TTZ cada semana (4 µg/ml). Al momento de obtener la resistencia se congelaron viales para su uso posterior. Cada vez que las células se descongelaron se mantuvieron en presencia de TTZ (4 µg/ml) con cambio cada 48 h.

6.3.- Viabilidad celular.

Para estimar la viabilidad celular (al inicio o al final de cada tratamiento) los cultivos celulares se fijaron con una solución al 1.1% de glutaraldehído en RPMI 1640 con 1% de suero fetal bovino durante 15 min a temperatura ambiente. Después de eliminar el fijador los pozos se tiñeron con 200 µl de una solución de cristal violeta al 0.1% en ácido fórmico 20 mM pH 6 por 20 min a temperatura ambiente bajo agitación suave. Al finalizar esta incubación la solución de cristal violeta se eliminó y los pozos se lavaron 5 veces con agua corriente. Las placas (48 pozos) se dejaron secar y el cristal violeta se extrajo con 500 µl por pozo de una solución de ácido acético al 10% colocando 150 µl en placas de 96 pozos que se leyeron en el equipo Multiscan Go (Thermo, Bartlesville, OK, USA). La densidad óptica se midió a 595 nm, empleando como control el 100% de crecimiento de cultivos que no recibieron ningún fármaco. El ruido de fondo se obtuvo midiendo la densidad óptica de pozos sin células, este valor de densidad óptica se restó a todos los demás valores. La viabilidad de cada tratamiento se expresará como porcentaje del control sin tratamiento (Campos-Gómez, *et al.*, 2013).

6.4.- Expresión y estado de fosforilación de HER2 y c-Src en BT474 y SKBR3.

La expresión de HER2 se evaluó mediante el inmuno-análisis tipo “*Western Blot*”. 48 h después de sembrar 50,000 células/cm² en cajas de Petri de 5 cm de diámetro, las células BT474 y SKBR3 fueron lisadas con una solución amortiguadora de lisis

(50 nM de Tris-HCl pH8.0, 150 mM de NaCl, 1% de Nonidet P-40 (NP-40), 0.5% de deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, y 1X de una mezcla de inhibidor de proteasa de Roche No. de Cat. 11873580001). El lisado celular se colectó y el material insoluble se sedimentó en tubos eppendorf que fueron centrifugados a 14,000 RPM por 10 min a 4°C en una microcentrífuga refrigerada (Modelo MicroMax RF, Thermo, Bartlesville, OK, USA). Se tomó una alícuota del sobrenadante celular para medir la cantidad de proteínas por el método de Bradford empleando el reactivo Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA. No. De Cat. 500-0006) y el resto se almacenó a -80°C. 20 y 40 µg de extracto proteico (para proteínas totales y fosforiladas, respectivamente) fueron separados en un gel de SDS-PAGE al 7.5% y transferido una membrana de difloruro de polipolivinilideno (PVDF) (Millipore, Billerica, MA, USA. No. de Cat. IPVH000010). Las membranas se bloquearon con 10% de leche descremada (Sveltis) en un amortiguador de Tris-salina y 0.1% de tween 20 (TBST) por 1 h. Después de bloquear las membranas se trataron de forma individual con los anticuerpos primarios a la dilución adecuada (Anti-HER2, 1:6000, Cell Signaling Technology No. de Cat. 2248; Anti-pHER2 contra los residuos de tirosina 1221/1222, 1:3000, Cell Signaling Technology No. de Cat. 2249; anti-Src, 1:3000, Cell Signaling Technology No. Cat. 2110s; anti-pSrc contra el residuo de tirosina 416, 1:1000, Cell Signaling Technology No. de Cat. 6943s; anti-AKT1, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, No. de Cat. Sc-1618; anti-pAKT1/2/3 contra el residuo de serina 473, 1:500, Santa Cruz Biotechnology, No. de Cat. Sc-7985-R; anti-ER, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, No. de Cat. Sc-8005; anti-PR, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, No. de Cat. Sc-810; anti-β-actina, 1:2000, Santa Cruz Biotechnology, No. de Cat. Sc-47778) en una solución de albumina de bovino (BSA) al 0.1% en TBST toda la noche a 4°C. Después de lavar las membranas con TBST se añadió el anticuerpo secundario (Anti-ratón, Thermo, No de Cat. 31430 o anti-conejo, Thermo, No Cat. 31400) acoplado a peroxidasa de rábano diluido en una solución con 10% de leche descremada en TBST por 45 min a temperatura ambiente a una dilución de 1:10,000 y 1:20,000, respectivamente. La señal quimioluminiscente se visualizó por medio del reactivo SuperSignal™ West pico chemiluminescent Sustrate (Thermo, No de

Cat. 34080) y se reveló en película autoradiográfica. La abundancia relativa de cada proteína se normalizará empleando la señal generada por el anticuerpo dirigido contra la proteína constitutiva β -actina mediante el uso del software ImageJ (Biscardi, *et al.*, 1999; Formisano, *et al.*, 2014; Ding, *et al.*, 2015; Garcia-Recio, *et al.*, 2015).

6.5.- Obtención de la concentración media inhibitoria (CI₅₀).

Las concentraciones de TTZ empleadas fueron de: 5, 10 y 40 μ g/ml. En tanto, de los inhibidores de cinasa se emplearon en diluciones logarítmicas (base 10) desde 0.001 hasta 100 μ M siguiendo esquemas previamente descritos (Chen, *et al.*, 2015).

Las células se sembraron a una densidad de 15,000 células/cm² en placas de 48 pozos con 500 μ l de medio, dejando 1 pozo sin células como blanco, sólo con medio de crecimiento. Las placas se incubaron durante 24 h, posteriormente se retiró el medio de siembra y se añadieron los diferentes tratamientos. A una fila con crecimiento celular no se le agregó ningún tratamiento y sirvió como control de 100% de crecimiento. A otra fila se le agregó la máxima concentración del vehículo de disolución de los TKI's (0.1% de DMSO). Las placas se incubaron nuevamente durante 48 h. Transcurrido el tiempo de incubación se eliminó el tratamiento y las células se fijaron para cuantificar su viabilidad empleando la técnica de cristal violeta previamente descrita. El porcentaje de inhibición se calculó con la fórmula: $IP(\%) = [100 - (\text{valor medio de las células tratadas} / \text{valor medio de las células control})] / 100$. Se tomó como IC₅₀ todo aquel tratamiento que inhiba el 50% de la proliferación celular y se obtuvo a través de una regresión logarítmica (base 10) mediante el programa de hoja de cálculo Microsoft Excel (Nagata, *et al.*, 2004; Chen, *et al.*, 2015).

6.6.- Análisis estadístico.

Los resultados de la proliferación celular de las concentraciones de TKI y de la combinación de TKI con TTZ fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y mediante comparaciones múltiples por el método de diferencia honestamente

significativa (HSD) de Tukey con un nivel de confianza del 95% en el programa StatGraphics Verisión Centurion XVI.I., se determinaron las diferencias entre cada tratamiento (concentraciones de TKI, concentraciones de TKI con TTZ) para cada línea celular y entre líneas celulares sensibles y resistentes a TTZ.

7.- RESULTADOS.

7.1.- Expresión de HER2 y c-Src en líneas celulares no resistentes a TTZ.

Para comprobar que las líneas celulares BT474 y SKBR3 eran positivas en su expresión de HER2 se realizó un análisis de *Western Blot*. En la Fig. 8 se muestra una señal muy fuerte para HER2 en las líneas celulares BT474 y SKBR3 (HER2-positivas) mientras que en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 no hay señal detectable para HER2. También se puede observar la presencia de la forma fosforilada en el residuo Y1221/2 (Fig. 8A). Al ser normalizada la señal de HER2 con β -actina se aprecian las diferencias en la expresión relativa entre cada línea celular (Fig. 8B). Estos resultados confirman que las líneas celulares BT474 y SKBR3 sobreexpresan HER2 y que este receptor se encuentra en un estado activo al presentar fosforilación de los residuos Y1221/1222.

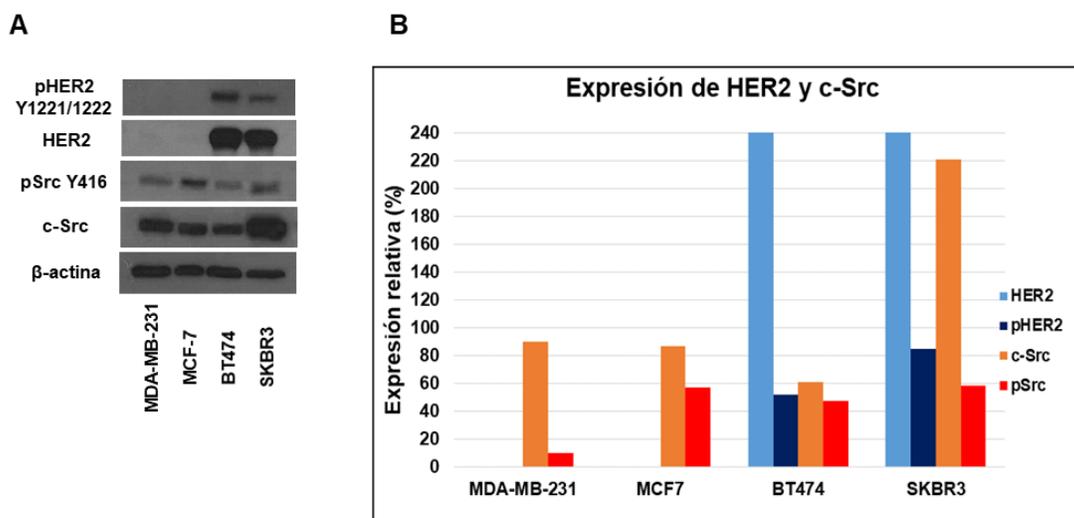


Fig. 8. Niveles de expresión de HER2 y c-Src en líneas celulares HER2-negativas y HER2-positivas. A) *Western Blot*. B) Histograma del análisis densitométrico, datos tomados del inciso A.

En cuanto a c-Src, la línea celular SKBR3 presenta la mayor expresión de esta cinasa, en tanto, BT474 muestra la menor expresión con respecto a MDA-MB-231 y MCF-7 (Fig. 8). Para pSrc Y416, las líneas celulares SKBR3, MCF-7 y BT474 presentan mayor estado de fosforilación que la línea celular MDA-MB-231 (Fig. 8).

Al comparar los niveles de expresión de ambas cinasas y sus estados de fosforilación nos damos cuenta que tanto HER2 total como pHER2 Y1221/2 varían dependiendo de la línea celular (HER2 negativo vs HER2 positivo). En tanto, la expresión de c-Src total y pSrc Y416 es independiente de la línea celular (HER2 negativo vs HER2 positivo).

7.2.- Respuesta antiproliferativa y resistencia a TTZ.

Para conocer la respuesta de las líneas celulares BT474 y SKBR3 a TTZ, así como la dosis a emplear para el estudio con los TKI's, se realizó una curva dosis respuesta con concentraciones de 2.5 a 160 µg/ml.

Las células BT474 y SKBR3 tuvieron una respuesta muy semejante al tratamiento con TTZ (Fig. 9). En las células BT474 el tratamiento con TTZ por 48 h redujo el número de células en forma estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$), con respecto al control (0 µg/ml de TTZ) (Tabla 1, Anexo 1), a partir de 2.5 µg/ml ($p \leq 0.01$) manteniéndose así hasta 10 µg/ml ($p \leq 0.05$). A partir de 20 µg/ml la viabilidad cae a 70% y se mantiene hasta 160 µg/ml ($p \leq 0.01$). En las células SKBR3 el número de células cae significativamente ($p \leq 0.01$), con respecto al control (0 µg/ml de TTZ), a partir de 2.5 µg/ml sin que haya más cambios a concentraciones más altas (Tabla 1, Anexo 1).

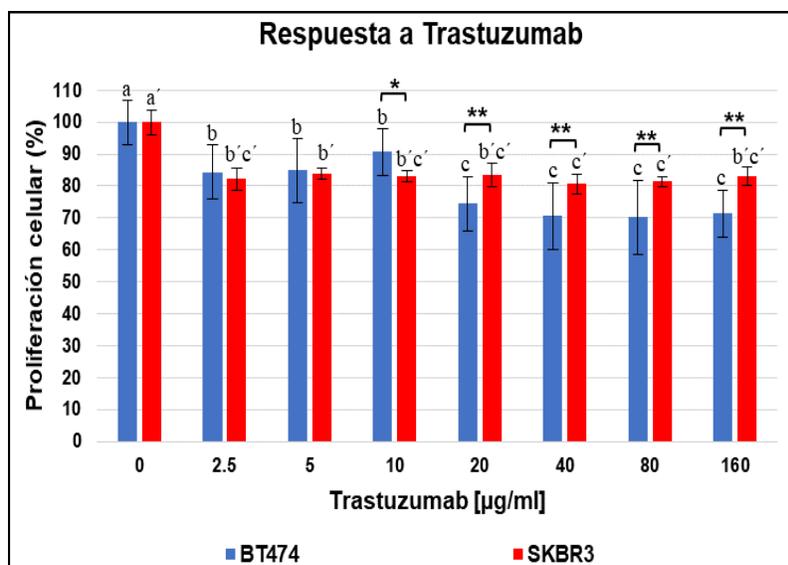


Fig. 9. Respuesta de las líneas celulares BT474 y SRBR3 a concentraciones crecientes de TTZ. La figura muestra el promedio \pm la desviación estándar del número de células al final de tres experimentos independientes ($n=3$). Los corchetes indican la comparación entre BT474 (barra azul) y SKBR3 (barra roja), la significancia estadística de esta comparación está indicada por: * ($p \leq 0.01$) o ** ($p \leq 0.05$). Diferente letra indica diferencia estadística entre las distintas concentraciones para cada línea celular. El análisis estadístico correspondiente a los tratamientos de cada línea celular así como entre líneas celulares se encuentra en los Anexos 1 y 2.

Concentración de TTZ µg/ml	BT474		SKBR3		BT474-R normalizado		SKBR3-R ⁻ normalizado		BT474-R ajustado con parentales		SKBR3-R ⁻ ajustado con parentales	
	X	Desvest	X	Desvest	X	Desvest	X	Desvest	X	Desvest	X	Desvest
0	100	6.92	100	3.91	100	3.65	100	2.97	112.47	6.57	62.69	1.86
2.5	84.34*	8.46	82.21*	3.39	84.36*	9.84	88.31*	1.75	95.3*	15.33	55.36*	1.1
5	84.87*	10	83.8*	1.78	82.28*	13.1	87.98**	6.16	93.02*	17.96	55.16**	3.86
10	90.72**	7.28	83.15*	1.83	97.29	5.9	92.3	9.43	109.34	6.71	57.86	5.91
20	74.39*	8.49	83.41*	3.72	99	4.21	79.53*	2.64	111.26	5.09	49.86*	1.66
40	70.67*	10.44	80.66*	3.04	95.99	5.91	84.61*	1.62	107.79	4.8	53.04*	1.02
80	70.16*	11.57	81.48*	1.55	94.83**	5.5	84.27*	1.23	106.56	5.99	52.83*	0.77
160	71.42*	7.37	82.98*	2.82	89.56*	6.16	77.46*	2.68	100.72*	7.98	48.56*	1.68

Tabla 1. Viabilidad celular de las líneas BT474, BT474-R, SKBR3 y SKBR3-R⁻ a TTZ. Datos mostrados en porcentaje (%). * ($p \leq 0.01$) o ** ($p \leq 0.05$) indica diferencia

estadísticamente significativa con respecto al control (0 µg/ml de TTZ). En las últimas 2 columnas los valores de viabilidad fueron ajustadas con el 100% del crecimiento de células que no recibieron ningún tratamiento (parentales). En la normalización, los valores de las células inducidas a resistencia fueron ajustadas con el 100% del crecimiento de las mismas células sin tratamiento (0 µg/ml de TTZ).

Para demostrar la resistencia a TTZ se partió de la premisa que células resistentes mantienen o incrementan su tasa de proliferación al ser tratadas con el anticuerpo. Nuestras líneas celulares fueron tratadas con concentraciones constantes de TTZ (4 µg/ml), se les realizó una curva dosis respuesta a partir del tercer mes de exposición y se repitió cada mes hasta obtener el fenotipo resistente. Los resultados fueron ajustados con el 100% del crecimiento de células que no recibieron ningún tratamiento previo (células parentales).

La Fig. 10A y la Tabla 1 muestran que la línea celular BT474 tratada durante 24 semanas con 4 µg/ml de TTZ (BT474-R) presenta mayor tasa de proliferación que la línea celular que no recibió tratamiento previo (BT474). Considerando que al día cero se sembró el mismo número de células (15,000 células/cm²) parentales y resistentes, la Fig. 10A muestra que después de 48 h de tratamiento con diferentes concentraciones de TTZ, las células resistentes de la línea BT474 presentaron una tasa de proliferación de entre 95 y 112% (al ser normalizadas con el 100% de las células BT474 sin tratamiento previo de TTZ), mientras que la línea celular parental (BT474) presentó una tasa de proliferación de entre 70 y 90% (Tabla 1), con diferencias estadísticas ($p \leq 0.01$), entre ambas líneas celulares (BT474 y BT474-R), en las concentraciones de 0 y 10 - 160 µg/ml de TTZ (Anexo 2).

En conclusión, en la Fig. 10A se puede apreciar que a partir de 10 µg/ml de TTZ, las células tratadas con el mismo anticuerpo por 24 semanas (barras azul claro) proliferan más que las parentales (barras azul oscuro), reflejando resistencia a TTZ.

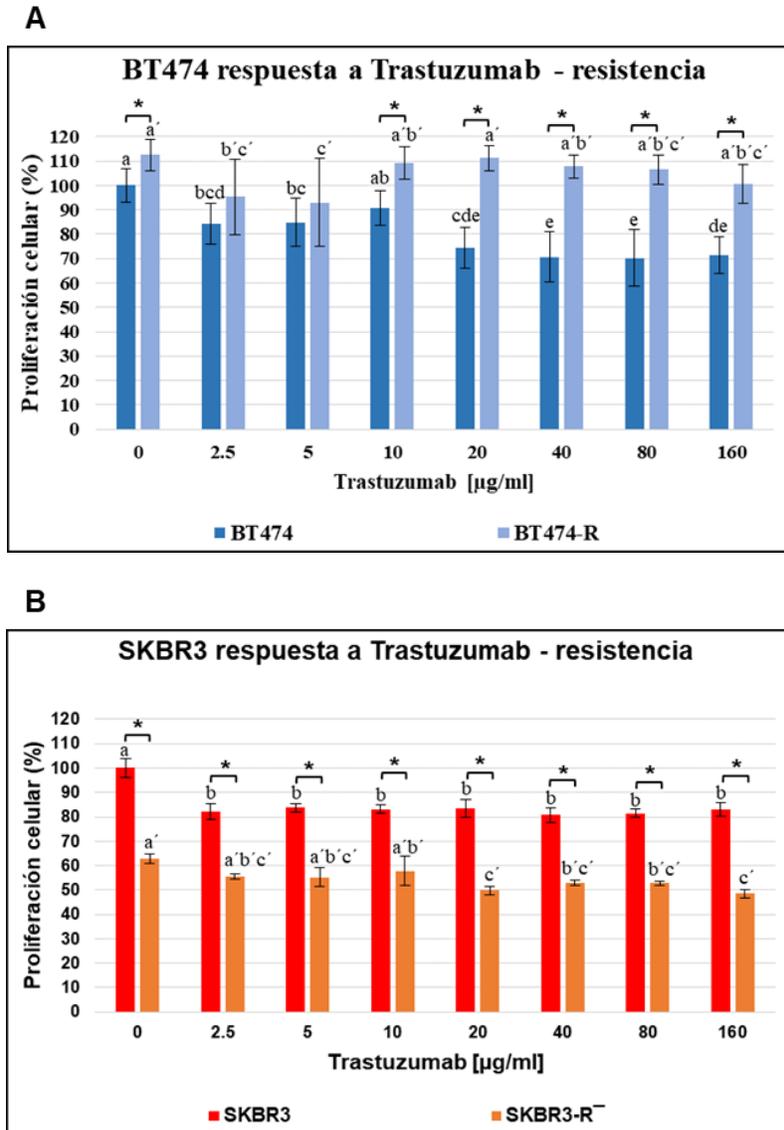


Fig. 10. Respuesta a TTZ. Los valores fueron ajustados con el 100% del crecimiento de las células parentales. A) línea celular BT474 y BT474-R. B) línea celular SKBR3 y SKBR3-R⁻ (sin resistencia a TTZ). La figura muestra el promedio \pm la desviación estándar del número de células al final de tres experimentos independientes (n=3). Los corchetes indican la comparación entre las células parentales (barras oscuras) y las células tratadas continuamente con TTZ (barra claras), la significancia estadística de esta comparación está indicada por: * ($p \leq 0.01$) o ** ($p \leq 0.05$). Diferente letra indica diferencia estadística entre las distintas concentraciones para cada línea celular. El análisis estadístico correspondiente a

los tratamientos de cada línea celular así como entre líneas celulares se encuentra en los Anexos 1 y 2.

La Fig. 10B muestra que las células SKBR3, tratadas por 28 semanas con TTZ (SKBR3-R⁻), presentan baja tasa de proliferación a las 48 h de tratamiento con diferentes concentraciones de TTZ. SKBR3-R⁻ (debido a que no presenta resistencia a TTZ) tiene una tasa de proliferación de 48 a 62% con respecto al 100% de crecimiento de las células parentales (SKBR3) (Tabla 1).

La Fig. 11A muestra la tasa de proliferación normalizada de BT474 y BT474-R, en ella se observa que las concentraciones de 2.5, 5 y 10 µg/ml tienen la misma actividad en ambas líneas celulares ($p \geq 0.05$). Sin embargo, a partir de 20 µg/ml BT474-R supera el 99% de proliferación y se mantiene hasta 160 µg/ml donde disminuye a 89%, concentraciones a la cual BT474 presenta una tasa de proliferación con diferencia estadística con respecto a BT474-R ($p \leq 0.05$) de entre 70 y 74% (Tabla 1, Anexo 2).

En conclusión, en la Fig. 11A se puede apreciar que a partir de 20 µg/ml las células tratadas con TTZ por 24 semanas (barras azul claro) proliferan más que las parentales (barras azul oscuro), reflejando resistencia a TTZ.

