

Determinación estandarizada basada en nCounter de *ERBB2* mRNA y perfiles inmunes en cáncer gástrico avanzado

Universidad de Barcelona

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

Programa de Doctorado en Medicina e Investigación Translacional

David Pesántez Coronel

Febrero 2026



UNIVERSITAT DE
BARCELONA





UNIVERSITAT DE
BARCELONA



Determinación estandarizada basada en nCounter de *ERBB2* mRNA y perfiles inmunes en cáncer gástrico avanzado

Memoria de tesis doctoral presentada por **David Santiago Pesántez Coronel** para optar al grado de doctor por la Universidad de Barcelona

Dirigida por la doctora **Tamara Saurí**, responsable de la Unidad de Cáncer Gastrointestinal alto del Departamento de Oncología Médica, Hospital Clínic de Barcelona. Profesora asociada, Universidad de Barcelona. Investigadora Grupo de Genómica Traslacional y Terapias Dirigidas en Tumores Sólidos — Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer (IDIBAPS)

Codirigida por el doctor **Aleix Prat**, Director del Clínic Barcelona Comprehensive Cancer Center. Profesor de la Universidad de Barcelona. Responsable del grupo de Genómica Traslacional y Terapias Dirigidas en Tumores Sólidos— IDIBAPS

Tutora: Doctora **Tamara Saurí**, previamente referenciada.

Programa de Doctorado en Medicina e Investigación Traslacional
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad de Barcelona
Barcelona, febrero de 2026

Directores

Tutora

Tamara Saurí; Firmado digitalmente
por Tamara Saurí; MD,
MD, PhD. PhD. N°Col: 48912
N°Col: 48912 Fecha: 2026.02.09
11:00:10 +01'00'

Aleix Prat
Aparicio - DNI
47713204A
(TCAT) Signat digitalment per
Aleix Prat Aparicio -
DNI 47713204A (TCAT)
Data: 2026.02.09
11:21:35 +01'00'

Tamara Saurí; Firmado digitalmente
por Tamara Saurí; MD,
MD, PhD. PhD. N°Col: 48912
N°Col: 48912 Fecha: 2026.02.09
11:00:10 +01'00'

AUTORIZACIÓN DEL DEPÓSITO DE LA TESIS POR PARTE DE LOS DIRECTORES

Los abajo firmantes, en calidad de director(a) y codirector(a) de la tesis doctoral titulada “Determinación estandarizada basada en nCounter de *ERBB2* mRNA y perfiles inmunes en cáncer gástrico avanzado”, elaborada por David Santiago Pesántez Coronel para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona, certificamos que el trabajo ha sido realizado bajo nuestra supervisión y cumple con los requisitos establecidos para su depósito, defensa y evaluación por el tribunal correspondiente.

Firmado:

Dra. Tamara Saurí

DNI 33472956K

Tamara Saurí; Firmado digitalmente
por Tamara Saurí; MD,
MD, PhD. Ph.D. N°Col: 48912
N°Col: 48912 Fecha: 2026.02.09
11:00:10 +01'00'

Dr. Aleix Prat

DNI 47713204A

Aleix Prat Signat digitalment per
Aparicio - DNI Aleix Prat Aparicio -
47713204A DNI 47713204A (TCAT)
(TCAT) Data: 2026.02.09
11:21:35 +01'00'

Declaración de originalidad, códigos éticos y buenas prácticas de la persona doctorada y de las personas que dirigen la tesis.

Las/los abajo firmantes, como director(a), codirector(a) y doctorando/a de la tesis doctoral titulada "Determinación estandarizada basada en nCounter de *ERBB2* mRNA y perfiles inmunes en cáncer gástrico avanzado", manifiestan que la tesis se trata de un trabajo original y contiene resultados fruto de la investigación propia, no contiene plagio de otras tesis ni de publicaciones previas; que conocen y consienten que la tesis podrá ser sometida a procedimientos para comprobar su originalidad; y que en la realización del trabajo se han seguido los códigos éticos y de buenas prácticas académicas.

Firmado:

Dra. Tamara Saurí

DNI 33472956K

Tamara Saurí; Firmado digitalmente
por Tamara Saurí; MD,
MD, PhD. Ph.D. N°Col: 48912
N°Col: 48912 Fecha: 2026.02.09
11:00:10 +01'00'

Dr. Aleix Prat

DNI 47713204A

Aleix Prat Signat digitalment per
Aparicio - DNI Aleix Prat Aparicio -
47713204A DNI 47713204A (TCAT)
(TCAT) Data: 2026.02.09
11:21:35 +01'00'

Dr. David Santiago Pesántez Coronel

DNI 60420502P

Signature: 
David Pesantez Coronel (2026/02/2026 10:23:05 GMT+1)

Declaración de autoría de la tesis

Yo, David Santiago Pesántez Coronel, con DNI 60420502P declaro que soy autor de la tesis doctoral titulada "Determinación estandarizada basada en nCounter de *ERBB2* mRNA y perfiles inmunes en cáncer gástrico avanzado", y no contiene plagio, respetando los códigos éticos y de buenas prácticas académicas durante su elaboración.

Firmado:

Dr. David Santiago Pesántez Coronel

DNI 60420502P

Signature: 
David Pesantez (20/02/2026 10:23:05 GMT+1)

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que me han acompañado y apoyado durante estos años. Este doctorado ha sido un desafío y una oportunidad para crecer tanto profesional como personalmente. Cada etapa, buena y difícil, ha valido la pena gracias al apoyo de quienes han estado junto a mí.

A mis padres, Daniel Pesántez y Libertad Coronel, por su amor incondicional y por ser siempre mi motor. A mis hermanos Daniel, Sebastián y Valeria, y a toda mi familia, por su apoyo constante.

A Andrea, mi esposa, por compartir este camino conmigo desde el comienzo, por su apoyo incondicional y por estar a mi lado en cada momento. Y a Lucas, nuestro hijo, por ser mi mayor inspiración, mi alegría diaria y lo más importante de mi vida. Gracias a ambos por su amor, su compañía y por dar sentido a cada esfuerzo.

A mis mentores, la Dra. Tamara Saurí y el Dr. Aleix Prat, gracias por su confianza, guía y enseñanzas.

A mis compañeros y amigos, por su apoyo y ayuda constante.

Y finalmente, gracias a Dios por sus bendiciones.

FINANCIACIÓN

Esta tesis fue llevada a cabo en el Hospital Clínic de Barcelona, IDIBAPS, en el Grupo de Genómica traslacional y terapias dirigidas en tumores sólidos con la ayuda de la Beca SEOM 2022 en cáncer gástrico, SEOM_CANCERGASTR22_1 “Roger contra el cáncer”.

Índice

Abreviaturas y acrónimos.....	7
Resumen	11
1. Cáncer gástrico: Generalidades	19
1.1 Epidemiología del cáncer gástrico.....	19
1.2 Etiología y factores de riesgo del cáncer gástrico	20
1.2.1 <i>Helicobacter pylori</i>	22
1.2.2 Factores ambientales, dietéticos y estilos de vida	23
1.3 Diagnóstico y clínica del cáncer gástrico	24
1.3.1 Anatomía patológica del cáncer gástrico.....	25
1.4 Tratamiento sistémico del cáncer gástrico avanzado.	28
1.4.1 Evolución de la quimioterapia: el punto de partida.....	28
1.4.2 Introducción de anticuerpos monoclonales: la revolución de las terapias dirigidas	29
1.4.3 Inmunoterapia en cáncer gástrico avanzado HER2+.....	37
1.5 Biomarcadores de interés en cáncer gástrico.....	38
1.5.1 Historia del descubrimiento del receptor HER2.....	41
1.5.2 Características del receptor HER2.....	41
1.5.3 Asociación del receptor HER2 con el cáncer de mama.....	44
1.5.4 HER2 en otros tipos de cáncer	45
1.5.5 HER2 en cáncer gástrico y de la unión gastroesofágica.....	46
1.5.6 Implicaciones clínicas y biológicas de HER2 en cáncer gástrico	46
1.5.7 Diferencias en la sobreexpresión del receptor HER2 entre cáncer gástrico y cáncer de mama	47
1.6. Puntuación de inmunohistoquímica e hibridación in situ de HER2 en cáncer gástrico.....	48
1.6.1 Diferencias clave entre muestras quirúrgicas y biopsias	49
1.6.2 Interpretación clínica de la clasificación de HER2 por inmunohistoquímica	51
1.6.3 Hibridación in situ para HER2 en cáncer gástrico	52
1.7 Clasificación y alteraciones moleculares relevantes en cáncer gástrico.....	53
1.8 Interacciones entre el sistema inmune y el cáncer gástrico HER2+.....	55
1.9 Heterogeneidad molecular del receptor HER2 y nuevos métodos de evaluación del receptor HER2	57
1.9.1 Heterogeneidad molecular de HER2	57
1.9.2 Nuevos métodos de evaluación del receptor HER2.	58
1.9.3 Evaluación de HER2 por técnicas de expresión génica: nCounter y test genómico HER2DX.....	59
2. Hipótesis	65

3. Objetivos.....	67
3.1 Objetivo primario del estudio	67
3.2 Objetivos secundarios del estudio	67
4. Metodología.....	69
4.1 Características y diseño del estudio.....	69
4.2 Criterios de inclusión.....	69
4.3 Criterios de exclusión	69
4.4 Selección y análisis de las muestras	69
4.4.1 Inmunohistoquímica de HER2 e hibridación fluorescente in situ.....	70
4.4.2 Extracción de RNA y análisis de expresión génica.....	70
4.4.3 Análisis in silico de <i>ERBB2</i>	70
4.4.4 Análisis in silico de PD-1 (<i>PDCDI</i>).....	70
4.4.5 Test HER2DX.....	71
4.6 Análisis estadísticos.....	71
4.7. Aspectos éticos	72
5. Resultados.....	73
5.1 Características de los Pacientes	73
5.2 Expresión de mRNA de <i>ERBB2</i> en cáncer gástrico	75
5.3. Comparación de la expresión de <i>ERBB2</i> entre varios tipos de cáncer	77
5.4 Expresión de PD-1 en cáncer gástrico	79
5.5. Resultados clínicos en cáncer gástrico HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia.....	81
5.6. Categorías de expresión de HER2DX <i>ERBB2</i> en cáncer gástrico HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia	81
5.7. Asociación entre el puntaje HER2DX <i>ERBB2</i> y los resultados de supervivencia en cáncer gástrico avanzado HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia	83
5.8 Firmas moleculares adicionales del ensayo HER2DX incluida una firma inmunológica en cáncer gástrico avanzado HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia.....	91
5.9 Asociación entre los niveles de expresión de PD-1 y los resultados de supervivencia y tasa de respuesta en CG avanzado HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia.....	94
6. Discusión	97
7. Conclusiones.....	109
8. Bibliografía.....	111
9. ANEXO 1	125
9.1. Artículo publicado en ESMO OPEN.....	125
9.2. Artículo publicado en Cancers.	131

Índice de tablas

Tabla 1. Características clínicas, morfológicas y terapéuticas de los subtipos de la clasificación de Lauren en cáncer gástrico.	27
Tabla 2. Evolución en el tratamiento sistémico del cáncer gástrico avanzado. Fuente: elaboración propia.	32
Tabla 3. Principales estudios sobre terapias anti-HER2 en cáncer gástrico avanzado HER2 positivo. Fuente: elaboración propia.	34
Tabla 4. Terapias Emergentes: Ensayos Clínicos recientes y nuevos agentes. innovadores en cáncer gástrico avanzado HER2 positivo. Fuente: elaboración propia.	36
Tabla 5. Puntuación de HER2 por IHQ en muestras quirúrgicas y endoscópicas .	51
Tabla 6. Características demográficas y de la enfermedad para todos los pacientes incluidos en el estudio.	70
Tabla 7. Características demográficas y de la enfermedad de los pacientes con CG avanzado HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia.	71
Tabla 8. Asociación del puntaje HER2DX ERBB2 con la SLP en pacientes con CG avanzado HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia.	80
Tabla 9. Asociación del puntaje HER2DX ERBB2 con la SG en pacientes con CG avanzado HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia.	81
Tabla 10. Asociación de las firmas HER2DX como variables continuas y categóricas según umbrales preespecificados con la SLP en pacientes con CG HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia.	87
Tabla 11. Asociación de las firmas HER2DX como variables continuas y categóricas según umbrales preespecificados con la SLP en pacientes con CG HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia.	88

Índice de Figuras

Figura 1. Factores de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico. Fuente: elaboración propia.....	21
Figura 2. Estructura tridimensional predicha de HER2 obtenida del visor Structure de Human Protein Atlas (predicción AlphaFold v2). Accedido el 09-11-2025.....	43
Figura 3. Representación esquemática de las características de los receptores de la familia HER.....	44
Figura 4. Imágenes representativas por IHQ de los diferentes niveles de HER2 en CG.	50
Figura 5. Expresión de mRNA de ERBB2 en cáncer gástrico avanzado.....	76
Figura 6. Porcentajes de tumores que presentan sobreexpresión o disminución en los niveles de mRNA de ERBB2 en diferentes tipos de cáncer.....	77
Figura 7. Comparación de los niveles de mRNA de ERBB2 (en valores log ₂) en cáncer de mama (izquierda) y CG (derecha), estratificados según el estatus de HER2 determinado por IHQ y ISH.	78
Figura 8. Dispersión de los z-scores de expresión de <i>PDCD1</i> (eje Y) frente a los de ERBB2 (eje X), obtenidos por RNA-Seq.....	79
Figura 9. Niveles de expresión de mRNA de <i>PDCD1</i> estratificados según el estatus de HER2 determinado por IHQ.....	80
Figura 10. Expresión del mRNA de ERBB2 HER2DX en 58 pacientes con CG avanzado HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia.	82
Figura 11. Supervivencia libre de progresión y supervivencia global en función del estado HER2 (IHQ 3+ vs. 2+/ISH+) en pacientes con CG avanzado HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia.....	83
Figura 12. Asociación de los grupos de puntuación HER2DX ERBB2 y la supervivencia libre de progresión en pacientes con CG avanzado HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia.....	84
Figura 13. Asociación de los grupos de puntuación HER2DX ERBB2 y la supervivencia global en pacientes con CG avanzado HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia.....	86
Figura 14. Discriminación y distribución del score ERBB2 en relación con el estado HER2 en CG.....	88
Figura 15. Distribución del nuevo punto de corte de ERBB2 (alto/bajo) en CG.....	89

Figura 16. Asociación del nuevo punto de corte de ERBB2 con el resultado de supervivencia en CG HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia.	89
Figura 17. Tasa de respuesta objetiva (TRO) a trastuzumab más quimioterapia en pacientes con CG con ERBB2 bajo, medio y alto.	91
Figura 18. Asociación del amplicón de HER2 (panel izquierda), Firma IGG (panel central) y firma de proliferación, con la supervivencia libre de progresión (paneles superiores) y la supervivencia global (paneles inferiores).	92
Figura 19. SLP según la expresión de PDCD1, definida por la mediana, en pacientes con CG avanzado HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia.	94
Figura 20. SG según la expresión de PDCD1, definida por la mediana, en pacientes con CG avanzado HER2+ tratado con trastuzumab más quimioterapia.	95
Figura 21. Niveles de expresión de PDCD1 y respuesta clínica en pacientes con CG HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia.	96

Abreviaturas y acrónimos

CG: Cáncer gástrico

UGE: Unión gastroesofágica

HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (Human Epidermal growth factor Receptor 2)

HER2+ / HER2-: Positividad / negatividad para HER2

IHQ: Inmunohistoquímica

ISH: Hibridación in situ

FISH: Hibridación fluorescente in situ (Fluorescent in situ Hybridization)

CISH: Hibridación cromogénica in situ (Chromogenic in situ Hybridization)

ERBB2: Nombre del gen que codifica la proteína HER2

SG: Supervivencia global

SLP: Supervivencia libre de progresión

PD-1: Proteína de muerte programada 1 (Programmed cell death 1)

PD-L1: Ligando de muerte programada 1 (Programmed cell death ligand 1)

NK: Natural killer (asesinos naturales)

TRO: Tasa de respuesta objetiva

mRNA: ácido ribonucleico mensajero (messenger ribonucleic acid)

FDA: Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU.)

TCGA: The Cancer Genome Atlas (Atlas del Genoma del Cáncer)

NGS: Secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

RT-qPCR: PCR cuantitativa con transcripción inversa.

dMMR: Deficiencia de proteínas de reparación de desajustes (Deficient Mismatch Repair)

MSI: Inestabilidad de microsatélites (Microsatellite Instability)

MSI-H: Alta inestabilidad de microsatélites (Microsatellite Instability-High)

CPS: Score combinado positivo (Combined Positive Score)

CAP: College of American Pathologists (Colegio de Patólogos Americanos)

ASCO: American Society of Clinical Oncology (Sociedad Americana de Oncología Clínica)

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group (score de estado funcional)

TNE: Tumor neuroendocrino

GIST: Tumor del estroma gastrointestinal (Gastrointestinal Stromal Tumor)

TAS-102: Trifluoridina-tipiracilo (fármaco citotóxico oral; nombre comercial Lonsurf)

ADC: Anticuerpo conjugado (Antibody–Drug Conjugate)

TKI: Inhibidor de tirosina quinasa (Tyrosine Kinase Inhibitor)

CAR-T: Células T con receptor de antígeno quimérico (Chimeric Antigen Receptor T-cell)

CLDN18.2: Claudina 18.2

FGFR2b: Receptor 2b del factor de crecimiento de fibroblastos (Fibroblast Growth Factor Receptor 2b)

TMB: Carga mutacional tumoral (Tumor Mutational Burden)

TIL/TILs: Linfocitos infiltrantes de tumor (Tumor-Infiltrating Lymphocytes)

OR: Odds ratio (razón de posibilidades)

IC: Intervalo de confianza

HR: Hazard ratio (razón de riesgos)

VEB: Virus de Epstein-Barr

TC: Tomografía computarizada

PET: Tomografía por emisión de positrones (Positron Emission Tomography)

EUS: Ultrasonido endoscópico (Endoscopic Ultrasound)

CEP17: Centrómero del cromosoma 17

PRM-MS: Monitoreo de reacción paralela por espectrometría de masas (Parallel Reaction Monitoring–Mass Spectrometry)

ctDNA: ADN tumoral circulante

Tesis doctoral presentada en formato clásico con 1 artículo original anexo y 1 artículo original complementario anexo.

Artículo original:

Pesántez D, Brasó-Maristany F, Pascual T, Angelats L, Indacochea A, Cuatrecasas M, López S, Sanfeliu E, Fernández-Esparrach G, Notario L, Méndez I, Momblan D, Candia L, Macias I, **Prat A**, **Sauri T**. HER2DX ERBB2 score in advanced HER2-positive gastric cancer treated with trastuzumab and chemotherapy. *ESMO Open*. 2025 Sep 5;10(9):105563. doi: 10.1016/j.esmoop.2025.105563. Epub ahead of print. PMID: 40913834.

- **Factor de impacto JCR 2024:** 7.1 (Q1, área: Oncology).
- **Indicador SJR 2024:** 3.582 (Q1, áreas: Biochemistry, Genetics and Molecular Biology; Cancer Research; Medicine; Oncology, según Scimago Journal Rank).
- **H-Index:** 70.

Artículo original complementario:

Griguolo G, Brasó-Maristany F, González-Farré B, Pascual T, Chic N, **Sauri T**, Kates R, Gluz O, Martínez D, Paré L, Tsvetkova V, **Pesantez D**, Vidal M, Adamo B, Muñoz M, Galván P, Barberá L, Cuatrecasas M, Christgen M, Kreipe H, Monge-Escartín I, Villagrasa P, Soy D, Giarratano T, Dieci MV, Conte P, Harbeck N, Guarneri V, **Prat A**. ERBB2 mRNA Expression and Response to Ado-Trastuzumab Emtansine (T-DM1) in HER2-Positive Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020 Jul 14;12(7):1902. doi: 10.3390/cancers12071902. PMID: 32674482. PMCID: PMC7409149.

- **Factor de impacto JCR 2024:** 4.4.
- **Indicador SJR 2024:** 1.462 (Q1, áreas: Biochemistry, Genetics and Molecular Biology; Cancer Research; Medicine; Oncology, según Scimago Journal Rank).
- **H-Index:** 157

Resumen

Introducción

El cáncer gástrico (CG) y el cáncer de la unión gastroesofágica (UGE) son neoplasias malignas que presentan una alta incidencia y mortalidad a nivel mundial. La mayoría de los casos se diagnostican en estadios avanzados, principalmente debido a la inespecificidad de los síntomas iniciales, lo que contribuye a un pronóstico desfavorable. En los últimos años, las terapias dirigidas, como trastuzumab en tumores HER2 positivos (HER2+), han representado un avance significativo en la práctica clínica; sin embargo, la respuesta al tratamiento varía considerablemente entre pacientes, lo que refleja una marcada heterogeneidad biológica y subraya la necesidad de herramientas más precisas para identificar pacientes que se beneficien del tratamiento anti-HER2. La determinación del estatus HER2 se realiza mediante inmunohistoquímica (IHQ) y/o hibridación in situ (ISH), técnicas semi-cuantitativas con limitaciones de precisión y reproducibilidad. Por ello, existe la necesidad de identificar y validar nuevos biomarcadores que permitan predecir con mayor exactitud la respuesta y pronóstico al tratamiento anti-HER2 de forma más precisa, y permitan una selección más adecuada de pacientes.

Hipótesis

La cuantificación de HER2 a través de la expresión génica de *ERBB2* se propone como un biomarcador pronóstico y predictivo de la respuesta al tratamiento anti-HER2 en CG y de la UGE HER2+, con posibles ventajas frente a las técnicas convencionales semi-cuantitativas como la IHQ y la ISH, con el objetivo de optimizar la selección de pacientes y mejorar los desenlaces clínicos.

Objetivos

El objetivo primario es identificar un biomarcador predictivo de respuesta a trastuzumab en CG y de la UGE HER2+, mediante la caracterización de la expresión génica de *ERBB2* y perfiles inmunes.

Como objetivos secundarios se plantean correlacionar la expresión de ácido ribonucleico mensajero (mRNA) de *ERBB2* con los resultados obtenidos por IHQ e ISH e identificar puntos de corte para clasificar tumores como HER2+ o HER2 negativo (HER2-); asociar la expresión de mRNA de *ERBB2* y HER2 con la supervivencia global (SG),

supervivencia libre de progresión (SLP) y respuesta al tratamiento anti-HER2; analizar la relación entre la expresión de genes individuales, incluyendo genes inmunes como PD-1 (proteína de muerte programada 1), y los desenlaces clínicos; y comparar el nivel de expresión de HER2 entre pacientes con CG/UGE y cáncer de mama.

Métodos

Se realizó un estudio retrospectivo en una cohorte de 134 pacientes con CG y de la UGE avanzado, de los cuales 58 fueron tratados con trastuzumab y quimioterapia en primera línea. Se incluyeron pacientes adultos con CG/UGE avanzado y estatus HER2 evaluado por IHQ/ISH; se excluyeron aquellos con tratamiento sistémico previo o muestra insuficiente. Se comparó la utilidad pronóstica y predictiva de la expresión de mRNA de *ERBB2* determinada por nCounter y cuantificada a través de HER2DX frente a los métodos convencionales (IHQ/ISH), evaluando además perfiles inmunes relevantes. Se establecieron correlaciones entre los diferentes métodos diagnósticos, los perfiles genómicos e inmunes y las principales variables clínicas (SG, SLP, respuesta al tratamiento). Se identificó un punto de corte de *ERBB2* para clasificar la positividad de HER2 en CG y de la UGE avanzado, y se realizó una comparación transversal entre la expresión de HER2 en CG y cáncer de mama.

Resultados principales

Una elevada expresión de mRNA de *ERBB2*, determinada mediante el test genómico HER2DX, mostró una correlación significativa con mejores tasas de respuesta, así como con la SLP (hazard ratio [HR] = 0,81; IC 95%: 0,69–0,95; p = 0,012) y la SG (HR = 0,43; Intervalo de confianza [IC] 95%: 0,23–0,81; p = 0,008). Estos resultados superaron la capacidad predictiva y pronóstica de la IHQ/ISH en nuestra cohorte de pacientes. El punto de corte pre-establecido permitió una clasificación más precisa de los tumores HER2+ y su respuesta al tratamiento. El análisis de los perfiles inmunes y de PD-1 no evidenció asociación con las variables clínicas evaluadas en la cohorte estudiada. Además, se identificaron diferencias significativas en la expresión de HER2 entre el CG y el cáncer de mama.

Conclusiones

La cuantificación de la expresión génica de *ERBB2*, realizada mediante el test genómico HER2DX, se asoció con una mayor SLP y SG en pacientes con CG/UGE HER2+, demostrando ser un biomarcador más robusto que las técnicas convencionales como la IHQ y la ISH; esto permite una estratificación más precisa del estatus HER2 y una mayor personalización del abordaje terapéutico anti-HER2 con potencial impacto en supervivencia en estos pacientes. Además, la incorporación del conocimiento clínico derivado de otros tumores HER2+, como el cáncer de mama, junto con la implementación de biomarcadores innovadores, utilizando nuevas tecnologías, puede contribuir significativamente al avance de la oncología de precisión en el ámbito gastrointestinal.

Palabras clave: cáncer gástrico HER2 positivo, HER2DX, expresión génica.

Resum

Introducció

El càncer gàstric (CG) i el càncer de la unió gastroesofàgica (UGE) són neoplàsies malignes amb una alta incidència i mortalitat a escala mundial. La majoria dels casos es diagnostiquen en estadis avançats, principalment a causa de la inespecificitat dels símptomes inicials, fet que contribueix a un pronòstic desfavorable. En els darrers anys, les teràpies dirigides, com el trastuzumab en tumors HER2 positius (HER2+), han representat un avenç significatiu en la pràctica clínica; tanmateix, la resposta al tractament varia considerablement entre pacients, fet que reflecteix una marcada heterogeneïtat biològica i subratlla la necessitat d'eines més precises per identificar els pacients que es beneficien del tractament anti-HER2. La determinació de l'estatus HER2 es duu a terme mitjançant immunohistoquímica (IHQ) i/o hibridació in situ (ISH), tècniques semiquantitatives amb limitacions de precisió i reproductibilitat. Per això, cal identificar i validar nous biomarcadors que permetin predir amb més exactitud la resposta i el pronòstic al tractament anti-HER2 de manera més precisa, i facilitin una selecció més adequada de pacients.