La Fig. 11B muestra que la actividad de TTZ en las líneas celulares SKBR3 y SKBR3-R⁻ son muy similares. En ambas líneas celulares la tasa de proliferación disminuye de manera significativa a partir de los 2.5 µg/ml ($p \leq 0.05$), actividad que se pierde en SKBR3-R⁻ a los 10 µg/ml y que se recupera a los 20 µg/ml (Tabla 1, Anexo 2).

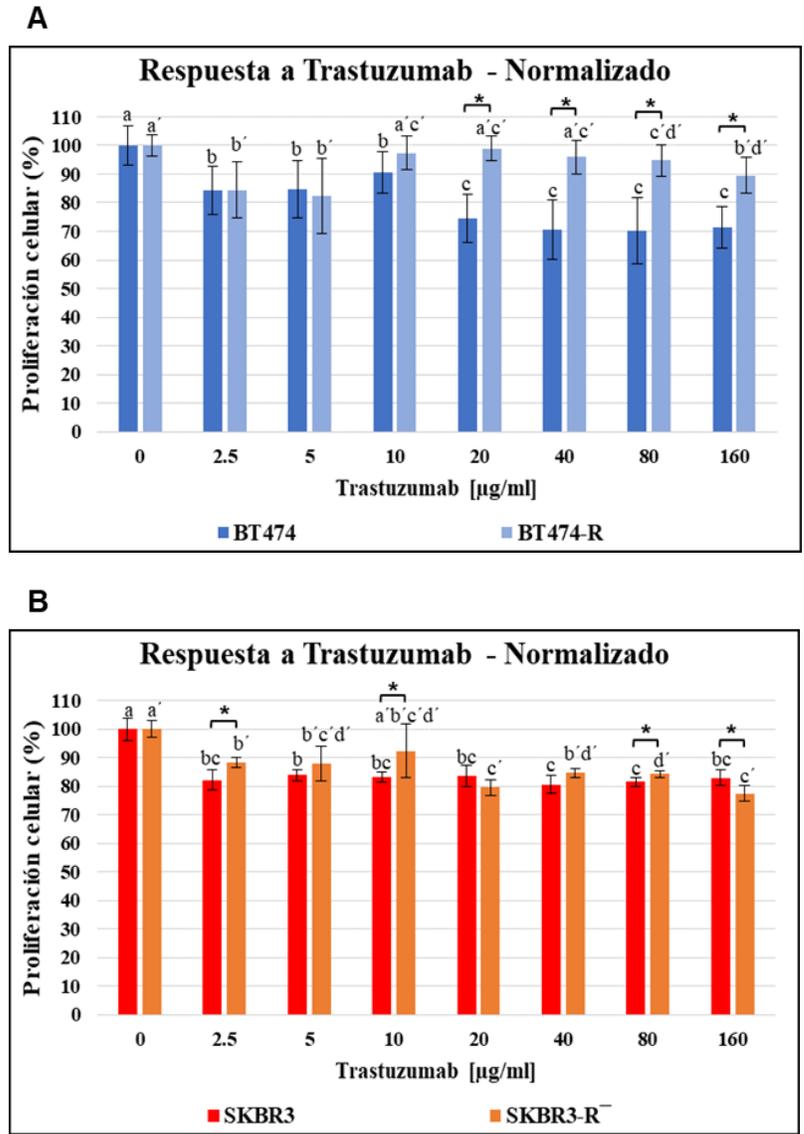


Fig. 11. Respuesta a TTZ. Valores normalizados contra las células sin tratamiento. A) línea celular BT474 y BT474-R. B) línea celular SKBR3 y SKBR3-R⁻ (sin resistencia a TTZ). La figura muestra el promedio \pm la desviación estándar del número de células al final de tres experimentos independientes (n=3). Los corchetes indican la comparación entre las células parentales (barras oscuras) y las células tratadas continuamente con TTZ (barra claras), la significancia estadística de esta comparación está indicada por: * (p \leq 0.01) o ** (p \leq 0.05). Diferente letra indica diferencia estadística entre las distintas concentraciones para cada línea celular. El análisis estadístico correspondiente a los tratamientos de cada línea celular así como entre líneas celulares se encuentra en los Anexos 1 y 2.

En conjunto, la Tabla 1, la Fig. 10 y 11 muestran que el tratamiento seleccionado permitió obtener células resistentes para la línea BT474, pero no así para la línea SKBR3. Por lo anterior, en el resto de esta tesis sólo se trabajó con las células BT474 parentales y las resistentes (BT474-R) generadas después de 24 semanas de tratamiento.

7.3.- Expresión de HER2 y c-Src durante la inducción de resistencia a TTZ.

Se documentaron posibles cambios en los niveles de expresión del receptor HER2 y de c-Src durante el periodo de inducción de resistencia a TTZ (4 µg/ml tres veces por semana durante 24 semanas) en las células BT474. Se realizaron semanalmente extracciones proteicas y al final de las 24 semanas, de la línea celular HER2-positivo tratada con TTZ y mediante la técnica de *Western Blot*, se analizaron los perfiles de expresión (Anexo 3).

A lo largo del proceso de inducción de resistencia observamos que HER2 total presentó pequeñas variaciones con una tendencia a la baja (Anexo 4). La forma fosforilada de HER2 que se analizó (pY1221/1222) tampoco mostró grandes variaciones, pero si, una tendencia al alza (Anexo 4).

La Fig. 12 compara los niveles de expresión de la línea celular BT474 y BT474-R, en ella se muestra que HER2 total y pHER2 presentan un ligero aumento en los niveles de expresión de BT474-R (105.8% y 107.2%, respectivamente). Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas ($p \geq 0.05$) (Anexo 6).

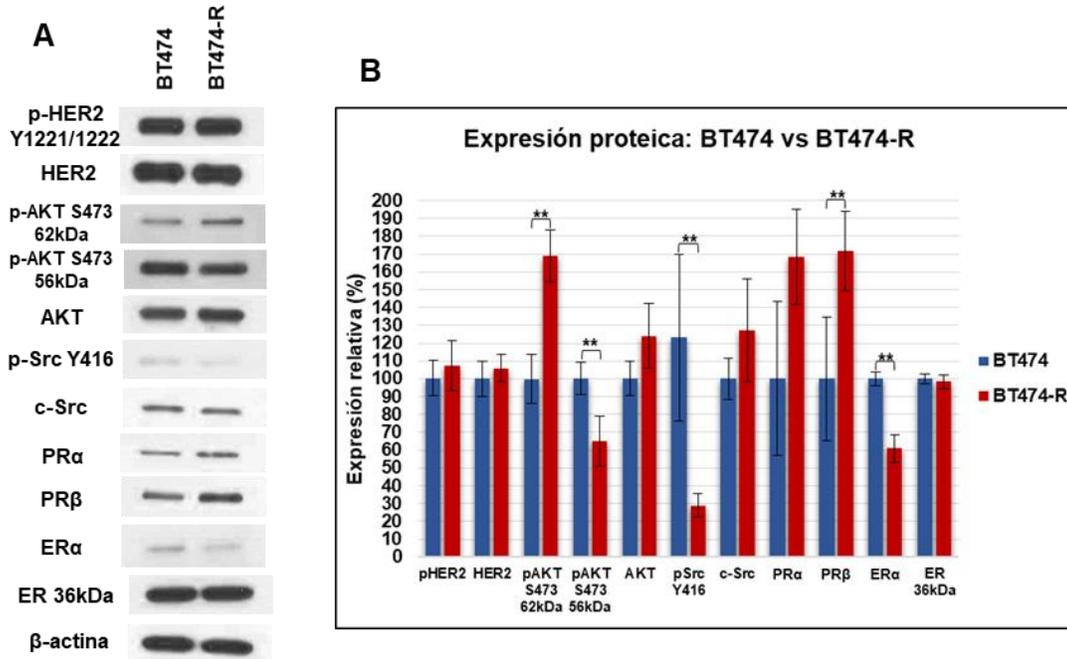


Fig.12. Caracterización de los niveles de expresión y estado basal de fosforilación de BT474 y BT474-R. A) *Western Blot*. B) Histograma del perfil de expresión proteica obtenida a partir del inciso A con una n=3. Los corchetes del inciso B indican la comparación entre BT474 (barra azul) y BT474-R (barra roja), la significancia estadística de esta comparación está indicada por: * ($p \leq 0.01$) o ** ($p \leq 0.05$). El análisis estadístico que compara los valores densitométrico entre líneas celulares BT474 y BT474-R se encuentra en el Anexo 6.

El seguimiento de c-Src total no mostró variaciones durante las 24 semanas de inducción a resistencia (Anexo 5). Sin embargo, al momento de seleccionar la línea resistente a TTZ se observa que c-Src total presenta un aumento en los niveles de expresión (127.1%) sin cambios estadísticamente significativos con respecto a BT474 ($p \geq 0.05$) (Fig. 12, Anexo 6). En el seguimiento de c-Src fosforilada se observa una tendencia a la baja patrón que se repite al momento de comparar los niveles de expresión de la línea celular BT474 y BT474-R ($p \leq 0.05$) (Fig. 12, Anexo 6).

Por otra parte y debido a que AKT juega un papel importante en los mecanismos de supervivencia y resistencia en células tumorales, se evaluaron los

cambios en los niveles de expresión de esta cinasa en las líneas celulares BT474 y BT474-R. La Fig. 12, muestra que BT474-R presenta un incremento en los niveles de AKT total (124%). Sin embargo, no es estadísticamente significativo con respecto a los niveles de BT474 ($p \geq 0.05$) (Anexo 6).

En el caso del anticuerpo anti-AKT dirigido contra la serina 473 (S473) en su forma fosforilada, reconoció dos variantes: una de 56 kDa y otra de 62 kDa. En la línea celular BT474-R, pAKT S473 de 56 kDa presenta una disminución (64.8%) en su expresión. En tanto, pAKT S473 de 62 kDa presenta un aumento en los niveles de expresión (168.9%). Ambas señales presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto a BT474 ($p \leq 0.05$) (Fig. 12, Anexo 6).

Paralelamente analizamos los niveles de expresión de los receptores nucleares ER y PR en los mismos cursos temporales en los que se analizó a HER2 y c-Src. Coincidente con que la línea celular BT474 es del tipo luminal B (receptores hormonales positivo y HER2-positivo), la expresión de ER α fue muy variable durante el periodo de inducción de resistencia (Anexo 3). Sin embargo, al momento de comparar la expresión del receptor (ER α) entre las líneas celulares BT474 y BT474-R se observa una disminución significativa ($p \leq 0.05$) en BT474-R (Fig. 12, Anexo 6).

Inesperadamente, el anticuerpo anti-ER detectó una proteína de menor peso molecular que coincide con el peso reportado para la forma citoplásmica de ER α (ER-36 kDa) (Fig. 12, Anexo 3). Considerando que el mismo anticuerpo detectó la forma de 66 (ER α) y 36 kDa (ER-36 kDa) es posible comparar sus intensidades y relacionarlas con el contenido proteico.

Para ver la señal correspondiente a ER α fue necesario exponer la película a la reacción quimioluminiscente por más de 10 min y para la señal de ER-36 kDa fue necesario 30 seg. Por tanto, interpretamos que hay muy poca cantidad de la proteína ER α (Fig. 12). Alternativamente, es posible que el anticuerpo no tenga la misma afinidad por ambas proteínas. Asumiendo que el anticuerpo tiene la misma

afinidad por ambas formas podemos concluir que la forma citoplásmica de 36 kDa es muy abundante. Esta forma citoplásmica se ha asociado a señalización y por tanto podría participar en los mecanismos de resistencia.

El análisis de expresión de PR muestra que las líneas celulares BT474 y BT474-R presentan dos isoformas: PR α de 81 kDa y PR β de 116 kDa. En el análisis curso temporal, se observa que los niveles de PR α son perceptibles a partir de la sexta semana de inducción de resistencia a TTZ mientras que PR β aparece a partir de la octava semana (Anexo 3). Sin embargo, ambas isoformas presentan una ligera tendencia a la baja a partir de la décima semana de tratamiento.

Al momento de comparar las líneas celulares (BT474 y BT474-R) se puede corroborar que BT474-R presenta un aumento en los niveles de expresión de PR siendo más abundante la isoforma PR β que la isoforma PR α (171.8% y 168.4 %, respectivamente) (Fig. 12, Anexo 6). Sin embargo, sólo la isoforma PR β presenta diferencia estadística con respecto a BT474 ($p \leq 0.05$). En conclusión, estos resultados sugieren que PR β podría funcionar como un mecanismo de respuesta al tratamiento con TTZ.

7.4.- Respuesta a la combinación TTZ más inhibidores de cinasa.

El último de nuestros objetivos consistía en tratar de vencer la resistencia a TTZ empleando 4 diferentes inhibidores de cinasas de residuos de tirosina: lapatinib (inhibidor del dominio cinasa de EGFR:HER1 y HER2), dasatinib (inhibidor del dominio cinasa de BCR-Abl y la familia Src), nintedanib (inhibidor del dominio cinasa de VEGFR1, 2 y 3, FGFR1, 2 y 3, PDGFR α y β) y sorafenib (inhibidor del dominio cinasa de VEGFR2, PDGFR, c-Kit y BRAF).

Esta propuesta se basa en reportes de activación o sobreexpresión de cinasas, como c-Src, que influyen en el desarrollo de resistencia a TTZ. Por tanto, establecimos los IC₅₀s de cada uno de los inhibidores como un índice objetivo de la posible reversión de la resistencia a TTZ. Se estableció un protocolo en el cual la

línea celular resistente a TTZ (BT474-R) se sometió a concentraciones crecientes de inhibidores de cinasa (0.001 – 100 μM) combinadas con diferentes concentraciones de TTZ (5, 10 y 40 $\mu\text{g/ml}$).

7.4.1.- Valoración individual de los inhibidores de cinasa en células BT474 y BT474-R.

La Fig. 13 muestra la actividad de los inhibidores de cinasas sobre la línea celular BT474 y BT474-R. En ella se muestra que de los cuatro TKI's probados, lapatinib tiene el mayor efecto antiproliferativo en ambas líneas celulares e incluso su actividad es muy superior a la de TTZ (Fig. 10A, Tabla 1, Anexo 7). La Fig. 13 también muestra que la actividad citotóxica de dasatinib aumenta significativamente ($p \leq 0.05$) en las células BT474-R (Anexo 7 y 11).

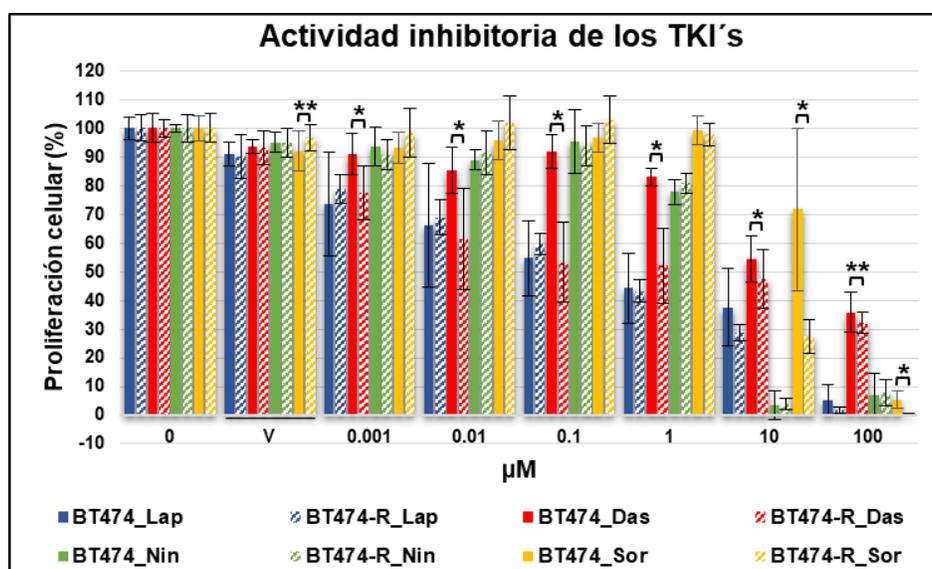


Fig. 13. Curva dosis-respuesta de los cuatro TKI's sobre las líneas celulares BT474 y BT474-R. La figura muestra el promedio \pm la desviación estándar del número de células al final de tres experimentos independientes ($n=3$). Los corchetes indican la comparación entre BT474 (barra sólida) y BT474-R (barra rayada), la significancia estadística de esta comparación está indicada por: * ($p \leq 0.01$) o ** ($p \leq 0.05$). V: vehículo. El análisis estadístico correspondiente a los tratamientos de cada línea celular así como entre líneas celulares se encuentra en los Anexos 7-11.

En BT474 la IC₅₀ de lapatinib (0.602 μM) (Tabla 2) fue cercana a la de nintedanib (1.209 μM) con diferencia estadísticamente significativa (p≤0.05). La IC₅₀ de lapatinib fue 38 veces menor que la de dasatinib (23.216 μM) (p≤0.01) y 65 veces menor a sorafenib (39.150 μM) (p≤0.01) (Tabla 3, Anexo 10).

En BT474-R lapatinib presenta un efecto citotóxico con una pendiente constante a lo largo del rango de las concentraciones estudiadas. Dasatinib tuvo el mismo comportamiento hasta 1 μM perdiendo eficiencia a dosis mayores (Fig. 13). En tanto, nintedanib y sorafenib desarrollaron un comportamiento semejante, ambos inhibidores carecen de efecto hasta 1 μM y su toxicidad alcanza un máximo a 10 μM (Fig. 13).

La IC₅₀ de lapatinib en BT474-R fue de 0.208 μM, seis veces menor que nintedanib (IC₅₀: 1.260 μM; p≤0.01), 17 veces menor que sorafenib (IC₅₀: 3.6 μM; p≤0.01) y 39 veces menor que dasatinib (IC₅₀: 8.286 μM; p≥0.05) (Tabla 3, Anexo 10). La Tabla 2 muestra las IC₅₀ calculadas para cada uno de los fármacos solos o en combinación con las tres concentraciones crecientes de TTZ (5, 10 y 40 μg/ml).

De manera general podemos concluir que lapatinib es muy activo en la línea celular BT474 actividad que se mantiene cuando la línea celular adquiere resistencia a TTZ. Por otra parte, BT474 es resistente a concentraciones menores a 1 μM de dasatinib. Sin embargo y en base a la Fig. 13, dasatinib induce muerte celular con mayor eficiencia en las células BT474-R (8.386 μM) que en las células BT474 (23.216 μM).

inhibidor	BT474 (IC ₅₀ μM)				BT474- R (IC ₅₀ μM)			
	Monoterapia	Combinado con TTZ			Monoterapia	Combinado con TTZ		
		5 μg/ml	10 μg/ml	40 μg/ml		5 μg/ml	10 μg/ml	40 μg/ml
Lapatinib	0.602 ± 0.50	0.002 ± 0.002 *	0.085 ± 0.101**	0.0319 ± 0.0473 **	0.208 ± 0.092	0.078 ± 0.0748*	0.225 ± 0.214	0.083 ± 0.053*
Dasatinib	23.216 ± 5.58	1.223 ± 0.875 *	0.872 ± 1.372 *	0.152 ± 0.067 *	8.286 ± 13.997	0.018 ± 0.0315	0.0002 ± 0.0003	2.315 ± 2.069
Nintedanib	1.209 ± 0.44	0.352 ± 0.118*	0.569 ± 0.531**	0.411 ± 0.087*	1.260 ± 0.412	0.396 ± 0.247*	0.429 ± 0.169*	0.623 ± 0.230*
Sorafenib	39.15 ± 29.88	1.905 ± 1.704 *	2.399 ± 1.057*	1.767 ± 0.436 *	3.6 ± 0.781	2.876 ± 1.905	4.296 ± 2.220	6.587 ± 3.126 **

Tabla 2. Resumen de la IC₅₀ para los cuatro TKI's probados solos o en combinación con TTZ en células BT474 y BT474-R. La tabla muestra el promedio ± la desviación estándar de las IC₅₀ obtenidas en tres experimentos independientes. La significancia estadística se representa con * (p≤0.01) o ** (p≤0.05) al comparar la IC₅₀ de cada TKI solo con la IC₅₀ del TKI combinado con TTZ (Anexo 10).

inhibidor	BT474 (Veces de disminución del IC ₅₀)				BT474- R (Veces de disminución del IC ₅₀)			
	Monoterapia	Combinado con TTZ			Monoterapia	Combinado con TTZ		
		5 μg/ml	10 μg/ml	40 μg/ml		5 μg/ml	10 μg/ml	40 μg/ml
Lapatinib	1	301.0	7.1	20.1	1	2.7	0.9	2.5
Dasatinib	1	19.0	26.6	152.6	1	460.3	41430.0	3.6
Nintedanib	1	3.4	2.1	2.9	1	3.2	2.9	2.0
Sorafenib	1	20.5	16.3	22.1	1	1.3	0.8	0.5

Tabla 3. Resumen de las veces de disminución de la IC₅₀ para los cuatro TKI's probados. Asumiendo la IC₅₀ de cada TKI individual como 1 cada valor muestra las veces de disminución al combinarlo con concentraciones crecientes de TTZ.

7.4.2.- Valoración de los inhibidores de cinasa combinados con TTZ en células BT474 y BT474-R.

La Fig. 14 muestra el efecto de lapatinib solo o en combinación con concentraciones crecientes de TTZ (5, 10 y 40 µg/ml). En las células BT474 la combinación de lapatinib con 5 µg/ml de TTZ muestra el mayor el efecto citotóxico con diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) con respecto a lapatinib solo (concentraciones de 0.001 a 1 µM y 100 µM de lapatinib) y la combinación con 10 µg/ml de TTZ (concentraciones de 0.001 a 0.1 µM de lapatinib) (Anexo 9). En la combinación de lapatinib con 40 µg/ml de TTZ presenta diferencias estadísticas en la proliferación celular ($p \leq 0.05$) en las concentraciones de 0.01 y 10 µM de lapatinib (Anexo 9).

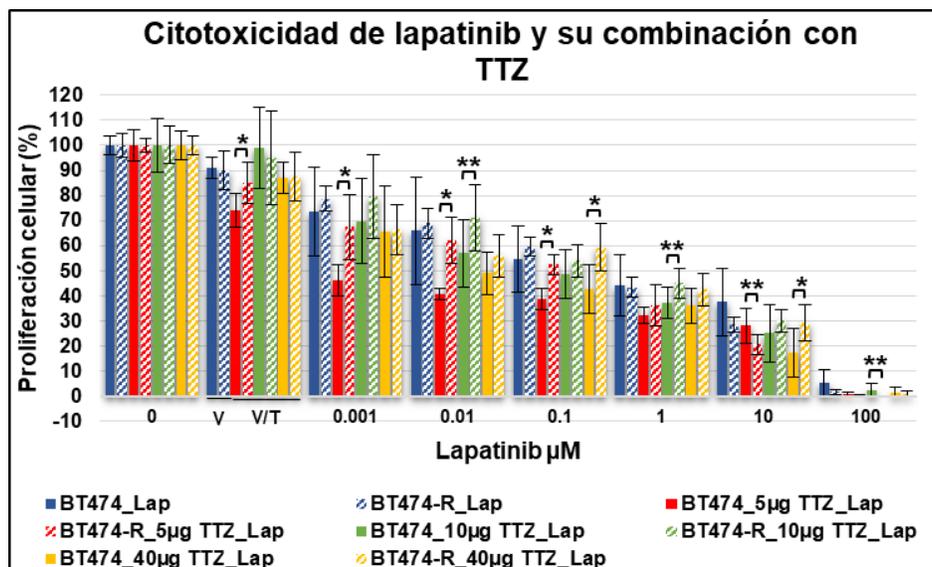


Fig. 14. Curva dosis-respuesta de lapatinib con concentraciones crecientes de TTZ sobre las líneas celulares BT474 y BT474-R. La figura muestra el promedio \pm la desviación estándar del número de células al final de tres experimentos independientes ($n=3$). Los corchetes indican la comparación entre BT474 (barra sólida) y BT474-R (barra rayada), la significancia estadística de esta comparación está indicada por: * ($p \leq 0.01$) o ** ($p \leq 0.05$). V: vehículo; V/T: vehículo con 5, 10 y 40 µg/ml de TTZ, respectivamente. El análisis estadístico correspondiente a los tratamientos de cada línea celular así como entre línea celular se encuentra en los Anexos 7 - 11.

El tratamiento de lapatinib solo o con 10 µg/ml de TTZ no presenta diferencias estadísticas entre las distintas concentraciones de lapatinib ($p \geq 0.05$) (Fig. 14, Anexo 9). Con 40 µg/ml de TTZ presenta diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) en las concentraciones de 0.01, 0.1, 10 y 100 µM de lapatinib (Anexo 9).

La IC_{50} alcanzada en la combinación lapatinib con 5 µg/ml de TTZ fue de 0.002 µM (Tabla 2). En tanto, para lapatinib solo y su combinación con 10 y 40 µg/ml de TTZ las IC_{50} fueron de 0.602, 0.085 y 0.031 µM, respectivamente. La Tabla 3 muestra que la IC_{50} de lapatinib en las células BT474 disminuye 301 veces al combinarse con 5 µg/ml de TTZ, esta eficiencia se pierde cuando se combina con 10 o 40 µg/ml de TTZ ya que la IC_{50} disminuye 7 y 20 veces, respectivamente.

En las células BT474-R la Fig. 14 muestra que lapatinib tiene un comportamiento similar al efecto citotóxico observado en la línea celular BT474 ($p \geq 0.05$) (Anexo 11). Lapatinib combinado con 5 µg/ml de TTZ muestran el mejor efecto citotóxico sobre la línea celular BT474-R con diferencias estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) con respecto a lapatinib solo (Anexo 9). La combinación de lapatinib con las concentraciones de 10 y 40 µg/ml de TTZ no incrementa, de manera general, el efecto citotóxico de lapatinib ($p \geq 0.05$) (Fig. 14, Anexo 9).

En BT474-R el IC_{50} de lapatinib fue de 0.208 µM y combinado con 5 µg/ml de TTZ fue de 0.078 µM. Esto significa que la adición de TTZ en la línea celular BT474-R incrementan, de manera significativa ($p \leq 0.05$), 2.7 veces la actividad de lapatinib (Tabla 3, Anexo 10). Esta actividad se pierde cuando se combina lapatinib con 10 µg/ml de TTZ (IC_{50} : 0.208 µM, $p \geq 0.05$) y se recupera cuando se combina con 40 µg/ml de TTZ (IC_{50} : 0.083 µM, $p \leq 0.05$) (Tabla 3, Anexo 10)

Si bien las IC_{50} de BT474 y BT474-R muestran una pequeña diferencia (0.602 contra 0.208 µM, Tabla 1), las células resistentes también fueron resistentes a la combinación de lapatinib con TTZ mostrando IC_{50} cercanas a uno, mientras que las células parentales mostraron IC_{50} de 7 a 301 veces menores (Tabla 3).

Estos resultados demuestran que lapatinib es altamente efectiva sobre la línea celular BT474 y su actividad se potencializa cuando se combina con dosis bajas de TTZ (5 µg/ml). Cuando BT474 adquiere resistencia a TTZ la actividad de lapatinib no cambia significativamente con respecto a BT474 ($p \geq 0.05$) (Anexo 11) y si bien la adición de dosis bajas de TTZ (5 µg/ml) potencializa su actividad, la citotoxicidad de esta combinación es menor que las células BT474 (Fig. 14, Tabla 3, Anexo 11). En general podemos concluir que la resistencia a TTZ también genera resistencia a la combinación lapatinib - TTZ.

La Fig. 15 muestra el efecto de dasatinib solo y en combinación con concentraciones crecientes de TTZ (5, 10 y 40 µg/ml). En la línea celular BT474 dasatinib desarrolla una escasa actividad inhibitoria a dosis menores de 10 µM (Anexo 7). Sin embargo, cuando se combina con TTZ aumenta su actividad de manera significativa ($p \leq 0.05$), con respecto a dasatinib solo (Anexo 7 y 9).

En la línea celular BT474 las combinación dasatinib con 10 y 40 µg/ml de TTZ desarrollan la mayor respuesta citotóxica con una IC_{50} de 0.087 y 0.15 µM, respectivamente (Tabla 2). La combinación dasatinib con 5 µg/ml de TTZ desarrolla la menor respuesta citotóxica de las tres combinaciones con una IC_{50} de 1.22 µM. La Tabla 3 muestra que la combinación dasatinib con 40 µg/ml de TTZ incrementa 152 veces la actividad de dasatinib ($p \leq 0.01$) (Anexo 10). Mientras que la combinación dasatinib con 5 y 10 µg/ml de TTZ incrementa la actividad citotóxica de dasatinib 19 y 26 veces ($p \leq 0.01$), respectivamente (Tabla 3, Anexo 10).

En BT474-R, la Fig. 15 muestra que dasatinib desarrolla una actividad citotóxica significativa ($p \leq 0.05$), con respecto a BT474 (Anexo 11). Combinado con 5 y 10 µg/ml de TTZ su actividad citotóxica incrementa significativamente con respecto a dasatinib en BT474-R ($p \leq 0.05$) y dasatinib combinado con 5 y 10 µg/ml de TTZ en BT474 ($p \leq 0.05$) (Fig. 15, Anexo 7, 10 y 11).

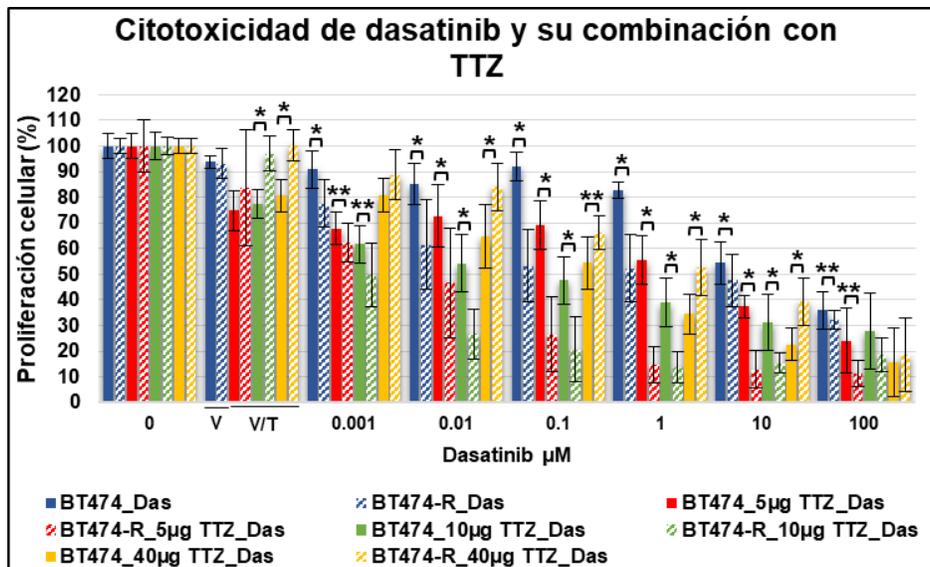


Fig. 15. Curva dosis-respuesta de dasatinib con concentraciones crecientes de TTZ sobre las líneas celulares BT474 y BT474-R. La figura muestra el promedio \pm la desviación estándar del número de células al final de tres experimentos independientes ($n=3$). Los corchetes indican la comparación entre BT474 (barra sólida) y BT474-R (barra rayada), la significancia estadística de esta comparación está indicada por: * ($p \leq 0.01$), ** ($p \leq 0.05$). V: vehículo; V/T: vehículo con 5, 10 y 40 $\mu\text{g/ml}$ de TTZ, respectivamente. El análisis estadístico correspondiente a los tratamientos de cada línea celular así como entre línea celular se encuentra en los Anexos 7 - 11.

La mayor actividad citotóxica en BT474-R se presentó en la combinación dasatinib con 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de TTZ con una IC_{50} de 0.018 y 0.0002 μM , respectivamente (Tabla 2). La combinación dasatinib con 40 $\mu\text{g/ml}$ de TTZ fue la menos activa de las tres combinaciones ensayadas con una IC_{50} de 2.315 μM . La Tabla 3 muestra que la combinación dasatinib con 10 $\mu\text{g/ml}$ de TTZ incrementa 41,430 veces la actividad de dasatinib, mientras que la combinación dasatinib con 5 y 40 $\mu\text{g/ml}$ de TTZ incrementan la actividad de dasatinib 460 y 3.6 veces, respectivamente.

Este resultado demuestra que la línea celular BT474-R activa mecanismos que le permiten generar resistencia a TTZ, mismos que puede ser contrarrestado de

manera significativa con el inhibidor del dominio de cinasa dasatinib o bien potencializar su actividad combinándolo con TTZ.

La Fig. 16 muestra que nintedanib solo y en combinación con concentraciones crecientes de TTZ desarrolla el mismo efecto citotóxico sobre las líneas celulares BT474 Y BT474-R (Anexo 11), con excepción de la combinación nintedanib con 10 $\mu\text{g/ml}$ de TTZ donde se observa un incremento en la proliferación celular de BT474-R en las concentraciones de 0.001 y 1 μM de nintedanib y una disminución en la proliferación celular con las concentraciones de 0.1, 10 y 100 μM de nintedanib ($p \leq 0.05$) (Anexo 7 y 11). La IC_{50} de nintedanib en ambas líneas celulares es de 1.2 μM y al combinarse con TTZ (5, 10 y 40 $\mu\text{g/ml}$) su actividad se incrementa entre dos y tres veces (Tabla 3).

En BT474, nintedanib combinado con TTZ (5, 10 y 40 $\mu\text{g/ml}$) presenta diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$), con respecto a nintedanib solo, en concentraciones de 0.001 a 1 μM , con excepción de la concentración de 0.1 μM de nintedanib con 5 $\mu\text{g/ml}$ de TTZ (Anexo 9).

En BT474 R, nintedanib combinado con TTZ (5, 10 y 40 $\mu\text{g/ml}$) muestra diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$), con respecto a nintedanib solo, en concentraciones de 0.01 a 100 μM , con excepción de la combinación de 0.01 μM de nintedanib con 5 $\mu\text{g/ml}$ de TTZ y 0.1 μM de nintedanib con 40 $\mu\text{g/ml}$ de TTZ (Anexo 9).

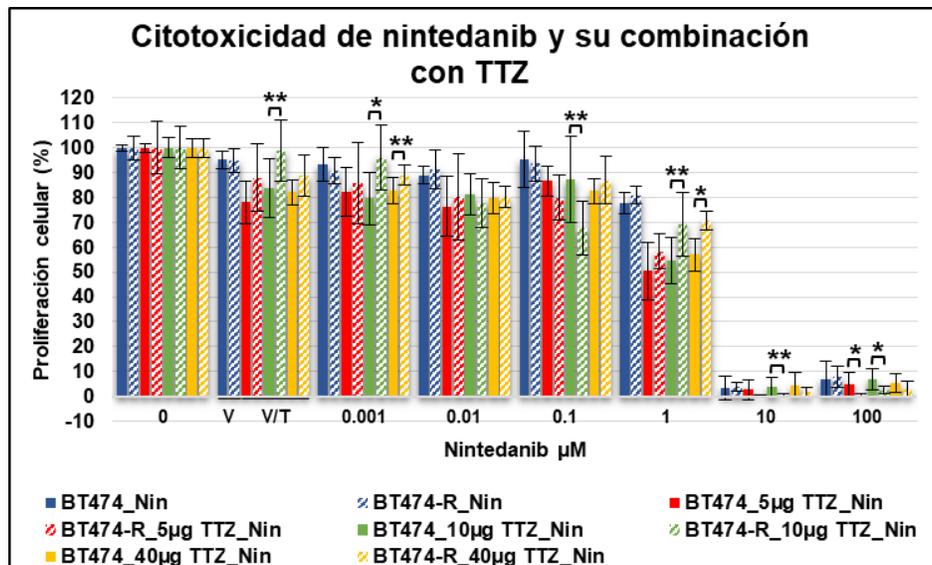


Fig. 16. Curva dosis-respuesta de nintedanib con concentraciones crecientes de TTZ sobre las líneas celulares BT474 y BT474-R. La figura muestra el promedio \pm la desviación estándar del número de células al final de tres experimentos independientes ($n=3$). Los corchetes indican la comparación entre BT474 (barra sólida) y BT474-R (barra rayada), la significancia estadística de esta comparación está indicada por: * ($p\leq 0.01$) o ** ($p\leq 0.05$). V: vehículo; V/T: vehículo con 5, 10 y 40 $\mu\text{g/ml}$ de TTZ, respectivamente. El análisis estadístico correspondiente a los tratamientos de cada línea celular así como entre línea celular se encuentra en los Anexos 7-11.

La mayor actividad citotóxica de nintedanib solo y en combinación con concentraciones crecientes de TTZ (5, 10 y 40 $\mu\text{g/ml}$) fue observada a concentraciones mayores a 10 μM , en ambas líneas celulares (BT474 y BT474 R), lo que demuestra la baja actividad citotóxica del inhibidor. En conclusión, nintedanib y su combinación con TTZ no vence la resistencia a TTZ en la línea celular BT474.

La Fig. 17 muestra el efecto citotóxico de sorafenib solo y en combinación con concentraciones creciente de TTZ (5, 10 y 40 $\mu\text{g/ml}$) en la línea celular BT474 y BT474-R.

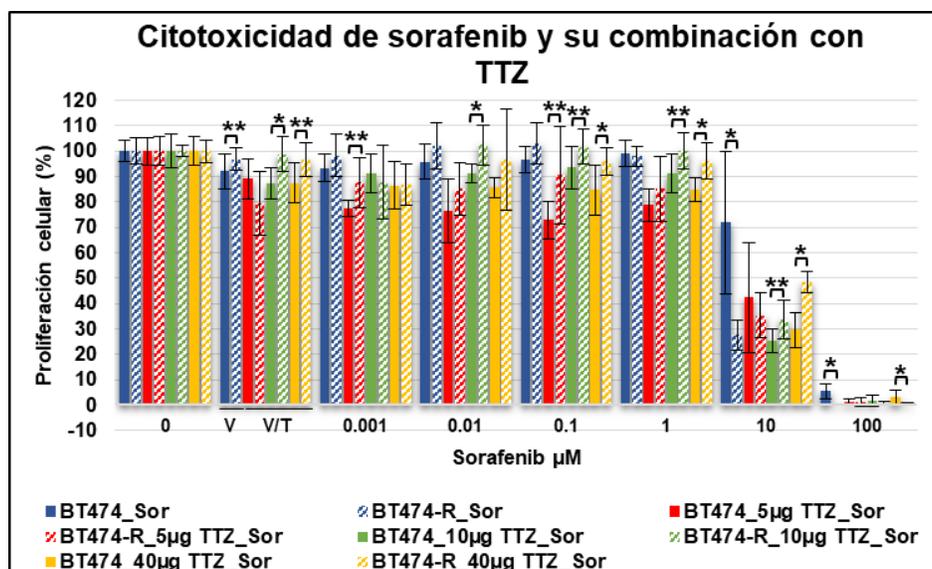


Fig. 17. Curva dosis-respuesta de sorafenib con concentraciones crecientes de TTZ sobre las líneas celulares BT474 y BT474-R. La figura muestra el promedio \pm la desviación estándar del número de células al final de tres experimentos independientes ($n=3$). Los corchetes indican la comparación entre BT474 (barra sólida) y BT474-R (barra rayada), la significancia estadística de esta comparación está indicada por: * ($p \leq 0.01$) o ** ($p \leq 0.05$). V: vehículo; V/T: vehículo con 5, 10 y 40 $\mu\text{g/ml}$ de TTZ, respectivamente. El análisis estadístico correspondiente a los tratamientos de cada línea celular así como entre línea celular se encuentra en los Anexos 7 - 11.

En la línea celular BT474 se puede observar que sorafenib desarrolla poca actividad citotóxica (IC_{50} 39.15 μM), actividad que se potencia entre 16 y 22 veces cuando se combina con TTZ ($p \leq 0.05$) (Tabla 3, Anexo 10). La combinación de sorafenib con 5 y 40 $\mu\text{g/ml}$ de TTZ son los más activos con un IC_{50} de 1.9 y 1.7 μM , respectivamente (Tabla 2). Sorafenib con 5 $\mu\text{g/ml}$ de TTZ presenta diferencia estadística ($p \leq 0.05$), con respecto al sorafenib solo, en todas sus concentraciones (Anexo 9). En tanto, la combinación sorafenib con 40 $\mu\text{g/ml}$ de TTZ presenta diferencias estadísticas, con respecto al inhibidor solo, en las concentraciones de entre 0.01 a 10 μM ($p \leq 0.05$) (Anexo 9). La combinación de sorafenib con 10 $\mu\text{g/ml}$ de TTZ es la menos activa de las tres combinaciones estudiadas con un IC_{50} de 2.3

μM y con diferencias estadísticas en concentraciones mayores a $1 \mu\text{M}$ ($p \leq 0.05$) (Anexo 9).

En BT474-R la Fig. 17 muestra que, a concentraciones menores de $1 \mu\text{M}$, sorafenib presenta una actividad citotóxica semejante a la línea celular BT474 ($p \geq 0.05$) (Anexo 11). Sin embargo, el IC_{50} de sorafenib solo en BT474-R es 10 veces menor que en BT474 (3.6 y $39.1 \mu\text{M}$, respectivamente) (Tabla 2). En la combinación, las concentraciones crecientes TTZ no incrementa la actividad citotóxica de sorafenib (Fig. 17). La Tabla 3, muestra que el incremento de concentración de TTZ disminuye la actividad citotóxica de sorafenib perdiéndose a la mitad con la concentración de $40 \mu\text{g/ml}$ de TTZ (Anexo 7, 9 y 11).

Estos resultados demuestran que sorafenib, al igual que nintedanib, no presenta una actividad significativa sobre las líneas celulares BT474 y BT474-R. También se demuestra que BT474-R, al momento de comparar las IC_{50} , es más sensible a sorafenib solo en comparación a BT474 y que dicha actividad se pierde al momento de combinarlo con concentraciones crecientes de TTZ. Sin embargo, sorafenib no es capaz de vencer los mecanismos de resistencia a TTZ debido a que se requieren de altas concentraciones para obtener el 50% de actividad inhibitoria.

8.- DISCUSIÓN.

El cáncer de mama es una de las principales causas de muerte en mujeres por neoplasias. La diversidad de formas de esta enfermedad se refleja en los diferentes perfiles de expresión génica que han permitido clasificar a las pacientes en subgrupos y así ajustar los tratamientos para cada subtipo de cáncer de mama y con ello mejorar y prolongar la calidad de vida de los pacientes que presentan este padecimiento (Sorlie, *et al.*, 2001; Sandhu, *et al.*, 2010).

En el caso del cáncer de mama HER2-positivo, la primer línea de tratamiento es el anticuerpo monoclonal TTZ. A pesar de ello, entre el 70% y el 90% de los pacientes que reciben este medicamento como única terapia desarrollan resistencia o incluso la presentan desde el principio del tratamiento (intrínseca o primaria) y pocos responden (11-26% de los pacientes) (Shattuck, *et al.*, 2008). De los pocos que responden, después de 9 meses de tratamiento el desarrollo de resistencia es inevitable (resistencia secundaria) (Nahta, *et al.*, 2005; Shattuck, *et al.*, 2008). Se ha sugerido que entre los mecanismos de resistencia esta la activación y/o sobreexpresión de proteínas cinasas como c-Src y que la combinación de terapias (TTZ más inhibidores de cinasas) podría contrarrestar estos mecanismos de resistencia (Wang, *et al.*, 2011; Zhang, *et al.*, 2011; Peiró, *et al.*, 2014).

En el presente estudio se desarrolló un modelo *in vitro* de resistencia a TTZ (inducida o secundaria) sobre células que sobreexpresan el receptor HER2 (BT474 y SKBR3) en la cual se ensayó el efecto citotóxico de cuatro inhibidores de cinasas (dasatinib, lapatinib, nintedanib y sorafenib) y el efecto de la combinación con TTZ.

La línea celular BT474-R fue obtenida después de 24 semanas de tratamiento, en tanto la línea celular SKBR3 no presento resistencia aun después de 28 semanas de tratamiento continuo con TTZ. Estudios de inducción de resistencia a TTZ sobre estas líneas celulares han mostrado que los tiempos requeridos para generar la resistencia son variables (Valabrega, *et al.*, 2011; Wang, *et al.*, 2011; Wu, *et al.*, 2012; Peiró, *et al.*, 2014). Esta variación en los tiempos de inducción de resistencia

a TTZ posiblemente se debe a los diferentes esquemas y concentraciones de TTZ empleados entre los diferentes grupos de trabajo.