Hipòtesi

La quantificació d'HER2 a través de l'expressió gènica d'*ERBB2* es proposa com un biomarcador pronòstic i predictiu de la resposta al tractament anti-HER2 en CG i UGE HER2+, amb possibles avantatges respecte de les tècniques convencionals semiquantitatives com l'IHQ i la ISH, amb l'objectiu d'optimitzar la selecció de pacients i millorar els resultats clínics.

Objectius

L'objectiu primari és identificar un biomarcador predictiu de resposta al trastuzumab en CG i UGE HER2+, mitjançant la caracterització de l'expressió gènica d'*ERBB2* i perfils immunitaris.

Com a objectius secundaris es planteja correlacionar l'expressió de àcid ribonucleic missatger (mRNA) d'*ERBB2* amb els resultats obtinguts per IHQ i ISH i identificar punts de tall per classificar tumors com a HER2+ o HER2 negatiu (HER2-); associar l'expressió

de mRNA d'*ERBB2* i HER2 amb la supervivència global (SG), la supervivència lliure de progressió (SLP) i la resposta al tractament anti-HER2; analitzar la relació entre l'expressió de gens individuals, incloent-hi gens immunitaris com PD-1 (proteïna de mort programada 1), i els resultats clínics; i comparar el nivell d'expressió d'HER2 entre pacients amb CG/UGE i càncer de mama.

Mètodes

Es va dur a terme un estudi retrospectiu en una cohort de 134 pacients amb CG i UGE avançat, dels quals 58 van ser tractats amb trastuzumab i quimioteràpia en primera línia. Es van incloure pacients adults amb CG/UGE avançat i estatus HER2 avaluat per IHQ/ISH; es van excloure aquells amb tractament sistèmic previ o mostra insuficient. Es va comparar la utilitat pronòstica i predictiva de l'expressió de mRNA d'*ERBB2* determinada per nCounter i quantificada mitjançant HER2DX respecte dels mètodes convencionals (IHQ/ISH), avaluant a més perfils immunitaris rellevants. Es van establir correlacions entre els diferents mètodes diagnòstics, els perfils genòmics i immunitaris i les principals variables clíniques (SG, SLP, resposta al tractament). Es va identificar un punt de tall d'*ERBB2* per classificar la positivitats d'HER2 en CG i UGE avançat, i es va realitzar una comparació transversal entre l'expressió d'HER2 en CG i càncer de mama.

Resultats principals

Una elevada expressió de mRNA d'*ERBB2*, determinada mitjançant el test genòmic HER2DX, va mostrar una correlació significativa amb millors taxes de resposta, així com amb la SLP (hazard ratio [HR] = 0,81; IC 95%: 0,69–0,95; p = 0,012) i la SG (HR = 0,43; interval de confiança [IC] 95%: 0,23–0,81; p = 0,008). Aquests resultats van superar la capacitat predictiva i pronòstica de l'IHQ/ISH en la nostra cohort de pacients. El punt de tall preestablert va permetre una classificació més precisa dels tumors HER2+ i de la seva resposta al tractament. L'anàlisi dels perfils immunitaris i de PD-1 no va evidenciar associació amb les variables clíniques avaluades en la cohort estudiada. A més, es van identificar diferències significatives en l'expressió d'HER2 entre el CG i el càncer de mama.

Conclusions

La quantificació de l'expressió gènica d'*ERBB2*, realitzada mitjançant el test genòmic HER2DX, es va associar amb una major SLP i SG en pacients amb CG/UGE HER2+, demostrant ser un biomarcador més robust que les tècniques convencionals com l'IHQ i la ISH; això permet una estratificació més precisa de l'estatus HER2 i una major personalització de l'abordatge terapèutic anti-HER2 amb potencial impacte en la supervivència d'aquests pacients. A més, la incorporació del coneixement clínic derivat d'altres tumors HER2+, com el càncer de mama, juntament amb la implementació de biomarcadors innovadors, utilitzant noves tecnologies, pot contribuir significativament a l'avenç de l'oncologia de precisió en l'àmbit gastrointestinal.

Paraules clau: càncer gàstric HER2 positiu, HER2DX, expressió gènica.

Introducción

1. Cáncer gástrico: Generalidades

1.1 Epidemiología del cáncer gástrico

El cáncer gástrico (CG) representa un desafío significativo para la salud global, con aproximadamente 1,089,000 nuevos casos diagnosticados anualmente. La tasa de incidencia ajustada por edad es de 11,1 por cada 100,000 personas. Este tipo de cáncer resulta en aproximadamente 800,000 muertes al año, lo que representa el 7,7% de todas las muertes relacionadas con cáncer (1). Estas cifras sitúan al CG como la quinta causa principal de mortalidad por cáncer en ambos géneros combinados (2).

Las tasas de incidencia y mortalidad muestran una notable variación regional: las tasas más altas se observan en el este de Asia (particularmente en China, Japón y Corea), Europa del Este y algunas partes de América del Sur, mientras que las tasas son sustancialmente más bajas en América del Norte, Europa Occidental y África. En Asia, especialmente en China, el CG representa casi la mitad de los casos y muertes globales, reflejando tanto la alta prevalencia de factores de riesgo como el tamaño de la población. Las tasas de incidencia y mortalidad ajustadas por edad son más altas en hombres y aumentan con la edad, alcanzando su punto máximo en personas mayores de 70 años (3,4).

El CG ha disminuido en las últimas décadas, con un descenso anual promedio en la incidencia de aproximadamente el 2% entre 1988 y 2012, una tendencia que se proyecta continuará en la mayoría de las regiones hasta 2030. Esta disminución se atribuye a la reducción de la prevalencia de la infección por *Helicobacter (H.) pylori*, la mejora en la conservación de alimentos, cambios dietéticos y la disminución de las tasas de tabaquismo. Sin embargo, algunas regiones, como Ecuador y Lituania, pueden experimentar un aumento en la incidencia debido a la persistencia de factores de riesgo. El CG de aparición temprana (diagnosticado antes de los 50 años) está incrementando en algunas poblaciones, aunque las razones de este incremento permanecen imprecisas (5,6).

La mayoría de los pacientes con CG y de la unión gastroesofágica (UGE) son diagnosticados en estadios avanzados, con enfermedad inoperable o metastásica, lo que

condiciona un pronóstico desfavorable a pesar de los avances recientes en diagnóstico y tratamiento (7).

1.2 Etiología y factores de riesgo del cáncer gástrico

El CG surge de una etiología multifactorial que involucra tanto factores de riesgo ambientales como genéticos. Entre los factores ambientales, la infección crónica por *H. pylori* es el más significativo, clasificado como un carcinógeno del grupo I por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer y fuertemente asociado con el cáncer de la UGE (1,8). Diversos estudios han demostrado que la erradicación de *H. pylori* puede reducir significativamente la incidencia de CG, especialmente en poblaciones de alto riesgo. Los factores dietéticos también desempeñan un papel crucial en el riesgo de CG. Un alto consumo de sal, carnes procesadas y granos refinados aumenta la probabilidad de desarrollar la enfermedad, mientras que una dieta rica en frutas y verduras puede ofrecer beneficios protectores. Además, micronutrientes específicos, como la vitamina C y el selenio, han mostrado potenciales efectos protectores frente al CG. Los factores de estilo de vida contribuyen aún más al perfil de riesgo. Tanto el tabaquismo como el consumo excesivo de alcohol están bien establecidos como factores de riesgo para el CG y de la UGE. Por otra parte, la obesidad se ha implicado específicamente en el aumento del riesgo de CG, lo que subraya la importancia de la gestión del peso como medida preventiva (9,10).

La predisposición genética también desempeña un papel crítico en el CG. Tener antecedentes familiares de CG, especialmente en familiares de primer grado, duplica o triplica el riesgo, lo que refleja tanto las exposiciones genéticas compartidas como las ambientales. Las mutaciones germinales en genes predisponentes al cáncer, como cadherina 1 (*CDH1*) asociado con el CG difuso hereditario, así como en *BRCA 1* y *2* y genes de reparación, se asocian con un aumento del riesgo. Los portadores de mutaciones patogénicas en *CDH1* presentan un riesgo acumulado elevado de cáncer gástrico difuso (25–80% según la cohorte), por lo que las guías internacionales recomiendan considerar gastrectomía total profiláctica, habitualmente desde los 20 años, dado su alta penetrancia y las limitaciones de la vigilancia endoscópica para detectar lesiones tempranas (11). Además, la infección con el virus de Epstein-Barr (VEB) está implicada en un subconjunto de cánceres gástricos. Otros factores de riesgo incluyen cirugías gástricas

previas, anemia perniciosa, ciertas exposiciones ocupacionales y un bajo nivel socioeconómico (12,13).

Sin embargo, el CG suelen surgir debido a combinaciones complejas, y la carcinogénesis se produce durante un largo período de tiempo, durante el cual la información epidemiológica anterior de los pacientes puede volverse difícil de identificar (14).

La figura 1 muestra cómo la interacción de diferentes factores—ambientales, genéticos, infecciosos, dietéticos y de riesgo poblacional—contribuyen al desarrollo del CG. Esta ilustración resalta la importancia de considerar todos estos elementos de manera integrada para comprender el origen multifactorial de la enfermedad.



Figura 1. Factores de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico. Fuente: elaboración propia.

1.2.1 *Helicobacter pylori*

En 1994, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasificó a *H. pylori* como un carcinógeno (es decir, como un agente del grupo 1) para el CG sobre la base de evidencia epidemiológica (15) y volvió a confirmar este hallazgo en el año 2009 (16). Actualmente es el principal factor de riesgo infeccioso para el CG, clasificado también como un carcinógeno de grupo I por la Organización Mundial de la Salud.

Aunque la infección por *H. pylori* se establece en la niñez y persiste de por vida a menos que sea tratada, su prevalencia varía a nivel mundial. Las tasas más altas se encuentran en América Central y del Sur (~60%), ciertas regiones de Asia (~55% en China y Corea del Sur) y Europa del este (~50%) (17). La fuerte correlación geográfica entre la prevalencia de *H. pylori* y la incidencia de CG subraya su vínculo etiológico, y los programas de erradicación poblacional de *H. pylori* están siendo considerados o implementados en países de alto riesgo para reducir la carga futura de CG (11,17).

Su papel en la carcinogénesis gástrica está mediado por la infección crónica de la mucosa gástrica, lo que conduce a una secuencia de cambios histopatológicos conocida como la cascada de Correa: la gastritis crónica activa progresa hacia la gastritis atrófica, luego a metaplasia intestinal, displasia y, finalmente, adenocarcinoma. El riesgo es especialmente elevado con cepas de *H. pylori* que expresan la proteína asociada al gen de citotoxina A (CagA), que se inyecta en las células epiteliales gástricas a través de un sistema de secreción tipo IV, provocando alteraciones en la señalización celular, aumento de la inflamación y promoción de vías oncogénicas como NF- κ B, STAT3 y Wnt/ β -catenina. Otros factores de virulencia, incluyendo *vacA*, *babA* y *sabA*, modulan aún más las interacciones entre huésped y patógeno y la evasión inmunitaria, contribuyendo a la inflamación persistente y daño de la mucosa (8,18–21).

La susceptibilidad genética del huésped, como los polimorfismos en genes de citoquinas (por ejemplo, IL-1 β), y los factores ambientales (como una dieta alta en sal y la deficiencia de hierro) pueden amplificar el potencial carcinogénico de la infección por *H. pylori* (8,22). La infección crónica por *H. pylori* induce estrés oxidativo, daño en el ácido desoxirribonucleico (ADN) y desregulación de los mecanismos de reparación del ADN, fomentando la inestabilidad genómica y la transformación neoplásica (8,19–23).

Estudios epidemiológicos demuestran que la infección por *H. pylori* aumenta el riesgo de adenocarcinoma gástrico de 4 a 18 veces, especialmente en presencia de cepas CagA-positivas y gastritis atrófica crónica (24,25). La erradicación de *H. pylori* ha demostrado reducir la incidencia de CG, lo que refuerza su papel central en la etiología (8,12). A pesar de su alta prevalencia, sólo una minoría de los individuos infectados desarrollan cáncer, lo que subraya la importancia de otros factores del huésped y ambientales en la modulación del riesgo (20–22).

1.2.2 Factores ambientales, dietéticos y estilos de vida

La dieta, el consumo de alcohol, de tabaco y el estilo de vida sedentario son factores de riesgo modificables bien establecidos que aumentan de manera independiente y sinérgica el riesgo de desarrollar CG, particularmente en el contexto de la infección por *H. pylori*. Una alta ingesta de sal, carnes procesadas y alimentos conservados altera la barrera mucosa gástrica, promueve la colonización de *H. pylori* y contribuye directamente a la inflamación y carcinogénesis de la mucosa (26); por el contrario, la dieta rica en frutas, verduras y granos integrales son protectoras.

El tabaquismo incrementa el riesgo de CG mediante mecanismos como la activación de los receptores nicotínicos de acetilcolina y la inducción de inflamación crónica, con un aumento del riesgo observado independientemente del estado de *H. pylori*. El Stomach Cancer Pooling Project, que incluyó a 10 290 pacientes con CG y 26 145 controles, mostró que, en comparación con los no fumadores, el odds ratio (OR) de los fumadores actuales es de 1,25 (IC del 95 %, 1,11–1,40), y el OR de los individuos con antecedentes de tabaquismo de más de 40 años fue de 1,33 (IC 95 %, 1,14–1,54) (27).

El consumo excesivo de alcohol (generalmente definido como más de cuatro bebidas por día o más de 42 gramos diarios) se asocia con un mayor riesgo de CG, especialmente del tipo intestinal. Además, este consumo puede actuar de forma sinérgica con la infección por *H. pylori* y una ingesta elevada de sal, incrementando aún más el riesgo (28). Diversos metaanálisis han confirmado esta asociación. Por ejemplo, en una muestra de 19 302 personas incluidas en diez estudios, se observó una razón de posibilidades de 1,39 (intervalo de confianza (IC) del 95 %, 1,20–1,61). En otro análisis, realizado con 5 886 792 participantes de veintitrés estudios, el riesgo proporcional fue de 1,17 (IC del 95 %, 1,00–1,34) (27,29,30).

El estilo de vida sedentario, a menudo reflejado en un aumento del perímetro de la cintura y obesidad, está relacionado con un mayor riesgo de CG y de la UGE, y es un componente del índice de estilo de vida poco saludable que se correlaciona con una mayor incidencia de CG (9,28,31,32).

Es importante destacar que análisis combinados demuestran que estos factores de estilo de vida pueden interactuar con la infección por *H. pylori* de manera más que aditiva, lo que significa que el efecto combinado de, por ejemplo, una alta ingesta de sal o un uso excesivo de alcohol con la infección por *H. pylori* es mayor que la suma de sus riesgos individuales. Por lo tanto, las estrategias preventivas integrales que se centran en la erradicación de *H. pylori* y la modificación del estilo de vida —cese del tabaquismo, moderación del consumo de alcohol, mejora de la dieta y aumento de la actividad física— probablemente tengan un impacto sustancial en la reducción de la carga del CG (9,31).

1.3 Diagnóstico y clínica del cáncer gástrico

El diagnóstico del CG y de la UGE se basa en una combinación de sospecha clínica, evaluación endoscópica, histopatología e investigaciones de estadificación.

Las características clínicas son a menudo inespecíficas e incluyen dispepsia, pérdida de peso, saciedad temprana, anemia, disfagia (más común en tumores de la UGE) y, en casos avanzados, masa palpable. Los cánceres de la UGE son más propensos a presentarse con disfagia y están asociados con factores de riesgo como la obesidad y la enfermedad por reflujo gastroesofágico, mientras que el CG está más estrechamente vinculado con la infección por *H. pylori*, factores dietéticos y antecedentes familiares (3,33–35).

El diagnóstico comienza con una endoscopia superior de alta definición, que permite la visualización directa y la biopsia dirigida de lesiones sospechosas. La Asociación Americana de Gastroenterología recomienda protocolos sistemáticos de biopsia (por ejemplo, el Sistema de Sídney actualizado) para condiciones premalignas sospechosas, con al menos cinco biopsias del antro/incisura y del cuerpo, y muestreo separado de cualquier lesión visible. La endoscopia mejorada por imagen (por ejemplo, imagen de banda estrecha) mejora la detección de neoplasias tempranas y metaplasia intestinal (36). Es necesaria la confirmación histopatológica, que permite clasificar la neoplasia como tipo intestinal o difuso según la clasificación de Lauren, además de evaluar la presencia de displasia o carcinoma. Para los tumores localizados en la unión gastroesofágica,

la clasificación de Siewert (tipos I–III) orienta tanto el abordaje clínico como la planificación quirúrgica (37,38).

La estadificación implica tomografía computarizada (TC) con contraste del tórax y abdomen, ultrasonido endoscópico (EUS) para la evaluación loco regional, y en ciertos casos estudio complementario con Tomografía por Emisión de Positrones (PET) para evaluar metástasis a distancia. En ciertos casos, si existe sospecha clínica, se puede realizar una laparoscopia para detectar metástasis peritoneales ocultas en el CG (38,39).

La National Comprehensive Cancer Network (NCCN) recomienda evaluar HER2, PD-L1 (ligando de muerte programada 1) y la inestabilidad de microsatélites (MSI) en enfermedad avanzada o metastásica. Además, la caracterización molecular —como la propuesta por *The Cancer Genome Atlas (TCGA)*, que clasifica el CG en subtipos VEB positivo, MSI, genómicamente estable e inestabilidad cromosómica— adquiere creciente relevancia para el pronóstico y la selección terapéutica (40,41).

En resumen, el diagnóstico y la caracterización de los CG y de la UGE requieren un enfoque multidisciplinario que integre datos clínicos, endoscópicos, histopatológicos y moleculares, según lo recomendado por las guías internacionales.

1.3.1 Anatomía patológica del cáncer gástrico

El adenocarcinoma representa más del 95% de los casos de CG y la gran mayoría de los cánceres de la UGE según las guías de la Red Nacional Integral del Cáncer y estudios epidemiológicos de gran escala. El carcinoma de células escamosas es extremadamente raro, representando menos del 1% de los casos en estas ubicaciones (37,42). Los tumores neuroendocrinos (TNE) comprenden aproximadamente un 6–7% de las neoplasias malignas gástricas y menos del 1% de los cánceres de la UGE. Otros tipos menos comunes incluyen los tumores del estroma gastrointestinal (GIST) y los linfomas, cada uno representando aproximadamente un 5–7% y un 6–7% de los CG, respectivamente, con frecuencias aún más bajas en la UGE (37,42,43).

La confirmación histopatológica es esencial para diagnosticar el adenocarcinoma y subclasificarlo en los tipos intestinal o difuso según la clasificación de Lauren (37).

El sistema de clasificación de Lauren es el método más utilizado para la clasificación histopatológica del CG y se aplica también a los adenocarcinomas de la UGE. Este

sistema divide los adenocarcinomas gástricos en tipos intestinal, difuso y mixto, basándose en la morfología microscópica.

Los tumores de tipo intestinal se caracterizan por la presencia de estructuras glandulares o tubulares que recuerdan al epitelio intestinal. A menudo están asociados con gastritis crónica, metaplasia intestinal y factores de riesgo ambientales. Estos tumores tienden a aparecer en pacientes de edad avanzada, son más comunes en hombres y generalmente se presentan como lesiones en forma de masa. El tipo intestinal se vincula con una progresión escalonada desde la gastritis atrófica hasta la displasia y el carcinoma, y generalmente tiene un mejor pronóstico que el tipo difuso (44–47).

Los tumores de tipo difuso carecen de formación glandular y están compuestos por células poco cohesivas, a menudo con morfología en anillo de sello. Infiltran la pared gástrica de manera difusa, conduciendo a la linitis plástica. El tipo difuso es más común en pacientes jóvenes y en mujeres, está menos asociado con factores ambientales y presenta un peor pronóstico debido a su comportamiento agresivo y tendencia a la diseminación peritoneal (45,47).

Los tumores de tipo mixto muestran características de ambos tipos, intestinal y difuso. La clasificación de Lauren (tabla 1) se reporta rutinariamente en los análisis patológicos de los CG y de la UGE, ya que proporciona información pronóstica y puede influir en las decisiones quirúrgicas y terapéuticas (45,48,49). Esta se determina tanto en biopsias como en muestras de resección, aunque pueden ocurrir discrepancias, especialmente en biopsias pequeñas. La subclasificación precisa es importante para el pronóstico y puede integrarse con clasificaciones moleculares y anatómicas para una gestión integral del paciente (48,49).

Además, se debe evaluar el grado del tumor, la profundidad de la invasión, la invasión linfovascular y el estado de los márgenes quirúrgicos (37,50). En el caso de los tumores de la UGE, es necesaria la clasificación de Siewert y la documentación precisa de la ubicación del tumor en relación con la UGE.

El estado de los ganglios linfáticos y el número de ganglios examinados deben ser reportados en las muestras de resección. Estos elementos son esenciales para la

estadificación y planificación del tratamiento, conforme a las recomendaciones de la NCCN (37,40).

Características	Tipo Intestinal	Tipo Difuso	Tipo Mixto
Morfología	Glándulas bien formadas, patrón tubular	Células dispersas, sin formación glandular	Áreas con glándulas y células dispersas; combinación de ambos patrones
Epidemiología	Más frecuente en hombres y ancianos	Más frecuente en mujeres y jóvenes	Sin predominio claro; distribución intermedia
Asociación ambiental	Relación con gastritis crónica, <i>H. pylori</i> , dieta	Menor asociación ambiental, más factores genéticos	Asociaciones ambientales y genéticas presentes; heterogéneo
Localización	Predomina en antro y curvatura menor	Más frecuente en todo el estómago, incluso cardias	Puede presentarse en cualquier localización gástrica
Carcinogénesis	Secuencia: gastritis → metaplasia → displasia → cáncer	Sin lesiones precursoras claras	Combinación de vías de carcinogénesis intestinal y difusa
Comportamiento biológico	Crecimiento expansivo, metástasis hematógena	Crecimiento infiltrativo, diseminación peritoneal	Mayor agresividad, frecuente invasión linfovascular y ganglionar
Pronóstico	Mejor pronóstico	Peor pronóstico	Intermedio o similar al difuso; mayor riesgo de

			metástasis ganglionar
Implicancias terapéuticas	Responde mejor a quimioterapia	Menor respuesta a quimioterapia	Manejo quirúrgico preferente; respuesta variable a quimioterapia

Tabla 1. Características clínicas, morfológicas y terapéuticas de los subtipos de la clasificación de Lauren en cáncer gástrico. Adaptada de referencias 45,48,49.

1.4 Tratamiento sistémico del cáncer gástrico avanzado.

El tratamiento del CG y de la UGE HER2+ ha experimentado una transformación significativa en los últimos años, impulsada por la incorporación de terapias dirigidas y, más recientemente, de combinaciones con inmunoterapia y quimioterapia. La Tabla 2 presenta una línea de tiempo detallada que resume los hitos más relevantes, incluyendo descubrimientos biológicos, ensayos clínicos clave y aprobaciones regulatorias que han definido el abordaje terapéutico actual.

1.4.1 Evolución de la quimioterapia: el punto de partida

La quimioterapia, desarrollada a mediados del siglo XX, constituyó el primer abordaje sistémico para el tratamiento del CG/UGE. Basada en agentes citotóxicos que actúan sobre células de rápida división, incluida la población tumoral, su falta de selectividad se tradujo en toxicidad significativa y respuestas heterogéneas. En CG, incluido el subtipo HER2+, fármacos como cisplatino y fluoropirimidinas (5-fluorouracilo, capecitabina, S-1) fueron durante décadas la base del tratamiento. No obstante, su impacto en la SG es limitado, especialmente en enfermedad avanzada, lo que evidenció la necesidad de estrategias más específicas (51).

Actualmente, la quimioterapia continúa siendo un pilar fundamental en la primera línea del CG avanzado HER2+, administrada en combinación con trastuzumab y, más

recientemente, integrada en esquemas triples junto con inmunoterapia, como se abordará en secciones posteriores.

Las guías internacionales recomiendan la asociación de quimioterapia con trastuzumab como tratamiento inicial, sustentada en los resultados del ensayo ToGA (52), que demostró que añadir trastuzumab a cisplatino y una fluoropirimidina mejora la SG y la calidad de vida frente a quimioterapia sola. En la práctica clínica, se emplean esquemas basados en platino (cisplatino u oxaliplatino) y fluoropirimidinas, ajustando dosis según estado funcional y patrones regionales.

Otros agentes citotóxicos, incluyendo fluoropirimidinas, platino, taxanos e irinotecan, son una pieza clave en el tratamiento del CG avanzado. Generalmente, las fluoropirimidinas (fluorouracilo, capecitabina y S-1) combinadas con platino se utilizan como base de la terapia de primera línea (53). Para los pacientes que no son aptos para quimioterapia intensiva (debido a edad avanzada o mal estado funcional), el ensayo de fase III GO2 demostró que una dosis modificada de quimioterapia de dos fármacos (60% de la dosis completa) proporcionaba mejor tolerancia sin comprometer el resultado clínico (54).

Paclitaxel, docetaxel e irinotecan son comúnmente utilizados en segunda línea o posteriores tras la progresión a tratamientos anti-HER2. En el ensayo clínico de fase III ABSOLUTE realizado en Japón, el uso semanal de paclitaxel albúmina (nab-paclitaxel) no fue inferior al paclitaxel semanal en términos de SG (55). En el tratamiento de tercera línea, el trifluoridina-tipiracilo (TAS-102), un agente citotóxico oral, ha demostrado en el ensayo de fase III TAGS mejorar la SG en comparación con el placebo (5,7 vs. 3,6 meses, HR 0,69, IC 95% 0,56–0,85) (56).

En este contexto, el papel de la quimioterapia en el CG avanzado HER2+ va más allá del tratamiento de primera línea y continúa siendo fundamental a lo largo de múltiples líneas terapéuticas (57–62).