Para conocer el efecto de TTZ se realizaron ensayos de dosis-respuesta sobre las líneas celulares BT474 y SKBR3. La actividad de TTZ muestra que el efecto antiproliferativo se da a partir de 5 µg/ml, concentración a la cual alcanza su actividad inhibitoria máxima (inhibición celular del 15.2±10% y 16.2±1.7%, respectivamente). Esta conclusión se apoya en el hecho de que al adicionar concentraciones crecientes de TTZ (5 – 160 µg/ml) estas no afectan significativamente la inhibición alcanzada con 5 µg/ml (Fig. 9). Estudios de dosis-respuesta muestran que TTZ desarrolla bajo efecto antiproliferativo (entre 20 y 30%) (Shattuck, *et al.*, 2008), datos coincidentes con nuestro resultado. Esto ha llevado a postular que *In vitro* estas líneas celulares no son completamente dependientes de HER2 para su proliferación o que son capaces de una rápida adaptación que les permite evitar algunos de los efectos del tratamiento con TTZ.

Sobre la línea celular BT474-R, la presencia de TTZ en concentraciones mayores a 20 µg/ml, no afecta de manera significativa la viabilidad celular, con respecto a BT474, e incluso la ausencia del mismo permite observar un ligero aumento en la proliferación (12.47 ± 6.57%) (Fig. 10A). Estos resultados concuerdan con los hallazgos de Wang y colaboradores (2011) y con los de Wu y colaboradores (2012) quienes muestran que la línea celular BT474-R, tanto en ausencia como en presencia de TTZ, desarrolla un incremento en la proliferación celular. En la línea celular SKBR3 después de 28 semanas de inducción de resistencia a TTZ, el anticuerpo afecta de manera significativa la proliferación celular e incluso es más sensible que la línea celular SKBR3 sin periodo de inducción de resistencia a TTZ (Fig. 10B).

En la evaluación de los niveles de expresión proteica y/o actividad, encontramos que BT474-R no presenta cambios significativos en los niveles de fosforilación de HER2. Esta observación concuerda con los hallazgos hechos por

Wang y colaboradores (2011) y de Kanzaki y colaboradores (2016), quienes muestran, en su modelo de resistencia, que BT474-R mantiene la fosforilación de HER2, así como la señalización dependiente de la familia HER. Aunado a ello, Wang y colaboradores (2011) señalan no encontrar cambios significativos en los niveles de ER ni en los de PR (mRNA y proteína). En nuestro modelo, BT474-R presenta un decremento en los niveles de ER α y mantiene sin cambios los niveles de la variante 36 kDa. En tanto en PR, observamos que nuestra línea celular BT474-R presenta un aumento significativo en la expresión de PR β . En los estudios de Kanzaki y colaboradores (2016), en su modelo de resistencia, muestran un incremento en la actividad de NF- κ B, mismo que es asociado con la activación de las isoformas de PR.

Por otra parte, Zhang y colaboradores (2011) así como Peiró y colaboradores (2014) y Takeda y colaboradores (2017) han mostrado, en sus modelos de resistencia a TTZ en la línea celular BT474, un incremento en el estado de fosforilación de c-Src (Tyr416). En la fosforilación de AKT (S473) Zhang y colaboradores (2011) reporta que pAKT S473 permanece sin cambios en la línea celular BT474-R, mientras Takeda y colaboradores (2017) reportan un incremento en la fosforilación de pAKT Ser473. En nuestro sistema de resistencia de la línea celular BT474, la fosforilación de c-Src (Tyr416) muestra una disminución con diferencia significativa con respecto a BT474 ($p \leq 0.05$). Por otra parte, pAKT S473 muestra incremento de la variante de 62 kDa (correspondiente a la isoforma AKT1/3) y una disminución de la variante de 56 kDa (correspondiente a la isoforma AKT2).

De manera general, la posible variación de nuestros resultados con los patrones de fosforilación reportados en la literatura, podría deberse a los diferentes diseños experimentales empleados para la inducción de resistencia a TTZ, así como a los tiempos de extracción proteicas. Esto lo demuestra de manera independiente Zhang y colaboradores (2011) quienes reportan que la fosforilación de c-Src, en BT474-R, cambia de manera curso-temporal en presencia de TTZ.

En conclusión, estos hallazgos sugieren que la resistencia a TTZ en las células BT474-R generada en nuestro sistema podría estar asociada al aumento del receptor de progesterona (PR- β) y/o a una señalización persistente por HER2/AKT y no a la activación de c-Src.

Para comprobar si la resistencia inducida a TTZ se puede vencer mediante terapia combinada con TKI's. Las células BT474 resistentes a TTZ fueron sometidas a ensayos de dosis respuestas con diferentes inhibidores de cinasas (dasatinib, lapatinib, nintedanib y sorafenib). De los inhibidores ensayados, dasatinib es el inhibidor más activo al combinarlo con TTZ (5 y 10 $\mu\text{g/ml}$). En tanto, lapatinib y nintedanib a pesar de tener una significativa actividad inhibitoria desarrollan el mismo efecto tanto en la línea celular BT474 como en BT474-R (Tablas 2 y 3).

Ensayos dosis respuesta con lapatinib en las líneas celulares BT474 y BT474 resistente a TTZ, muestran que ambas líneas celulares son altamente sensibles a este inhibidor (O'Brien, *et al.*, 2010; Wang, *et al.*, 2011; Kanzaki, *et al.*, 2016). En nuestro estudio, lapatinib es altamente activo sobre las líneas celulares BT474 (IC_{50} = 0.6 μM) y BT474-R (IC_{50} = 0.2 μM). En tanto, la terapia combinada sobre la línea celular BT474-R, TTZ no potencializa la actividad de lapatinib, como sucede con la línea celular sensible a TTZ, BT474, donde es potencializada hasta 301 veces.

Por otro lado, se ha demostrado que la línea celular BT474 es altamente resistente a la actividad inhibitoria de dasatinib (Huang, *et al.*, 2007; Kurebayashi, *et al.*, 2010). Sin embargo, cuando se combina con TTZ su efecto se potencializa (Seoane, *et al.*, 2010; Takeda, *et al.*, 2017). Los ensayos realizados en el presente estudio muestran que, ambas líneas celulares, BT474 y BT474-R, son altamente resistentes a este inhibidor (IC_{50} = 23.2 μM y 8.2 μM , respectivamente) y que la adición de TTZ potencializa la actividad del inhibidor hasta 152 veces en la línea celular BT474 y 41,000 veces en la línea celular BT474-R (Tabla 2 y 3).

9.- CONCLUSIÓN.

Estos resultados demuestran que la resistencia a TTZ es generada mediante una combinación de vías de señalización que le permiten escapar al efecto inhibitorio de la monoterapia. Sin embargo, al momento de combinar inmunoterapias con TKIs (dasatinib) se pueden bloquear varias de estas vías y con ello vencer el estado de resistencia celular a TTZ.

10.- PERSPECTIVAS.

El incremento en la fosforilación de AKT S473 de 62 kDa y del receptor de progesterona (PR β) asociados a la resistencia a TTZ sugiere una posible participación en la adquisición de este fenotipo. Sería de interés emplear inhibidores farmacológicos y/o iRNA para neutralizar su funcionamiento y así evaluar su posible participación en la resistencia a TTZ. Paralelo a esto se podría evaluar si la fosforilación de AKT S473 de 62 kDa y la sobreexpresión de PR β son suficientes para conferir resistencia a TTZ. Por otra parte, sería de interés evaluar la actividad de lapatinib y dasatinib sobre las células BT474-R generadas mediante nuestro sistema en modelos de xenotransplantes murinos.

11.- BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, A. G. y O'Neill, E. O. 2014. PI3K/AKT-mediated regulation of p53 in cancer. *Biochemical Society Transactions*. 42(4): 798-803.
- Alvarez, R. H.; Kantarjian, H. M. y Cortes, J. E. 2006. The role of Src in solid and hematologic malignancies: development of new-generation src inhibitors. *Cancer*. 107(8): 1918-1929.
- Arteaga, C. L. y Engelman, J. A. 2014. ERBB Receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell*. 25(3): 282-303.
- Atalay, G.; Cardoso, F.; Awada, A. y Piccart, M. J. 2003. Novel therapeutic strategies targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR) family and its downstream effectors in breast cancer. *Annals of Oncology*. 14(9): 1346-1363.
- Bader, A.G.; Kang, S.; Zhao, L. y Vogt, P. K. 2005. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nature Reviews: Cancer*. 5(12): 921-929.
- Belsches-Jablonski, A. P; Biscardi, J. S.; Paevy, D. R.; Tice, D. A.; Romney, D. A. y Parsons, S.J. 2001. Src family kinases and HER2 interactions in human breast cancer cell growth and survival. *Oncogene*. 20(12): 1465-1475.
- Bilancia, D.; Rosati, G.; Dinota, A.; Germano, D.; Romano, R. y Manzione, L. 2007. Lapatinib in breast cancer. *Annals of Oncology*. 18(6): 26-30.
- Biscardi, J. S.; Maa, M. C.; Tice, D. A.; Cox, M. E.; Leu, T, H. y Parsons, S. J. 1999. c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(12): 8335-8343.
- Brown, M. T. y Cooper, J. A. 1996. Regulation, substrates and functions of src. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1287(2-3): 121-149.
- Burgess, A.W. 2008. EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets. *Growth Factors*. 26(5): 263-274.
- Burriss, H.A., 2004. Dual kinase inhibition in the treatment of breast cancer: initial experience with the EGFR/ErbB-2 inhibitor lapatinib. *The Oncologist*. 9(3): 10-15.
- Burriss, H. A.; Hurwitz, H. I.; Dees, E. C.; Dowlati, A.; Blackwell, K. L.; O'Neil, B.;

- Marcom, P. K.; Ellis, M. J.; Overmoyer, B.; Jones, S. F.; Harris, J. L.; Smith, D. A.; Koch, K. M.; Stead, A.; Mangum, S. y Spector, N. L. 2005. Phase I safety, pharmacokinetics, and clinical activity study of lapatinib (GW572016), a reversible dual inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinases, in heavily pretreated patients with metastatic carcinomas. *Journal of Clinical Oncology*. 23(23): 5305-5313.
- Campos-Gómez, S.; Cruz-Ramos, M.; Esparza-López, J.; León-Rodríguez, E.; Dip-Borunda, K.; Zentella-Dehesa, A. e Ibarra-Sánchez, M. J. 2013. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 12(2): 92-100.
- Cárdenas-Sánchez, J.; Bargalló-Rocha, J. E.; Erazo-Valle, A.; Poitevin-Chacón, A.; Valero-Castillo, V. y Pérez-Sánchez, V. 2015. Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. Sexta revisión: Colima 2015. Masson Doyma México. México, D.F. 144 Pp.
- Carmona, F. J.; Montemurro, F.; Kannan, S.; Rossi, V.; Verma, C.; Baselga, J. y Scaltriti, M. 2016. AKT signaling in ERBB2-amplified breast cancer. *Pharmacology and Therapeutic*. 158: 63-70.
- Carracedo, A. y Pandolfi, P. P. 2008. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talk. *Oncogene*. 27(41): 5527-5541.
- Carter, P.; Presta, L.; Gorman, C. M.; Ridgway, J. B. B; Henner, D.; Wong, W. L. T.; Rowland, A. M.; Kotts, C.; Carver, M. E. y Shepard, M. 1992. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89(10): 4285–4289.
- Chávarri-Guerra, Y.; Villarreal-Garza, C.; Liedke, P. E. R.; Knaul, F.; Mohar, A.; Finkelstein, D. M. y Goss, P. E. 2012. Breast cancer in Mexico: a growing challenge to health and the health system. *The Lancet Oncology*. 13(8): e335–e343.
- Chen, S.; Zhu, X.; Qiao, H.; Ye, M.; Lai, X.; Yu, S.; Ding, L.; Wen, A. y Zhang, J. 2015. Protective autophagy promotes the resistance of HER2-positive breast cancer cells to lapatinib. *Tumor Biology*. 37(2): 2321-2331.
- Chojnacka, K. y Mruk, D. D. 2015. The Src non-receptor tyrosine kinase paradigm:

- new insights into mammalian Sertoli cell biology. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 415: 133-142.
- Chong, Y. P.; Ia, K. K.; Mulherm, T. D. y Cheng, H. C. 2005. Endogenous and synthetic inhibitors of the Src-family protein tyrosine kinases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1754(1-2): 210-220.
- Cidado, J. y Park, B. H. 2012. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway for breast cancer therapy. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 17(3-4): 205-216.
- Citri, A. y Yarden, Y. 2006. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*. 7(7): 505-516.
- Cordo-Russo, R. I.; Béguelin, W.; Díaz-Flaqué, M. C.; Proietti, C. J.; Venturutti, L.; Galigniana, N.; Tkach, M.; Guzmán, P.; Roa, J. C.; O'Brien, N. A.; Charreau, E. H.; Schillaci, R. y Elizalde, P. V. 2015. Targeting ErbB-2 nuclear localization and function inhibits breast cancer growth and overcomes Trastuzumab resistance. *Oncogene*. 34(26): 3413-3428.
- Dillon, R. L.; White, D. E. y Muller, W. J. 2007. The phosphatidyl inositol 3-kinase signaling: implications for human breast cancer. *Oncogene*. 26(9): 1338-1345.
- Ding, L.; Tian, C.; Feng, S.; Fida, G.; Zhang, C.; Ma, Y.; Ai, G.; Achilefu, S. y Gu, Y. 2015. Small sized EGFR1 and HER2 specific bifunctional antibody for targeted cancer therapy. *Theranostics*. 5(4): 378-398.
- Du, C.; Yi, X.; Liu, W.; Han, T.; Liu, Z.; Ding, Z.; Zheng, Z.; Piao, Y.; Yuan, J.; Han, Y.; Xie, M. y Xie, X. 2014. MTDH mediates Trastuzumab resistance in HER2 positive breast cancer by decreasing PTEN expression through an NFκB-dependent pathway. *BMC Cancer*. 14(1): 869.
- Duru, N.; Candas, D.; Jiang, G.; Li, J. J. 2014. Breast cancer adaptive resistance: HER2 and cancer stem cell repopulation in a heterogeneous tumor society. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 140(1): 1-14.
- Eliyatkin, N. O.; Aktas, S.; Ozgur, H.; Ercetin, P. y Kupelioglu, A. 2016. The role of p95HER2 in Trastuzumab resistance in breast cancer. *The Official Journal of Balkan Union of Oncology*. 21(2): 382-389.
- Esteva, F. J.; Valero, V.; Booser, D.; Guerra, L. T.; Murray, J. L.; Pusztai, L.;

- Cristofanilli, M.; Arun, B.; Esmaeli, B.; Fritsche, H. A.; Sneige, N.; Smith, T. L. y Hortobagyi, G. N. 2002. Phase II study of weekly Docetaxel and Trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 20(7): 1800-1808.
- Falasca, M.; Hamilton, J. R.; Selvadurai, M.; Sundaram, K.; Adamska, A. y Thompson, P. E. 2017. Class II phosphoinositide 3-kinases as novel drug targets. *Journal of Medicinal Chemistry*. 60(1): 47-65.
- Force, T.; Krause, D. S. y Van-Etten, R. A. 2007. Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition. *Nature Reviews: Cancer*. 7(5): 332-344.
- Formisano, L.; Nappi, L.; Rosa, R.; Marciano, R.; D'Amato, C.; D'Amato, V.; Damiano, V.; Raimondo, L.; Iommelli, F.; Scorziello, A.; Troncone, G.; Veneziani, B. M.; Parsons, S. J.; De Placido, S. y Bianco, R. 2014. Epidermal growth factor-receptor activation modulates Src-dependent resistance to lapatinib in breast cancer models. *Breast Cancer Research*. 16(3): R45.
- Frame, M.C. 2002. Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1602(2): 114-130.
- Franke, T. F. 2008. PI3K/AKT: getting it right matters. *Oncogene*. 27(50): 6473-6488.
- Garcia-Recio, S.; Pastor-Arroyo, E. M.; Marín-Aguilera, M.; Almendro, V. y Gascón, P. 2015. The transmodulation of HER2 and EGFR by substance P in breast cancer cells requires c-Src and metalloproteinase activation. *Plos One*. 10(6): e0129661.
- GLOBOCAN. 2012. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
- González-Niño, L. A.; Avila-Garavito, A.; Echceverri-Jaramillo, C.; Jaramillo-Velásquez, S.; Salazar-Corcho, R. D. y Aristizábal-Bernal, B. H. 2007. Cáncer de mama: HER2/neu, métodos diagnósticos y consideraciones clínicas. *Revista Colombiana de Cancerología*. 11(4): 40-57.
- Harbeck, N. y Wuerstlein, R. 2013. Optimal sequencing of anti-HER2 therapy throughout the continuum of HER2-positive breast cancer: evidence and clinical considerations. *Drugs*. 73(15): 1665-1680.

- Hennessey, B.T.; Smith, D. L.; Ram, P. T.; Lu, Y. y Mills, G. B. 2005. Exploiting the PI3K /AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature Reviews: Drug Discovery*. 4(12): 988-1004.
- Hilbig, A. 2008. Src kinase and pancreatic cancer. *Recent Results in Cancer Research*. 177: 179-185.
- Holbro, T. y Hynes, N. E. 2004. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 44: 195-217.
- Howe, L. R. y Brown, P. H. 2011. Targeting the HER/EGFR/ErbB family to prevent breast cancer. *Cancer Prevention Research*. 4(8): 1149-1157.
- Huang, F.; Reeves, K.; Han, X.; Fairchild, C.; Platero, S.; Wong, T. W.; Lee, F.; Shaw, P. y Clark, E. 2007. Identification of candidate molecular markers predicting sensitivity in solid tumors to dasatinib: rationale for patient selection. *Cancer Research*. 67(5): 2226-2238.
- Hynes, N. E.; Horsch, K.; Olayioye, M. A. y Badache, A. 2001. The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators. *Endocrine Related Cancer*. 8(3):151-159.
- Hynes, N. E. y Lane, H. A. 2005. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews: Cancer*. 5(5): 341-354.
- Hynes, N. E. y MacDonald, G. 2009. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Current Opinion in Cell Biology*. 21(2):177-184.
- Irby, R. B. y Yeatman, T. J. 2000. Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene*. 19(49): 5636-5642.
- Ishikawa, T.; Seto, M.; Banno, H.; Kawakita, Y.; Oorui, M.; Taniguchi, T.; Ohta, Y.; Tamaru, T.; Nakayama, A.; Miki, H.; Kamiguchi, H.; Tanaka, T.; Habuka, N.; Sogabe, S.; Yano, J.; Aertgeerts, K. y Kamiyama, K. 2011. Design and synthesis of novel human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)/epidermal growth factor receptor (EGFR) dual inhibitors bearing a pyrrolo[3,2-d]pyrimidine scaffold. *Journal of Medicinal Chemistry*. 54(23): 8030-8050.
- Ishizawar, R. y Parsons, S. J. 2004. c-Src and cooperating partners in human cancer. *Cancer Cell*. 6(3): 209-214.
- Jain, D.; Russell, R. R.; Schwartz, R. G.; Panjrath, G. S. y Aronow, W. 2017. Cardiac complications of cancer therapy: pathophysiology, identification, prevention,

- treatment, and future directions. *Current Cardiology Reports*. 19(5): 36.
- Jiang, B. H. y Liu, L. Z. 2008. PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1784(1): 150-158.
- Junttila, T.T.; Akita, R. W.; Parsons, K.; Fields, C.; Phillips, G. D. L.; Friedman, L. S.; Sampath, D. y Sliwkowski, M. X. 2009. Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by Trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. *Cancer Cell*. 15(5): 429–440.
- Kanzaki, H.; Mukhopadhyaya, N. K.; Cui, X.; Ramanujan. V. K. y Murali, R. 2016. Trastuzumab-resistant luminal B breast cancer cells show basal-like cell growth features through NF- κ B-activation. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*. 35(1): 1-11.
- Kruser, T.J. y Wheeler, D. L. 2010. Mechanisms of resistance to HER family targeting antibodies. *Experimental Cell Research*. 316(7): 1083-1100.
- Kurebayashi, J.; Kanomata, N.; Moriya, T.; Kozuka, Y.; Watanabe, M. y Sonoo, H. 2010. Preferential antitumor effect of the Src inhibitor dasatinib associated with a decreased proportion of aldehyde dehydrogenase 1-positive cells in breast cancer cells of the basal B subtype. *BMC Cancer*. 10(1): 568.
- Landgraf, R. 2007. HER2 (ERBB2): functional diversity from structurally conserved building blocks. *Breast Cancer Research*. 9(1): 202.
- Le, X. F. y Bast, R. C. 2011. Src family kinases and paclitaxel sensitivity. *Cancer Biology and Therapy*. 12(4): 260-269.
- Liu, P.; Cheng, H.; Roberts, T. M. y Zhao, J. J. 2009. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature Reviews: Drug Discovery*. 8(8): 627-644.
- Louis, K. S. y Siegel, A. C. 2011. Cell viability analysis using tripan blue: manual and automated methods. En Stoddart, M. J. *Mammalian cell viability: methods and protocols*. Humana Press. New York. Vol 740. Pp. 7-12.
- Martin, G. S. 2004. The road to Src. *Oncogene*. 23(48): 7910-7917.
- Moy, B. y Goss, P. E. 2006. Lapatinib: current status and future directions in breast cancer. *The Oncologist*. 11(10): 1047-1057.
- Nagata, Y.; Lan, K. H.; Zhou, X.; Tan, M.; Esteva. F. J.; Sahin, A. A.; Klos, K. S.; Li, P.; Monia, B. P.; Nguyen, N. T.; Hortobagyi, G. N.; Hung, M. C. y Yu, D. 2004.