1.4.2 Introducción de anticuerpos monoclonales: la revolución de las terapias dirigidas

Con el avance de la biología molecular en los años 80 y 90, se identificaron dianas terapéuticas específicas en la superficie de las células tumorales, entre las que destaca HER2 tras su reconocimiento como oncogén amplificado en cáncer de mama y CG. El

desarrollo de anticuerpos monoclonales, como trastuzumab, marcó una nueva era en oncología. Trastuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido al dominio extracelular 4 de HER2, se estableció como tratamiento de primera línea para el CG avanzado HER2+, en combinación con quimioterapia. Esta estrategia logró un aumento en la SG (mediana de 13,8 meses frente a 11,1 meses con quimioterapia sola) y en la SLP (mediana de 6,7 meses frente a 5,5 meses), además de una mayor tasa de respuesta objetiva (TRO) (47,3% frente a 34,5%; $p = 0,0017$). El beneficio fue especialmente marcado en pacientes con alta expresión de HER2 (IHQ 3+) (52,63). Los eventos adversos fueron comparables entre los grupos, sin un aumento significativo en la toxicidad de grado 3–4 atribuible a trastuzumab (52). No obstante, se recomienda la monitorización cardíaca debido al pequeño, pero relevante, riesgo de cardiotoxicidad.

El ensayo ToGA fue diseñado para detectar diferencias en la SG; el hazard ratio (HR) observado de 0,74 se traduce en una reducción del 26% en el riesgo de muerte con la adición de trastuzumab. Sobre la base de estos resultados, las guías internacionales recomiendan trastuzumab en combinación con quimioterapia como el régimen estándar de primera línea para el CG avanzado HER2+ (37,64).

Adicionalmente, el ensayo EVIDENCE ha demostrado que combinar trastuzumab de primera línea con quimioterapia se asoció con mejores resultados clínicos en pacientes chinos con CG metastásico HER2+, proporcionando evidencia adicional (65).

Sin embargo, los intentos subsecuentes de terapia dirigida a HER2 en CG avanzado no fueron tan exitosos como se esperaba. Aunque pertuzumab (66), trastuzumab emtansina (T-DM1) (67), y lapatinib (68,69) fueron investigados en varios ensayos de primera y segunda línea, no se observó mejora en la supervivencia en ninguno de estos ensayos. Además, el uso de trastuzumab más allá de la progresión tampoco mostró un beneficio en la supervivencia en pacientes con CG HER2+ pretratados en el ensayo T-ACT (70).

Recientemente, trastuzumab deruxtecan ha mostrado beneficios clínicos significativos en pacientes con CG avanzado HER2+, como se demuestra en ensayos clínicos de fase II y III. En el estudio DESTINY-Gastric01, realizado en pacientes en tercera línea o líneas subsiguientes de tratamiento, la TRO con trastuzumab deruxtecan fue del 51%, en comparación con el 14% observado con la quimioterapia estándar ($p < 0,001$). La mediana de SG alcanzó los 12,5 meses en el grupo tratado con trastuzumab deruxtecan frente a 8,4

meses en el grupo control (HR 0,59; IC 95%: 0,39–0,88; p=0,01). De forma paralela, la mediana de SLP fue de 5,6 meses para trastuzumab deruxtecan versus 3,5 meses para la quimioterapia, y la duración mediana de la respuesta fue de 11,3 meses frente a 3,9 meses, respectivamente (71).

En segunda línea, el ensayo fase III DESTINY-Gastric04 confirmó la eficacia de trastuzumab deruxtecan, mostrando una mediana de SG de 14,7 meses, comparada con 11,4 meses para la combinación de ramucirumab y paclitaxel (HR 0,70; IC 95%: 0,55–0,90; p=0,004). Asimismo, la TRO confirmada fue superior con trastuzumab deruxtecan (44,3%) en relación con ramucirumab-paclitaxel (29,1%), y la SLP también favoreció al grupo de tratamiento dirigido (HR 0,74; IC 95%: 0,59–0,92) (62).

En cuanto a la seguridad, el perfil de toxicidad de trastuzumab deruxtecan incluye, principalmente, neutropenia de grado ≥ 3 (51%), anemia (38%) y enfermedad pulmonar intersticial o neumonitis (13,9%, en su mayoría de grado 1–2), lo que obliga a una monitorización pulmonar estrecha durante el tratamiento. La dosis recomendada en los ensayos fue de 6,4 mg/kg cada tres semanas. Basándose en estos resultados, trastuzumab deruxtecan ha sido aprobado por la FDA (Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés) para CG avanzado HER2+ tras progresión a trastuzumab (62). En la Tabla 3 se resumen los estudios relevantes sobre terapia anti HER2 y en la tabla 4 se describen nuevos ensayos clínicos relevantes para esta población de pacientes.

Actualmente, se están investigando varios agentes innovadores dirigidos a HER2 para el tratamiento del CG avanzado: anticuerpos monoclonales como margetuximab; anticuerpos biespecíficos como ZW25 y KN026; anticuerpos conjugados como trastuzumab deruxtecan, disitamab vedotin y ARX788; inhibidores de la tirosina quinasa como tucatinib; y otros enfoques terapéuticos novedosos con resultados prometedores (72).

La evolución de las terapias en CG y de la UGE, particularmente en tumores HER2+, ha avanzado desde la quimioterapia no específica hacia tratamientos dirigidos e inmunoterapia. A pesar del éxito inicial con trastuzumab, los intentos por ampliar las opciones terapéuticas han enfrentado retos significativos, como la heterogeneidad tumoral y la resistencia adquirida. Sin embargo, los avances recientes en anticuerpos biespecíficos, anticuerpos conjugados, ofrecen una perspectiva alentadora para el futuro. La integración de biomarcadores más precisos y combinaciones terapéuticas innovadoras

será clave para mejorar los resultados clínicos en esta población de pacientes y la investigación nos ayudará a abordar las necesidades no cubiertas en el tratamiento del CG avanzado HER2+.

Año	Evento relevante en cáncer gástrico
1950s	Introducción de la quimioterapia como tratamiento sistémico para tumores sólidos, incluyendo el cáncer gástrico.
1981	Identificación del oncogén <i>neu</i> en modelos animales, precursor del receptor HER2 (Schechter AL, et al. <i>Nature</i> . 1984).
1985	Descubrimiento del gen humano HER2 (<i>ERBB2</i>), un receptor tirosina quinasa implicado en la regulación del crecimiento celular (Coussens L, et al. <i>Science</i> . 1985).
1987	Asociación de la amplificación del gen HER2 con un peor pronóstico en cáncer de mama (Slamon DJ, et al. <i>Science</i> . 1987).
1998	Aprobación de trastuzumab (Herceptin), el primer anticuerpo monoclonal dirigido a HER2, para cáncer de mama HER2+.
2010	Ensayo ToGA: Trastuzumab combinado con quimioterapia es aprobado como estándar de tratamiento para CG/UGE HER2+ avanzado, mejorando la supervivencia global (Bang YJ, et al. <i>Lancet</i> . 2010).
2014	Ensayo TyTAN: Lapatinib más paclitaxel no mejora la supervivencia global frente a paclitaxel solo en CG HER2+ en segunda línea (Satoh T, et al. <i>J Clin Oncol</i> . 2014).
2018	Ensayo JACOB: Pertuzumab más trastuzumab y quimioterapia no demuestra mejora significativa en supervivencia global frente a trastuzumab y quimioterapia estándar en CG HER2+ (Taberero J, et al. <i>Lancet Oncol</i> . 2018).
2020	Ensayo DESTINY-Gastric01: Trastuzumab deruxtecan (T-DXd) mejora significativamente la supervivencia global y la tasa de respuesta en CG HER2+ refractario (Shitara K, et al. <i>N Engl J Med</i> . 2020).
2021	Ensayo DESTINY-Gastric02: Trastuzumab deruxtecan (T-DXd) mejora significativamente la supervivencia global y la tasa de respuesta en CG HER2+ en progresión a primera línea y recibe aprobación en segunda línea (Van Cutsem E, et al. <i>The Lancet. Oncology</i> . 2023;24(7):744-756.).
2023	Investigación en curso sobre nuevas estrategias, como anticuerpos biespecíficos (ZW25, KN026) y conjugados anticuerpo-fármaco (Disitamab vedotin, ARX788), para superar la resistencia a trastuzumab.
2024	Ensayo KEYNOTE-811: Aprobación de Trastuzumab + Pembrolizumab + Quimioterapia en primera línea para CG avanzado HER2+, tras demostrar mejoría en la supervivencia libre de progresión frente a trastuzumab + quimioterapia (Janjigian YY, et al. <i>Nature</i> . 2021;600(7890):727-730.).

Tabla 2. Evolución en el tratamiento sistémico del cáncer gástrico avanzado. Fuente: elaboración propia.

Nombre del Estudio	Año	Terapia Evaluada	Indicaciones	Resultados Clave	Referencia
ToGA	2010	Trastuzumab + quimioterapia	CG/UGE avanzado HER2+	Incremento en la supervivencia global (13,8 vs. 11,1 meses) en pacientes HER2+	Bang YJ, et al. Lancet. 2010
TyTAN	2014	Lapatinib + paclitaxel	CG HER2+ en segunda línea	No mejora en la supervivencia global frente a paclitaxel solo (8,8 vs. 8,1 meses).	Satoh T, et al. J Clin Oncol. 2014
LOGiC	2016	Lapatinib + capecitabina y oxaliplatino	CG HER2+	No mejora en la supervivencia global frente a quimioterapia estándar (12,2 vs. 10,5 meses).	Hecht JR, et al. J Clin Oncol. 2016
GATSBY	2017	Trastuzumab emtansina (T- DM1)	CG/UGE avanzado HER2+	No mejora en la supervivencia global frente a taxanos en segunda línea (7,9 vs. 8,6 meses).	Thuss-Patience PC, et al. Lancet Oncol. 2017
JACOB	2018	Pertuzumab + trastuzumab + quimioterapia	CG/UGE avanzado HER2+	No mejora significativa en supervivencia global frente a trastuzumab + quimioterapia (14,2 vs. 13,8 meses).	Tabernero J, et al. Lancet Oncol. 2018
DESTINY-Gastric01	2020	Trastuzumab deruxtecan (T- DXd)	CG HER2+ refractario	Mejora significativa en supervivencia global (12,5 vs. 8,4 meses) y tasa	Shitara K, et al. N Engl J Med. 2020

				de respuesta global (51% vs. 14%).	
T-ACT	2020	Trastuzumab más allá de la progresión	CG HER2+ avanzado	No se observaron beneficios en supervivencia global frente a quimioterapia estándar.	Makiyama A, et al. <i>J Clin Oncol</i> . 2020
DESTINY-Gastric02	2022	Trastuzumab deruxtecan (T-DXd)	CG/UGE HER2+ ($\geq 2^a$ línea)	Tasa de respuesta ~40–45%; SG media ~12,1 meses	Van Cutsem E, et al. <i>Nat Med</i> 2023
KEYNOTE-811	2024	Pembrolizumab + trastuzumab + quimioterapia	CG/UGE HER2+ (1 ^a línea)	Mayor tasa de respuesta (72,6% vs. 60,1% con terapia estándar). La SG fue mayor con pembrolizumab combinado con tratamiento estándar (mediana de 20 vs 16,8 meses; IC del 95%: 0,67-0,94;p=0,0040).	Janjigian YY, N Engl J Med 2024

Tabla 3. Principales estudios sobre terapias anti-HER2 en cáncer gástrico avanzado HER2 positivo. Fuente: elaboración propia.

Agente/Ensayo	Tipo de Terapia	Fase Más Avanzada	Indicación	Resultados	Estado / Aprobación	Referencias
Zanidatamab (ZW25)	Anticuerpo biespecífico o anti-HER2	II/III	HER2+ avanzado	Tasas de respuesta prometedoras en combinación con quimioterapia	En investigación	Zanidatamab in HER2+ Gastric Cancer, Clin Cancer Res, 2021
KN026	Anticuerpo biespecífico o anti-HER2	II/III	HER2+ avanzado, refractario	Alta eficacia en combinación con quimioterapia en pacientes refractarios	En investigación	KN026 Bispecific Antibody Study, J Clin Oncol, 2022
Trastuzumab deruxtecan (DS-8201, DESTINY-Gastric 01, 03 y 04)	ADC (Anticuerpo conjugado) anti-HER2	III	HER2+ avanzado/refractario, 2ª/3ª línea	Alta supervivencia global y tasa de respuesta en estudios DESTINY-Gastric	FDA 2ª línea, aprobado internacional	Trastuzumab Deruxtecan in Advanced HER2+ Gastric Cancer, N Engl J Med, 2020 & 2025
Disitamab vedotin (RC48-ADC)	ADC anti-HER2	II/III	HER2+ avanzado, refractario	Respuestas robustas en pacientes con progresión tras trastuzumab	En investigación	Disitamab Vedotin and ADCs in Gastric Cancer, J Clin Oncol, 2021; Int J Mol Sci, 2025
ALX148	ADC anti-HER2	II	HER2+ refractario	Actividad antitumoral prometedoras según	En investigación	ASPEN 06 Study, ASCO Gastrointestinal Cancer

				estudios en curso		Symposium 2025
Tucatinib	TKI (Inhibidor de tirosina quinasa) anti-HER2	II/III	HER2+ avanzado, refractario	Se evalúa combinado con trastuzumab y quimioterapia en líneas avanzadas	En investigación	Tucatinib for HER2+ Gastric Cancer, J Clin Oncol, 2023
Patritumab deruxtecan (HER3-DXd)	ADC anti-HER3	I/II	HER2+/HER3 activado	Resultados iniciales prometedores en tumores con expresión elevada de HER3	En investigación	HER3-DXd Activity in Gastric Cancer, J Clin Oncol, 2022
CAR-T (Células T con receptor de antígeno quimérico) anti-HER2	Terapia celular dirigida anti-HER2	I/II	HER2+ avanzado	Seguridad y actividad preliminar; en fase experimental	Experimental	Fighting HER2 in Gastric Cancer: Current Approaches..., Int J Mol Sci, 2025
Vacunas anti-HER2	Inmunoterapia específica anti-HER2	I/II	HER2+ avanzado	Resultados preliminares; en desarrollo	Experimental	Fighting HER2 in Gastric Cancer: Current Approaches..., Int J Mol Sci, 2025

Tabla 4. Terapias Emergentes: Ensayos Clínicos recientes y nuevos agentes innovadores en cáncer gástrico avanzado HER2 positivo. Fuente: elaboración propia.

1.4.3 Inmunoterapia en cáncer gástrico avanzado HER2+

La inmunoterapia, basada en la activación del sistema inmunológico contra las células tumorales, ha revolucionado el manejo del cáncer avanzado, incluido el CG HER2+. Aunque los inhibidores de puntos de control inmunitario (como los inhibidores de PD-1/PD-L1) no se dirigen directamente a HER2, se han explorado con éxito en combinación con terapias anti-HER2 y quimioterapia para potenciar la respuesta antitumoral (61).

Actualmente, la inmunoterapia se recomienda como parte del tratamiento de primera línea para el CG y de la UGE avanzado o metastásico HER2+, integrada con terapia dirigida contra HER2 y quimioterapia. La ASCO recomienda la combinación de trastuzumab, pembrolizumab y quimioterapia basada en fluoropirimidina y oxaliplatino para pacientes con CG HER2+ irresecable o metastásico, no tratados previamente, basándose en los resultados interinos del estudio KEYNOTE-811 que demostró un aumento significativo en la TRO sin incremento en la toxicidad en comparación con trastuzumab y quimioterapia solos (61,64). La justificación para esta recomendación es el efecto sinérgico observado entre la terapia dirigida contra HER2 y la inhibición de puntos de control inmunitario, lo cual potencia la actividad antitumoral. La guía señala que la mayoría de los pacientes en el ensayo KEYNOTE-811 presentaban un Combined Positive Score (CPS) de PD-L1 ≥ 1 , pero el beneficio fue independiente del estado de PD-L1 (64).

En la actualidad, la combinación de trastuzumab con quimioterapia, con o sin inmunoterapia, constituye el estándar terapéutico de primera línea en pacientes con CG avanzado HER2+. La complejidad biológica del CG HER2+, junto con los mecanismos de resistencia adquirida, continúa representando un desafío clínico significativo. A pesar de la disponibilidad de nuevas generaciones de agentes dirigidos a HER2 —incluidos conjugados anticuerpo-fármaco (ADC), inhibidores de tirosina quinasa y anticuerpos biespecíficos, la selección óptima y secuencial de estas estrategias sigue siendo un área prioritaria de investigación. La identificación de biomarcadores predictivos de respuesta, así como la caracterización de toxicidades asociadas a cada régimen, son elementos esenciales para avanzar hacia una medicina personalizada y precisa (73).

Cabe destacar que, debido a la marcada heterogeneidad en la expresión de HER2, es imperativo evaluar el estatus HER2 en el tejido tumoral en el momento de la progresión, mediante la obtención de nuevas muestras de biopsia, incluso de lesiones metastásicas.

Finalmente, la resistencia a terapias anti-HER2 constituye un proceso multifactorial que involucra alteraciones genómicas, reprogramación de vías de señalización y modificaciones en el microambiente inmunológico tumoral. Se prevé que el desarrollo e implementación de tecnologías avanzadas de caracterización molecular permitan dilucidar los mecanismos específicos responsables de la resistencia y faciliten la generación de estrategias terapéuticas innovadoras orientadas a mejorar los resultados en pacientes con CG avanzado HER2+.

1.5 Biomarcadores de interés en cáncer gástrico

Los biomarcadores recomendados para la caracterización molecular al momento del diagnóstico de CG avanzado según las guías clínicas internacionales y la práctica estándar actual incluyen: HER2, MSI o deficiencia de proteínas de reparación de desajustes (dMMR), PD-L1 mediante CPS y, más recientemente, Claudina 18.2 (CLDN18.2) y expresión del receptor 2b del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR2b). El análisis de estos marcadores permite personalizar el tratamiento de los pacientes con diferentes terapias dirigidas o inmunoterapia en primera línea y líneas subsecuentes; su determinación debe realizarse en tejido tumoral del tumor primario o de las metástasis al diagnóstico de enfermedad avanzada o metastásica (74–77).

A continuación, se detallan:

- **HER2:** Todos los pacientes con adenocarcinoma gástrico o de la UGE avanzado o metastásico deben someterse a pruebas de HER2 mediante IHQ, con ISH para casos equívocos (IHQ 2+). La positividad de HER2 identifica candidatos para la terapia anti-HER2 (37,74,77,78). La positividad del receptor HER2 es el primer biomarcador descrito asociado con respuesta a la terapia anti HER2 como trastuzumab como se estableció en el ensayo clínico ToGA en primera línea de tratamiento (52). Además, la señalización de HER2 puede influir en la activación de células inmunes en los tumores, y trastuzumab aumenta la expresión de PD-1 y PD-L1, mejorando la eficacia de los inhibidores de HER2 cuando se combinan con anticuerpos anti-PD-1(79).
- **Proteínas de reparación de desajustes (MMR) e inestabilidad de microsatélites (MSI):** Se recomienda realizar la prueba universal para detectar dMMR mediante IHQ para MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2, o evaluar la MSI a través de reacción

en cadena de la polimerasa (PCR) o secuenciación de nueva generación (NGS). El estado de alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H) o dMMR, puede asociarse al síndrome de Lynch y predice beneficio al tratamiento con inhibidores de puntos de control inmunitario (37,74,77). El subtipo de tumor con MSI-H es uno de los cuatro subtipos de CG según el TCGA (80). La incidencia de MSI-H en CG varía entre 8 y 25%, siendo menor en enfermedad metastásica (72). Los tumores con estatus MSI-H o con dMMR presentan acumulación de mutaciones que pueden ser objetivos para las células inmunitarias, incrementando la eficacia de la inmunoterapia (81) independientemente de la línea de terapia (82).

- PD-L1: La expresión de PD-L1 debe evaluarse utilizando la puntuación de CPS mediante IHQ. El estado de PD-L1 se ha considerado un biomarcador predictivo para la respuesta a los inhibidores de puntos de control inmunológico y guía la selección de la inmunoterapia, especialmente en combinación con quimioterapia en primera línea (37,74,77).
- CLDN18.2 (claudina 18.2): Su expresión permite considerar el uso de anticuerpos dirigidos como zolbetuximab en primera línea, recientemente incorporado tras resultados positivos en ensayos fase III y aprobado en EE. UU. para esta indicación (77,83).
- Expresión del FGFR2b: FGFR2b es un biomarcador independiente que se sobreexpresa en 4–15 % de los cánceres gástricos y de la UGE, asociado a mayor agresividad tumoral y peor pronóstico. Su detección es fundamental para identificar pacientes que pueden beneficiarse de terapias dirigidas como bemarituzumab (84,85).

Otros biomarcadores de interés que pueden ayudar en la toma de decisiones terapéuticas son:

- Carga mutacional tumoral (TMB por sus siglas en inglés): Una TMB alta es poco frecuente en CG HER2+, pero cuando está presente, se asocia con mejor pronóstico y mayor respuesta a inmunoterapia, independientemente de otros biomarcadores como PD-L1 y linfocitos infiltrantes de tumores (TILs por sus

siglas en inglés). La TMB aporta valor predictivo adicional y su integración con otros marcadores puede mejorar la selección de pacientes candidatos a inmunoterapia (37,86,87).

- **Linfocitos Infiltrantes de Tumores (TILs):** Los TILs representan un componente clave del microambiente tumoral en el CG, incluyendo los subtipos HER2+. Niveles elevados de TILs, en particular de células T CD3+ y CD8+, se asocian con una mejor SG y SLP en pacientes con CG. La presencia de TILs refleja una respuesta inmunitaria antitumoral activa por parte del huésped, y se ha vinculado con características pronósticas favorables, tales como menor invasión tumoral, menor compromiso ganglionar y estadios más tempranos según la clasificación TNM (88–92). En el caso específico del CG HER2+, si bien los datos directos son limitados, la relevancia pronóstica general de los TILs en el CG sigue siendo aplicable. Una alta densidad de TILs puede indicar un microambiente tumoral más inmunogénico, lo cual podría potenciar la eficacia de la inmunoterapia, e incluso mejorar la respuesta a terapias dirigidas contra HER2. Adicionalmente, los TILs suelen estar asociados con la positividad para PD-L1, lo cual resulta relevante para la selección de pacientes en ensayos de inmunoterapia (88,89,91–93) .
- **Fusiones del gen NTRK:** Se recomienda la prueba de fusiones NTRK, ya que estas alteraciones raras son susceptibles de acción con inhibidores específicos (37,74).
- **Estado del VEB:** Los tumores VEB-positivos representan un subtipo molecular distinto y pueden tener implicaciones terapéuticas únicas, incluyendo alta expresión de PD-L1 y potencial sensibilidad a la inmunoterapia (94).

Las guías europeas y americanas recomiendan que, cuando hay abundante tejido tumoral, se puede utilizar un perfil genómico integral mediante NGS validada para evaluar estos biomarcadores (37).

1.5.1 Historia del descubrimiento del receptor HER2

HER2, también conocido como *ERBB2* o *c-erbB-2*, fue identificado por primera vez en la década de 1980 como un miembro de la familia ErbB de receptores de tirosina-quinasa, moléculas que presentan una homología estructural significativa con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). El potencial oncogénico de HER2 se evidenció inicialmente a partir de estudios realizados sobre el oncogén *neu* en ratas, el cual resultó ser homólogo a un gen humano posteriormente denominado HER2. Investigaciones subsiguientes demostraron que tanto la amplificación génica como la sobreexpresión de HER2 ocurren en un subconjunto de carcinomas mamarios humanos, fenómeno directamente asociado con un comportamiento tumoral más agresivo y un pronóstico desfavorable en comparación con otros subtipos de cáncer de mama (95–98).

A fines de los años 1980 y principios de los 1990, el uso de técnicas de IHQ y de análisis molecular permitió establecer de manera concluyente la sobreexpresión de HER2 como un biomarcador clínicamente relevante en cáncer de mama. Este hallazgo condujo a la definición de un subgrupo clínico distinto de pacientes con peor pronóstico y respuestas diferentes al tratamiento estándar (95,96). El reconocimiento de la importancia de HER2 como diana terapéutica impulsó el desarrollo de terapias dirigidas, destacándose la introducción del anticuerpo monoclonal trastuzumab a finales de la década de 1990.

Trastuzumab se consolidó como la primera terapia anti-HER2 que demostró un beneficio clínico significativo en pacientes con cáncer de mama HER2+, transformando el abordaje terapéutico de esta patología (99). Desde entonces, HER2 ha sido reconocido como un impulsor crítico no solo en cáncer de mama, sino también en otros tipos de neoplasias malignas, lo que ha propiciado importantes avances en el campo de la oncología personalizada, con el descubrimiento de nuevos agentes dirigidos contra este receptor (95,96,99).

1.5.2 Características del receptor HER2

HER2, es una glicoproteína transmembrana perteneciente a la familia de receptores EGFR. Esta familia consta de cuatro miembros: EGFR (HER1), HER2, HER3 y HER4, todos los cuales desempeñan un papel crucial en la regulación de procesos celulares fundamentales como la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. HER2 está

codificado por el gen *ERBB2*, localizado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q12-21), y carece de un ligando conocido, lo que lo hace único entre los receptores de su familia (98,100).

La Figura 2 presenta la estructura tridimensional predicha de la proteína HER2 (*ERBB2*) obtenida con AlphaFold y visualizada mediante el módulo Structure de Human Protein Atlas. El modelo exhibe la organización modular característica del receptor: un dominio extracelular compuesto por cuatro subdominios ricos en láminas beta (I–IV) que median la dimerización y el reconocimiento de epítomos terapéuticos, una hélice transmembrana única, y un dominio citoplásmico tirosina-quinasa bilobulado que alberga el bolsillo de unión a ATP y los motivos catalíticos conservados. La codificación por colores facilita distinguir áreas bien definidas del plegamiento frente a regiones flexibles o desordenadas, lo que aporta contexto para interpretar el impacto potencial de mutaciones sobre estabilidad, dimerización y señalización. En conjunto, esta representación estructural de HER2 sustenta la racionalidad terapéutica en el CG HER2+, al situar en su entorno tridimensional los sitios de unión de anticuerpos (por ejemplo, trastuzumab y pertuzumab) y las cavidades “drogables” del dominio cinasa, además de permitir el mapeo de variantes de significado clínico directamente sobre la estructura.