- PTEN activation contributes to tumor inhibition by Trastuzumab, and loss of PTEN predicts Trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell*. 6(2): 117-127.
- Nahta, R.; Hung, M.C. y Esteva F. J. 2004a. The HER-2-Targeting antibodies Trastuzumab and Pertuzumab synergistically inhibit the survival of breast cancer cells. *Cancer Research*. 64(7): 2343-2346.
- Nahta, R.; Takahashi, T.; Ueno, N. T.; Hung, M. C. y Esteva, F. J. 2004b. P27^{kip1} down-regulation is associated with Trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Cancer Research*. 64(11): 3981-3986.
- Nahta, R.; Yuan, L. X. H.; Zhang, B.; Kobayashi, R. y Esteva, F. J. 2005. Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to Trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Research*. 65(23): 11118-11128.
- Nahta, R. y Esteva, F. J. 2006. Molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast Cancer Research*. 8(6): 215.
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). 2015. Clinical practice guidelines in oncology (NCCN guidelines version 3.2015): Breast cancer. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx
- O'Brien, N. A.; Browne, B. C.; Chow, L.; Wang, Y.; Ginther, C.; Arboleada, J.; Duffy, M. J.; Crown, J.; O'Donovan, N. y Slamon, D. J. 2010. Activated phosphoinositide 3-kinase/AKT signaling confers resistance to Trastuzumab but not lapatinib. *Molecular Cancer Therapeutics*. 9(6): 1489-1502.
- Ono, M. y Kuwano, M. 2006. Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs. *Clinical Cancer Research*. 12(24): 7242-7251.
- Pareja, F.; Pines, G. y Yarden, Y. 2015. The EGFR/ERBB receptor family. En Wheeler, D. L. y Yarden, Y. Receptor Tyrosine Kinases: family and subfamilies. Humana Press. New York. NY. Pp. 107-164.
- Pal, I. y Mandal, M. 2012. PI3K and AKT as molecular targets for cancer therapy: current clinical outcomes. *Acta Pharmacologica Sinica*. 33(12): 1441-1458.
- Parsons, S. J.; Pritchard, J. E.; Fox, E. M. y Shupnik, M. A. 2012. Cooperative interactions between c-Src, estrogen receptors and receptor tyrosine kinases in

- breast cancer. En Castoria, G. y Migliaccio, A. *Advances in rapid sex-steroid action. Springer Science Business Media*. New York. NY. USA. Pp. 31-59.
- Peiró, G.; Ortiz-Martínez, F.; Gallardo, A.; Pérez-Balaguer, A.; Sánchez-Payá, J.; Ponce, J. J.; Tibau, A.; López-Vilaro, L.; Escuin, D.; Adrover, E.; Barnadas, A. y Lerma, E. 2014. Src, a potential target for overcoming Trastuzumab resistance in HER2-positive breast carcinoma. *British Journal of Cancer*. 111(4): 689-695.
- Prenzel, N.; Fischer, O. M.; Streit, S.; Hart, S. y Ullrich, A. 2001. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocrine Related Cancer*. 8(1): 11-31.
- Puglisi, F.; Minisini, A. M.; De Angelis, C. y Arpino, G. 2012. Overcoming treatment resistance in HER2-positive breast cancer: potential strategies. *Drugs*. 72(9): 1175-1193.
- Qiu, C.; Tarrant, M. K.; Choi, S. H.; Sathyamurthy, A.; Bose, R.; Banjade, S.; Pal, A.; Bornmann, W. G.; Lemmon, M. A.; Cole, P. A. y Leahy, D. J. 2008. Mechanism of activation and inhibition of the HER4/ErbB4 kinase. *Structure*. 16(3): 460-467.
- Razumienko, E. J.; Scollard, D. A. y Reilly, R. M. 2012. Small-animal SPECT/CT of HER2 and HER3 expression in tumor xenografts in athymic mice using Trastuzumab Fab-Heregulin bispecific radioimmunoconjugates. *The Journal of Nuclear Medicine*. 53(12): 1943-1951.
- Roskoski, R. 2004a. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 319(1): 1-11.
- Roskoski, R. 2004b. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 324(4): 1155-1164.
- Roskoski, R. 2014. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacological Research*. 79: 34-74.
- Sandhu, R.; Parker, J. S.; Jones, W. D.; Livasy, C. A. y Coleman, W. B. 2010. Microarray-based gene expression profiling for molecular classification of breast cancer and identification of new targets for therapy. *Laboratory Medicine*. 41(6): 364-372.
- Seoane, S.; Montero, J. C.; Ocaña, A. y Pandiella, A. 2010. Effect of multikinase inhibitors on caspase-independent cell death and DNA damage in HER2-

- overexpressing breast cancer cells. *Journal of the National Cancer Institute*. 102(18): 1432-1446.
- Shah, D. y Osipo, C. 2016. Cancer stem cells and HER2 positive breast cancer: the story so far. *Genes and Diseases*. 3(2): 114-123.
- Shattuck, D. L.; Miller, J. K.; Carraway, K. L. y Sweeney, C. 2008. Met receptor contributes to Trastuzumab resistance of HER2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Research*. 68(5): 1471-1477.
- Sorlie, T.; Perou, C. M.; Tibshirani, R.; Aas, T.; Geisler, S.; Johnsen, H.; Hastie, T.; Eisen, M. B.; Van de Rijn, M.; Jeffrey, S. S.; Thorsen, T.; Quist, H.; Matese, J. C.; Brown, P. O.; Botstein, D.; Lonning, P. E. y Borresen-Dale A. L. 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98(19): 10869-10874.
- Stamos, J.; Sliwkowski, M. X. y Eigenbrot, C. 2002. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(48): 46265-46272.
- Takeda, T.; Yamamoto, H.; Kanzaki, H.; Suzawa, K.; Yoshioka, T.; Tomida, S.; Cui, X.; Murali, R.; Namba, K.; Sato, H.; Torigoe, H.; Watanabe, M.; Shien, K.; Soh, J.; Asano, H.; Tsukuda, K.; Kitamura, Y.; Miyoshi, S.; Sendo, T. y Toyooka, S. 2017. Yes1 signaling mediates the resistance to Trastuzumab/lapatinib in breast cancer. *PLoS ONE*: 12(2): e0171356.
- Tan, M.; Lan, K. H.; Yao, J.; Lu, C. H.; Sun, M.; Neal, C. L.; Lu, J. y Yu, D. 2006. Selective inhibition of ErbB2-overexpressing breast cancer *in vivo* by a novel TAT-based ErbB2-targeting signal transducers and activators of transcription 3-blocking peptide. *Cancer Research*. 66(7): 3764-3772.
- Toss, A. y Cristofanilli, M. 2015. Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer. *Breast Cancer Research*. 17(1): 60.
- Valabrega, G.; Capellero, S.; Cavalloni, G.; Zaccarello, G.; Petrelli, A.; Migliardi, G.; Milani, A.; Peraldo-Neia, C.; Gammaitoni, L.; Sapino, A.; Pecchioni, C.; Moggio, A.; Giordano, S.; Aglietta, M. y Montemurro, F. 2011. HER2-positive breast

- cancer cells resistant to Trastuzumab and lapatinib lose reliance upon HER2 and are sensitive to the multitargeted kinase inhibitor sorafenib. *Breast Cancer Research and Treatment*. 130(1): 29-40.
- Vanhaesebroeck, B.; Stephens, L. y Hawkins, P. 2012. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*. 13(3): 195-203.
- Vogel, C. L.; Cobleigh, M. A.; Tripathy, D., Gutheil, J. C.; Harris, L. N.; Fehrenbacher, L.; Slamon, D. J.; Murphy, M.; Novotny, W. F.; Burchmore, M.; Shak, S.; Stewart, S. J. y Press, M. 2002. Efficacy and safety of Trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 20(3): 719-726.
- Vu, T. y Claret, F. X. 2012. Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Frontiers in Oncology*. 18(2): 62.
- Wang, Y. C.; Morrison, G.; Gillihan, R.; Guo, J.; Ward, R. M.; Fu, X.; Botero, M. F.; Healy, N. A.; Hilsenbeck, S. G.; Phillips, G. L.; Chamness, G. C.; Rimawi, M. F.; Osborne, C. K. y Schiff, R. 2011. Different mechanisms for resistance to Trastuzumab versus lapatinib in HER2-positive breast cancers - role of estrogen receptor and HER2 reactivation. *Breast Cancer Research*. 13(6): R121.
- Wilson, G. R.; Cramer, A.; Welman, A.; Knox, F.; Swindell, R.; Kawakatsu, H.; Clarke, R. B.; Dive, C. y Bundred, N. J. 2006. Activated c-SRC in ductal carcinoma *in situ* correlates with high tumour grade, high proliferation and HER2 positivity. *British Journal of Cancer*. 95(10): 1410-1414.
- Wong, H.; Leung, R.; Kwong, A.; Chiu, J.; Liang, R.; Swanton, C. y Yau, T. 2011. Integrating molecular mechanisms and clinical evidence in the management of Trastuzumab resistant or refractory HER-2⁺ metastatic breast cancer. *The Oncologist*. 16(11): 1535-1546.
- World Health Organization (WHO). 2017. Cancer. <http://www.who.int/en/>
- Wu, Y.; Ginther, C.; Kim, J.; Mosher, N.; Chung, S.; Slamon, D. y Vadgama, J. V. 2012. Expression of Wnt3 activates Wnt/ β -catenin pathway and promotes EMT-like phenotype in Trastuzumab-resistant HER2-overexpressing breast cancer cells. *Molecular Cancer Research*. 10(12): 1597-1606.

- Yarden, Y. y Sliwkowski, M. X. 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews: Molecular Cell Biology*. 2(2): 127-137.
- Yarden, Y. y Pines, G. 2012. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nature Reviews: Cancer*. 12(8): 553-563.
- Zaczek, A.; Brandt, B. y Bielawski, K. P. 2005. The diverse signaling network of EGFR, HER2, HER3 and HER4 tyrosine kinase receptors and the consequences for therapeutic approaches. *Histology and Histopathology*. 20(3): 1005-1015.
- Zhang, S.; Huang, W. C.; Li, P.; Guo, H.; Poh, S. B.; Brady, S. W.; Xiong, Y.; Tseng, L. M.; Li, S. H.; Ding, Z.; Sahin, A. A.; Esteva, F. J.; Hortobagyi, G. N. y Yu, D. 2011. Combating Trastuzumab resistance by targeting Src, a common node downstream of multiple resistance pathways. *Nature Medicine*. 17(4): 461-469.

12.- ANEXOS.

Anexo 1. Análisis estadístico (ANOVA) de la curva dosis-respuesta de las líneas celulares BT474 y SKBR3 (parentales y tratadas continuamente con TTZ) a TTZ.

Concentración de TTZ µg/ml	p-valor					
	BT474	SKBR3	BT474-R normalizado	SKBR3-R-normalizado	BT474-R ajustado con parentales	SKBR3-R-ajustado con parentales
0-2.5	0.0006*	0.0000*	0.0004*	0.0042*	0.0070*	0.0042*
0-5	0.0018*	0.0000*	0.0013*	0.0384**	0.0076*	0.0384**
0-10	0.0137**	0.0000*	0.2600	0.2489	0.3313	0.2489
0-20	0.0000*	0.0000*	0.5984	0.0009*	0.6648	0.0009*
0-40	0.0000*	0.0000*	0.1035	0.0014*	0.1036	0.0014*
0-80	0.0000*	0.0000*	0.0324**	0.0011*	0.0633	0.0011*
0-160	0.0000*	0.0000*	0.0005*	0.0006*	0.0036*	0.0006*
2.5 - 5	0.9039	0.2296	0.7084	0.9336	0.7759	0.9336
2.5-10	0.1059	0.4749	0.0038*	0.5111	0.0229**	0.5111
2.5-20	0.0243**	0.4829	0.0008*	0.0087*	0.0091*	0.0087**
2.5-40	0.0076*	0.3255	0.0078*	0.0553	0.0331**	0.0553
2.5-80	0.0091*	0.5640	0.0132**	0.0310**	0.0569	0.0310**
2.5-160	0.0033*	0.6088	0.1980	0.0043*	0.3608	0.0043*
5-10	0.1758	0.4524	0.0064*	0.5431	0.0213**	0.5431
5-20	0.0292**	0.7809	0.0022*	0.0945	0.0097*	0.0945
5-40	0.0095*	0.0169**	0.0113**	0.4113	0.0299**	0.4113
5-80	0.0108**	0.0091*	0.0175**	0.3639	0.0477**	0.3639
5-160	0.0051*	0.4682	0.1511	0.0536	0.2572	0.0536
10-20	0.0005*	0.8497	0.4911	0.0868	0.5017	0.0868
10-40	0.0002*	0.0525	0.6471	0.2363	0.5819	0.2363
10-80	0.0004*	0.0520	0.3739	0.2173	0.3680	0.2173
10-160	0.0000*	0.8803	0.0152**	0.0588	0.0247**	0.0588
20-40	0.4187	0.1060	0.2326	0.0473**	0.1539	0.0473**
20-80	0.3895	0.1683	0.0905	0.0484**	0.0902	0.0484**
20-160	0.4403	0.7822	0.0016*	0.3969	0.0040*	0.3969
40-80	0.9234	0.4863	0.6720	0.7861	0.6368	0.7861
40-160	0.8610	0.1148	0.0382**	0.0170**	0.0369**	0.0170**
80-160	0.7855	0.1809	0.0739	0.0164**	0.0985	0.0164**

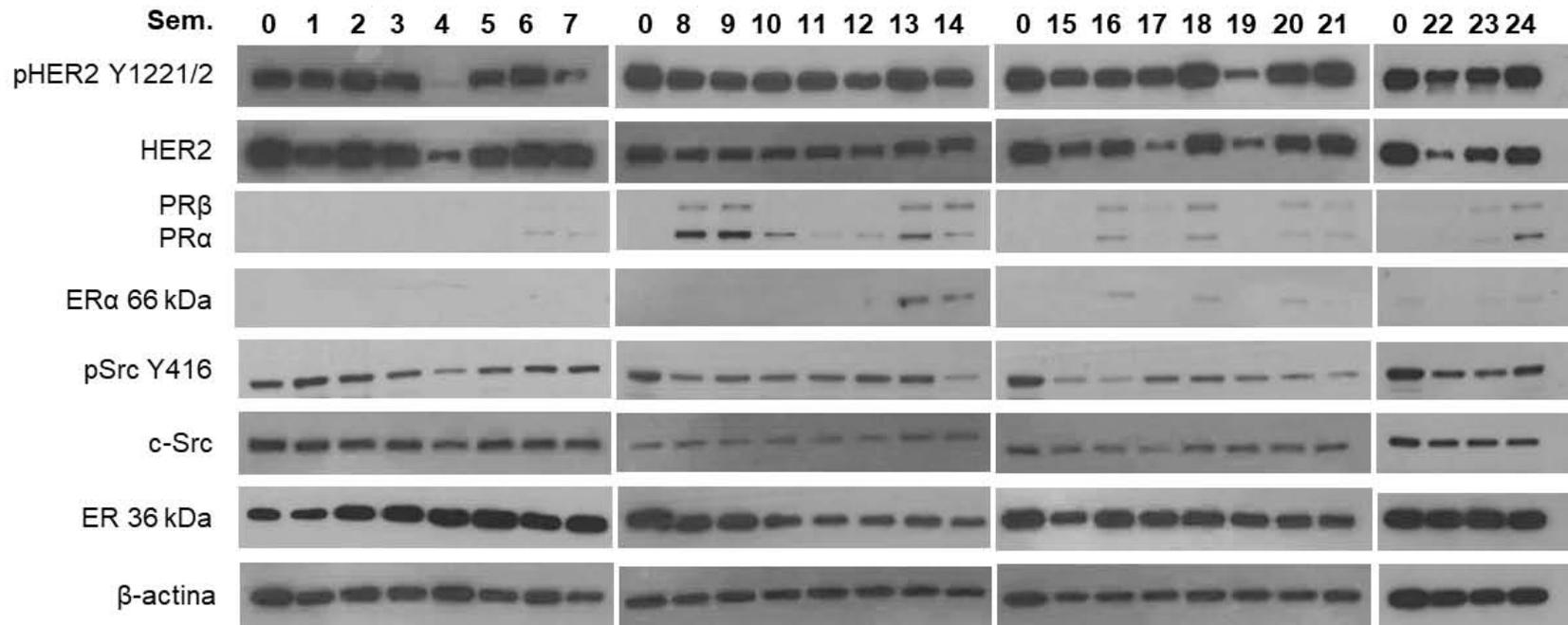
La significancia estadísticas de la comparación entre concentraciones de TTZ está indicada por: * ($p \leq 0.01$) o ** ($p \leq 0.05$).

Anexo 2. Análisis estadístico (ANOVA) que compara, entre las líneas celulares parentales y tratadas continuamente con TTZ (4 µg/ml) (BT474 y SKBR3), el número de células al final de tres experimentos independientes para cada concentración de TTZ.

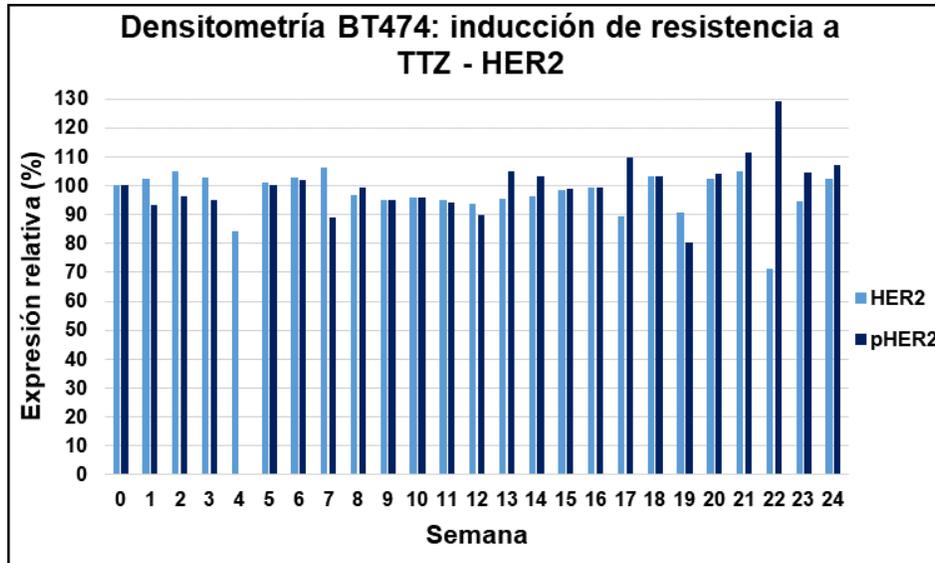
Concentracion de TTZ (µg/ml)	p-valor			
	BT474/BT474-R ajustado con parentales	SKBR3/SKBR3-R-ajustado con parentales	BT474/BT474-R normalizado	SKBR3/SKBR3-R-normalizado
0	0.0012*	0.0000*	1.0000	1.0000
2.5	0.0788	0.0000*	0.9959	0.0153**
5	0.2521	0.0000*	0.6434	0.0775
10	0.0000*	0.0000*	0.0517	0.0126**
20	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.1304
40	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0625
80	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0180**
160	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0145**

La significancia estadísticas de la comparación entre la líneas celulares para cada concentración de TTZ está indicada por: * ($p \leq 0.01$) o ** ($p \leq 0.05$).

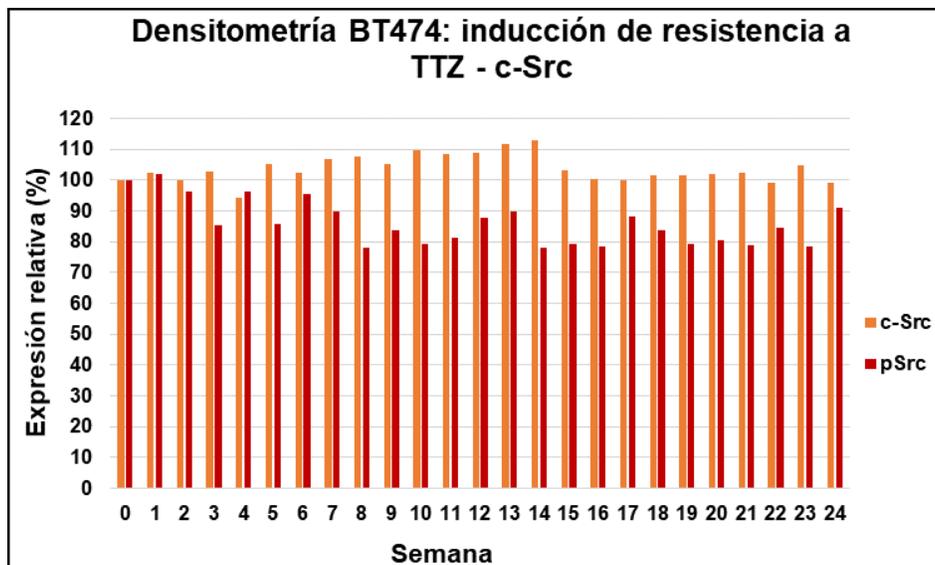
Anexo 3. Expresión proteica de la línea celular BT474 durante su periodo de inducción de resistencia a TTZ.



Anexo 4. Histograma del análisis densitométrico de los niveles de HER2 durante el periodo de inducción de resistencia de la línea celular BT474. Datos obtenidos del Anexo 3.



Anexo 5. Histograma del análisis densitométrico de los niveles de c-Src durante el periodo de inducción de resistencia de la línea celular BT474. Datos obtenidos del Anexo 3.



Anexo 6. Análisis estadístico (ANOVA) que compara la expresión proteica de las líneas celulares BT474 y BT474-R. Datos obtenidos a partir de la Fig. 12A con una n=3.

	BT474 (%)	DE (%)	BT474-R (%)	DE (%)	p-valor
pHER2	100.468	9.739	107.235	13.945	0.4592
HER2	100	9.764	105.894	7.768	0.5286
pAKT S473 62kDa	99.938	13.989	168.966	14.520	0.0129**
pAKT S473 56kDa	100.164	9.233	64.863	14.121	0.0223**
AKT	100	9.629	124.095	17.949	0.1098
pSrc Y416	123.065	46.883	28.945	6.448	0.0334**
c-Src	100	11.779	127.148	28.682	0.2040
PRα	100	43.173	168.425	26.932	0.0803
PRβ	100	34.701	171.852	22.131	0.0390**
ERα	100	4.029	61.041	7.837	0.0016**
ER 36kDa	100	2.668	98.402	3.981	0.5946

La significancia estadísticas que compara los valores densitométrico obtenidos de cada proteína entre las líneas celulares BT474 y BT474-R está indicada por: * ($p \leq 0.01$) o ** ($p \leq 0.05$). DE: desviación estándar.

Anexo 7. Viabilidad celular al final de tres experimentos independientes de BT474 y BT474-R a los tratamientos con TKI's y a su combinación con TTZ.

Concentración de TKI (μM)	BT474_Lap		BT474_Das		BT474_Nin		BT474_Sor	
	X	Desvest	X	Desvest	X	Desvest	X	Desvest
0	100	3.948	100	4.95	100	1.36	100	4.31
V	91.05*	4.03	93.71**	2.39	95.12*	3.61	92.03*	6.92
0.001	73.58*	17.91	90.84**	7.21	93.5**	6.81	93.32**	5.48
0.01	66.09*	21.43	85.21*	8.11	88.91*	3.47	95.85	6.79
0.1	54.77*	13.09	91.93*	5.77	95.32	11.1	96.69	5.05
1	44.25*	12.28	82.95*	3.16	77.75*	4.47	99.16	5.04
10	37.52*	13.45	54.36*	8.12	3.48*	4.89	71.76*	28.27
100	5.428*	5.229	35.85*	7.11	7.1*	7.28	5.35*	3.05
Concentración de TKI (μM)	BT474_5 μg TTZ_Lap		BT474_5 μg TTZ_Das		BT474_5 μg TTZ_Nin		BT474_5 μg TTZ_Sor	
	X	Desvest	X	Desvest	X	Desvest	X	Desvest
0	100	6.06	100	4.91	100	1.71	100	5.39
V/TTZ	74.09*	6.69	74.75*	7.87	78.03*	8.71	89.05*	7.76
0.001	46.18*	6.43	67.89*	6.34	82.22*	9.78	77.56*	3.23
0.01	40.51*	2.18	72.74*	12.18	76.33*	12.1	76.54*	12.66
0.1	38.89*	4.25	69.03*	9.57	86.71*	5.99	72.81*	7.41
1	32.2*	3.44	55.5*	9.41	50.36*	11.79	78.8*	6.38
10	28.01*	7.06	37.4*	4.23	2.71*	3.91	42.29*	21.69
100	0.8*	1.02	24.12*	12.81	4.82*	5	1.04*	1.22
Concentración de TKI (μM)	BT474_10 μg TTZ_Lap		BT474_10 μg TTZ_Das		BT474_10 μg TTZ_Nin		BT474_10 μg TTZ_Sor	
	X	Desvest	X	Desvest	X	Desvest	X	Desvest
0	100	10.5	100	5.47	100	4.01	100	6.46
V/TTZ	98.95	16.07	77.53*	5.49	83.85*	11.92	87.03*	6.16
0.001	69.74*	16.97	61.62*	7.29	79.51*	10.64	91.25**	7.78
0.01	56.96*	13.43	54.13*	11.15	81.18*	8.24	91.2*	3.81
0.1	48.65*	9.62	47.63*	9.35	87.23**	17.26	93.45	8.53
1	37.01*	6.21	39.17*	9.55	54.51*	9.3	91.16**	7.54
10	25*	11.7	31.36*	10.99	3.9*	3.68	25.25*	4.8
100	2.3*	2.69	27.72*	14.9	6.98*	4.37	1.7*	2.04
Concentración de TKI (μM)	BT474_40 μg TTZ_Lap		BT474_40 μg TTZ_Das		BT474_40 μg TTZ_Nin		BT474_40 μg TTZ_Sor	
	X	Desvest	X	Desvest	X	Desvest	X	Desvest
0	100	5.85	100	3.07	100	3.81	100	5.86
V/TTZ	87*	6.39	80.73*	6.38	82.15*	4.98	87.34*	7.96
0.001	65.54*	18.28	80.69*	6.48	82.81*	5.36	86.48*	9.39
0.01	48.98*	8.51	64.66*	12.45	79.67*	6.43	85.65*	3.82
0.1	42.67*	9.85	54.52*	10.17	82.62*	4.91	84.64*	9.89
1	36.01*	6.9	34.44*	7.75	57.1*	6.56	84.94*	4.67
10	17.24*	9.68	22.68*	6.37	4.5*	4.97	29.45*	6.67
100	1.48*	1.87	15.76*	13.42	5.27*	3.74	3.25*	2.66

Datos mostrados en porcentaje (%). * ($p \leq 0.01$) o ** ($p \leq 0.05$) indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (0 μM de TKI y 0 $\mu\text{g/ml}$ de TTZ). V – vehículo, V/TTZ – vehículo con 5, 10 y 40 $\mu\text{g/ml}$ de TTZ, respectivamente.

Anexo 7. Continuación.

Concentración de TKI (μM)	BT474-R_Lap		BT474-R_Das		BT474-R_Nin		BT474-R_Sor	
	X	Desvest	X	Desvest	X	Desvest	X	Desvest
0	100	4.64	100	2.97	100	4.81	100	5.05
V	90.16*	7.73	93.2*	5.99	94.98**	4.87	96.66	4.42
0.001	78.73*	4.91	77.55*	9.31	90.72*	5.34	98.31	8.4
0.01	68.97*	5.94	61.44*	17.51	91.28**	7.61	101.94	9.21
0.1	59.8*	3.75	53.28*	14.03	93.68**	7.03	102.85	8.18
1	43.31*	4.06	52.22*	13.08	80.81*	3.51	97.87	3.83
10	28.56*	2.82	47.57*	10.19	3.81*	1.91	27.48*	5.77
100	1.73*	0.97	32.11*	3.62	7.86*	4.51	0.15*	0.31

Concentración de TKI (μM)	BT474-R_5 μg TTZ_Lap		BT474-R_5 μg TTZ_Das		BT474-R_5 μg TTZ_Nin		BT474-R_5 μg TTZ_Sor	
	X	Desvest	X	Desvest	X	Desvest	X	Desvest
0	100	2.8	100	10.38	100	10.64	100	5.55
V/TTZ	85.19*	8.23	83.87	22.66	88.02	13.61	79.44*	12.61
0.001	67.39*	13.03	62.43*	7.68	85.66**	16.32	87.62*	9.84
0.01	62.33*	9.19	46.61*	21.4	80.44**	17.34	85.12*	10.46
0.1	52.45*	4.06	26.53*	14.69	79.93*	9.01	90.62	19.2
1	36.22*	8.11	14.78*	7.16	58.22*	7.02	85.16*	12.67
10	20.59*	4.06	12.92*	7.37	0.1*	0.31	35.26*	8.72
100	0.11*	0.22	11.27*	4.92	0.56*	0.61	1.15*	1.8

Concentración de TKI (μM)	BT474-R_10 μg TTZ_Lap		BT474-R_10 μg TTZ_Das		BT474-R_10 μg TTZ_Nin		BT474-R_10 μg TTZ_Sor	
	X	Desvest	X	Desvest	X	Desvest	X	Desvest
0	100	7.48	100	3.21	100	8.69	100	2.3
V/TTZ	94.89	18.61	97.07	6.77	98.86	12.38	98.63	6.92
0.001	79.53*	16.63	49.78*	12.47	96.08	13.01	87.8**	14.39
0.01	71.09*	13.13	26.7*	9.73	77.79*	9.99	102.32	7.74
0.1	53.91*	6.67	20.62*	12.65	67.57*	10.81	101.74	6.98
1	44.97*	6.03	13.75*	6.1	69.23*	13.03	99.97	7.25
10	30.09*	4.46	15.32*	3.86	0.26*	0.79	33.48*	7.64
100	0*	0	18.7*	6.55	2.45*	1.41	0.6*	0.74

Concentración de TKI (μM)	BT474-R_40 μg TTZ_Lap		BT474-R_40 μg TTZ_Das		BT474-R_40 μg TTZ_Nin		BT474-R_40 μg TTZ_Sor	
	X	Desvest	X	Desvest	X	Desvest	X	Desvest
0	100	3.5	100	3.05	100	3.86	100	4.46
V/TTZ	87.46*	9.86	100.32	6.05	88.62*	8.34	96.71	6.61
0.001	66.42*	9.84	88.81*	9.76	88.95*	4.07	86.55*	8.14
0.01	55.92*	8.41	84.02*	9.11	80.13*	4.2	96.62	19.86
0.1	59.28*	9.54	66.25*	6.48	86.89*	9.52	95.92	5.4
1	42.59*	6.56	52.53*	11	70.87*	3.81	96.12	7.03
10	29.12*	7.16	39.4*	9.32	1.82*	1.99	48.43*	4.34
100	0.87*	1.32	18.63*	14.16	3.07*	3.15	0.34*	0.63

Datos mostrados en porcentaje (%). * ($p \leq 0.01$) o ** ($p \leq 0.05$) indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (0 μM de TKI y 0 $\mu\text{g/ml}$ de TTZ). V – vehículo, V/TTZ – vehículo con 5, 10 y 40 $\mu\text{g/ml}$ de TTZ, respectivamente.

Anexo 8. Análisis estadístico (ANOVA) que comprara, entre concentraciones de TKI, el número de células al final de tres experimentos independientes para la línea celular BT474 y BT474-R.

BT474 (p-valor)								
Comparación entre concentración (µM)	Lapatinib				Dasatinib			
	Monoterapia	TTZ 5 µg/ml	TTZ 10 µg/ml	TTZ 40 µg/ml	Monoterapia	TTZ 5 µg/ml	TTZ 10 µg/ml	TTZ 40 µg/ml
0 - V	0.0002*	0.0000*	0.8720	0.0003*	0.0263**	0.0000*	0.0000*	0.0000*
0 - 0.001	0.0005*	0.0000*	0.0003*	0.0000*	0.0210**	0.0000*	0.0000*	0.0000*
0 - 0.01	0.0003*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0048*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
0 - 0.1	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0006*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
0 - 1	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0031*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
0 - 10	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
0 - 100	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
V - 0.001	0.0114**	0.0000*	0.0018*	0.0003*	0.5658	0.2468	0.0001*	0.9897
V - 0.01	0.0034*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.1552	0.8298	0.0000*	0.0033*
V - 0.1	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0605	0.1854	0.0000*	0.0000*
V - 1	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.1229	0.0002*	0.0000*	0.0000*
V - 10	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
V - 100	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0001*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
0.001 - 0.01	0.4324	0.0235**	0.0956	0.2328	0.3045	0.2811	0.1115	0.0035*
0.001 - 0.1	0.0216**	0.0119**	0.0051*	0.0504	0.5392	0.6694	0.0027*	0.0000*
0.001 - 1	0.0009*	0.0000*	0.0001*	0.0048*	0.2661	0.0010*	0.0000*	0.0000*
0.001 - 10	0.0002*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
0.001 - 100	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
0.01 - 0.1	0.1950	0.3237	0.1506	0.1656	0.4697	0.2082	0.1990	0.0769
0.01 - 1	0.0174**	0.0000*	0.0009*	0.0027*	0.9639	0.0011*	0.0075*	0.0000*
0.01 - 10	0.0038*	0.0001*	0.0001*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0005*	0.0000*
0.01 - 100	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0001*	0.0000*	0.0006*	0.0000*
0.1 - 1	0.0978	0.0021*	0.0077*	0.1160	0.4129	0.0081*	0.0760	0.0002*
0.1 - 10	0.0140**	0.0011*	0.0002*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0038*	0.0000*
0.1 - 100	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0037*	0.0000*
1-10	0.2838	0.1288	0.0152**	0.0002*	0.0000*	0.0001*	0.1273	0.0029*
1-100	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0001*	0.0000*	0.0701	0.0023*
10-100	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0002*	0.0951	0.0094*	0.5634	0.1814

La significancia estadísticas de la comparación entre concentraciones de TKI está indicada por: * (p≤0.01) o ** (p≤0.05).

Anexo 8. Continuación.

Comparación entre concentración (µM)	BT474 (p-valor)							
	Nintedanib				Sorafenib			
	Monoterapia	TTZ 5 µg/ml	TTZ 10 µg/ml	TTZ 40 µg/ml	Monoterapia	TTZ 5 µg/ml	TTZ 10 µg/ml	TTZ 40 µg/ml
0 - V	0.0013*	0.0000*	0.0014*	0.0000*	0.0019*	0.0031*	0.0005*	0.0015*
0 - 0.001	0.0126**	0.0001*	0.0001*	0.0000*	0.0112**	0.0000*	0.0196**	0.0021*
0 - 0.01	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.1417	0.0001*	0.0029*	0.0000*
0 - 0.1	0.2281	0.0000*	0.0462**	0.0000*	0.1552	0.0000*	0.0852	0.0010*
0 - 1	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.7123	0.0000*	0.0168**	0.0000*
0 - 10	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0092*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
0 - 100	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
V - 0.001	0.4529	0.3522	0.4270	0.7902	0.3324	0.0008*	0.2202	0.8363
V - 0.01	0.0008*	0.7357	0.5884	0.3745	0.1053	0.0224**	0.1035	0.5750
V - 0.1	0.9778	0.0255**	0.6360	0.8434	0.0369**	0.0003*	0.0862	0.5323
V - 1	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0056*	0.0075*	0.2219	0.4483
V - 10	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0699	0.0000*	0.0000*	0.0000*
V - 100	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
0.001 - 0.01	0.0908	0.2727	0.7140	0.2773	0.3984	0.8186	0.9863	0.8106
0.001 - 0.1	0.6799	0.2573	0.2704	0.9380	0.1948	0.0976	0.5766	0.6911
0.001 - 1	0.0000*	0.0000*	0.0001*	0.0000*	0.0319**	0.6098	0.9793	0.6674
0.001 - 10	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0392**	0.0002*	0.0000*	0.0000*
0.001 - 100	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
0.01 - 0.1	0.1178	0.0347*	0.3574	0.2909	0.7697	0.4569	0.4817	0.7773
0.01 - 1	0.0000*	0.0003*	0.0000*	0.0000*	0.2570	0.6394	0.9875	0.7298
0.01 - 10	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0244**	0.0009*	0.0000*	0.0000*
0.01 - 100	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
0.1 - 1	0.0003*	0.0000*	0.0001*	0.0000*	0.3141	0.0851	0.5549	0.9336
0.1 - 10	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0192**	0.0010*	0.0000*	0.0000*
0.1 - 100	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
1-10	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0113**	0.0002*	0.0000*	0.0000*
1-100	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
10-100	0.2336	0.3323	0.1258	0.7150	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*

La significancia estadísticas de la comparación entre concentraciones de TKI está indicada por: * (p≤0.01) o ** (p≤0.05).

Anexo 8. Continuación.

Comparación entre concentración (µM)	BT474-R (p-valor)							
	Lapatinib				Dasatinib			
	Monoterapia	TTZ 5 µg/ml	TTZ 10 µg/ml	TTZ 40 µg/ml	Monoterapia	TTZ 5 µg/ml	TTZ 10 µg/ml	TTZ 40 µg/ml
0 - V	0.0048*	0.0001*	0.4566	0.0024*	0.0077*	0.0717	0.2588	0.8889
0 - 0.001	0.0000*	0.0000*	0.0039*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0047*
0 - 0.01	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0001*
0 - 0.1	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
0 - 1	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
0 - 10	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
0 - 100	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
V - 0.001	0.0018*	0.0032*	0.0834	0.0003*	0.0006*	0.0158*	0.0000*	0.0084*
V - 0.01	0.0000*	0.0000*	0.0064*	0.0000*	0.0001*	0.0024*	0.0000*	0.0004*
V - 0.1	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
V - 1	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
V - 10	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
V - 100	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000	0.0000*	0.0000*
0.001 - 0.01	0.0016*	0.3561	0.2497	0.0271**	0.0268*	0.0533*	0.0005*	0.2974
0.001 - 0.1	0.0000*	0.0047*	0.0006*	0.1378	0.0006*	0.0000*	0.0002*	0.0000*
0.001 - 1	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0002*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
0.001 - 10	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
0.001 - 100	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
0.01 - 0.1	0.0012*	0.0094*	0.0030*	0.4400	0.2963	0.0339**	0.2697	0.0002*
0.01 - 1	0.0000*	0.0000*	0.0001*	0.0018*	0.2241	0.0006*	0.0038*	0.0000*
0.01 - 10	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0569	0.0004*	0.0049*	0.0000*
0.01 - 100	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0002*	0.0002*	0.0577	0.0000*
0.1 - 1	0.0000*	0.0001*	0.0089*	0.0005*	0.8726	0.0466**	0.1619	0.0053*
0.1 - 10	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.3466	0.0245**	0.2474	0.0000*
0.1 - 100	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0006*	0.0093*	0.6922	0.0000*
1-10	0.0000*	0.0001*	0.0000*	0.0007*	0.4131	0.5958	0.5229	0.0148*
1-100	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0004*	0.2439	0.1166	0.0000*
10-100	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0006*	0.5845	0.2014	0.0021*

La significancia estadísticas de la comparación entre concentraciones de TKI está indicada por: * (p≤0.01) o ** (p≤0.05).

Anexo 8. Continuación.

Comparación entre concentración (µM)	BT474-R (p-valor)							
	Nintedanib				Sorafenib			
	Monoterapia	TTZ 5 µg/ml	TTZ 10 µg/ml	TTZ 40 µg/ml	Monoterapia	TTZ 5 µg/ml	TTZ 10 µg/ml	TTZ 40 µg/ml
0 - V	0.0281**	0.0538	0.8251	0.0019*	0.1564	0.0004*	0.5818	0.2341
0 - 0.001	0.0014*	0.0423**	0.4644	0.0000*	0.6127	0.0047*	0.0232**	0.0005*
0 - 0.01	0.0104**	0.0108**	0.0001*	0.0000*	0.5872	0.0017*	0.4002	0.6254
0 - 0.1	0.0412**	0.0005*	0.0000*	0.0015*	0.3870	0.1785	0.4863	0.1008
0 - 1	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.3300	0.0054*	0.9914	0.1820
0 - 10	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
0 - 100	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
V - 0.001	0.1380	0.7444	0.6490	0.9161	0.6110	0.1448	0.0589	0.0103**
V - 0.01	0.3040	0.3185	0.0011*	0.0168*	0.1413	0.3138	0.3017	0.9898
V - 0.1	0.7831	0.1572	0.0000*	0.6873	0.0636	0.1639	0.3561	0.7873
V - 1	0.0000*	0.0000*	0.0001*	0.0000*	0.5457	0.3518	0.6937	0.8578
V - 10	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
V - 100	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
0.001 - 0.01	0.8583	0.5205	0.0041*	0.0004*	0.3956	0.6097	0.0169**	0.1787
0.001 - 0.1	0.3290	0.3707	0.0001*	0.5588	0.2627	0.6822	0.0188**	0.0109**
0.001 - 1	0.0003*	0.0003*	0.0005*	0.0000*	0.8888	0.6520	0.0377**	0.0168**
0.001 - 10	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
0.001 - 100	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
0.01 - 0.1	0.4970	0.9387	0.0537	0.0762	0.8272	0.4621	0.8698	0.9211
0.01 - 1	0.0018*	0.0026*	0.1374	0.0001*	0.2393	0.9950	0.5150	0.9447
0.01 - 10	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
0.01 - 100	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
0.1 - 1	0.0002*	0.0000*	0.7727	0.0002*	0.1181	0.4870	0.6042	0.9481
0.1 - 10	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
0.1 - 100	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
1-10	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
1-100	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*
10-100	0.0246**	0.0630	0.0009*	0.3277	0.0000*	0.0000*	0.0000*	0.0000*

La significancia estadísticas de la comparación entre concentraciones de TKI está indicada por: * (p≤0.01) o ** (p≤0.05).

Anexo 9. Análisis estadístico (ANOVA) que compara el número de células al final de tres experimentos independientes de cada concentración de TKI y de su combinación con TTZ (5, 10 y 40 µg/ml) en cada línea celular (BT474 y BT474-R).