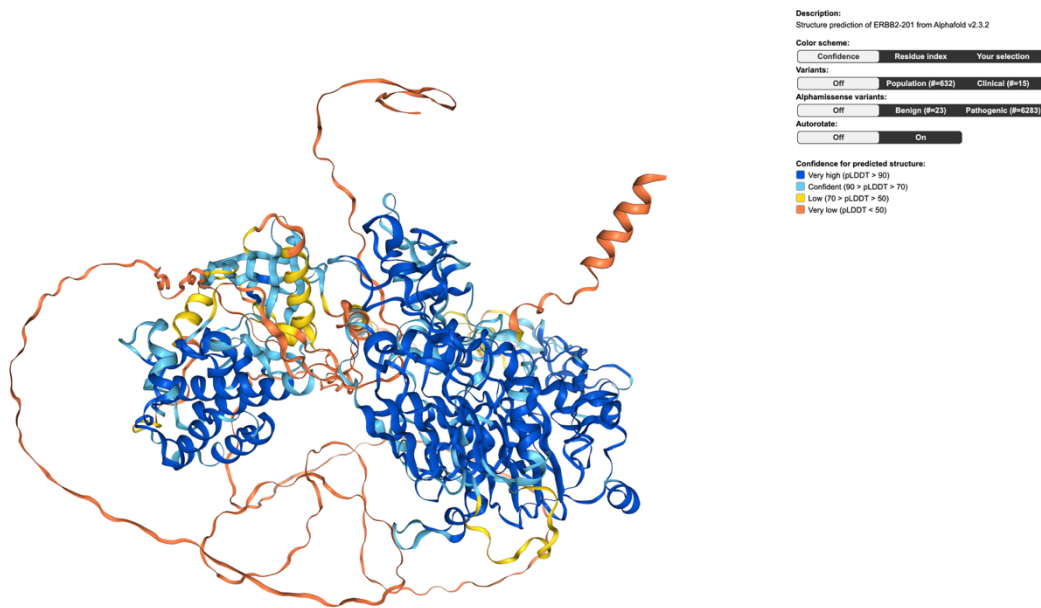


Figura 2. Estructura tridimensional predicha de HER2 obtenida del visor Structure de Human Protein Atlas (predicción AlphaFold v2). Accedido el 09-11-2025.

Desde el punto de vista estructural, HER2 consta de tres dominios principales (101):

1. Dominio extracelular: Responsable de la interacción con otros receptores de la familia ErbB, lo que facilita la formación de heterodímeros funcionales.
2. Dominio transmembrana: Proporciona anclaje en la membrana plasmática.
3. Dominio quinasa intracelular: Posee actividad tirosina quinasa, lo que permite la transmisión de señales hacia el núcleo y otras partes de la célula

HER2 funciona principalmente al formar heterodímeros con otros miembros de la familia, como HER3. Estos heterodímeros son particularmente potentes en la activación de vías de señalización intracelular, entre las que destacan PI3K/AKT/mTOR y RAS/RAF/MEK/ERK. Estas rutas están implicadas en procesos clave como la proliferación celular, la inhibición de la apoptosis, la angiogénesis y la invasión tumoral, lo que subraya la relevancia biológica de HER2 en la progresión del cáncer (102). En la figura 3 se muestra una representación esquemática de la familia HER, incluido el receptor HER2.

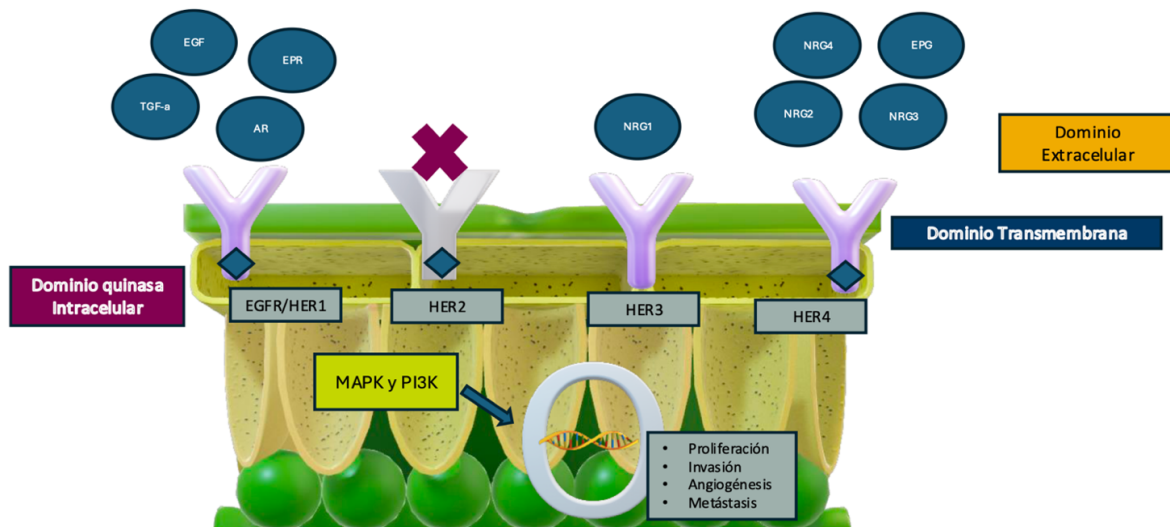


Figura 3. Representación esquemática de las características de los receptores de la familia HER. Todos los miembros de la familia HER tienen un ligando conocido (representado por círculos azules), excepto HER2 (indicado con una X). Todos poseen un dominio intracelular (representado por el rombo azul), a excepción de HER3. Fuente: elaboración propia.

1.5.3 Asociación del receptor HER2 con el cáncer de mama

El descubrimiento más significativo relacionado con HER2 ocurrió en 1987, cuando Dennis Slamon y su equipo demostraron que la amplificación del gen HER2 estaba presente en aproximadamente el 20-30% de los casos de cáncer de mama. Además, encontraron que esta amplificación estaba asociada con un comportamiento tumoral más agresivo, mayor riesgo de recaída y menor SG. Este estudio pionero estableció por primera vez una conexión directa entre la amplificación de HER2 y un pronóstico desfavorable en pacientes con cáncer (103). Los cánceres de mama con sobreexpresión de HER2 o HER2+, se asocian con un mayor riesgo de recurrencia y un pronóstico considerablemente más desfavorable en comparación con los subtipos HER2-negativos (97,99,104).

El estado de HER2 constituye un biomarcador fundamental, tanto para establecer el pronóstico de la enfermedad como para la toma de decisiones terapéuticas. La identificación de la sobreexpresión de HER2 o la amplificación del gen HER2 en tumores mamarios permite predecir la respuesta a terapias dirigidas contra HER2, como el

anticuerpo monoclonal trastuzumab y otros agentes anti-HER2, los cuales han revolucionado el manejo clínico y mejorado de manera significativa el pronóstico de las pacientes con enfermedad HER2+ (99,105). Cabe destacar que la positividad para HER2 se asocia con resistencia relativa a la terapia endocrina, sino también con una mayor sensibilidad a quimioterapia, como las antraciclinas (105,106). La asociación de HER2 con el cáncer de mama no solo transformó la comprensión del papel de los receptores tirosina quinasa en la oncogénesis, sino que también destacó la importancia de HER2 como un biomarcador pronóstico y potencialmente terapéutico. Este descubrimiento fue un catalizador para la investigación de HER2 en otros tipos de cáncer.

1.5.4 HER2 en otros tipos de cáncer

La amplificación de HER2 posee una relevancia clínica considerable en diversos tipos de cáncer más allá del cáncer de mama, donde actúa no solo como un impulsor oncogénico, sino también como un marcador pronóstico y un biomarcador predictivo de respuesta a terapias dirigidas. Entre las indicaciones más establecidas fuera del contexto mamario se encuentran los adenocarcinomas gástricos y de la UGE en los cuales la amplificación de HER2 se presenta en aproximadamente el 15 a 20% de los casos. En este escenario, la presencia de HER2 predice el beneficio clínico derivado del uso de terapias anti-HER2, como trastuzumab, tal como fue demostrado en el ensayo clínico ToGA (52).

En el caso del cáncer colorrectal, la amplificación de HER2 se observa en alrededor del 5% de los casos metastásicos, especialmente en tumores que no presentan alteraciones en los genes RAS o BRAF. En este contexto las terapias dirigidas contra HER2 han evidenciado un beneficio clínico significativo (107). Por su parte, el adenocarcinoma pulmonar exhibe amplificación de HER2 en una minoría de los casos (1–3%), condición que se asocia a un pronóstico desfavorable y que actualmente es objeto de investigación activa como posible diana terapéutica (108–111).

En las neoplasias ginecológicas, la amplificación de HER2 es más frecuente en el carcinoma seroso uterino (hasta un 13%), el carcinoma ovárico mucinoso (14%), y, en menor medida, en los cánceres de endometrio y cuello uterino, donde estudios en curso evalúan la eficacia de los agentes dirigidos contra HER2 en estos contextos. Otras neoplasias que presentan tasas bajas, pero clínicamente relevantes de amplificación de

HER2 incluyen el cáncer de vejiga, de vesícula biliar, el colangiocarcinoma extrahepático y el carcinoma endometrial (112–115).

La importancia clínica de la amplificación de HER2 en estos tipos tumorales radica no solo en su asociación con una biología tumoral más agresiva, sino en su papel como biomarcador predictivo de respuesta a terapias dirigidas contra HER2, las cuales están siendo progresivamente incorporadas en los esquemas terapéuticos de varios de estos tumores (97,116).

1.5.5 HER2 en cáncer gástrico y de la unión gastroesofágica

HER2 se encuentra amplificado en aproximadamente el 10–20% de los adenocarcinomas gástricos y de la UGE, con una mayor prevalencia en los tumores de tipo intestinal, bien o moderadamente diferenciados, y en los tumores proximales (117).

Desde el punto de vista biológico, HER2 contribuye a la progresión tumoral en el CG/UGE al activar múltiples vías de señalización. La activación de la vía PI3K/AKT/mTOR, en particular, promueve la supervivencia celular al inhibir la apoptosis y aumentar la resistencia a condiciones adversas como la hipoxia. Por otro lado, la vía RAS/RAF/MEK/ERK está involucrada en la proliferación celular y la regulación del ciclo celular, lo que favorece un crecimiento tumoral acelerado (118). Además, HER2 puede influir en la remodelación del microambiente tumoral al promover la angiogénesis mediante la regulación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (101).

La sobreexpresión de HER2 también puede asociarse con un pronóstico desfavorable y, en el caso del CG temprano no diferenciado, con un mayor riesgo de metástasis en los ganglios linfáticos (119).

1.5.6 Implicaciones clínicas y biológicas de HER2 en cáncer gástrico

La positividad para HER2 en CG y UGE tiene implicaciones tanto clínicas como biológicas. Biológicamente, *ERBB2* es un protooncogén que codifica un receptor tirosina quinasa transmembrana, el cual participa en la proliferación celular, la supervivencia y la señalización antiapoptótica, y se asocia a una biología tumoral más agresiva, incluyendo mayores tasas de invasión y metástasis ganglionares, aunque su significado pronóstico independiente continúa siendo motivo de debate (37,120,121).

Clínicamente, la positividad para HER2 constituye un biomarcador predictivo de respuesta a la terapia dirigida contra HER2. La incorporación de trastuzumab a la quimioterapia de primera línea basada en platino y fluoropirimidinas fue considerado el estándar de tratamiento para la enfermedad avanzada o metastásica HER2+, por la mejoría en la SG demostrada en el estudio ToGA (52). La American Society of Clinical Oncology (ASCO), el College of American Pathologists (CAP) y la American Society for Clinical Pathology recomiendan la determinación sistemática del estado de HER2 en adenocarcinomas gastroesofágicos avanzados o metastásicos para guiar la decisión terapéutica. Asimismo, la NCCN recomienda la evaluación de HER2 al momento del diagnóstico de enfermedad metastásica. Más recientemente, la adición de inhibidores de puntos de control inmunitario (por ejemplo, pembrolizumab) a trastuzumab y quimioterapia, así como el uso nuevos anticuerpos conjugados contra HER2 (por ejemplo, trastuzumab deruxtecan), han contribuido a mejorar los resultados clínicos (71,120–122). Estos avances serán analizados en mayor detalle más adelante.

Sin embargo, la expresión de HER2 en estos tumores suele ser heterogénea, y la pérdida de positividad puede ocurrir con la progresión de la enfermedad o posterior al tratamiento, contribuyendo a la aparición de resistencia. Por lo tanto, la evaluación precisa y la monitorización del estado de HER2 previo inicio del tratamiento es fundamental en la toma de decisiones para un manejo óptimo de los pacientes (123,124).

1.5.7 Diferencias en la sobreexpresión del receptor HER2 entre cáncer gástrico y cáncer de mama

La expresión de HER2 en el CG se diferencia significativamente de la observada en el cáncer de mama, tanto en aspectos clínicos como biológicos. En el CG, la positividad para HER2 se presenta en aproximadamente el 10–20% de los casos, con mayor prevalencia en los tumores de la UGE y en aquellos de histología tipo intestinal, caracterizándose por una expresión frecuentemente heterogénea. En contraste, en el cáncer de mama la sobreexpresión o amplificación de HER2 ocurre en cerca del 15–20% de los casos, habitualmente con un patrón homogéneo y difuso (37,58,120,121,125).

La heterogeneidad de la expresión de HER2 en CG/UGE se manifiesta tanto dentro de un mismo tumor como entre las lesiones primarias y metastásicas, lo que ha exigido el desarrollo de criterios específicos para la interpretación de la IHQ e ISH de HER2,

distintos a los aplicados cánceres de mama. Por ejemplo, en CG/UGE se considera positiva la tinción incompleta o basolateral de la membrana, mientras que en el cáncer de mama sólo se acepta como positiva la tinción membranosa completa (120,123,125).

Desde el punto de vista biológico, HER2 es un reconocido impulsor oncogénico en el cáncer de mama, confiriendo mal pronóstico en ausencia de terapia dirigida, además de ser un marcador predictivo robusto de respuesta a agentes anti-HER2. En el CG/UGE, el significado pronóstico de HER2 es menos claro y podría limitarse a ciertos subgrupos (por ejemplo, tipo intestinal), ya que algunos estudios han mostrado asociación con características de agresividad, pero no consistentemente con mal pronóstico (58,121).

En la práctica clínica, las terapias dirigidas contra HER2, como por ejemplo trastuzumab, constituyen el estándar de tratamiento en ambas neoplasias, aunque la eficacia y el espectro de agentes activos difieren. En el cáncer de mama, múltiples agentes dirigidos contra HER2 (trastuzumab, pertuzumab, T-DM1, lapatinib) han demostrado eficacia, mientras que en CG/UGE, hasta la fecha sólo trastuzumab y más recientemente trastuzumab deruxtecan han mostrado un beneficio claro; en contra, otros fármacos anti-HER2 no han mostrado eficacia significativa en términos de supervivencia hasta el momento (62,71,120). Tanto la NCCN como la ASCO recomiendan la determinación de HER2 en todos los pacientes diagnosticados de CG/UGE avanzados o metastásicos para orientar el tratamiento, aunque los protocolos de evaluación y los criterios de interpretación son diferentes a los empleados en el cáncer de mama (37,120).

En resumen, la expresión de HER2 en el CG/UGE es más heterogénea, requiere criterios diagnósticos distintos y su valor pronóstico es menos claro en comparación con el cáncer de mama, aspectos que tienen importantes implicaciones para la realización de pruebas diagnósticas y la selección del tratamiento.

1.6. Puntuación de inmunohistoquímica e hibridación in situ de HER2 en cáncer gástrico

La IHQ es el método principal para la evaluación de la expresión de HER2 en el CG y de la UGE, y resulta fundamental para identificar a los pacientes candidatos a terapia dirigida contra HER2. La IHQ valora la intensidad y el patrón de tinción en la membrana celular de las células tumorales, empleando un sistema de puntuación (0 a 3+) específico para el CG/UGE, debido a sus frecuentes patrones de tinción heterogénea e incompleta. Una

puntuación de 3+ se considera positiva, mientras que una puntuación de 2+ es equívoca y requiere confirmación mediante ISH para determinar la amplificación del gen HER2. Sólo los tumores con IHQ 3+ o IHQ 2+/ISH+ se consideran HER2+ y candidatos a tratamiento con trastuzumab. En la tabla 5 se definen los criterios de evaluación de HER2 por IHQ en muestras quirúrgicas y endoscópicas (120,126), mientras que en la figura 4 se muestran imágenes representativas de los diferentes niveles de IHQ en muestras de pacientes con CG.

1.6.1 Diferencias clave entre muestras quirúrgicas y biopsias

El sistema desarrollado por Hofmann et al. también considera diferencias técnicas y prácticas entre muestras quirúrgicas y biopsias endoscópicas. Estas diferencias son especialmente relevantes en el CG debido a la heterogeneidad intratumoral y a la distribución irregular de HER2 dentro del tumor (120,127–129).

1. Muestras quirúrgicas:

- Permiten la evaluación de áreas más amplias del tumor, lo que reduce el riesgo de falsos negativos debido a la heterogeneidad.
- Requieren la evaluación de al menos el 10% de las células tumorales para clasificar adecuadamente la puntuación de IHQ.

2. Biopsias endoscópicas:

- Son más limitadas en cantidad de tejido y suelen incluir un número reducido de células tumorales.
- Las puntuaciones se basan en la evaluación de al menos 5 células cohesivas, lo que refleja la necesidad de ajustar los criterios para muestras más pequeñas.
- Los estudios han demostrado que la concordancia entre biopsias y muestras quirúrgicas es alta en tumores con puntuaciones de 3+, pero puede ser limitada en casos con puntuaciones de 2+ o menor. Esto subraya la importancia de un muestreo adecuado y la confirmación mediante técnicas de ISH cuando sea necesario (128).

Tanto la NCCN, el CAP, la American Society for Clinical Pathology, como la ASCO recomiendan la evaluación de HER2 mediante IHQ (con ISH de rescate en casos equívocos) en el momento del diagnóstico en todos los pacientes con adenocarcinoma gástrico o de UGE avanzado o metastásico, ya que el estado de HER2 guía directamente

el uso de trastuzumab en primera línea. Puede considerarse una reevaluación en caso de progresión de la enfermedad, si está clínicamente indicado. La valoración precisa mediante IHQ es crítica, dado que la terapia dirigida contra HER2 mejora significativamente los resultados sólo en los casos HER2+, y una clasificación incorrecta podría conducir a una selección inapropiada del tratamiento (130–134).

IHQ Puntuación	Muestra quirúrgica	Biopsia endoscópica	Resultado de HER2
0	No hay tinción membranosa o tinción en < 10% de las células tumorales.	No hay tinción membranosa o tinción sólo en células raras (< 5 células cohesivas).	Negativo
1+	Tinción membranosa débil o incompleta en \geq 10% de las células tumorales.	Tinción membranosa débil o incompleta en al menos 5 células cohesivas.	Negativo
2+	Tinción membranosa completa o basolateral débil/moderada en \geq 10% de las células tumorales.	Tinción membranosa completa o basolateral débil/moderada en al menos 5 células cohesivas.	Equívoco (requiere ISH).
3+	Tinción membranosa completa o basolateral fuerte en \geq 10% de las células tumorales.	Tinción membranosa completa o basolateral fuerte en al menos 5 células cohesivas.	Positivo

Tabla 5. Puntuación de HER2 por IHQ en muestras quirúrgicas y endoscópicas. Fuente: Adaptada de referencias 120,126.

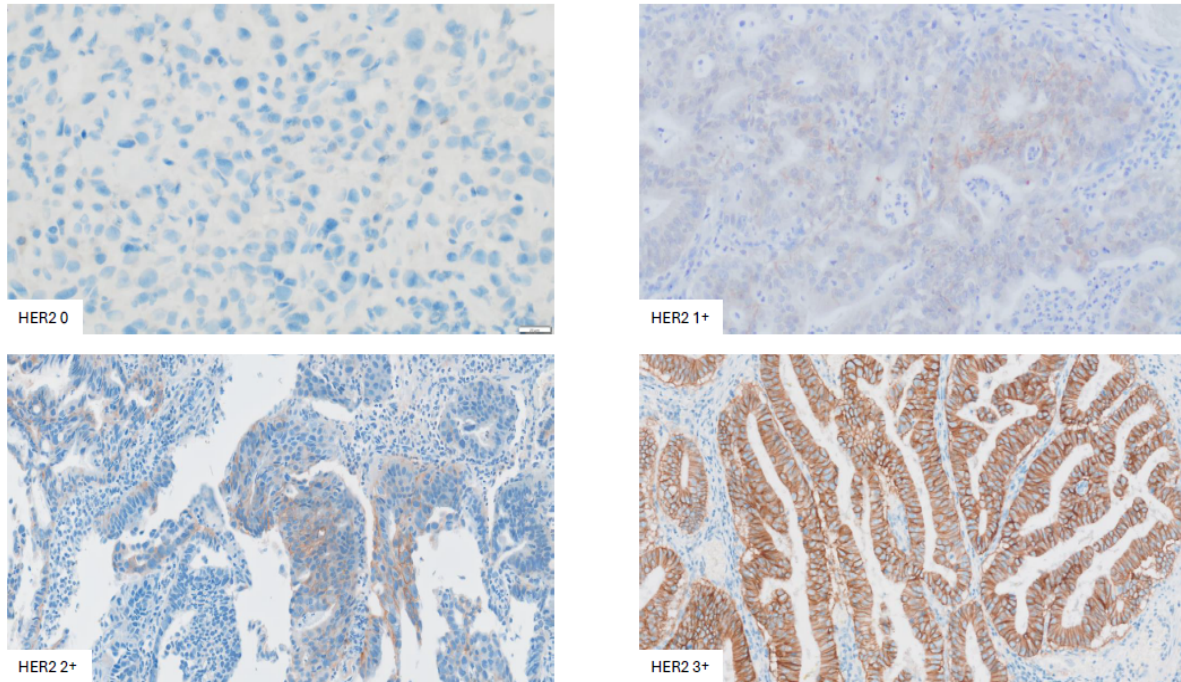


Figura 4. Imágenes representativas por IHQ de los diferentes niveles de HER2 en CG. Fuente: imágenes originales proporcionadas por la Dra. Miriam Cuatrecasas.

1.6.2 Interpretación clínica de la clasificación de HER2 por inmunohistoquímica

La interpretación clínica de la clasificación de HER2 por IHQ en CG difiere de la utilizada en cáncer de mama y sigue criterios específicos validados por el estudio ToGA (52) y las guías de la CAP, American Society for Clinical Pathology y ASCO (126). La clasificación se aplica de la siguiente manera:

- HER2+ (IHQ 3+): Los tumores cuya expresión HER2 es 3+ por IHQ son considerados positivos y por lo tanto candidatos a tratamiento con trastuzumab sin necesidad de pruebas adicionales.
- HER2-equivoco (IHQ 2+): Requiere confirmación mediante ISH, ya sea por fluorescencia (FISH) o cromogénica (CISH), para determinar la amplificación del gen *HER2*. En este contexto, la amplificación se define como un incremento clonal del número de copias del locus HER2 en relación con el centrómero del cromosoma 17 (CEP17), generalmente determinado por una relación

HER2/CEP17 $\geq 2,0$ en al menos 20 núcleos tumorales no superpuestos, como se describe en la siguiente sección. Esta confirmación es crucial para clasificar adecuadamente a los pacientes y optimizar su manejo terapéutico.

- HER2-negativo (IHQ 0 o 1+): Se considera que los tumores con estas puntuaciones no presentan sobreexpresión de HER2 o amplificación genómica y no son candidatos a tratamiento con trastuzumab.

La heterogeneidad intratumoral de HER2 en CG es alta, por lo que se recomienda evaluar múltiples bloques o cortes, especialmente en biopsias, para evitar falsos negativos (135). La interpretación debe realizarse con los criterios específicos para CG, ya que la expresión puede ser focal y basolateral, a diferencia del patrón circunferencial típico en mama.

En resumen, sólo los tumores con IHQ 3+ o IHQ 2+ con amplificación confirmada por ISH se consideran HER2+ y son candidatos a terapia anti-HER2, según las recomendaciones de las guías internacionales (37,126).

1.6.3 Hibridación in situ para HER2 en cáncer gástrico

La ISH desempeña un papel fundamental en la evaluación del estatus de HER2 en CG y de la UGE, ya que permite confirmar resultados equívocos (2+) de IHQ y orientar la elegibilidad para la terapia dirigida contra HER2. Las guías clínicas recomiendan iniciar la valoración de HER2 mediante IHQ; ante un resultado IHQ 2+ (interpretado como equívoco), se debe complementar con ISH (como FISH) para identificar si existe amplificación del gen HER2. Sólo se consideran tumores HER2+ aquellos con un puntaje de IHQ 3+ o IHQ 2+ junto con ISH positiva. Por el contrario, los casos con IHQ 0 o 1+ se clasifican como negativos y no requieren evaluación adicional por ISH, ya que una positividad aislada por ISH en estos pacientes no predice respuesta clínica a las terapias anti-HER2. La justificación de este enfoque radica en que el beneficio clínico de la terapia dirigida contra HER2 se correlaciona con la sobreexpresión de la proteína HER2, y la ISH aporta la mayor utilidad diagnóstica para resolver los casos equívocos por IHQ, en los cuales la amplificación génica puede encontrarse en un 30–50% de los casos (120).

Partiendo del papel de la ISH en la confirmación de resultados equívocos por IHQ, es importante señalar que tanto la FISH como la ISH en campo claro (incluyendo la ISH cromogénica y la ISH dual) están técnicamente validadas y son ampliamente utilizadas

para la detección de la amplificación génica de HER2 en adenocarcinomas gástricos y de la UGE. Estos métodos cuantifican las señales de HER2 y del CEP17 en al menos 20 núcleos tumorales no superpuestos, considerando como positiva para amplificación una relación $HER2/CEP17 \geq 2.0$. Este enfoque confiere especial importancia en casos IHQ 2+ (equivocos), en los cuales la ISH puede establecer de manera definitiva el estatus de HER2 y, por tanto, la elegibilidad para la terapia dirigida (126,136).