BT474							
Tratamiento con lapatinib			p-valor	Tratamiento con dasatinib			p-valor
Lap 0 µM	Lap 0 µM - TTZ 5 µg/ml	1.0000	Das 0 µM	Das 0 µM - TTZ 5 µg/ml	1.0000		
Lap 0 µM	Lap 0 µM - TTZ 10 µg/ml	1.0000	Das 0 µM	Das 0 µM - TTZ 10 µg/ml	1.0000		
Lap 0 µM	Lap 0 µM - TTZ 40 µg/ml	1.0000	Das 0 µM	Das 0 µM - TTZ 40 µg/ml	1.0000		
Lap 0 µM - TTZ 5 µg/ml	Lap 0 µM - TTZ 10 µg/ml	1.0000	Das 0 µM - TTZ 5 µg/ml	Das 0 µM - TTZ 10 µg/ml	1.0000		
Lap 0 µM - TTZ 5 µg/ml	Lap 0 µM - TTZ 40 µg/ml	1.0000	Das 0 µM - TTZ 5 µg/ml	Das 0 µM - TTZ 40 µg/ml	1.0000		
Lap 0 µM - TTZ 10 µg/ml	Lap 0 µM - TTZ 40 µg/ml	1.0000	Das 0 µM - TTZ 10 µg/ml	Das 0 µM - TTZ 40 µg/ml	1.0000		
Lap V	Lap V-TTZ 5 µg/ml	0.0000*	Das V	Das V-TTZ 5 µg/ml	0.0001*		
Lap V	Lap V - TTZ 10 µg/ml	0.1724	Das V	Das V - TTZ 10 µg/ml	0.0000*		
Lap V	Lap V - TTZ 40 µg/ml	0.1164	Das V	Das V - TTZ 40 µg/ml	0.0004*		
Lap V-TTZ 5 µg/ml	Lap V - TTZ 10 µg/ml	0.0006*	Das V-TTZ 5 µg/ml	Das V - TTZ 10 µg/ml	0.3969		
Lap V-TTZ 5 µg/ml	Lap V - TTZ 40 µg/ml	0.0008*	Das V-TTZ 5 µg/ml	Das V - TTZ 40 µg/ml	0.0958		
Lap V - TTZ 10 µg/ml	Lap V - TTZ 40 µg/ml	0.0526	Das V - TTZ 10 µg/ml	Das V - TTZ 40 µg/ml	0.2718		
Lap 0.001 µM	Lap 0.001 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0005*	Das 0.001 µM	Das 0.001 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0000*		
Lap 0.001 µM	Lap 0.001 µM - TTZ 10 µg/ml	0.6466	Das 0.001 µM	Das 0.001 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0000*		
Lap 0.001 µM	Lap 0.001 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0747	Das 0.001 µM	Das 0.001 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0045*		
Lap 0.001 µM-TTZ 5 µg/ml	Lap 0.001 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0013*	Das 0.001 µM-TTZ 5 µg/ml	Das 0.001 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0124**		
Lap 0.001 µM-TTZ 5 µg/ml	Lap 0.001 µM - TTZ 40 µg/ml	0.1041	Das 0.001 µM-TTZ 5 µg/ml	Das 0.001 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0045*		
Lap 0.001 µM - TTZ 10 µg/ml	Lap 0.001 µM - TTZ 40 µg/ml	0.1547	Das 0.001 µM - TTZ 10 µg/ml	Das 0.001 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0000*		
Lap 0.01 µM	Lap 0.01 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0026*	Das 0.01 µM	Das 0.01 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0458**		
Lap 0.01 µM	Lap 0.01 µM - TTZ 10 µg/ml	0.2951	Das 0.01 µM	Das 0.01 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0000*		
Lap 0.01 µM	Lap 0.01 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0408**	Das 0.01 µM	Das 0.01 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0007*		
Lap 0.01 µM-TTZ 5 µg/ml	Lap 0.01 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0023*	Das 0.01 µM-TTZ 5 µg/ml	Das 0.01 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0012*		
Lap 0.01 µM-TTZ 5 µg/ml	Lap 0.01 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0106**	Das 0.01 µM-TTZ 5 µg/ml	Das 0.01 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0731		
Lap 0.01 µM - TTZ 10 µg/ml	Lap 0.01 µM - TTZ 40 µg/ml	0.1515	Das 0.01 µM - TTZ 10 µg/ml	Das 0.01 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0771		
Lap 0.1 µM	Lap 0.1 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0032*	Das 0.1 µM	Das 0.1 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0000*		
Lap 0.1 µM	Lap 0.1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.2754	Das 0.1 µM	Das 0.1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0000*		
Lap 0.1 µM	Lap 0.1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0417**	Das 0.1 µM	Das 0.1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0000*		
Lap 0.1 µM-TTZ 5 µg/ml	Lap 0.1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0133**	Das 0.1 µM-TTZ 5 µg/ml	Das 0.1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0002*		
Lap 0.1 µM-TTZ 5 µg/ml	Lap 0.1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.3061	Das 0.1 µM-TTZ 5 µg/ml	Das 0.1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0067*		
Lap 0.1 µM - TTZ 10 µg/ml	Lap 0.1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.2115	Das 0.1 µM - TTZ 10 µg/ml	Das 0.1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.1542		
Lap 1 µM	Lap 1 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0120**	Das 1 µM	Das 1 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0000*		
Lap 1 µM	Lap 1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.1341	Das 1 µM	Das 1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0000*		
Lap 1 µM	Lap 1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0983	Das 1 µM	Das 1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0000*		
Lap 1 µM-TTZ 5 µg/ml	Lap 1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0593	Das 1 µM-TTZ 5 µg/ml	Das 1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0021*		
Lap 1 µM-TTZ 5 µg/ml	Lap 1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.1584	Das 1 µM-TTZ 5 µg/ml	Das 1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0001*		
Lap 1 µM - TTZ 10 µg/ml	Lap 1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.7498	Das 1 µM - TTZ 10 µg/ml	Das 1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.2655		
Lap 10 µM	Lap 10 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0787	Das 10 µM	Das 10 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0000*		
Lap 10 µM	Lap 10 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0513	Das 10 µM	Das 10 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0000*		
Lap 10 µM	Lap 10 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0021*	Das 10 µM	Das 10 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0000*		
Lap 10 µM-TTZ 5 µg/ml	Lap 10 µM - TTZ 10 µg/ml	0.5186	Das 10 µM-TTZ 5 µg/ml	Das 10 µM - TTZ 10 µg/ml	0.1441		
Lap 10 µM-TTZ 5 µg/ml	Lap 10 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0160**	Das 10 µM-TTZ 5 µg/ml	Das 10 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0000*		
Lap 10 µM - TTZ 10 µg/ml	Lap 10 µM - TTZ 40 µg/ml	0.1451	Das 10 µM - TTZ 10 µg/ml	Das 10 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0573		
Lap 100 µM	Lap 100 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0191**	Das 100 µM	Das 100 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0047*		
Lap 100 µM	Lap 100 µM - TTZ 10 µg/ml	0.1303	Das 100 µM	Das 100 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0170**		
Lap 100 µM	Lap 100 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0489**	Das 100 µM	Das 100 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0005*		
Lap 100 µM-TTZ 5 µg/ml	Lap 100 µM - TTZ 10 µg/ml	0.1385	Das 100 µM-TTZ 5 µg/ml	Das 100 µM - TTZ 10 µg/ml	0.5902		
Lap 100 µM-TTZ 5 µg/ml	Lap 100 µM - TTZ 40 µg/ml	0.3536	Das 100 µM-TTZ 5 µg/ml	Das 100 µM - TTZ 40 µg/ml	0.1954		
Lap 100 µM - TTZ 10 µg/ml	Lap 100 µM - TTZ 40 µg/ml	0.4655	Das 100 µM - TTZ 10 µg/ml	Das 100 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0926		

La significancia estadísticas de la comparación entre tratamiento con TTZ y concentración de TKI está indicada por: * (p≤0.01) o ** (p≤0.05).

Anexo 9. Continuación.

BT474					
Tratamiento con nintedanib		p-valor	Tratamiento con sorafenib		p-valor
Nin 0 µM	Nin 0 µM - TTZ 5 µg/ml	1.0000	Sor 0 µM	Sor 0 µM - TTZ 5 µg/ml	1.0000
Nin 0 µM	Nin 0 µM - TTZ 10 µg/ml	1.0000	Sor 0 µM	Sor 0 µM - TTZ 10 µg/ml	1.0000
Nin 0 µM	Nin 0 µM - TTZ 40 µg/ml	1.0000	Sor 0 µM	Sor 0 µM - TTZ 40 µg/ml	1.0000
Nin 0 µM - TTZ 5 µg/ml	Nin 0 µM - TTZ 10 µg/ml	1.0000	Sor 0 µM - TTZ 5 µg/ml	Sor 0 µM - TTZ 10 µg/ml	1.0000
Nin 0 µM - TTZ 5 µg/ml	Nin 0 µM - TTZ 40 µg/ml	1.0000	Sor 0 µM - TTZ 5 µg/ml	Sor 0 µM - TTZ 40 µg/ml	1.0000
Nin 0 µM - TTZ 10 µg/ml	Nin 0 µM - TTZ 40 µg/ml	1.0000	Sor 0 µM - TTZ 10 µg/ml	Sor 0 µM - TTZ 40 µg/ml	1.0000
Nin V	Nin V-TTZ 5 µg/ml	0.0000*	Sor V	Sor V-TTZ 5 µg/ml	0.6660
Nin V	Nin V - TTZ 10 µg/ml	0.0126**	Sor V	Sor V - TTZ 10 µg/ml	0.2536
Nin V	Nin V - TTZ 40 µg/ml	0.0000*	Sor V	Sor V - TTZ 40 µg/ml	0.3621
Nin V-TTZ 5 µg/ml	Nin V - TTZ 10 µg/ml	0.2545	Sor V-TTZ 5 µg/ml	Sor V - TTZ 10 µg/ml	0.5488
Nin V-TTZ 5 µg/ml	Nin V - TTZ 40 µg/ml	0.2368	Sor V-TTZ 5 µg/ml	Sor V - TTZ 40 µg/ml	0.6496
Nin V - TTZ 10 µg/ml	Nin V - TTZ 40 µg/ml	0.6975	Sor V - TTZ 10 µg/ml	Sor V - TTZ 40 µg/ml	0.9282
Nin 0.001 µM	Nin 0.001 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0119**	Sor 0.001 µM	Sor 0.001 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0000*
Nin 0.001 µM	Nin 0.001 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0043*	Sor 0.001 µM	Sor 0.001 µM - TTZ 10 µg/ml	0.5235
Nin 0.001 µM	Nin 0.001 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0019*	Sor 0.001 µM	Sor 0.001 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0773
Nin 0.001 µM-TTZ 5 µg/ml	Nin 0.001 µM - TTZ 10 µg/ml	0.5817	Sor 0.001 µM-TTZ 5 µg/ml	Sor 0.001 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0002*
Nin 0.001 µM-TTZ 5 µg/ml	Nin 0.001 µM - TTZ 40 µg/ml	0.8764	Sor 0.001 µM-TTZ 5 µg/ml	Sor 0.001 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0160**
Nin 0.001 µM - TTZ 10 µg/ml	Nin 0.001 µM - TTZ 40 µg/ml	0.4186	Sor 0.001 µM - TTZ 10 µg/ml	Sor 0.001 µM - TTZ 40 µg/ml	0.2573
Nin 0.01 µM	Nin 0.01 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0085*	Sor 0.01 µM	Sor 0.01 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0010*
Nin 0.01 µM	Nin 0.01 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0198**	Sor 0.01 µM	0.01 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0925
Nin 0.01 µM	Nin 0.01 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0016*	Sor 0.01 µM	Sor 0.01 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0012*
Nin 0.01 µM-TTZ 5 µg/ml	Nin 0.01 µM - TTZ 10 µg/ml	0.3346	Sor 0.01 µM-TTZ 5 µg/ml	0.01 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0043*
Nin 0.01 µM-TTZ 5 µg/ml	Nin 0.01 µM - TTZ 40 µg/ml	0.4752	Sor 0.01 µM-TTZ 5 µg/ml	Sor 0.01 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0554
Nin 0.01 µM - TTZ 10 µg/ml	Nin 0.01 µM - TTZ 40 µg/ml	0.6695	0.01 µM - TTZ 10 µg/ml	Sor 0.01 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0071*
Nin 0.1 µM	Nin 0.1 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0576	Sor 0.1 µM	Sor 0.1 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0000*
Nin 0.1 µM	Nin 0.1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0074*	Sor 0.1 µM	Sor 0.1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.3415
Nin 0.1 µM	Nin 0.1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0064*	Sor 0.1 µM	Sor 0.1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0050*
Nin 0.1 µM-TTZ 5 µg/ml	Nin 0.1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.9340	Sor 0.1 µM-TTZ 5 µg/ml	Sor 0.1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0001*
Nin 0.1 µM-TTZ 5 µg/ml	Nin 0.1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.1324	Sor 0.1 µM-TTZ 5 µg/ml	Sor 0.1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0111**
Nin 0.1 µM - TTZ 10 µg/ml	Nin 0.1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.4522	Sor 0.1 µM - TTZ 10 µg/ml	Sor 0.1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0601
Nin 1 µM	Nin 1 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0000*	Sor 1 µM	Sor 1 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0000*
Nin 1 µM	Nin 1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0000*	Sor 1 µM	Sor 1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0176**
Nin 1 µM	Nin 1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0000*	Sor 1 µM	Sor 1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0000*
Nin 1 µM-TTZ 5 µg/ml	Nin 1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.4193	Sor 1 µM-TTZ 5 µg/ml	Sor 1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0017*
Nin 1 µM-TTZ 5 µg/ml	Nin 1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.1536	Sor 1 µM-TTZ 5 µg/ml	Sor 1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0334**
Nin 1 µM - TTZ 10 µg/ml	Nin 1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.5048	Sor 1 µM - TTZ 10 µg/ml	Sor 1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0520
Nin 10 µM	Nin 10 µM-TTZ 5 µg/ml	0.7158	Sor 10 µM	Sor 10 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0246**
Nin 10 µM	Nin 10 µM - TTZ 10 µg/ml	0.8421	Sor 10 µM	Sor 10 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0002*
Nin 10 µM	Nin 10 µM - TTZ 40 µg/ml	0.6689	Sor 10 µM	Sor 10 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0005*
Nin 10 µM-TTZ 5 µg/ml	Nin 10 µM - TTZ 10 µg/ml	0.5171	Sor 10 µM-TTZ 5 µg/ml	Sor 10 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0352**
Nin 10 µM-TTZ 5 µg/ml	Nin 10 µM - TTZ 40 µg/ml	0.4093	Sor 10 µM-TTZ 5 µg/ml	Sor 10 µM - TTZ 40 µg/ml	0.1091
Nin 10 µM - TTZ 10 µg/ml	Nin 10 µM - TTZ 40 µg/ml	0.7751	Sor 10 µM - TTZ 10 µg/ml	Sor 10 µM - TTZ 40 µg/ml	0.1447
Nin 100 µM	Nin 100 µM-TTZ 5 µg/ml	0.4501	Sor 100 µM	Sor 100 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0012*
Nin 100 µM	Nin 100 µM - TTZ 10 µg/ml	0.9647	Sor 100 µM	Sor 100 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0089*
Nin 100 µM	Nin 100 µM - TTZ 40 µg/ml	0.5108	Sor 100 µM	Sor 100 µM - TTZ 40 µg/ml	0.1388
Nin 100 µM-TTZ 5 µg/ml	Nin 100 µM - TTZ 10 µg/ml	0.3455	Sor 100 µM-TTZ 5 µg/ml	Sor 100 µM - TTZ 10 µg/ml	0.4195
Nin 100 µM-TTZ 5 µg/ml	Nin 100 µM - TTZ 40 µg/ml	0.8342	Sor 100 µM-TTZ 5 µg/ml	Sor 100 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0379**
Nin 100 µM - TTZ 10 µg/ml	Nin 100 µM - TTZ 40 µg/ml	0.3866	Sor 100 µM - TTZ 10 µg/ml	Sor 100 µM - TTZ 40 µg/ml	0.1863

La significancia estadísticas de la comparación entre tratamiento con TTZ y concentración de TKI está indicada por: * (p<0.01) o ** (p<0.05).

Anexo 9. Continuación.

BT474-R					
Tratamiento con lapatinib		p-valor	Tratamiento con dasatinib		p-valor
Lap 0 µM	Lap 0 µM - TTZ 5 µg/ml	1.0000	Das 0 µM	Das 0 µM - TTZ 5 µg/ml	1.0000
Lap 0 µM	Lap 0 µM - TTZ 10 µg/ml	1.0000	Das 0 µM	Das 0 µM - TTZ 10 µg/ml	1.0000
Lap 0 µM	Lap 0 µM - TTZ 40 µg/ml	1.0000	Das 0 µM	Das 0 µM - TTZ 40 µg/ml	1.0000
Lap 0 µM - TTZ 5 µg/ml	Lap 0 µM - TTZ 10 µg/ml	1.0000	Das 0 µM - TTZ 5 µg/ml	Das 0 µM - TTZ 10 µg/ml	1.0000
Lap 0 µM - TTZ 5 µg/ml	Lap 0 µM - TTZ 40 µg/ml	1.0000	Das 0 µM - TTZ 5 µg/ml	Das 0 µM - TTZ 40 µg/ml	1.0000
Lap 0 µM - TTZ 10 µg/ml	Lap 0 µM - TTZ 40 µg/ml	1.0000	Das 0 µM - TTZ 10 µg/ml	Das 0 µM - TTZ 40 µg/ml	1.0000
Lap V	Lap V-TTZ 5 µg/ml	0.2063	Das V	Das V-TTZ 5 µg/ml	0.2544
Lap V	Lap V - TTZ 10 µg/ml	0.4914	Das V	Das V - TTZ 10 µg/ml	0.2184
Lap V	Lap V - TTZ 40 µg/ml	0.5269	Das V	Das V - TTZ 40 µg/ml	0.0234**
Lap V-TTZ 5 µg/ml	Lap V - TTZ 10 µg/ml	0.1722	Das V-TTZ 5 µg/ml	Das V - TTZ 10 µg/ml	0.1161
Lap V-TTZ 5 µg/ml	Lap V - TTZ 40 µg/ml	0.6048	Das V-TTZ 5 µg/ml	Das V - TTZ 40 µg/ml	0.0529
Lap V - TTZ 10 µg/ml	Lap V - TTZ 40 µg/ml	0.3053	Das V - TTZ 10 µg/ml	Das V - TTZ 40 µg/ml	0.2992
Lap 0.001 µM	Lap 0.001 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0266**	Das 0.001 µM	Das 0.001 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0017*
Lap 0.001 µM	Lap 0.001 µM - TTZ 10 µg/ml	0.8913	Das 0.001 µM	Das 0.001 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0001*
Lap 0.001 µM	Lap 0.001 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0040*	Das 0.001 µM	Das 0.001 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0235**
Lap 0.001 µM-TTZ 5 µg/ml	Lap 0.001 µM - TTZ 10 µg/ml	0.1041	Das 0.001 µM-TTZ 5 µg/ml	Das 0.001 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0198**
Lap 0.001 µM-TTZ 5 µg/ml	Lap 0.001 µM - TTZ 40 µg/ml	0.8615	Das 0.001 µM-TTZ 5 µg/ml	Das 0.001 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0000*
Lap 0.001 µM - TTZ 10 µg/ml	Lap 0.001 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0588	Das 0.001 µM - TTZ 10 µg/ml	Das 0.001 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0000*
Lap 0.01 µM	Lap 0.01 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0877	Das 0.01 µM	Das 0.01 µM-TTZ 5 µg/ml	0.1273
Lap 0.01 µM	Lap 0.01 µM - TTZ 10 µg/ml	0.6654	Das 0.01 µM	Das 0.01 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0001*
Lap 0.01 µM	Lap 0.01 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0016*	Das 0.01 µM	Das 0.01 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0034*
Lap 0.01 µM-TTZ 5 µg/ml	Lap 0.01 µM - TTZ 10 µg/ml	0.1209	Das 0.01 µM-TTZ 5 µg/ml	Das 0.01 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0219**
Lap 0.01 µM-TTZ 5 µg/ml	Lap 0.01 µM - TTZ 40 µg/ml	0.1421	Das 0.01 µM-TTZ 5 µg/ml	Das 0.01 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0002*
Lap 0.01 µM - TTZ 10 µg/ml	Lap 0.01 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0101**	Das 0.01 µM - TTZ 10 µg/ml	Das 0.01 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0000*
Lap 0.1 µM	Lap 0.1 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0011*	Das 0.1 µM	Das 0.1 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0013*
Lap 0.1 µM	Lap 0.1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0345**	Das 0.1 µM	Das 0.1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0001*
Lap 0.1 µM	Lap 0.1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.8801	Das 0.1 µM	Das 0.1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0255**
Lap 0.1 µM-TTZ 5 µg/ml	Lap 0.1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.5839	Das 0.1 µM-TTZ 5 µg/ml	Das 0.1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.3740
Lap 0.1 µM-TTZ 5 µg/ml	Lap 0.1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0659	Das 0.1 µM-TTZ 5 µg/ml	Das 0.1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0000*
Lap 0.1 µM - TTZ 10 µg/ml	Lap 0.1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.1854	Das 0.1 µM - TTZ 10 µg/ml	Das 0.1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0000*
Lap 1 µM	Lap 1 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0321**	Das 1 µM	Das 1 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0000*
Lap 1 µM	Lap 1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.5030	Das 1 µM	Das 1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0000*
Lap 1 µM	Lap 1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.7820	Das 1 µM	Das 1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.9573
Lap 1 µM-TTZ 5 µg/ml	Lap 1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0194**	Das 1 µM-TTZ 5 µg/ml	Das 1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.7479
Lap 1 µM-TTZ 5 µg/ml	Lap 1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0856	Das 1 µM-TTZ 5 µg/ml	Das 1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0000*
Lap 1 µM - TTZ 10 µg/ml	Lap 1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.4340	Das 1 µM - TTZ 10 µg/ml	Das 1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0000*
Lap 10 µM	Lap 10 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0002*	Das 10 µM	Das 10 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0000*
Lap 10 µM	Lap 10 µM - TTZ 10 µg/ml	0.3974	Das 10 µM	Das 10 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0000*
Lap 10 µM	Lap 10 µM - TTZ 40 µg/ml	0.8299	Das 10 µM	Das 10 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0949
Lap 10 µM-TTZ 5 µg/ml	Lap 10 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0002*	Das 10 µM-TTZ 5 µg/ml	Das 10 µM - TTZ 10 µg/ml	0.3997
Lap 10 µM-TTZ 5 µg/ml	Lap 10 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0068*	Das 10 µM-TTZ 5 µg/ml	Das 10 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0000*
Lap 10 µM - TTZ 10 µg/ml	Lap 10 µM - TTZ 40 µg/ml	0.7344	Das 10 µM - TTZ 10 µg/ml	Das 10 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0000*
Lap 100 µM	Lap 100 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0002*	Das 100 µM	Das 100 µM-TTZ 5 µg/ml	0.0000*
Lap 100 µM	Lap 100 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0001*	Das 100 µM	Das 100 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0001*
Lap 100 µM	Lap 100 µM - TTZ 40 µg/ml	0.1407	Das 100 µM	Das 100 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0138*
Lap 100 µM-TTZ 5 µg/ml	Lap 100 µM - TTZ 10 µg/ml	0.1563	Das 100 µM-TTZ 5 µg/ml	Das 100 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0152*
Lap 100 µM-TTZ 5 µg/ml	Lap 100 µM - TTZ 40 µg/ml	0.1079	Das 100 µM-TTZ 5 µg/ml	Das 100 µM - TTZ 40 µg/ml	0.1602
Lap 100 µM - TTZ 10 µg/ml	Lap 100 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0645	Das 100 µM - TTZ 10 µg/ml	Das 100 µM - TTZ 40 µg/ml	0.9894

La significancia estadísticas de la comparación entre tratamiento con TTZ y concentración de TKI está indicada por: * (p<0.01) o ** (p<0.05).

Anexo 9. Continuación.