Las técnicas de ISH también son útiles para abordar la significativa heterogeneidad intratumoral característica de los CG. La interpretación debe priorizar las áreas de carcinoma invasivo y aquellas con la tinción más intensa en IHQ, ya que es donde existe mayor probabilidad de encontrar amplificación génica, siendo esencial evitar elementos no tumorales y artefactos (120,136,137). Si bien la FISH es el método de ISH más establecido, la ISH en campo claro ofrece ventajas prácticas, como la identificación más sencilla de los núcleos tumorales y la compatibilidad con plataformas automatizadas de tinción, aunque ninguno de los métodos ha demostrado superioridad diagnóstica clara sobre los demás (120).

Los estudios han mostrado una alta concordancia entre IHQ e ISH; sin embargo, un pequeño subgrupo de casos con IHQ 1+ o incluso 0 pueden presentar amplificación de HER2 por ISH, lo que plantea la posibilidad de una subdetección de casos, si la ISH se realiza sólo en casos IHQ 2+ (130). No obstante, la práctica clínica actual y los datos de estudios clínicos respaldan limitar el uso de ISH a los casos con IHQ 2+, dado que no se ha demostrado beneficio de la terapia anti-HER2 en tumores IHQ 0/1+, incluso si hay amplificación (120,130).

En resumen, la ISH (incluida la FISH) resulta esencial para confirmar el estatus de HER2 en casos equivocos por IHQ, orientar el uso de terapias dirigidas contra HER2 y enfrentar los desafíos derivados de la heterogeneidad tumoral en del CG y de la UGE.

1.7 Clasificación y alteraciones moleculares relevantes en cáncer gástrico

Los avances recientes en la secuenciación del genoma del cáncer han revelado los perfiles completos de mutaciones somáticas en los pacientes con CG. El TCGA identificó cuatro subtipos de CG basados en análisis genómicos, epigenómicos y transcriptómicos integrados (131).

1. Virus de Epstein-Barr (VEB)-positivo: Caracterizado por la presencia de VEB en las células tumorales, frecuentes mutaciones de PIK3CA, hipermetilación extrema del ADN y amplificación recurrente de JAK2, CD274 (PD-L1) y PDCD1LG2 (PD-L2). Estos tumores a menudo muestran una alta infiltración de células inmunitarias y pueden responder mejor a la inmunoterapia (80,131,133).
2. Inestabilidad de microsatélites (MSI): Definido por altos niveles de inestabilidad de microsatélites e hipermutación, con mutaciones frecuentes en genes involucrados en vías de señalización oncogénica. Estos tumores están asociados con una alta carga mutacional y pueden tener respuestas favorables a los inhibidores de puntos de control inmunitario (80,131,133).
3. Genómicamente estable: Enriquecido para la variante histológica difusa, estos tumores normalmente carecen de alteraciones extensas en el número de copias somáticas. Frecuentemente presentan mutaciones en RHOA o fusiones que involucran proteínas activadoras de GTPasa de la familia RHO, y están asociados con pacientes más jóvenes y un pronóstico más desfavorable (80,131–133).
4. Inestabilidad cromosómica: Caracterizada por una aneuploidía marcada y la amplificación focal de receptores tirosina-quinasa (por ejemplo, ERBB2/HER2, EGFR, FGFR2, MET). Estos tumores son con mayor frecuencia del subtipo histológico intestinal y están asociados con mutaciones de TP53 y frecuentes alteraciones en el número de copias cromosómicas (80,131,132).

Además, los estudios de secuenciación a gran escala en CG identificaron y confirmaron amplificaciones genéticas frecuentes en genes que codifican tirosina quinasa receptoras (ej. ERBB2, ERBB3, EGFR, FGFR2, MET y VEGFR) y mutaciones somáticas en P53, ARID1A, PIK3CA, SMAD4, CDH1 y los genes RHOA, con altas frecuencias en los dos últimos específicamente entre los CG de tipo difuso (134,138,139).

La fusión de genes somáticos de CLDN18/ARHGAP también se ha informado como un evento frecuente en CG difuso (140). El conocimiento de las alteraciones somáticas de los diferentes subtipos de CG definidos molecularmente, podrían ser objetivos terapéuticos en un futuro.

También se sabe que las variaciones de la línea germinal en el genoma humano juegan un papel importante en la carcinogénesis en varios órganos, incluido el estómago.

El CG difuso hereditario es un síndrome de predisposición a CG bien conocido que se atribuye a variantes de línea germinal de genes causantes como CDH1 (141).

CDH1 es un miembro de la superfamilia de cadherinas que desempeña un papel importante en la adhesión epitelial de célula a célula (142). Se ha demostrado también que las variaciones de la línea germinal en los genes que codifican la maquinaria de reparación de roturas de doble cadena, como BRCA1/2, PALB2 y RAD51, son factores causantes de los CG familiares (143). Adicionalmente, se han reportado variaciones en otros genes de reparación del ADN, como ATR, NBN, RECQL5, y MSH2 en casos de CG difuso hereditario sin variaciones de CDH1 (144).

La clasificación molecular y alteraciones identificadas en el CG proporcionan un marco para la estratificación de pacientes y tiene implicaciones para el pronóstico y la selección de terapias dirigidas, sin embargo, hoy en día, la clasificación molecular no se utiliza en la práctica clínica asistencial de forma habitual para guiar el tratamiento de los pacientes con CG/UGE avanzado.

1.8 Interacciones entre el sistema inmune y el cáncer gástrico HER2+

La sobreexpresión de HER2 en CG se asocia con alteraciones profundas en el microambiente tumoral, que adquiere características inmunosupresoras. Diversos estudios han demostrado que el CG HER2+ presenta una infiltración reducida de linfocitos T CD3+ y CD8+, junto a un incremento relativo en la proporción de células T reguladoras (Tregs) FoxP3+, lo que favorece la evasión inmune por parte de las células tumorales. Esta plasticidad inmunológica se traduce en menor densidad global de células inmunes y reducción significativa en la expresión de moléculas inmunorreguladoras tales como PD-1, PD-L1, CTLA-4 y LAG-3, especialmente en aquellos tumores con baja puntuación de PD-L1 (CPS < 1). De este modo, el microambiente se configura como “inmunológicamente frío”, lo que limita considerablemente la eficacia de la inmunoterapia (110,145,146).

En este contexto, se ha demostrado que los niveles de mRNA de PD-1 en el CG suelen ser inferiores en el tejido tumoral respecto al tejido normal adyacente. El análisis

mediante PCR cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR; donde RT = transcripción inversa y q = cuantitativa) ha corroborado que la expresión de PD-1 está significativamente reducida en las muestras tumorales, y este descenso se asocia con una menor SG, constituyendo un factor pronóstico independiente, especialmente en casos con subtipos histológicos indiferenciados (147,148).

El sistema inmune en este escenario desempeña un papel dual y dinámico. Por un lado, la señalización aberrante mediada por HER2 induce mecanismos que suprimen la actividad antitumoral, dificultando la infiltración y activación de linfocitos T citotóxicos e impidiendo una respuesta inmunitaria efectiva. Por otro lado, la intervención terapéutica dirigida contra HER2, particularmente mediante anticuerpos monoclonales como trastuzumab, aprovecha mecanismos inmunológicos para potenciar la eliminación tumoral. Específicamente, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos emerge como un mecanismo central de acción. Este proceso requiere la cooperación funcional entre células NK, responsables de la lisis tumoral, y linfocitos T, especialmente CD4 positivos (+) los cuales secretan interleucina-2 (IL-2) y potencian la función citotóxica de las NK. La insuficiencia de esta señal de ayuda mediada por linfocitos T se reconoce como un mecanismo relevante de resistencia primaria o adquirida a la terapia anti-HER2. Estrategias innovadoras, como la activación específica de linfocitos T o el uso de anticuerpos biespecíficos capaces de reclutar estas células, han mostrado potencial para revertir dicha resistencia y mejorar la eficacia terapéutica (149).

La combinación de inmunoterapia con agentes anti-HER2 ha adquirido especial importancia a raíz de resultados preclínicos y clínicos que documentan efectos sinérgicos. La terapia anti-HER2 induce la expresión de antígenos tumorales y moléculas inmunorreguladoras, sensibilizando las células tumorales y facilitando el reconocimiento inmunitario. En pacientes con microambiente tumoral inmunológicamente activo (CPS \geq 1), caracterizado por mayor infiltración de linfocitos T y células NK, la combinación de ambos enfoques ha demostrado incrementar significativamente la SG y la tasa de respuesta clínica. No obstante, es fundamental considerar la heterogeneidad intratumoral y la plasticidad inherente al microambiente tumoral, ya que ambos factores condicionan la magnitud de la respuesta terapéutica y favorecen el desarrollo de resistencia en determinados subgrupos de pacientes. Esta variabilidad clínica refleja la compleja interacción entre las señales oncológicas y la regulación inmune local, lo que

subraya la importancia de implementar estrategias terapéuticas personalizadas para optimizar los resultados (145,146,150,151).

En resumen, la sobreexpresión de HER2 en el CG modula el microambiente tumoral y dificulta la respuesta inmune, pero representa a su vez una diana fundamental para intervenciones terapéuticas que combinan agentes anti-HER2 con inmunoterapia. Comprender la dinámica de este microambiente y los mecanismos de resistencia constituye un aspecto clave para optimizar el tratamiento y mejorar el pronóstico de los pacientes con esta neoplasia (145,146,150,151).

1.9 Heterogeneidad molecular del receptor HER2 y nuevos métodos de evaluación del receptor HER2

1.9.1 Heterogeneidad molecular de HER2

La heterogeneidad molecular de HER2 en el CG es relevante y se manifiesta tanto a nivel intratumoral (dentro de un mismo tumor) como intertumoral (entre distintas lesiones o entre el tumor primario y las metástasis). Esta heterogeneidad implica que la expresión o amplificación de HER2 pueden variar ampliamente en distintas áreas del tumor, lo que complica la evaluación diagnóstica y la selección de pacientes para terapias dirigidas anti HER2 (137,152–154).

En la práctica clínica, la heterogeneidad de HER2 impacta directamente en la precisión de la determinación del estatus HER2, ya que biopsias limitadas pueden no reflejar la verdadera proporción de células HER2+, generando falsos negativos y subóptima selección de candidatos para tratamiento con trastuzumab u otros agentes anti-HER2. Por esa razón, se recomienda la evaluación de múltiples bloques tumorales y el uso combinado de IHQ y técnicas ISH para mejorar la exactitud diagnóstica (152,153).

En cuanto al tratamiento, la heterogeneidad de HER2 se asocia con menor beneficio clínico de las terapias anti-HER2. Los pacientes con expresión homogénea de HER2 presentan mayor supervivencia y mejor respuesta a trastuzumab, mientras que la heterogeneidad se relaciona con resistencia primaria y progresión más temprana (155,156).

Además, la heterogeneidad puede coexistir con otras alteraciones moleculares, como mutaciones en TP53 y variabilidad en otros genes, lo que contribuye a la resistencia y a la complejidad biológica del tumor (58,157).

Un importante punto que destacar es que la heterogeneidad intratumoral de la expresión y amplificación de HER2 es significativamente mayor en el CG HER2+ en comparación con el cáncer de mama. En el CG, esta variabilidad ocurre tanto a nivel de IHQ como ISH, afectando hasta un 30-50% de los casos. Esta heterogeneidad se asocia a una menor proporción de células HER2+, menor eficacia de las terapias anti-HER2 y peor pronóstico, en contraste con el cáncer de mama, donde la expresión de HER2 es más homogénea y las determinaciones diagnósticas suelen ser más fiables. Además, la heterogeneidad en CG requiere evaluaciones diagnósticas más exhaustivas, ya que puede impactar negativamente en la selección de pacientes y en la respuesta clínica a tratamientos anti-HER2 (67,155,156,158–161).

Esta heterogeneidad subyacente se considera una de las principales causas del frecuente fracaso de los ensayos clínicos basados en biomarcadores en CG HER2+ (66–68).

Las limitaciones de los métodos diagnósticos actuales, como la IHQ y la ISH, en la captura precisa de la complejidad de la expresión de HER2, subrayan la necesidad urgente de biomarcadores avanzados. Estos biomarcadores podrían ofrecer una comprensión más detallada de la biología tumoral, lo que potencialmente llevaría a estrategias de tratamiento más personalizadas y efectivas.

1.9.2 Nuevos métodos de evaluación del receptor HER2.

Los nuevos métodos para la evaluación del receptor HER2 en CG buscan superar las limitaciones de la IHQ y la ISH, especialmente frente a la marcada heterogeneidad intratumoral característica de estos tumores.

Dentro de las técnicas emergentes para la evaluación de HER2, destaca la cuantificación de la expresión génica de *ERBB2* mediante métodos basados en ácido ribonucleico mensajero (mRNA), como la PCR digital (ddPCR) y el RNA scope. Estas técnicas permiten no solo detectar, sino también cuantificar de manera precisa el nivel de transcripción de *ERBB2* en muestras de tejido tumoral. La ddPCR, en particular, posibilita la medición exacta del número de copias de HER2, tanto en tejido como en plasma,

mostrando alta concordancia con la IHQ y la ISH en tejido sólido, y brindando un prometedor potencial para la monitorización no invasiva de la progresión tumoral. Sin embargo, cabe señalar que la sensibilidad para la detección en plasma todavía es limitada y su adopción en la práctica clínica no es estándar (162).

Otra innovación relevante es la cuantificación objetiva de HER2 mediante inmunofluorescencia automatizada a nivel de célula individual, la cual permite evaluar la heterogeneidad de la expresión tanto proteica como génica dentro de una misma muestra. Esta metodología no solo discrimina subgrupos específicos de pacientes tradicionalmente clasificados como HER2+, sino que también facilita la identificación de aquellos que podrían beneficiarse en mayor grado de terapias dirigidas. Asimismo, el desarrollo de ensayos basados en mRNA de *ERBB2* y el uso de técnicas proteómicas como la espectrometría de masas están ampliando la precisión y reproducibilidad en la cuantificación de la expresión génica y proteica, refinando así la estratificación diagnóstica y terapéutica de los pacientes (112,163).

A pesar de estos avances, la literatura subraya que la evaluación de múltiples bloques tumorales, así como la integración de técnicas tradicionales como IHQ e ISH, sigue siendo fundamental para minimizar el impacto de la heterogeneidad intratumoral y reducir el riesgo de falsos negativos, especialmente en casos con focos pequeños de positividad o resultados equívocos. En consecuencia, si bien los nuevos métodos genómicos y proteómicos aportan ventajas relevantes en la cuantificación y en la identificación de heterogeneidad, actualmente actúan de forma complementaria y no sustituyen a los métodos convencionales en la rutina clínica (135,153).

1.9.3 Evaluación de HER2 por técnicas de expresión génica: nCounter y test genómico HER2DX.

El análisis del HER2 mediante tecnologías como nCounter (NanoString Technologies), ofrece un método cuantitativo y robusto para la evaluación del estatus HER2 en el cáncer, particularmente en el cáncer de mama. Esta plataforma permite medir directamente la abundancia de mRNA sin la necesidad de amplificación, lo que facilita la cuantificación fiable a partir de muestras fijadas en formol e incluidas en parafina (FFPE), condición que frecuentemente representa un desafío para otros estudios moleculares (164–166).

La evaluación de *ERBB2* basada en mRNA muestra una alta correlación con la expresión proteica determinada mediante IHQ, así como un rango dinámico más amplio con mayor objetividad. Esto es especialmente relevante en tumores con bajos niveles de HER2, donde la IHQ presenta limitaciones inherentes como la variabilidad inter observador y una ventana de detección reducida (167–170). Diversos estudios han demostrado que la cuantificación de mRNA puede identificar casos con discordancia en el estatus HER2 respecto a la IHQ, incluyendo tumores con sobreexpresión de mRNA, pero negativos en IHQ y en ensayos de número de copias, algunos de los cuales pueden responder a terapias dirigidas contra HER2 (112). Esta característica adquiere especial relevancia en las posibles indicaciones terapéuticas para tumores HER2-bajos.

Las plataformas nCounter han mostrado alta sensibilidad, reproducibilidad y solidez técnica para su aplicación clínica, lo que respalda su uso como métodos complementarios o alternativos a la IHQ y a la ISH para la evaluación de HER2 (164–166). Sin embargo, aunque la cuantificación de mRNA se correlaciona adecuadamente con la IHQ en muchos casos, existen situaciones de discordancia. Por ello, se requieren ensayos clínicos prospectivos que determinen qué método predice mejor la respuesta a terapias dirigidas contra HER2 y los desenlaces clínicos asociados (112).

Basándonos en la evidencia en cáncer de mama, donde la cuantificación del mRNA de *ERBB2* se ha asociado de forma más consistente que las técnicas semicuantitativas de IHQ/ISH con la respuesta a T-DM1, nuestro grupo investigó si estos hallazgos podrían trasladarse al CG HER2+. En un análisis pan-tumoral de 10,071 muestras correspondientes a 33 tipos de cáncer, publicado por nuestro grupo, identificamos una proporción relevante de adenocarcinomas gástricos y esofágicos con niveles elevados de *ERBB2* (6%), y aportamos evidencia translacional adicional al documentar retrospectivamente un caso de adenocarcinoma gastroesofágico HER2 3+ con altos niveles de mRNA de *ERBB2* que obtuvo una respuesta parcial prolongada a T-DM1, superior a las tasas medias de respuesta y SLP reportadas en la cohorte global del ensayo GATSBY (67,171).

Dado que la sobreexpresión de HER2 comparten bases biológicas entre diferentes histologías, resulta científicamente sólido y clínicamente pertinente explorar y transferir este conocimiento a pacientes con CG HER2+ para optimizar la selección y maximizar

el beneficio de las terapias anti-HER2 en estos pacientes. El artículo completo publicado por nuestro grupo, que estableció los fundamentos metodológicos y conceptuales de esta tesis, se presenta en el **Anexo 2**.

La plataforma nCounter es una tecnología de expresión génica que utiliza sondas de ADN marcadas con fluorescencia, diseñadas para genes específicos, que se hibridan con sus RNA diana en muestras FFPE. Posteriormente, los complejos son capturados y las moléculas de RNA individuales son contadas. nCounter presenta varias ventajas frente a otras técnicas de cuantificación de expresión génica, entre ellas (112,164,165,172,173):

- 1) No se utiliza ningún paso enzimático, por lo que este enfoque es el recuento verdaderamente digital.
- 2) La cantidad de RNA necesaria es menor (100-200 ng).
- 3) Se utiliza un solo tubo de reacción (en contraposición a una reacción por tubo/pocillo).
- 4) Más fácil de usar.
- 5) Los datos son altamente reproducibles.
- 6) Es coste equivalente.
- 7) Se pueden testar hasta 800 genes.

Por lo tanto, esta plataforma permite una fácil detección de los biomarcadores mediante la evaluación de la expresión génica.

Entre las desventajas destacan la necesidad de normalización cuidadosa usando genes de referencia internos, lo que puede afectar la precisión si estos no se seleccionan adecuadamente. El diseño de sondas requiere conocimiento previo de la secuencia diana, limitando la detección de variantes desconocidas o nuevas isoformas. Además, aunque la plataforma es robusta, su coste puede ser elevado en comparación con los métodos tradicionales, y la interpretación clínica de resultados discordantes entre mRNA y la IHQ requiere validación prospectiva, especialmente en el contexto de HER2 bajo o casos discordantes (112).

En conclusión, la cuantificación de mRNA de HER2 mediante tecnologías como nCounter constituye una herramienta valiosa y complementaria a los métodos tradicionales de evaluación, particularmente en casos ambiguos o con baja expresión de HER2. Además, su aplicación tiene pleno sentido en el contexto del CG HER2+, ya que puede mejorar la selección de pacientes candidatos a terapias anti-HER2 y potencialmente optimizar los resultados clínicos en este grupo de pacientes (112,167,169).

Por otro lado, en esta tesis abordaremos el análisis de HER2 mediante test HER2DX. HER2DX es una prueba genómica clínicamente validada y desarrollada en cáncer de mama HER2+. La tecnología que utiliza HER2DX para la evaluación de la expresión génica de HER2 es la plataforma nCounter (NanoString Technologies) descrita previamente. HER2DX ha mostrado un gran potencial al integrar características clínicas con firmas de expresión génica, que incluyen la respuesta inmune, la proliferación, la diferenciación luminal, y la expresión del amplicón HER2 (incluyendo los niveles de mRNA de *ERBB2*) para generar un perfil molecular integral (174–176).

A diferencia de las metodologías convencionales, como la IHQ y la ISH, que son semicuantitativas y susceptibles a errores de muestreo en tumores heterogéneos, HER2DX integra la expresión de 27 genes vinculados a la infiltración inmune, proliferación celular, diferenciación luminal y expresión del amplicón *ERBB2*, junto con características clínicas relevantes como el tamaño tumoral y el estado ganglionar (163,174–176).

HER2DX proporciona una puntuación de mRNA de *ERBB2*. Esta prueba clasifica a los pacientes en tres grupos: *ERBB2 bajo* (1–32), *ERBB2 intermedio* (33–50) y *ERBB2 alto* (51–99). Estos puntos de corte se entrenaron para predecir el estado clínico de HER2 de acuerdo con las guías de la CAP (239). En particular, el valor de corte de 33 separa *ERBB2* bajo de *ERBB2* intermedio/alto y se correlaciona con el estado clínico HER2- frente a HER2+ en cáncer de mama HER2+ (174).

HER2DX permite así una estratificación pronóstica robusta que supera la información aportada por variables clínicas convencionales y la respuesta patológica, facilitando la toma de decisiones sobre la intensidad del tratamiento sistémico y la selección de candidatos para estrategias de escalamiento o de-escalamiento terapéutico (177–179).

En un metaanálisis publicado recientemente (178) el score de riesgo HER2DX se asocia de manera independiente y significativa con la SLP y la SG. Por ejemplo, los pacientes clasificados como bajo riesgo por HER2DX presentan tasas de SLP a 6 años superiores al 93%, mientras que los de alto riesgo tienen tasas cercanas al 83%, con diferencias absolutas clínicamente relevantes (177,178). Esta capacidad de discriminación se mantiene en subgrupos según estadio, estado ganglionar, receptor hormonal y tipo de tratamiento recibido (179).

Considerando el potencial de la puntuación de mRNA de HER2DX *ERBB2* como biomarcador predictivo, especialmente en el contexto de tratamientos anti-HER2, es conveniente validar su capacidad para predecir la supervivencia en pacientes con CG avanzado HER2+ tratados con trastuzumab. La identificación precisa de aquellos pacientes que puedan beneficiarse más de terapias específicas permitirá personalizar las estrategias terapéuticas en este escenario clínico dinámico y complejo. En este sentido, el desarrollo y la validación de biomarcadores avanzados como la determinación del estatus de *ERBB2* mediante técnicas de expresión génica como HER2DX podrían superar las limitaciones de los métodos diagnósticos convencionales, facilitando decisiones terapéuticas eficaces para el CG avanzado HER2+. Esta innovación no solo ofrece una evaluación más exacta de la enfermedad, sino que también abre la puerta a una verdadera personalización de los tratamientos, optimizando las intervenciones según el perfil molecular individual y preciso de cada paciente, contribuyendo así a mejorar los resultados clínicos (112,180).

Por lo tanto, la determinación de HER2 mediante la expresión génica de *ERBB2* como un biomarcador pronóstico y predictivo en CG y de la UGE HER2+ surge de la necesidad clínica de superar las limitaciones inherentes a los métodos convencionales como la IHQ y la ISH, los cuales presentan problemas de precisión y reproducibilidad, especialmente ante la heterogeneidad tumoral característica de estos tumores. Diversos estudios han demostrado que la evaluación cuantitativa de la expresión de *ERBB2* mediante plataformas como nCounter y HER2DX, ya validada en cáncer de mama, permite una estratificación más precisa del estatus HER2 y una mejor correlación con los desenlaces clínicos como TRO, SG y SLP en pacientes tratados con anti-HER2 (171,181,182). Este enfoque facilita la identificación de subgrupos de pacientes realmente susceptibles al beneficio terapéutico, optimizando así la selección individualizada y personalizando el

abordaje del CG/UGE HER2+. Adicionalmente, la integración de la evaluación de perfiles inmunes y la comparación transversal con casos de cáncer de mama HER2+ respaldan el potencial de esta metodología para avanzar hacia una oncología de precisión en el ámbito gastrointestinal.

2. Hipótesis

La hipótesis principal de este estudio es que la determinación del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano mediante un método cuantitativo, como la evaluación de la expresión génica de *ERBB2* por nCounter, constituye un biomarcador superior de pronóstico y de respuesta al tratamiento anti-receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano en comparación con los métodos semicuantitativos tradicionales, como la evaluación del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano por inmunohistoquímica e hibridación in situ.

3. Objetivos

3.1 Objetivo primario del estudio

Identificar un biomarcador capaz de predecir la respuesta a trastuzumab en el cáncer gástrico y en el cáncer de la unión gastroesofágica con positividad para el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano, mediante la cuantificación del ácido ribonucleico mensajero de *ERBB2* y la caracterización de perfiles inmunes.

3.2 Objetivos secundarios del estudio

3.2.1. Correlacionar la expresión del ácido ribonucleico mensajero de *ERBB2* determinada por nCounter con la expresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano evaluada por inmunohistoquímica e hibridación in situ, e identificar un punto de corte del ácido ribonucleico mensajero de *ERBB2* que permita clasificar los tumores cáncer gástrico y de la unión gastroesofágica como receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano positivo o receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano negativo.

3.2.2. Correlacionar la expresión del ácido ribonucleico mensajero de *ERBB2* determinada por nCounter y la expresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano evaluada por inmunohistoquímica e hibridación in situ con la supervivencia global, la supervivencia libre de progresión y la respuesta al tratamiento anti- receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.

3.2.3. Analizar la correlación entre la expresión de genes individuales, incluyendo genes inmunes como *PDCDI* (que codifica la proteína de muerte programada 1), y la supervivencia global, la supervivencia libre de progresión y la respuesta al tratamiento, tanto en la población receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano positivo, como en la población receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano negativo y en la cohorte global.

3.2.4. Comparar los niveles de expresión de receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano en pacientes con cáncer gástrico y de la unión gastroesofágica receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano positivo frente a los observados

en pacientes con cáncer de mama receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano positivo.

Correspondencia con el artículo publicado

El objetivo primario y los objetivos secundarios 3.2.1, 3.2.2 y 3.2.4 se abordan en el artículo publicado en ESMO Open (Anexo 1). El objetivo secundario 3.2.3 se desarrolla en el presente documento. Adicionalmente, se incluye como resultado complementario el artículo publicado en Cancers (Anexo 2), que proporcionó las bases metodológicas y conceptuales para el desarrollo de esta tesis doctoral

4. Metodología

4.1 Características y diseño del estudio.

Se trata de un estudio retrospectivo y descriptivo. Se seleccionó una cohorte de 134 pacientes diagnosticados con CG o de la UGE avanzado, entre enero de 2010 y diciembre de 2019, en el Hospital Clínic de Barcelona y el Hospital General de Granollers. De este grupo, 58 pacientes recibieron tratamiento de primera línea con trastuzumab más quimioterapia: 41 en el Hospital Clínic de Barcelona y 17 en el Hospital General de Granollers.

Los datos clínicos y patológicos de interés fueron recogidos y registrados en una base de datos para su posterior análisis. En cuanto al tamaño de la muestra, al tratarse de un estudio exploratorio, el número de casos se determinó en función de la experiencia previa y del presupuesto disponible.

4.2 Criterios de inclusión.

Para seleccionar a los pacientes, se siguieron los siguientes criterios:

- 1) Consentimiento informado por escrito de acuerdo con los requisitos reglamentarios locales antes de comenzar el estudio en los pacientes vivos.
- 2) Pacientes mayores de 18 años.
- 3) Adenocarcinoma gástrico o de la unión gastroesofágica avanzado.
- 4) Resultado local disponible del análisis del estado de HER2 mediante IHQ/ISH.

4.3 Criterios de exclusión

- 1) Pacientes que recibieron tratamiento sistémico previo (neoadyuvante/adyuvante) al análisis de HER2.
- 2) Muestra histológica insuficiente para el análisis.

4.4 Selección y análisis de las muestras

Se seleccionó una muestra de tumor FFPE por paciente. Las muestras seleccionadas fueron las más cercanas al último tratamiento sistémico recibido. El último seguimiento de los pacientes se realizó en diciembre de 2024.

4.4.1 Inmunohistoquímica de HER2 e hibridación fluorescente in situ

El estado de HER2 se evaluó en 134 FFPE CG/UGE de acuerdo con la normativa de ASCO/CAP (183). La IHQ se realizó en secciones de 2 μm de espesor utilizando el anticuerpo monoclonal de conejo anti-HER2/neu (4B5) (Ventana Medical Systems Inc., Oro Valley, AZ, EE. UU.). La ISH para HER2 se llevó a cabo en secciones de 4 μm utilizando la sonda AMP XL ERBB2 (HER2/NEU), aprobada por la FDA (MetaSystems Probes, Altlußheim, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.4.2 Extracción de RNA y análisis de expresión génica

El RNA se extrajo de biopsias tumorales FFPE y muestras quirúrgicas utilizando el High Pure FFPE RNA Isolation Kit (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron de una a cinco láminas FFPE de 10 μm , dependiendo de la celularidad del tumor, para cada muestra tumoral, y se realizó macrodisecado, cuando fue necesario, para evitar la contaminación con tejido normal. Un mínimo de 100 ng de RNA total fue analizado en la plataforma nCounter (Nanostring Technologies, Seattle, EE.UU.) utilizando un panel personalizado de 72 genes, incluyendo *ERBB2* y *PDCDI* (PD-1).

Los datos de expresión génica fueron transformados a logaritmo y normalizados respecto a los genes de referencia utilizando scripts personalizados en el software R v4.0.3. Los niveles de mRNA de *ERBB2* en tumores gástricos fueron comparados con una cohorte de 392 muestras tumorales de cáncer de mama (171).

4.4.3 Análisis in silico de *ERBB2*

Para evaluar la expresión del mRNA de *ERBB2* en múltiples tipos de tumores, descargamos los datos del Pan-Cancer Atlas del TCGA a través de cBioportal (184), que contienen datos de 6463 muestras de pacientes. Para los datos de expresión de mRNA, la puntuación Z calcula la expresión relativa de un gen individual y un tumor con respecto a la distribución de la expresión del gen en una población de referencia (todas las muestras de pacientes en la base de datos).

4.4.4 Análisis in silico de PD-1 (*PDCDI*)

Para evaluar la expresión del mRNA de PD-1 (codificado por el gen *PDCDI*) en el CG y la UGE, descargamos los datos del Pan-Cancer atlas del TCGA a través de cBioportal (184). Para los datos de expresión de mRNA, la puntuación Z calcula la expresión relativa

de un gen individual y un tumor con respecto a la distribución de la expresión del gen en una población de referencia (todas las muestras de pacientes en la base de datos).

4.4.5 Test HER2DX

El test HER2DX estandarizado (163,174,182,185) se llevó a cabo en el Hospital Clínic de Barcelona, IDIBAPS, en muestras de pacientes con CG avanzado HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia (n=58), así como muestras de 27 pacientes con CG avanzado HER2-negativo. El ensayo HER2DX cuantifica los niveles de mRNA de 27 genes objetivo y 5 genes de normalización con expresión constitutiva.

Estos 27 genes están agrupados en cuatro firmas génicas: 1) infiltración inmune, 2) proliferación de células tumorales, 3) diferenciación luminal, y 4) expresión del amplicón HER2. El puntaje HER2DX ERBB2 se calculó en base a los niveles de mRNA de *ERBB2*.

El test HER2DX informa la expresión de mRNA de *ERBB2* como una puntuación continua que va de 1 a 99. Esta puntuación fue desarrollada y validada utilizando un conjunto de datos de referencia compuesto por muestras de cáncer de mama HER2+. Con base en esta cohorte de referencia, se definieron tres categorías de expresión: *ERBB2*-baja (puntuaciones de 1 a 32), *ERBB2*-media (puntuaciones de 33 a 50) y *ERBB2*-alta (puntuaciones de 51 a 99). Estas categorías fueron establecidas para alinearse con el estatus clínico de HER2 (según las guías ASCO/CAP en cáncer de mama) y corresponden a niveles crecientes de expresión de la proteína HER2. En concreto, el punto de corte de 33 distingue los tumores mamarios probablemente HER2- de los HER2+ (174,175).

En el presente estudio, utilizamos los puntos de corte existentes de HER2DX (desarrollados para cáncer de mama) para la estratificación inicial, pero adicionalmente analizamos la puntuación de *ERBB2* como variable continua.

4.6 Análisis estadísticos

Se evaluaron las asociaciones entre *ERBB2* (medido por HER2DX) y la SLP, la SG y la respuesta al tratamiento con trastuzumab más quimioterapia, utilizando modelos de regresión de Cox univariados y multivariados.

La SLP se definió como el tiempo transcurrido desde el inicio de trastuzumab más quimioterapia hasta la progresión de la enfermedad o el fallecimiento, lo que ocurriera

primero. Por su parte, la SG se definió como el intervalo entre el diagnóstico de la enfermedad avanzada y la muerte o el último seguimiento realizado.

Para analizar la relación entre la puntuación HER2DX *ERBB2* y la TRO, se aplicaron modelos de regresión logística. Las variables incluidas en el modelo multivariado fueron seleccionadas en función de su relevancia clínica y de asociaciones conocidas con los resultados en el CG HER2+, aunque no alcanzaran significación estadística en los análisis univariados, con el objetivo de evitar posibles factores de confusión y mejorar la robustez del análisis.

La concordancia entre el estado de HER2 determinado por IHQ y/o ISH y los niveles de expresión del mRNA de *ERBB2* se evaluó mediante el coeficiente kappa de Cohen, que permite medir el grado de acuerdo entre dos métodos de diagnóstico. Asimismo, se realizó un análisis de la curva ROC (Receiver Operating Characteristics) para identificar un nuevo punto de corte preliminar del HER2DX *ERBB2* específico para CG, contribuyendo así a la adaptación del test en este contexto clínico.

Adicionalmente, se evaluó la asociación entre los niveles de expresión del gen inmune *PDCDI* (PD-1) con la TRO y los desenlaces de SLP y SG mediante curvas de Kaplan-Meier y comparación entre grupos definidos por la mediana de expresión génica, utilizando la prueba de log-rank para determinar la significancia estadística.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software R, versión 4.2.2, asegurando así la reproducibilidad y calidad de los resultados.

4.7. Aspectos éticos

El Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Hospital Clínic de Barcelona y el del Hospital de Granollers aprobaron el proyecto y la utilización de muestras biológicas para el estudio mencionado. Todos los participantes que se encontraban vivos en la fecha de inicio del estudio proporcionaron su consentimiento informado por escrito, utilizando un formulario aprobado por el Comité de Ética de la Investigación con medicamentos. En los casos de muestras procedentes de pacientes fallecidos antes del inicio del estudio, se siguieron las disposiciones legales y éticas vigentes para el uso de material biológico retrospectivo, conforme a la aprobación del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos.

5. Resultados

5.1 Características de los Pacientes

Se analizaron un total de 134 pacientes consecutivos diagnosticados con CG o UGE en estadio avanzado. Las características demográficas y de la enfermedad para toda la cohorte de pacientes se resumen en la Tabla 6 mientras que los detalles específicos de los pacientes tratados con trastuzumab más quimioterapia se muestran en la Tabla 7.

Como resumen, el 78% de los pacientes eran hombres, con una edad media de 70 años al momento del diagnóstico. En cuanto al estado HER2, el 41% de los pacientes presentaban expresión IHQ 3+. Entre los tratados con trastuzumab más quimioterapia Tabla 7, la mayoría eran hombres (81%), con una edad mediana de 70 años, y una mayor proporción (72%) mostraba expresión HER2 IHQ 3+.

Características	Valor (N = 134)
Sexo masculino	104 (78%)
Edad mediana al diagnóstico de CG, años (rango)	70 (28-91)
Localización tumoral CG (Cáncer Gástrico)	98 (73%)
Localización tumoral UGE (Unión Gastroesofágica)	36 (27%)
Subtipo de Lauren: Intestinal	94 (70%)
Subtipo de Lauren: Difuso	38 (28%)
Subtipo de Lauren: NA	2 (2%)
Estado HER2 IHQ 0+	13 (10%)
Estado HER2 IHQ 1+	12 (9%)
Estado HER2 IHQ 2+/ISH-	24 (18%)
Estado HER2 IHQ 2+/ISH+	29 (22%)
Estado HER2 IHQ 3+	56 (41%)

Tabla 6. Características demográficas y de la enfermedad para todos los pacientes incluidos en el estudio.

Características	Valor (N = 58)
Sexo masculino	48 (83%)
Edad mediana al diagnóstico de CG, años (rango)	70 (28-86)
Estado funcional (ECOG) 0-1	38 (66%)
Estado funcional (ECOG) 2	18 (31%)
Estado funcional (ECOG) 3	2 (3%)
Localización tumoral CG (Cáncer Gástrico)	37 (64%)
Localización tumoral UGE (Unión Gastroesofágica)	21 (36%)
Subtipo de Lauren: Intestinal	52 (90%)
Subtipo de Lauren: Difuso	6 (10%)
Estado HER2 IHQ 2+/ISH+	15 (26%)
Estado HER2 IHQ 3+	42 (72%)
Estado HER2 IHQ NA/ISH+	1 (2%)
Primera línea con trastuzumab + quimioterapia	58 (100%)
Enfermedad metastásica al inicio de trastuzumab + quimioterapia	58 (100%)

Tabla 7. Características demográficas y de la enfermedad de los pacientes con CG avanzado HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia.

5.2 Expresión de mRNA de *ERBB2* en cáncer gástrico

La expresión de mRNA de *ERBB2* se evaluó en todas las muestras tumorales, independientemente del estado HER2. Se observó un amplio rango de niveles de expresión de mRNA de *ERBB2* (mediana log2: -0.75; rango intercuartil [IQR]: 1.26).

Como era de esperar, la expresión de *ERBB2* varió según las categorías de expresión HER2 IHQ (0, 1+, 2+ y 3+). Entre los casos de CG HER2+, se observaron niveles significativamente más altos de *ERBB2* en tumores con expresión IHQ 3+ en comparación con otras categorías, con una diferencia de 2.15 veces ($p < 0.001$). Notablemente, también se observó una considerable heterogeneidad en la expresión de *ERBB2* dentro del subgrupo de CG HER2 IHQ 3+ (IQR: 2.75) (Figura 5).

La expresión de mRNA de *ERBB2* se evaluó utilizando la plataforma nCounter en los distintos subgrupos definidos por la IHQ de HER2.

Los valores de p se calcularon mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), que permite comparar los niveles de expresión de *ERBB2* entre los diferentes grupos de pacientes clasificados según el estado de HER2, proporcionando así información sobre posibles diferencias significativas en la expresión génica relacionada con la clasificación IHQ/ISH.

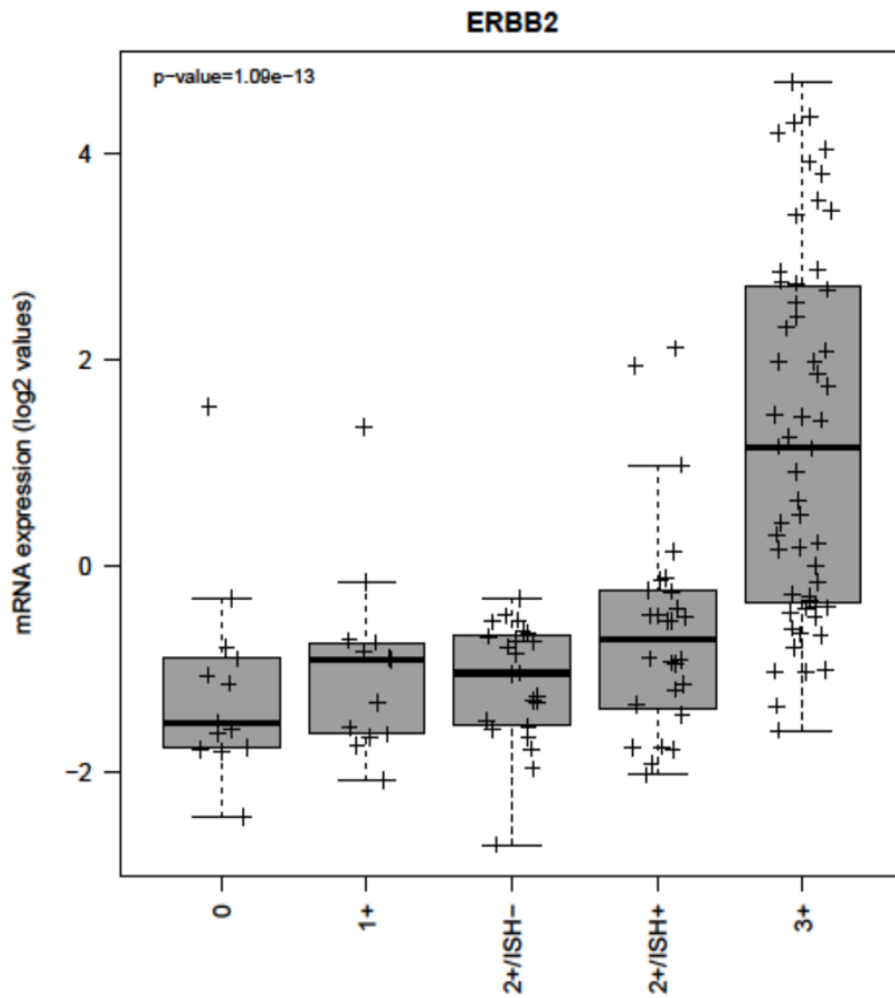


Figura 5. Expresión de mRNA de *ERBB2* en cáncer gástrico avanzado. La figura ilustra la correlación entre la expresión de mRNA de *ERBB2* (eje Y, escala log₂) y las categorías de IHQ para HER2, mostrando un incremento progresivo desde IHQ 0/1+ y 2+ ISH⁻, pasando por 2+ ISH⁺, hasta IHQ 3+, donde se observan los niveles más elevados.

5.3. Comparación de la expresión de *ERBB2* entre varios tipos de cáncer

Para contextualizar aún más la expresión de *ERBB2* en pacientes con CG avanzado, analizamos datos de 12 tipos de cáncer incluidos en TCGA. El CG exhibió la segunda expresión más alta de mRNA de *ERBB2* después del cáncer de mama (Figura 6).

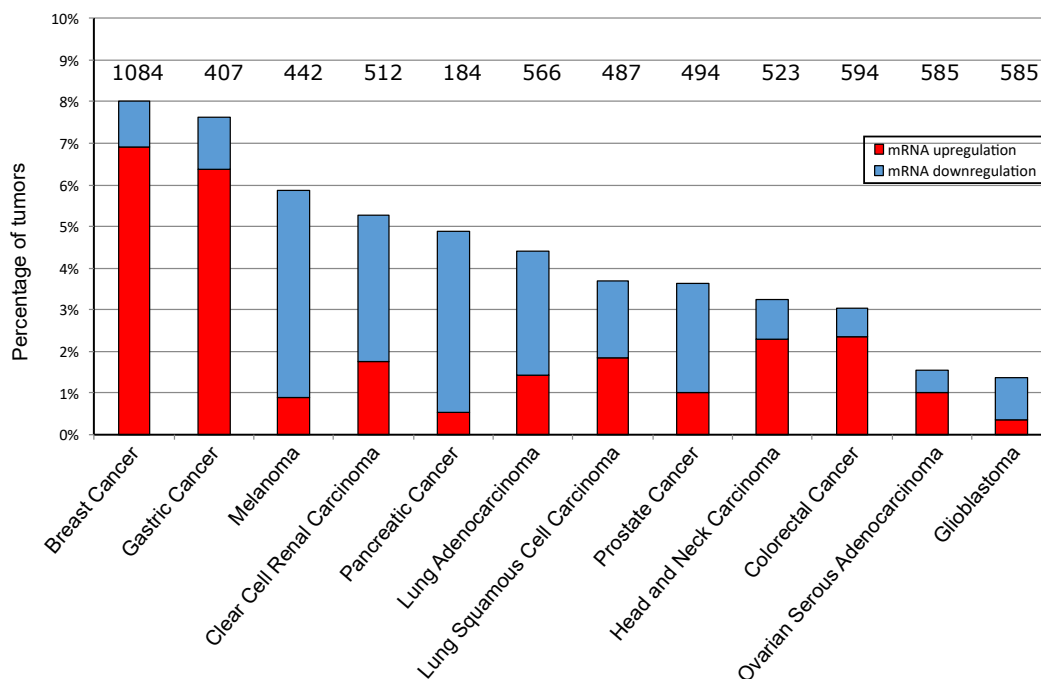


Figura 6. Porcentajes de tumores que presentan sobreexpresión o disminución en los niveles de mRNA de *ERBB2* en diferentes tipos de cáncer. La gráfica representa cada tipo de cáncer con dos colores: el azul indica la proporción de tumores que presentan sobreexpresión de *ERBB2* (niveles aumentados de mRNA), mientras que el rojo señala aquellos casos con expresión disminuida (niveles reducidos de mRNA). Se observa que el cáncer de mama y el CG presentan mayores porcentajes de tumores con sobreexpresión (barras rojas más altas), lo que resalta la importancia de *ERBB2* en estos tipos de cáncer.

Finalmente, al comparar los niveles de expresión de *ERBB2* entre los distintos niveles de HER2 por IHQ en ambos tipos de cáncer, se observó que la expresión de *ERBB2* fue significativamente mayor en el cáncer de mama que en el cáncer CG, con una diferencia de 4.6 veces ($p < 0.001$; Figura 7).

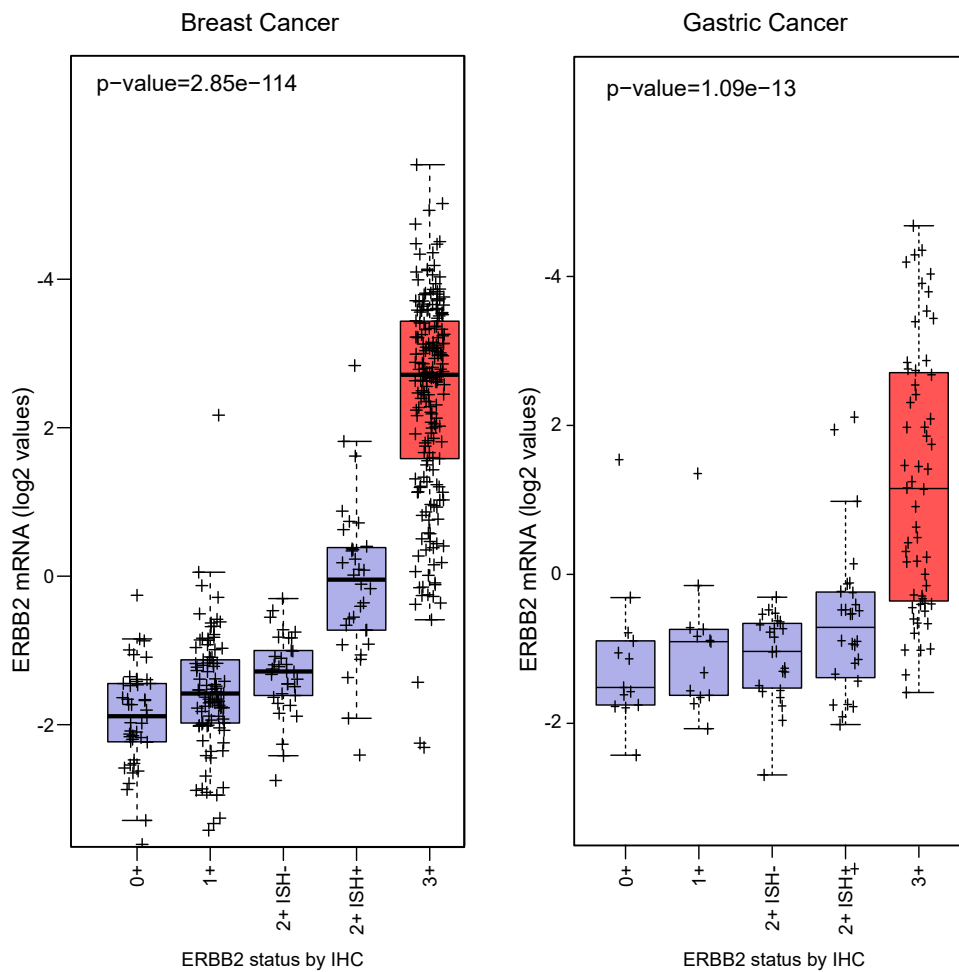


Figura 7. Comparación de los niveles de mRNA de *ERBB2* (en valores log2) en cáncer de mama (izquierda) y CG (derecha), estratificados según el estatus de HER2 determinado por IHQ y ISH. Los gráficos de cajas representan las categorías de IHQ: 0+, 1+, 2+/ISH-, 2+/ISH+, y 3+. En ambas neoplasias, la expresión de *ERBB2* aumenta progresivamente con el incremento de la puntuación de HER2 por IHQ, siendo notablemente mayor en los grupos 3+ (cajas rojas). La expresión de *ERBB2* en cáncer de mama fue significativamente más alta que en CG en cada categoría equivalente, con una diferencia global de 4.6 veces en el grupo 3+ ($p < 0.001$). Los valores individuales se muestran como puntos, y las medianas están indicadas por la línea central de cada caja. Los valores de p indican diferencias significativas entre los grupos comparados.

5.4 Expresión de PD-1 en cáncer gástrico

Analizamos los niveles de expresión de PD-1 (*PDCD1*) y *ERBB2* en CG/UGE utilizando datos del TCGA Pan-Cancer Atlas. De manera destacable, encontramos una correlación inversa moderada y altamente significativa entre la expresión de PD-1 y *ERBB2* (Pearson $r = -0.30$, $p = 6.64 \times 10^{-10}$; Spearman $r = -0.28$, $p = 9.03 \times 10^{-9}$) (Figura 8). Este resultado indica que los tumores con mayor expresión de *ERBB2* tienden a presentar niveles más bajos de expresión de PD-1, lo que sugiere una posible interacción relevante en la biología tumoral e inmunitaria.

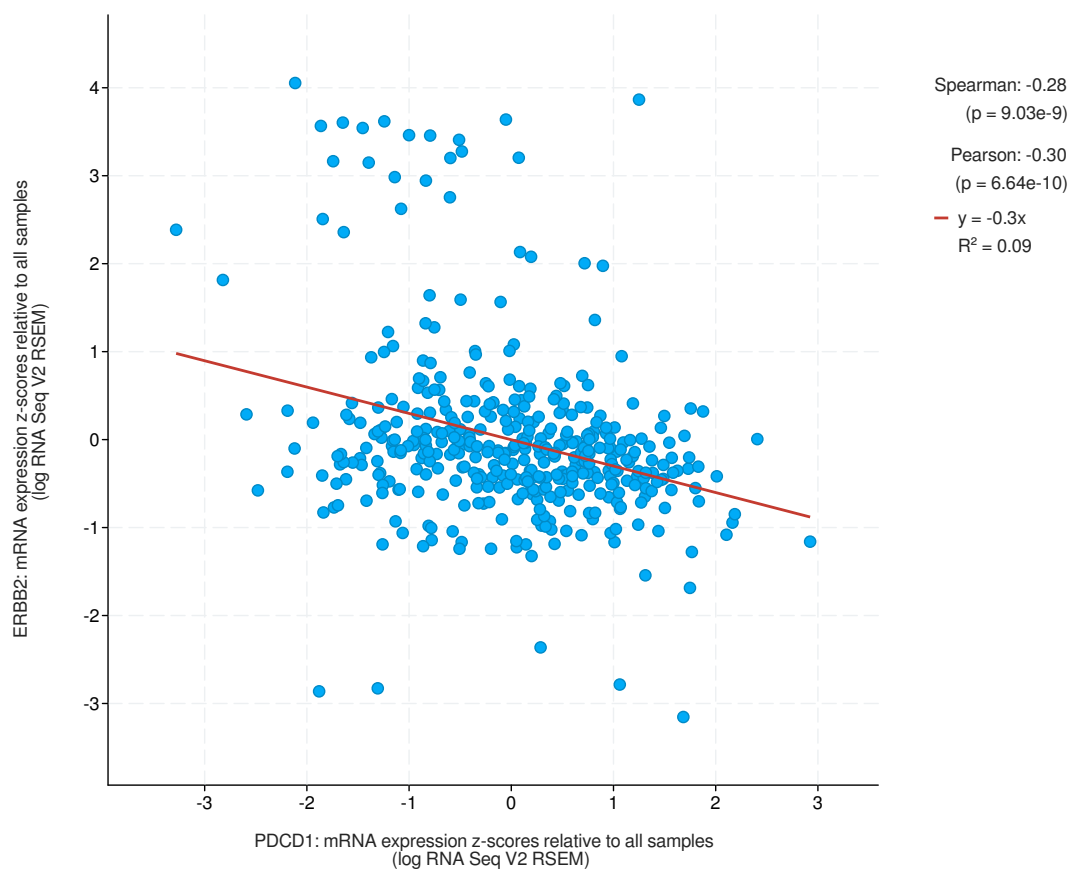


Figura 8. Dispersión de los z-scores de expresión de *PDCD1* (eje Y) frente a los de *ERBB2* (eje X), obtenidos por RNA-Seq. La gráfica muestra una correlación negativa significativa entre ambas variables (Pearson $r = -0.30$, $p = 6.64e-10$; Spearman $r = -0.28$, $p = 9.03e-9$). La línea de regresión ($y = -0.3x$, $R^2 = 0.09$) indica que niveles elevados de *ERBB2* se asocian con una reducción relativa de la expresión de *PDCD1*.