BT474-R						
Tratamiento con nintedanib			p-valor	Tratamiento con sorafenib		p-valor
Nin 0 µM	Nin 0 µM - TTZ 5 µg/ml	1.0000	Sor 0 µM	Sor 0 µM - TTZ 5 µg/ml	1.0000	
Nin 0 µM	Nin 0 µM - TTZ 10 µg/ml	1.0000	Sor 0 µM	Sor 0 µM - TTZ 10 µg/ml	1.0000	
Nin 0 µM	Nin 0 µM - TTZ 40 µg/ml	1.0000	Sor 0 µM	Sor 0 µM - TTZ 40 µg/ml	1.0000	
Nin 0 µM - TTZ 5 µg/ml	Nin 0 µM - TTZ 10 µg/ml	1.0000	Sor 0 µM - TTZ 5 µg/ml	Sor 0 µM - TTZ 10 µg/ml	1.0000	
Nin 0 µM - TTZ 5 µg/ml	Nin 0 µM - TTZ 40 µg/ml	1.0000	Sor 0 µM - TTZ 5 µg/ml	Sor 0 µM - TTZ 40 µg/ml	1.0000	
Nin 0 µM - TTZ 10 µg/ml	Nin 0 µM - TTZ 40 µg/ml	1.0000	Sor 0 µM - TTZ 10 µg/ml	Sor 0 µM - TTZ 40 µg/ml	1.0000	
Nin V	Nin V-TTZ 5 µg/ml	0.1978	Sor V	Sor V-TTZ 5 µg/ml	0.0014*	
Nin V	Nin V - TTZ 10 µg/ml	0.3384	Sor V	Sor V - TTZ 10 µg/ml	0.4843	
Nin V	Nin V - TTZ 40 µg/ml	0.0875	Sor V	Sor V - TTZ 40 µg/ml	0.9876	
Nin V-TTZ 5 µg/ml	Nin V - TTZ 10 µg/ml	0.0959	Sor V-TTZ 5 µg/ml	Sor V - TTZ 10 µg/ml	0.0010*	
Nin V-TTZ 5 µg/ml	Nin V - TTZ 40 µg/ml	0.9100	Sor V-TTZ 5 µg/ml	Sor V - TTZ 40 µg/ml	0.0022*	
Nin V - TTZ 10 µg/ml	Nin V - TTZ 40 µg/ml	0.0564	Sor V - TTZ 10 µg/ml	Sor V - TTZ 40 µg/ml	0.5561	
Nin 0.001 µM	Nin 0.001 µM -TTZ 5 µg/ml	0.3898	Sor 0.001 µM	Sor 0.001 µM -TTZ 5 µg/ml	0.0247**	
Nin 0.001 µM	Nin 0.001 µM - TTZ 10 µg/ml	0.2696	Sor 0.001 µM	Sor 0.001 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0768	
Nin 0.001 µM	Nin 0.001 µM - TTZ 40 µg/ml	0.4415	Sor 0.001 µM	Sor 0.001 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0082*	
Nin 0.001 µM -TTZ 5 µg/ml	Nin 0.001 µM - TTZ 10 µg/ml	0.1536	Sor 0.001 µM -TTZ 5 µg/ml	Sor 0.001 µM - TTZ 10 µg/ml	0.9756	
Nin 0.001 µM -TTZ 5 µg/ml	Nin 0.001 µM - TTZ 40 µg/ml	0.5652	Sor 0.001 µM -TTZ 5 µg/ml	Sor 0.001 µM - TTZ 40 µg/ml	0.8052	
Nin 0.001 µM - TTZ 10 µg/ml	Nin 0.001 µM - TTZ 40 µg/ml	0.1363	Sor 0.001 µM - TTZ 10 µg/ml	Sor 0.001 µM - TTZ 40 µg/ml	0.8238	
Nin 0.01 µM	Nin 0.01 µM -TTZ 5 µg/ml	0.1053	Sor 0.01 µM	Sor 0.01 µM -TTZ 5 µg/ml	0.0023*	
Nin 0.01 µM	Nin 0.01 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0053*	Sor 0.01 µM	0.01 µM - TTZ 10 µg/ml	0.9245	
Nin 0.01 µM	Nin 0.01 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0016*	Sor 0.01 µM	Sor 0.01 µM - TTZ 40 µg/ml	0.4767	
Nin 0.01 µM -TTZ 5 µg/ml	Nin 0.01 µM - TTZ 10 µg/ml	0.6966	Sor 0.01 µM -TTZ 5 µg/ml	0.01 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0011*	
Nin 0.01 µM -TTZ 5 µg/ml	Nin 0.01 µM - TTZ 40 µg/ml	0.9824	Sor 0.01 µM -TTZ 5 µg/ml	Sor 0.01 µM - TTZ 40 µg/ml	0.1442	
Nin 0.01 µM - TTZ 10 µg/ml	Nin 0.01 µM - TTZ 40 µg/ml	0.4963	0.01 µM - TTZ 10 µg/ml	Sor 0.01 µM - TTZ 40 µg/ml	0.4338	
Nin 0.1 µM	Nin 0.1 µM -TTZ 5 µg/ml	0.0024*	Sor 0.1 µM	Sor 0.1 µM -TTZ 5 µg/ml	0.0980	
Nin 0.1 µM	Nin 0.1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0000*	Sor 0.1 µM	Sor 0.1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.7621	
Nin 0.1 µM	Nin 0.1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.1045	Sor 0.1 µM	Sor 0.1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0503	
Nin 0.1 µM -TTZ 5 µg/ml	Nin 0.1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0180	Sor 0.1 µM -TTZ 5 µg/ml	Sor 0.1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.1220	
Nin 0.1 µM -TTZ 5 µg/ml	Nin 0.1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.1311	Sor 0.1 µM -TTZ 5 µg/ml	Sor 0.1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.4365	
Nin 0.1 µM - TTZ 10 µg/ml	Nin 0.1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0010*	Sor 0.1 µM - TTZ 10 µg/ml	Sor 0.1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0657	
Nin 1 µM	Nin 1 µM -TTZ 5 µg/ml	0.0000*	Sor 1 µM	Sor 1 µM -TTZ 5 µg/ml	0.0109**	
Nin 1 µM	Nin 1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0204**	Sor 1 µM	Sor 1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.4544	
Nin 1 µM	Nin 1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0000*	Sor 1 µM	Sor 1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.5219	
Nin 1 µM -TTZ 5 µg/ml	Nin 1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0405**	Sor 1 µM -TTZ 5 µg/ml	Sor 1 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0078*	
Nin 1 µM -TTZ 5 µg/ml	Nin 1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0002*	Sor 1 µM -TTZ 5 µg/ml	Sor 1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0375**	
Nin 1 µM - TTZ 10 µg/ml	Nin 1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.7220	Sor 1 µM - TTZ 10 µg/ml	Sor 1 µM - TTZ 40 µg/ml	0.2703	
Nin 10 µM	Nin 10 µM -TTZ 5 µg/ml	0.0000*	Sor 10 µM	Sor 10 µM -TTZ 5 µg/ml	0.0403**	
Nin 10 µM	Nin 10 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0001*	Sor 10 µM	Sor 10 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0787	
Nin 10 µM	Nin 10 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0459**	Sor 10 µM	Sor 10 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0000*	
Nin 10 µM -TTZ 5 µg/ml	Nin 10 µM - TTZ 10 µg/ml	0.5901	Sor 10 µM -TTZ 5 µg/ml	Sor 10 µM - TTZ 10 µg/ml	0.6510	
Nin 10 µM -TTZ 5 µg/ml	Nin 10 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0218**	Sor 10 µM -TTZ 5 µg/ml	Sor 10 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0009*	
Nin 10 µM - TTZ 10 µg/ml	Nin 10 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0452**	Sor 10 µM - TTZ 10 µg/ml	Sor 10 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0001*	
Nin 100 µM	Nin 100 µM -TTZ 5 µg/ml	0.0002*	Sor 100 µM	Sor 100 µM -TTZ 5 µg/ml	0.1234	
Nin 100 µM	Nin 100 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0034*	Sor 100 µM	Sor 100 µM - TTZ 10 µg/ml	0.1197	
Nin 100 µM	Nin 100 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0189**	Sor 100 µM	Sor 100 µM - TTZ 40 µg/ml	0.4543	
Nin 100 µM -TTZ 5 µg/ml	Nin 100 µM - TTZ 10 µg/ml	0.0021*	Sor 100 µM -TTZ 5 µg/ml	Sor 100 µM - TTZ 10 µg/ml	0.4097	
Nin 100 µM -TTZ 5 µg/ml	Nin 100 µM - TTZ 40 µg/ml	0.0325**	Sor 100 µM -TTZ 5 µg/ml	Sor 100 µM - TTZ 40 µg/ml	0.2205	
Nin 100 µM - TTZ 10 µg/ml	Nin 100 µM - TTZ 40 µg/ml	0.5965	Sor 100 µM - TTZ 10 µg/ml	Sor 100 µM - TTZ 40 µg/ml	0.4322	

La significancia estadísticas de la comparación entre tratamiento con TTZ y concentración de TKI está indicada por: * (p<0.01) o ** (p<0.05).

Anexo 10. Análisis estadístico (ANOVA) que compara las IC₅₀ obtenidas de cada TKI y de su combinación con TTZ en cada línea celular (BT474 y BT474-R)

BT-474 IC50			BT-474-R IC50		
Combinación		p-valor	Combinación		p-valor
Lapatinib	Dasatinib	0.0000*	Lapatinib	Dasatinib	0.1027
Lapatinib	Nintedanib	0.0269**	Lapatinib	Nintedanib	0.0000*
Lapatinib	Sorafenib	0.0014*	Lapatinib	Sorafenib	0.0000*
Lapatinib + 5 µg/ml TTZ	Dasatinib + 5 µg/ml TTZ	0.0007*	Lapatinib + 5 µg/ml TTZ	Dasatinib + 5 µg/ml TTZ	0.0430**
Lapatinib + 5 µg/ml TTZ	Nintedanib + 5 µg/ml TTZ	0.0000*	Lapatinib + 5 µg/ml TTZ	Nintedanib + 5 µg/ml TTZ	0.0020*
Lapatinib + 5 µg/ml TTZ	Sorafenib + 5 µg/ml TTZ	0.0041*	Lapatinib + 5 µg/ml TTZ	Sorafenib + 5 µg/ml TTZ	0.0004*
Lapatinib + 10 µg/ml TTZ	Dasatinib + 10 µg/ml TTZ	0.1058	Lapatinib + 10 µg/ml TTZ	Dasatinib + 10 µg/ml TTZ	0.0061*
Lapatinib + 10 µg/ml TTZ	Nintedanib + 10 µg/ml TTZ	0.0163**	Lapatinib + 10 µg/ml TTZ	Nintedanib + 10 µg/ml TTZ	0.0399**
Lapatinib + 10 µg/ml TTZ	Sorafenib + 10 µg/ml TTZ	0.0000*	Lapatinib + 10 µg/ml TTZ	Sorafenib + 10 µg/ml TTZ	0.0001*
Lapatinib + 40 µg/ml TTZ	Dasatinib + 40 µg/ml TTZ	0.0005*	Lapatinib + 40 µg/ml TTZ	Dasatinib + 40 µg/ml TTZ	0.0052*
Lapatinib + 40 µg/ml TTZ	Nintedanib + 40 µg/ml TTZ	0.0000*	Lapatinib + 40 µg/ml TTZ	Nintedanib + 40 µg/ml TTZ	0.0000*
Lapatinib + 40 µg/ml TTZ	Sorafenib + 40 µg/ml TTZ	0.0000*	Lapatinib + 40 µg/ml TTZ	Sorafenib + 40 µg/ml TTZ	0.0000*
Dasatinib	Nintedanib	0.0000*	Dasatinib	Nintedanib	0.1518
Dasatinib	Sorafenib	0.1345	Dasatinib	Sorafenib	0.3309
Dasatinib + 5 µg/ml TTZ	Nintedanib + 5 µg/ml TTZ	0.0092*	Dasatinib + 5 µg/ml TTZ	Nintedanib + 5 µg/ml TTZ	0.0003*
Dasatinib + 5 µg/ml TTZ	Sorafenib + 5 µg/ml TTZ	0.3018	Dasatinib + 5 µg/ml TTZ	Sorafenib + 5 µg/ml TTZ	0.0004*
Dasatinib + 10 µg/ml TTZ	Nintedanib + 10 µg/ml TTZ	0.5462	Dasatinib + 10 µg/ml TTZ	Nintedanib + 10 µg/ml TTZ	0.0000*
Dasatinib + 10 µg/ml TTZ	Sorafenib + 10 µg/ml TTZ	0.0177**	Dasatinib + 10 µg/ml TTZ	Sorafenib + 10 µg/ml TTZ	0.0000*
Dasatinib + 40 µg/ml TTZ	Nintedanib + 40 µg/ml TTZ	0.0000*	Dasatinib + 40 µg/ml TTZ	Nintedanib + 40 µg/ml TTZ	0.0268**
Dasatinib + 40 µg/ml TTZ	Sorafenib + 40 µg/ml TTZ	0.0000*	Dasatinib + 40 µg/ml TTZ	Sorafenib + 40 µg/ml TTZ	0.0035*
Nintedanib	Sorafenib	0.0015*	Nintedanib	Sorafenib	0.0000*
Nintedanib + 5 µg/ml TTZ	Sorafenib + 5 µg/ml TTZ	0.0149**	Nintedanib + 5 µg/ml TTZ	Sorafenib + 5 µg/ml TTZ	0.0013*
Nintedanib + 10 µg/ml TTZ	Sorafenib + 10 µg/ml TTZ	0.0003*	Nintedanib + 10 µg/ml TTZ	Sorafenib + 10 µg/ml TTZ	0.0001*
Nintedanib + 40 µg/ml TTZ	Sorafenib + 40 µg/ml TTZ	0.0000*	Nintedanib + 40 µg/ml TTZ	Sorafenib + 40 µg/ml TTZ	0.0000*

La significancia estadísticas de la comparación de las IC₅₀ entre TKI y su combinación con TTZ está indicada por: * (p≤0.01) o ** (p≤0.05).

Anexo 10. Continuación.

BT-474 IC50			BT-474-R IC50		
Combinación		p-valor	Combinación		p-valor
Lapatinib	Lapatinib + 5 µg/ml TTZ	0.0086*	Lapatinib	Lapatinib + 5 µg/ml TTZ	0.0046*
Lapatinib	Lapatinib + 10 µg/ml TTZ	0.0219**	Lapatinib	Lapatinib + 10 µg/ml TTZ	0.8323
Lapatinib	Lapatinib + 40 µg/ml TTZ	0.0120**	Lapatinib	Lapatinib + 40 µg/ml TTZ	0.0027*
Lapatinib + 5 µg/ml TTZ	Lapatinib + 10 µg/ml TTZ	0.0252**	Lapatinib + 5 µg/ml TTZ	Lapatinib + 10 µg/ml TTZ	0.0696
Lapatinib + 5 µg/ml TTZ	Lapatinib + 40 µg/ml TTZ	0.0801	Lapatinib + 5 µg/ml TTZ	Lapatinib + 40 µg/ml TTZ	0.8782
Lapatinib + 10 µg/ml TTZ	Lapatinib + 40 µg/ml TTZ	0.1671	Lapatinib + 10 µg/ml TTZ	Lapatinib + 40 µg/ml TTZ	0.0709
Dasatinib	Dasatinib + 5 µg/ml TTZ	0.0000*	Dasatinib	Dasatinib + 5 µg/ml TTZ	0.0955
Dasatinib	Dasatinib + 10 µg/ml TTZ	0.0000*	Dasatinib	Dasatinib + 10 µg/ml TTZ	0.0948
Dasatinib	Dasatinib + 40 µg/ml TTZ	0.0000*	Dasatinib	Dasatinib + 40 µg/ml TTZ	0.2237
Dasatinib + 5 µg/ml TTZ	Dasatinib + 10 µg/ml TTZ	0.5265	Dasatinib + 5 µg/ml TTZ	Dasatinib + 10 µg/ml TTZ	0.0934
Dasatinib + 5 µg/ml TTZ	Dasatinib + 40 µg/ml TTZ	0.0021*	Dasatinib + 5 µg/ml TTZ	Dasatinib + 40 µg/ml TTZ	0.0042*
Dasatinib + 10 µg/ml TTZ	Dasatinib + 40 µg/ml TTZ	0.1357	Dasatinib + 10 µg/ml TTZ	Dasatinib + 40 µg/ml TTZ	0.0040*
Nintedanib	Nintedanib + 5 µg/ml TTZ	0.0000*	Nintedanib	Nintedanib + 5 µg/ml TTZ	0.0001*
Nintedanib	Nintedanib + 10 µg/ml TTZ	0.0136**	Nintedanib	Nintedanib + 10 µg/ml TTZ	0.0000*
Nintedanib	Nintedanib + 40 µg/ml TTZ	0.0001*	Nintedanib	Nintedanib + 40 µg/ml TTZ	0.0009*
Nintedanib + 5 µg/ml TTZ	Nintedanib + 10 µg/ml TTZ	0.2473	Nintedanib + 5 µg/ml TTZ	Nintedanib + 10 µg/ml TTZ	0.7449
Nintedanib + 5 µg/ml TTZ	Nintedanib + 40 µg/ml TTZ	0.2397	Nintedanib + 5 µg/ml TTZ	Nintedanib + 40 µg/ml TTZ	0.0609
Nintedanib + 10 µg/ml TTZ	Nintedanib + 40 µg/ml TTZ	0.3913	Nintedanib + 10 µg/ml TTZ	Nintedanib + 40 µg/ml TTZ	0.0589
Sorafenib	Sorafenib + 5 µg/ml TTZ	0.0018*	Sorafenib	Sorafenib + 5 µg/ml TTZ	0.3068
Sorafenib	Sorafenib + 10 µg/ml TTZ	0.0020*	Sorafenib	Sorafenib + 10 µg/ml TTZ	0.3880
Sorafenib	Sorafenib + 40 µg/ml TTZ	0.0017*	Sorafenib	Sorafenib + 40 µg/ml TTZ	0.0134**
Sorafenib + 5 µg/ml TTZ	Sorafenib + 10 µg/ml TTZ	0.4701	Sorafenib + 5 µg/ml TTZ	Sorafenib + 10 µg/ml TTZ	0.1645
Sorafenib + 5 µg/ml TTZ	Sorafenib + 40 µg/ml TTZ	0.8168	Sorafenib + 5 µg/ml TTZ	Sorafenib + 40 µg/ml TTZ	0.0078*
Sorafenib + 10 µg/ml TTZ	Sorafenib + 40 µg/ml TTZ	0.1166	Sorafenib + 10 µg/ml TTZ	Sorafenib + 40 µg/ml TTZ	0.0920

La significancia estadísticas de la comparación de las IC₅₀ entre TKI y su combinación con TTZ está indicada por: * (p≤0.01) o ** (p≤0.05).

Anexo 11. Análisis estadístico (ANOVA) que compara, entre las líneas celulares BT474 y BT474-R, el número de células al final de tres experimentos independientes de cada concentración de TKI y de su combinación con TTZ.

Lapatinib							
BT474/BT474-R monoterapia	p-valor	BT474/BT474-R 5 µg/ml de TTZ	p-valor	BT474/BT474-R 10 µg/ml de TTZ	p-valor	BT474/BT474-R 40 µg/ml de TTZ	p-valor
0	1.0000	0	1.0000	0	1.0000	0	1.0000
V	0.7621	V	0.0063*	V	0.6276	V	0.8830
0.001 µM	0.4179	0.001 µM	0.0005*	0.001 µM	0.2342	0.001 µM	0.2066
0.01 µM	0.7017	0.01 µM	0.0000*	0.01 µM	0.0384**	0.01 µM	0.1010
0.1 µM	0.2830	0.1 µM	0.0000*	0.1 µM	0.1966	0.1 µM	0.0022*
1 µM	0.8321	1 µM	0.1903	1 µM	0.0139**	1 µM	0.0545
10 µM	0.0685	10 µM	0.0149**	10 µM	0.2395	10 µM	0.0092*
100 µM	0.0535	100 µM	0.0684	100 µM	0.0211**	100 µM	0.4445

Dasatinib							
BT474/BT474-R monoterapia	p-valor	BT474/BT474-R 5 µg/ml de TTZ	p-valor	BT474/BT474-R 10 µg/ml de TTZ	p-valor	BT474/BT474-R 40 µg/ml de TTZ	p-valor
0	1.0000	0	1.0000	0	1.0000	0	1.0000
V	0.8479	V	0.2660	V	0.0000*	V	0.0000*
0.001 µM	0.0028*	0.001 µM	0.0243**	0.001 µM	0.0258**	0.001 µM	0.0541
0.01 µM	0.0015*	0.01 µM	0.0026*	0.01 µM	0.0000*	0.01 µM	0.0017*
0.1 µM	0.0000*	0.1 µM	0.0000*	0.1 µM	0.0001*	0.1 µM	0.0101**
1 µM	0.0000*	1 µM	0.0000*	1 µM	0.0000*	1 µM	0.0010*
10 µM	0.0055*	10 µM	0.0000*	10 µM	0.0008*	10 µM	0.0004*
100 µM	0.0176**	100 µM	0.0127**	100 µM	0.1162	100 µM	0.6643

Nintedanib							
BT474/BT474-R monoterapia	p-valor	BT474/BT474-R 5 µg/ml de TTZ	p-valor	BT474/BT474-R 10 µg/ml de TTZ	p-valor	BT474/BT474-R 40 µg/ml de TTZ	p-valor
0	1.0000	0	1.0000	0	1.0000	0	1.0000
V	0.6339	V	0.0826	V	0.0186**	V	0.0631
0.001 µM	0.3503	0.001 µM	0.5953	0.001 µM	0.0093*	0.001 µM	0.0146**
0.01 µM	0.4074	0.01 µM	0.5674	0.01 µM	0.4440	0.01 µM	0.8054
0.1 µM	0.7137	0.1 µM	0.0785	0.1 µM	0.0106**	0.1 µM	0.2492
1 µM	0.0553	1 µM	0.1049	1 µM	0.0140**	1 µM	0.0001*
10 µM	0.8541	10 µM	0.0641	10 µM	0.0106**	10 µM	0.1529
100 µM	0.7937	100 µM	0.0220**	100 µM	0.0093*	100 µM	0.1975

Sorafenib							
BT474/BT474-R monoterapia	p-valor	BT474/BT474-R 5 µg/ml de TTZ	p-valor	BT474/BT474-R 10 µg/ml de TTZ	p-valor	BT474/BT474-R 40 µg/ml de TTZ	p-valor
0	1.0000	0	1.0000	0	1.0000	0	1.0000
V	0.0302**	V	0.0692	V	0.0017*	V	0.0153**
0.001 µM	0.1558	0.001 µM	0.0102**	0.001 µM	0.5352	0.001 µM	0.9863
0.01 µM	0.1302	0.01 µM	0.1368	0.01 µM	0.0014*	0.01 µM	0.1236
0.1 µM	0.0729	0.1 µM	0.0196**	0.1 µM	0.0384**	0.1 µM	0.0084*
1 µM	0.5487	1 µM	0.1980	1 µM	0.0225**	1 µM	0.0011*
10 µM	0.0003*	10 µM	0.3808	10 µM	0.0147**	10 µM	0.0000*
100 µM	0.0001*	100 µM	0.8811	100 µM	0.1501	100 µM	0.0056*

La significancia estadísticas de la comparación entre línea celular para cada concentración de TKI y de su combinación con TTZ está indicada por: * ($p \leq 0.01$) o ** ($p \leq 0.05$).