De forma similar, en nuestra cohorte de pacientes, se evaluaron los niveles de expresión de PD-1 (*PDCD1*) y HER2 en todos los casos. Como se muestra en la Figura 9, la expresión de PD-1, medida como valores de mRNA (\log_2), es significativamente menor en los tumores HER2 3+ en comparación con los grupos de menor expresión de HER2 (0+, 1+, 2+/ISH-, 2+/ISH+), con una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.048$). Este hallazgo confirma lo observado previamente en los datos del TCGA y sugiere una relación inversa entre la sobreexpresión de HER2 y los niveles de PD-1.

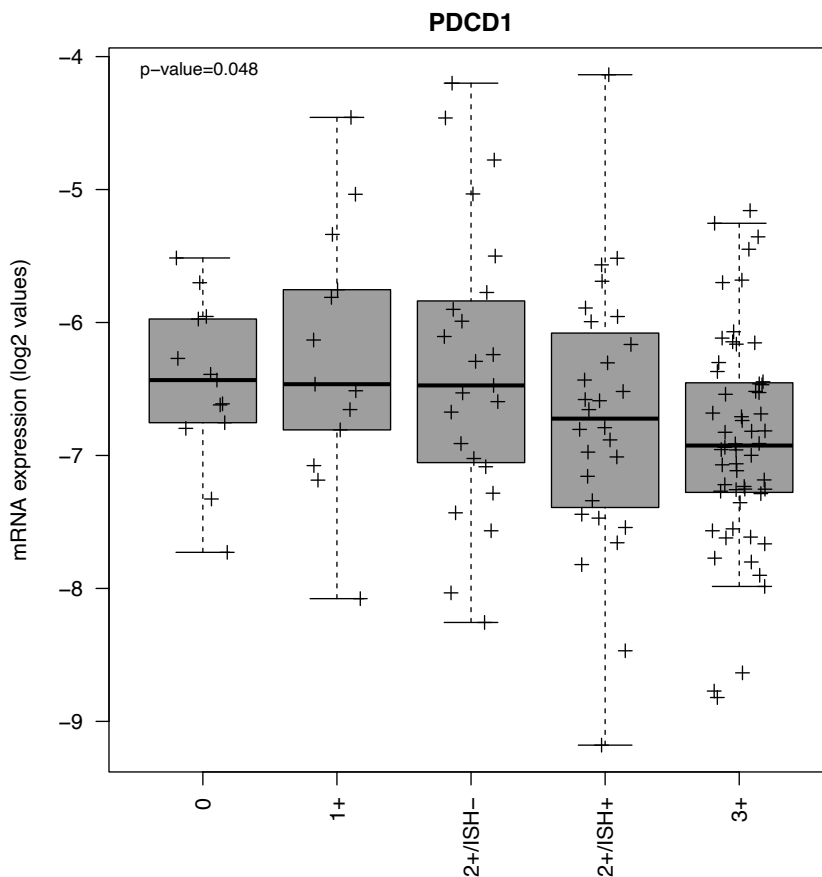


Figura 9. Niveles de expresión de mRNA de *PDCD1* estratificados según el estatus de HER2 determinado por IHQ. La figura ilustra la correlación entre la expresión de mRNA de *PDCD1* (eje Y, escala \log_2) y las categorías de IHQ para HER2, mostrando una disminución progresiva desde IHQ 0/1+ y 2+ ISH-, pasando por 2+ ISH+, hasta IHQ 3+, donde se observan los niveles más bajos de la expresión de *PDCD1* respecto a los demás grupos ($p = 0.048$).

5.5. Resultados clínicos en cáncer gástrico HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia

Entre los 134 pacientes con CG avanzado, 58 (43%) fueron clasificados como HER2+ y recibieron trastuzumab más quimioterapia de primera línea. Las características de los pacientes tratados se resumen en la Tabla 7. El seguimiento medio desde el inicio del tratamiento fue de 8.77 meses. Las medianas de SLP y SG fueron de 5.87 meses (IC del 95% = 1.43–8.1) y 9.33 meses (IC del 95% = 7.97–13.4), respectivamente. La tasa de respuesta fue del 38.6%.

5.6. Categorías de expresión de HER2DX *ERBB2* en cáncer gástrico HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia

Entre los 58 pacientes tratados con trastuzumab más quimioterapia, 42 (72%) tenían tumores HER2 IHQ 3+, 15 (26%) tenían tumores HER2 IHQ 2+/ISH+, y un paciente carecía de información de IHQ de HER2. La distribución de las categorías de expresión HER2DX *ERBB2*, usando los puntos de corte predefinidos del cáncer de mama, fue la siguiente: 44.8% baja, 19.0% media, y 36.2% alta (figura 10a).

En tumores HER2 IHQ 3+, la proporción de grupos HER2DX *ERBB2* baja, media y alta fue de 32.6%, 23.3%, y 44.2%, respectivamente. En contraste, entre tumores HER2 IHQ2+/ISH+, la distribución fue 85.7% baja, 7.1% media, y 7.1% alta (figura 10b).

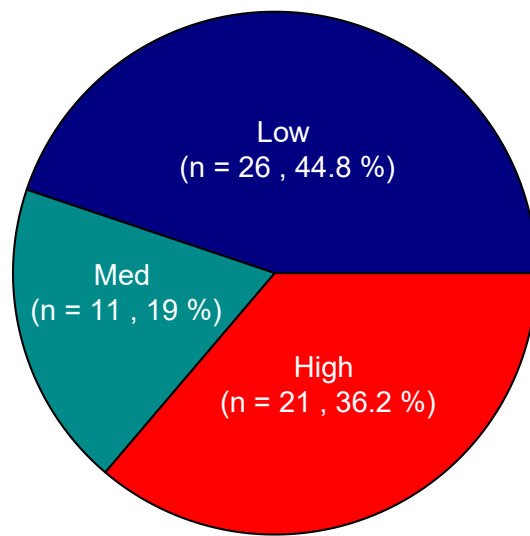
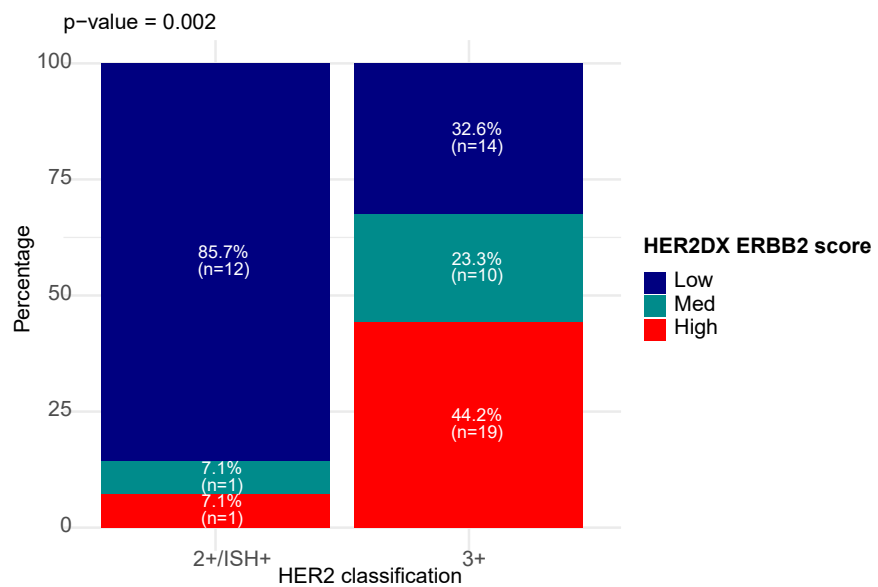
a**b**

Figura 10. Expresión del mRNA de *ERBB2* HER2DX en 58 pacientes con CG avanzado HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia.

(10a) Distribución de los grupos de puntuación de HER2DX *ERBB2* según los puntos de corte predefinidos en cáncer de mama.

(10b) Distribución de los grupos de puntuación de HER2DX *ERBB2* según la clasificación de IHQ HER2.

5.7. Asociación entre el puntaje HER2DX *ERBB2* y los resultados de supervivencia en cáncer gástrico avanzado HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia

Notablemente, el estado HER2 (es decir, HER2 IHQ 3+ versus IHQ 2+/ISH+) no se asoció significativamente ni con la SLP ($p = 0.12$) ni con la SG ($p = 0.088$). (Figura 11).

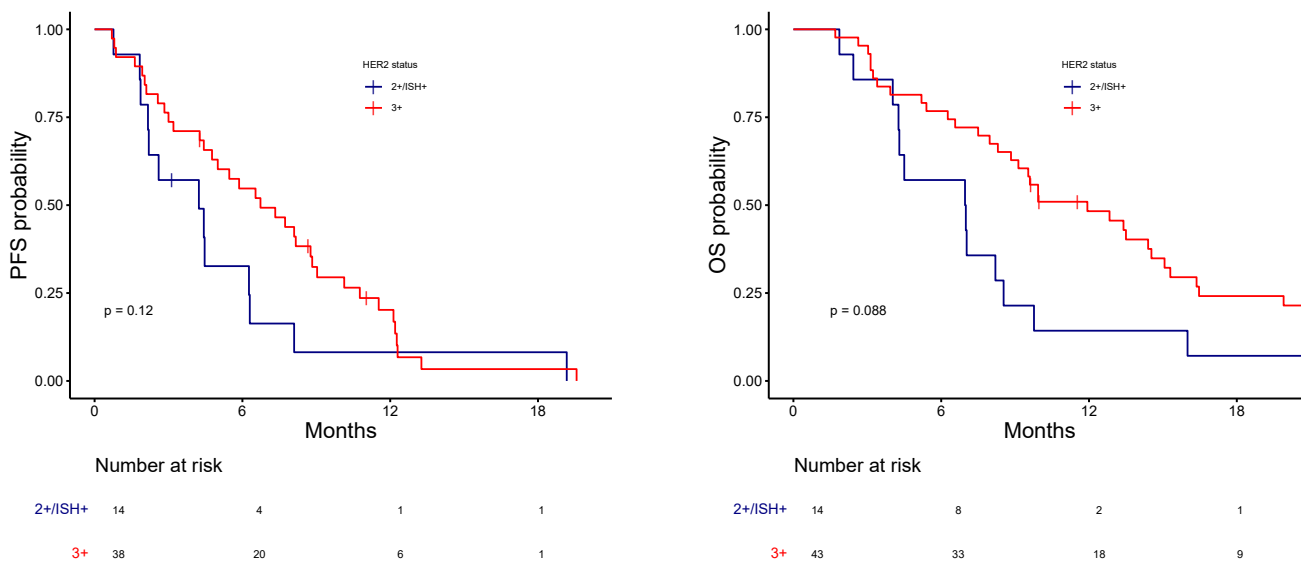


Figura 11. Supervivencia libre de progresión (panel de la izquierda) y supervivencia global (panel de la derecha) en función del estado HER2 (IHQ 3+ vs. 2+/ISH+) en pacientes con CG avanzado HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia.

En contraste, los niveles de mRNA de *ERBB2* medidos mediante HER2DX, se asociaron significativamente con SLP, tanto como variable continua (HR = 0,81, IC del 95% = 0,69–0,95 $p = 0,012$) como variable categórica. Los pacientes en el grupo con altos niveles de mRNA de *ERBB2* tuvieron una mediana de SLP de 8,1 meses, en comparación con 2,9 meses en el grupo de baja expresión (HR = 0,38, IC del 95% = 0,19–0,72, $p = 0,003$) (Figura 12). Estas asociaciones siguieron siendo estadísticamente significativas después de ajustar por el estado HER2 y otras variables clínicas, incluyendo sexo, edad, localización del tumor y estado de desempeño ECOG (Tabla 8).

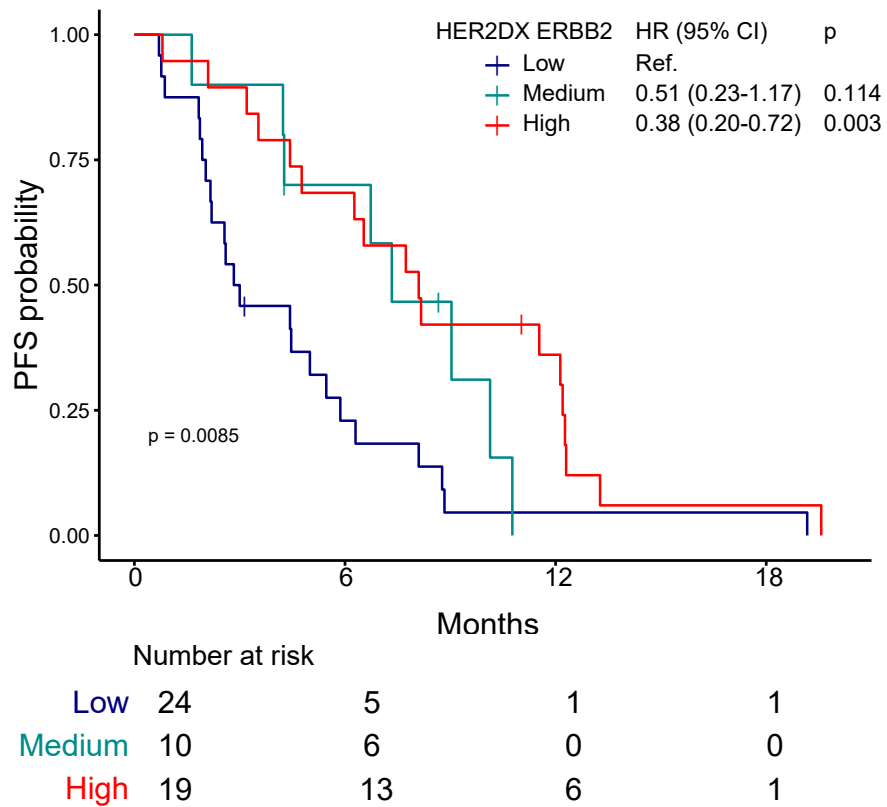


Figura 12. Asociación de los grupos de puntuación HER2DX *ERBB2* y la supervivencia libre de progresión en pacientes con CG avanzado HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia.

Variable	HR Univariado	IC 95% Univariado	p-valor Univariado	HR Multivariado	IC 95% Multivariado	p-valor Multivariado
Puntaje HER2DX <i>ERBB2</i> (variable continua)	0,81	0,69–0,95	0,012	0,77	0,61–0,97	0,025
HER2 IHQ (3+ vs 2+/ISH+)	0,59	0,31–1,14	0,117	1,11	0,49–2,51	0,802

Sexo (hombre vs mujer)	1,03	0,47–2,23	0,944	0,53	0,21–1,33	0,174
Edad	0,99	0,97–1,02	0,557	1,00	0,98–1,02	0,881
Localización (gástrico vs UGE)	1,11	0,62–1,98	0,730	0,75	0,37–1,51	0,415
ECOG	2,01	1,18–3,42	0,010	1,70	0,89–3,23	0,106

Tabla 8. Asociación del puntaje HER2DX *ERBB2* con la SLP en pacientes con CG avanzado HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia.

Se observó una asociación similar para SG. El grupo de alto mRNA de *ERBB2* tuvo una mediana de SG de 14,5 meses, en comparación con 6,8 meses en el grupo de baja expresión (HR = 0,43, IC del 95% = 0,23–0,81, p = 0,008). Como variable continua, los niveles más altos de mRNA de *ERBB2* también se asociaron significativamente con una mejora en SG (HR = 0,82, IC del 95% = 0,71–0,96, p = 0,011) (Figura 13). Estas asociaciones se mantuvieron robustas después de ajustar por el estado HER2 y covariables clínicas (Tabla 9).

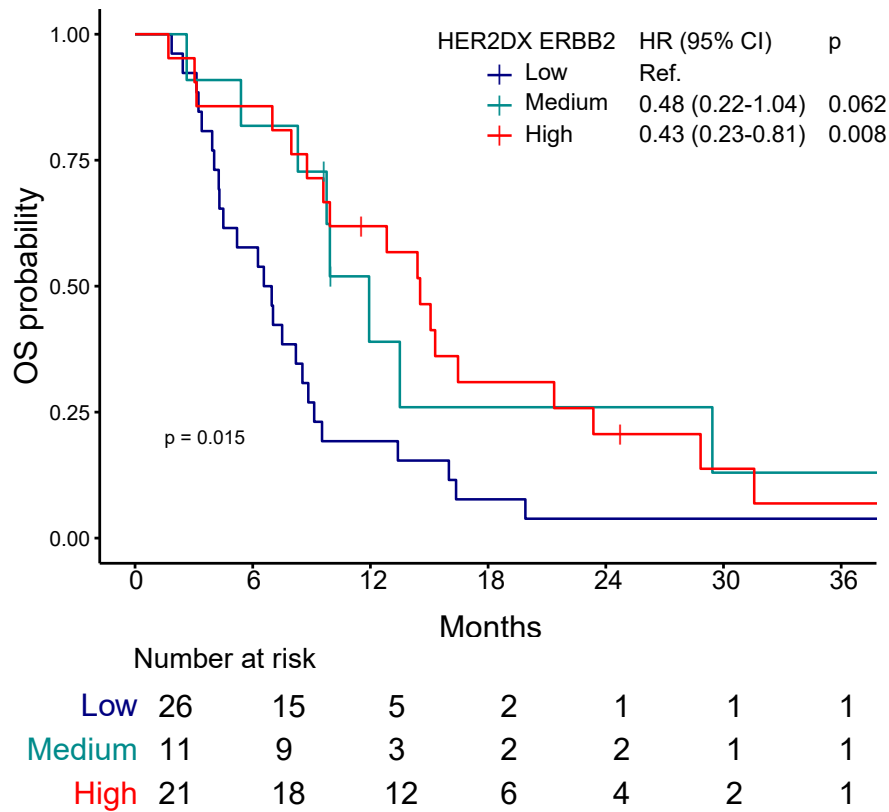


Figura 13. Asociación de los grupos de puntuación HER2DX *ERBB2* y la supervivencia global en pacientes con CG avanzado HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia.

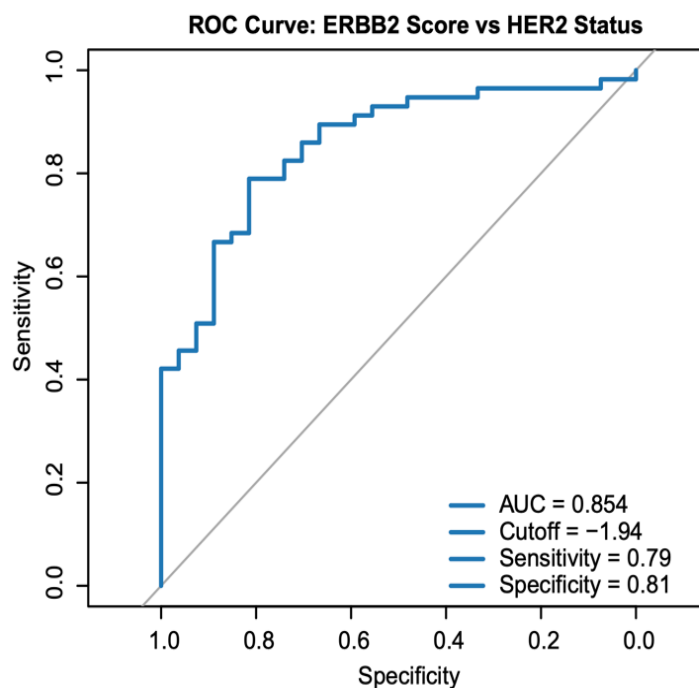
Variable	HR Univariado	IC 95% Univariado	Valor p Univariado	HR Multivariado	IC 95% Multivariable	Valor p Multivariable
Puntaje HER2DX <i>ERBB2</i> (variable continua)	0,43	0,23–0,81	0,008	0,77	0,62–0,97	0,023
HER2 IHQ (3+ vs 2+/ISH+)	0,58	0,30–1,10	0,093	1,04	0,47–2,31	0,928
Sexo (hombre vs mujer)	1,03	0,50–2,13	0,931	0,49	0,20–1,18	0,109
Edad	1,00	0,98–1,02	0,783	1,01	0,99–1,03	0,562

Localización (gástrico vs unión GE)	1,28	0,73–2,28	0,392	0,84	0,42–1,69	0,632
ECOG	1,80	1,10–2,94	0,019	1,50	0,86–2,61	0,151

Tabla 9. Asociación del puntaje HER2DX ERBB2 con la SG en pacientes con CG avanzado HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia.

Además, identificamos un punto de corte específico para CG que define la positividad de HER2, con un área bajo la curva ROC (AUC) de 0,854, una sensibilidad de 0,79 y una especificidad de 0.81 (Figura 14, a-b).

a



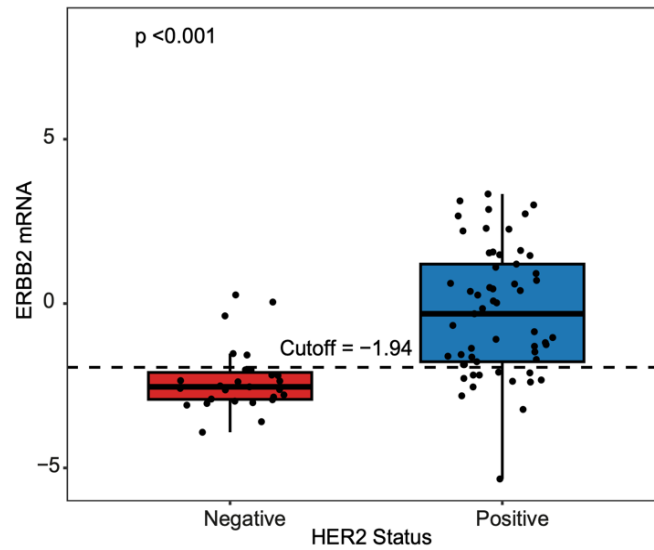
b

Figura 14. Discriminación y distribución del score *ERBB2* en relación con el estado HER2 en CG.

(a) Curva ROC que muestra la capacidad del score *ERBB2* para discriminar el estado HER2. El área bajo la curva (AUC) es 0.854, con un punto de corte de -1.94 , sensibilidad de 0.79 y especificidad de 0.81.

(b) Diagrama de caja que compara la expresión de mRNA de *ERBB2* entre tumores HER2 negativos y positivos, utilizando el punto de corte -1.94 . Se observa una diferencia significativa entre ambos grupos ($p < 0.001$).

Al aplicar este nuevo umbral, el 79,3% de los tumores HER2+ de nuestra cohorte fueron clasificados como *ERBB2*-alto y el 20,7% como *ERBB2*-bajo (Figura 15, panel de la izquierda). Es interesante destacar que los tumores *ERBB2*-bajo representaron el 50% de los casos con IHQ 2+/ISH+ y el 11,6% de los tumores con IHQ 3+ (Figura 15, panel de la derecha).

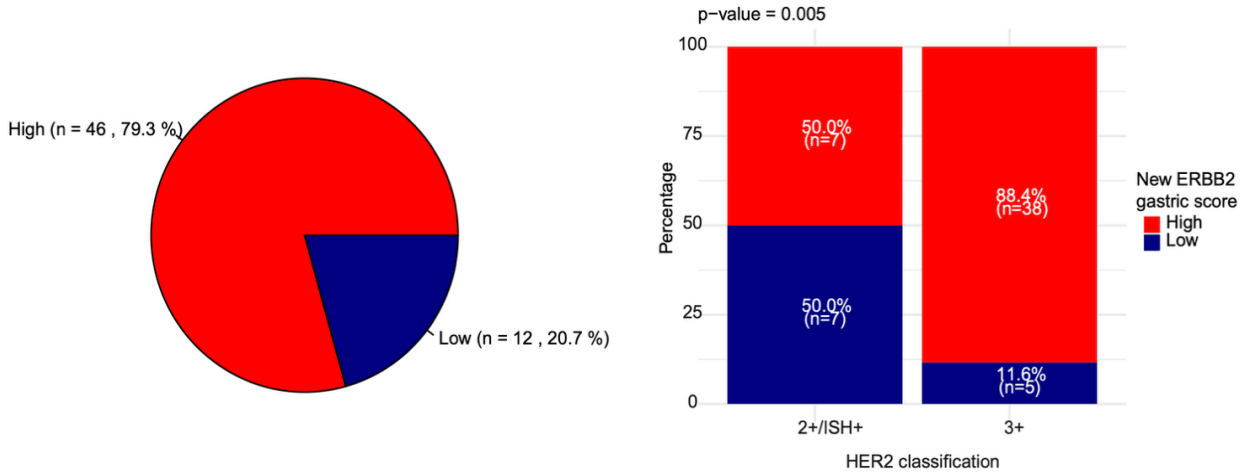


Figura 15. Distribución del nuevo punto de corte de *ERBB2* (alto/bajo) en CG.

De manera relevante, esta clasificación específica para CG mostró una asociación significativa con la SLP (HR alto vs bajo = 0,33, IC 95% = 0,16-0,69, p = 0,003) y la SG (HR alto vs bajo = 0,32, IC 95% = 0,16-0,63, p = 0,001) (Figura 16).

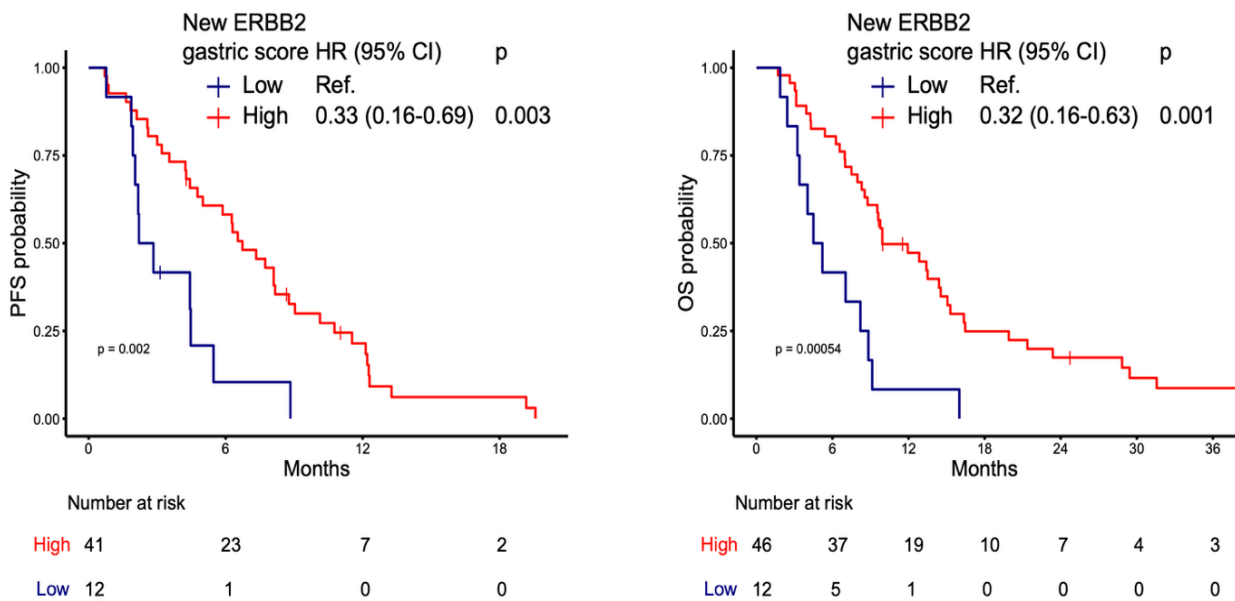


Figura 16. Asociación del nuevo punto de corte de *ERBB2* con el resultado de supervivencia en CG HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia. Panel de la izquierda: SLP. Panel de la derecha: SG.

Establecer este punto de corte adaptado al CG HER2+ representa un avance importante, ya que mejora la identificación de tumores HER2+ de acuerdo con sus características moleculares específicas, lo que se refleja en una discriminación más precisa y con impacto clínico, permitiendo correlacionar esta clasificación molecular con desenlaces clave como la supervivencia y facilitando la toma de decisiones terapéuticas personalizadas.

Puntaje HER2DX *ERBB2* y tasa de respuesta en CG HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia.

El puntaje HER2DX *ERBB2* también se asoció con la respuesta a trastuzumab más quimioterapia. La TRO fue del 23,1% en el grupo con *ERBB2* bajo, 45,5% en el grupo de *ERBB2* medio, y 55,0% en el grupo de *ERBB2* alto (Figura 17). Los pacientes en el grupo de alta expresión tenían significativamente más probabilidades de lograr una respuesta en comparación con el grupo de baja expresión (OR = 4,07, IC del 95% = 1,18–15,35, p = 0,030). Cuando se analizó como variable continua, el puntaje HER2DX *ERBB2* mostró una tendencia hacia tasas de respuesta más altas con el aumento de la expresión (OR = 1,33, IC del 95% = 1,01–1,82, p = 0,054).

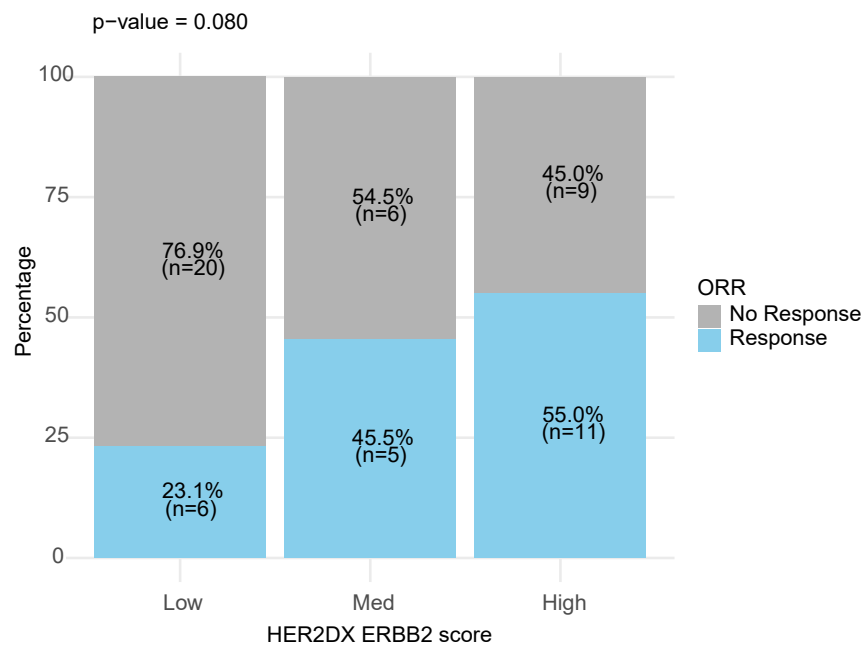


Figura 17. Tasa de respuesta objetiva (TRO) a trastuzumab más quimioterapia en pacientes con CG con *ERBB2* bajo, medio y alto.

5.8 Firmas moleculares adicionales del ensayo HER2DX incluida una firma inmunológica en cáncer gástrico avanzado HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia

Finalmente, exploramos características moleculares adicionales proporcionadas por el ensayo HER2DX, que incluyen el amplicón HER2, IGG, y firmas de proliferación. Entre estas, solo la firma del amplicón HER2 se asoció significativamente con SLP cuando se analizó como variable continua ($p = 0,024$) (Figura 18). Las firmas IGG (firma

inmunológica) y de proliferación no se asociaron significativamente con SLP o SG (Tablas 10 y 11).

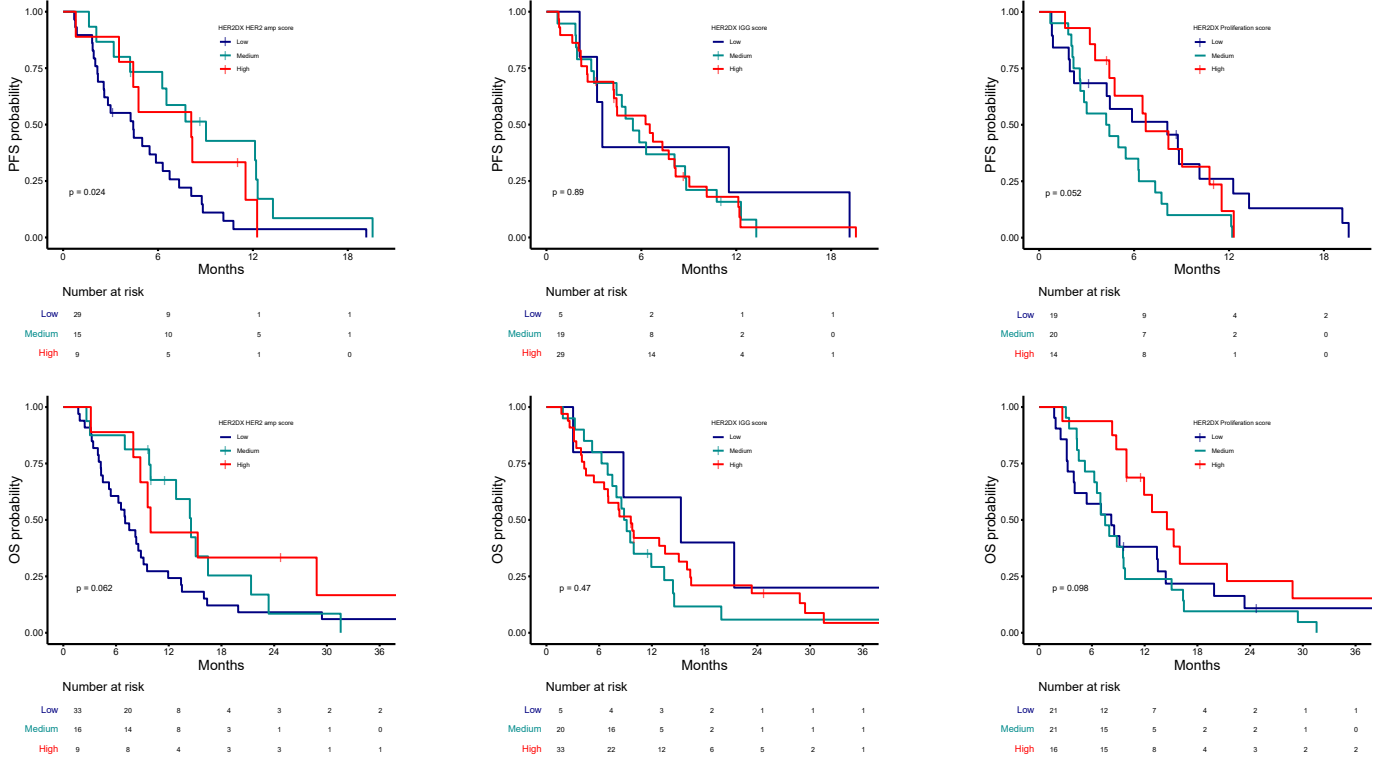


Figura 18. Asociación del amplicón de HER2 (panel izquierdo), Firma IGG (panel central) y firma de proliferación, con la supervivencia libre de progresión (paneles superiores) y la supervivencia global (paneles inferiores).

Tabla 10. Asociación de las firmas HER2DX como variables continuas y categóricas según umbrales preespecificados con la SLP en pacientes con CG HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia.

Firma HER2DX como variable continua

Firma HER2DX	HR	IC 95%	p-valor
IGG	1,00	0,99–1,01	0,901
Proliferación	1,01	0,99–1,02	0,333
HER2 amplicón	0,99	0,98–0,99	0,040
Luminal	1,01	0,97–1,06	0,532

Firma HER2DX como variable categórica

Firma HER2DX	Nivel	HR	IC 95%	p-valor
IGG	Bajo	Ref.		
	Medio	1.28	0,46–3,52	0,639
	Alto	1.24	0,47–3,31	0,667
Proliferación	Bajo	Ref.		
	Medio	2.23	1,09–4,56	0,028
	Alto	1.16	0,53–2,54	0,703
HER2 amplicón	Bajo	Ref.		
	Medio	0,40	0,20–0,81	0,010
	Alto	0,56	0,25–1,25	0,159

Tabla 11. Asociación de las firmas HER2DX como variables continuas y categóricas según umbrales preespecificados con la SLP en pacientes con CG HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia

Firma HER2DX como variable continua

Firma HER2DX	HR	IC 95%	Valor p
IGG	1,00	0,99-1,01	0,698
Proliferación	0,99	0,98-1,00	0,197
Amplificación HER2	0,99	0,98-1,00	0,059
Luminal	1,01	0,97-1,06	0,561

Firma HER2DX como variable categórica

Firma HER2DX	Grupo	HR	IC 95%	Valor p
IGG	Bajo	Ref.		
IGG	Medio	1,98	0,66-5,92	0,224
IGG	Alto	1,72	0,60-4,92	0,310
Proliferación	Bajo	Ref.		
Proliferación	Medio	1,18	0,62-2,22	0,617
Proliferación	Alto	0,56	0,27-1,15	0,114
Amplificación HER2	Bajo	Ref.		
Amplificación HER2	Medio	0,55	0,29-1,01	0,070
Amplificación HER2	Alto	0,46	0,20-1,05	0,066

5.9 Asociación entre los niveles de expresión de PD-1 y los resultados de supervivencia y tasa de respuesta en CG avanzado HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia

Se analizó la relación del gen inmune *PDCD1* (PD1) con la supervivencia en pacientes con CG HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia. Para ello, los pacientes se dividieron en dos grupos de expresión alta y baja de *PDCD1* según la mediana de expresión del gen. Al comparar la SLP entre ambos grupos mediante curvas de Kaplan-Meier, no se observó una diferencia significativa, con un valor de p por log-rank de 0.674 (Figura 19). Esto indica que la expresión de *PDCD1* no se asoció a cambios relevantes en la SLP dentro de esta cohorte, mostrando ambas curvas una evolución muy similar.

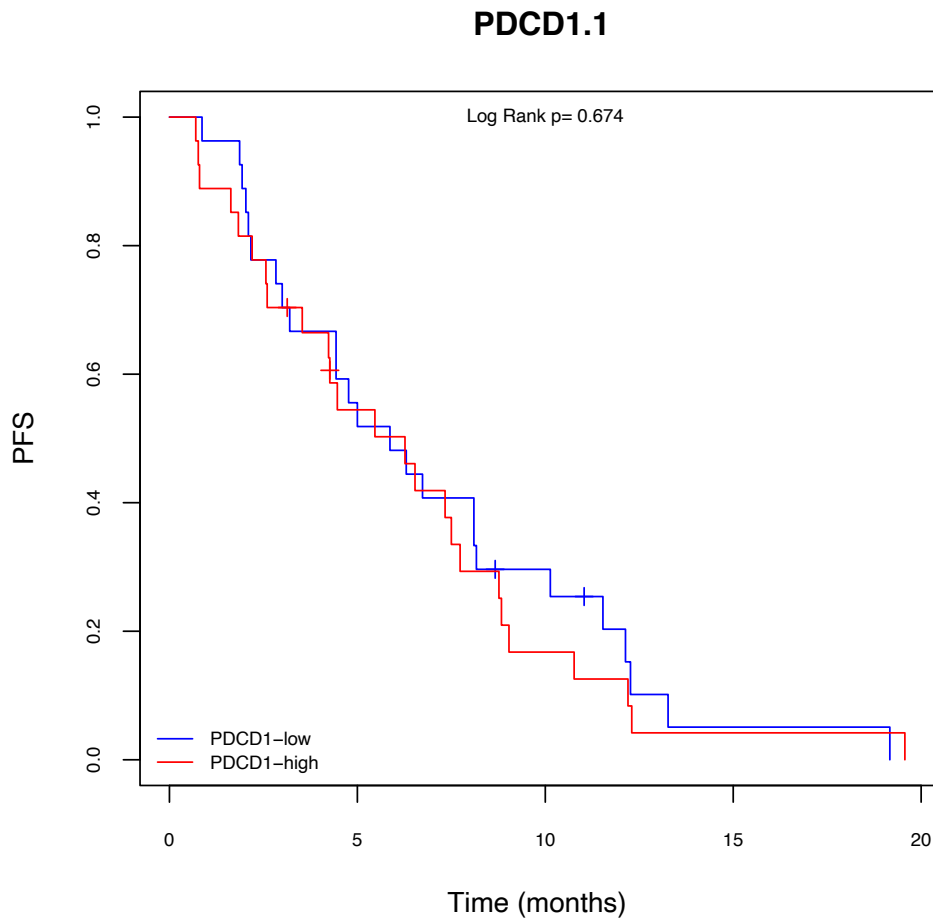


Figura 19. SLP según la expresión de *PDCD1*, definida por la mediana, en pacientes con CG avanzado HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia

Adicionalmente, se analizó la relación del gen inmune *PDCD1* (PD1) con la SG en pacientes con CG HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia. Los pacientes fueron agrupados en función de niveles altos y bajos de expresión de *PDCD1*, definidos según la mediana de expresión del gen. Al comparar la SG entre ambos grupos mediante curvas de Kaplan-Meier, no se observaron diferencias significativas, con un valor de p por log-rank de 0,465 (figura 20). Esto sugiere que la expresión de *PDCD1* no se asoció con variaciones relevantes en la SG en esta cohorte de pacientes.

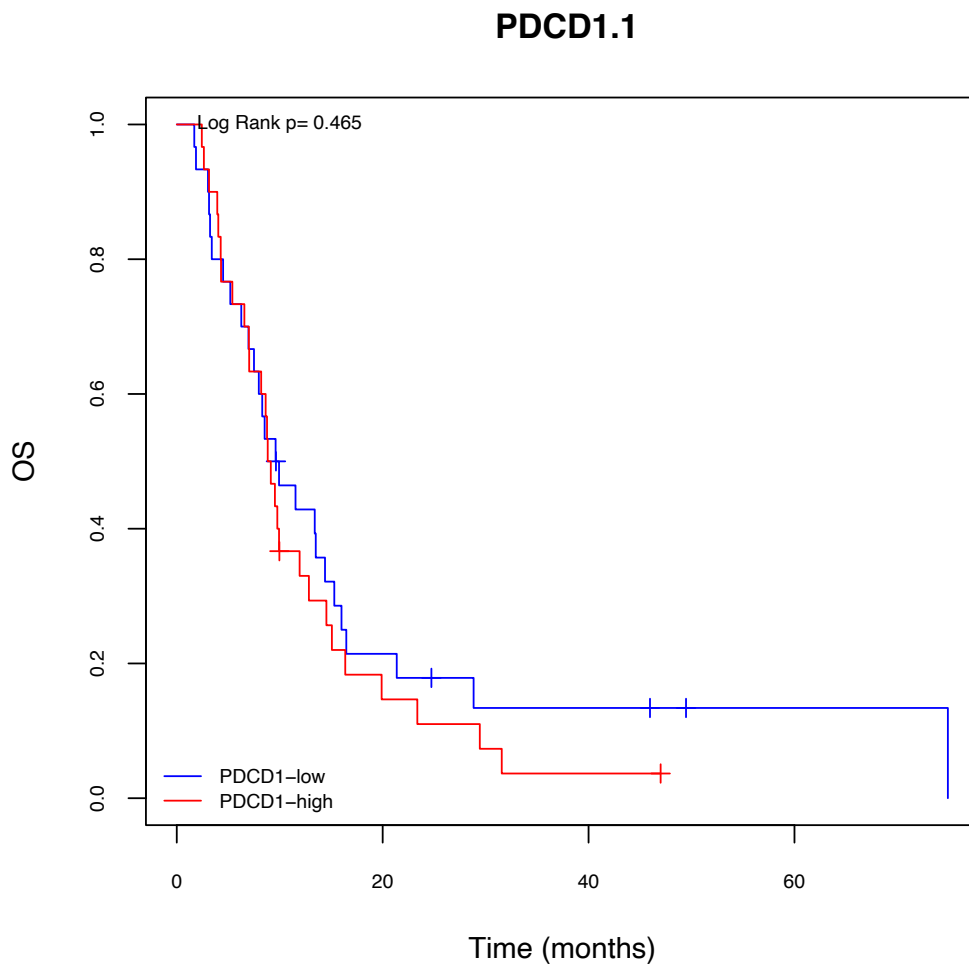


Figura 20. SG según la expresión de *PDCD1*, definida por la mediana, en pacientes con CG avanzado HER2+ tratado con trastuzumab más quimioterapia

Finalmente, se compararon los niveles de expresión de *PDCD1* (expresados como valores log2 de mRNA) según la mejor respuesta clínica en pacientes con CG HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia. El análisis reveló que la expresión de *PDCD1* no mostró una asociación significativa con la mejor respuesta clínica en esta cohorte de pacientes bajo el régimen terapéutico evaluado (Figura 21).

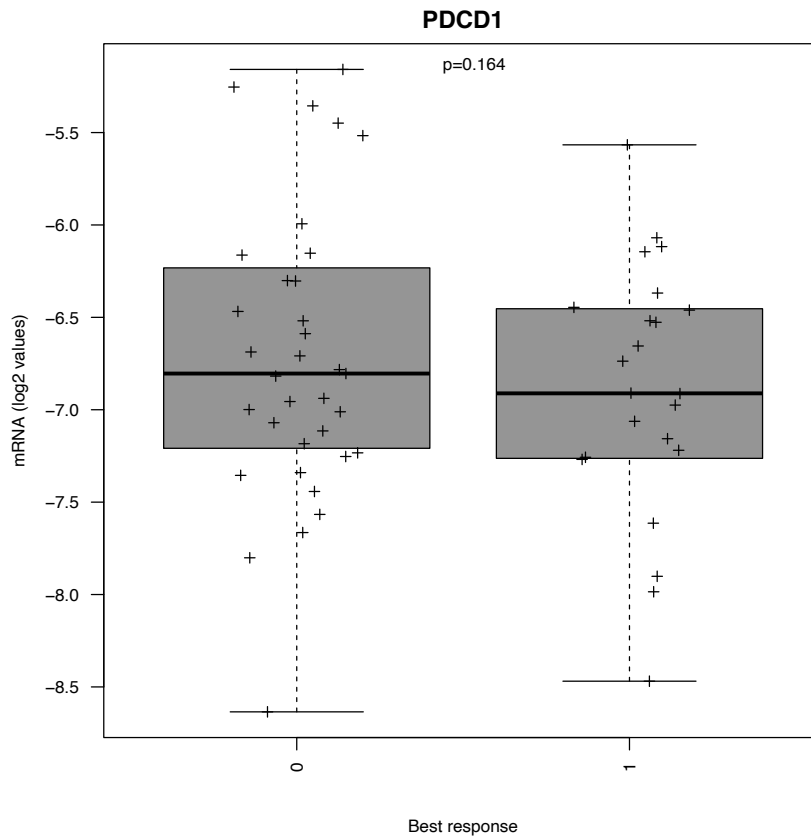


Figura 21. Niveles de expresión de *PDCD1* y respuesta clínica en pacientes con CG HER2+ tratados con trastuzumab más quimioterapia. El eje y muestra los valores de mRNA de *PDCD1* (log2), y el eje x representa la mejor respuesta clínica obtenida tras el tratamiento (0 = sin respuesta, 1 = respuesta parcial o completa). Aunque se observa una tendencia en los datos, el análisis estadístico no evidenció diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0,164$), indicando que la expresión de *PDCD1* no se relaciona de manera significativa con la tasa de respuesta clínica en esta cohorte de pacientes.

6. Discusión

En los últimos años, el panorama terapéutico de las estrategias dirigidas contra HER2 en CG ha experimentado una notable transformación, convirtiendo un escenario previamente asociado a un pronóstico desfavorable en una enfermedad con alternativas terapéuticas cada vez más efectivas y personalizables (58,186).

En este contexto, el avance en el desarrollo de nuevas opciones de tratamiento se ha visto acompañado por la creciente y urgente necesidad de identificar biomarcadores robustos, precisos y reproducibles. La detección e implementación de estos biomarcadores resulta fundamental no solo para anticipar la respuesta individual a las distintas terapias dirigidas, sino también para optimizar la selección de pacientes, asegurando así un abordaje verdaderamente personalizado y alineado con los principios de la oncología de precisión (187).

Este reto adquiere una especial relevancia en el contexto del CG y de la UGE HER2+, donde la complejidad radica en una marcada heterogeneidad, tanto genómica como fenotípica, que introduce múltiples dificultades en la adecuada selección de los pacientes y, en consecuencia, en la toma de decisiones terapéuticas (161). La heterogeneidad en la expresión y amplificación de HER2 en el CG representa un obstáculo fundamental para el éxito de las estrategias terapéuticas anti HER2.

Por ejemplo, la eficacia de los tratamientos dirigidos a HER2, como la combinación de trastuzumab con quimioterapia, depende en gran medida de cómo se distribuye la proteína HER2 dentro del tumor. Cuando el tumor presenta una heterogeneidad intratumoral significativa, es decir, cuando la expresión de HER2 varía entre diferentes regiones dentro del mismo tumor, los resultados clínicos suelen ser peores. Esta heterogeneidad puede limitar tanto la respuesta a trastuzumab como a trastuzumab deruxtecan, aunque este último ofrece ventajas clínicas gracias a su mecanismo de acción.

Trastuzumab deruxtecan es un anticuerpo conjugado que posee una alta relación fármaco-anticuerpo y un payload citotóxico altamente permeable, lo que le permite penetrar y destruir células cercanas independientemente de que tengan una alta expresión de HER2. Por ello, trastuzumab deruxtecan puede resultar activo incluso en tumores con expresión baja o heterogénea de HER2, superando parcialmente las barreras impuestas por la

heterogeneidad tumoral y mejorando la eficacia frente a otras terapias dirigidas exclusivamente a HER2 (62,71,188). No obstante, la evidencia indica que la respuesta terapéutica es mayor en tumores con expresión homogénea y alta de HER2, donde el fármaco puede ejercer su máxima acción. Por este motivo, se recomienda realizar una reevaluación del estatus HER2 mediante biopsias adicionales tras la progresión de la enfermedad, además de una cuantificación precisa de la expresión de HER2.

Sin embargo, los métodos clásicos para determinar la positividad HER2, como la IHQ y la ISH, no siempre capturan la complejidad de la heterogeneidad tumoral y pueden no ser suficientemente precisos para predecir la respuesta clínica real. Así, existe la necesidad de incorporar tecnologías más sensibles y biomarcadores más sofisticados que permitan una mejor selección y estratificación de los pacientes y predecir el beneficio clínico de los fármacos anti-HER2 (153,157,160,161).

Los estudios demuestran que los pacientes con tumores homogéneamente HER2+ presentan una mayor SLP y SG tras tratamiento con trastuzumab, en comparación con aquellos tumores con alta heterogeneidad (155,156). Además, la proporción de células HER2+ y el grado de amplificación génica son factores predictivos de beneficio clínico; se ha sugerido que al menos un 40% de células HER2+ y una relación de amplificación ≥ 3 optimizan la selección de pacientes (156)

En consecuencia, la búsqueda de métodos diagnósticos más sofisticados se ha traducido en el desarrollo e integración de biomarcadores innovadores, cuyo potencial reside en ofrecer una caracterización más integral del estado tumoral y una mejor selección de los pacientes candidatos a tratamientos anti-HER2.

Actualmente, existe mucha investigación en este contexto; así, la cuantificación precisa de los niveles proteicos de HER2 mediante proteómica basada en espectrometría de masas ha alcanzado un especial protagonismo. Diversos trabajos han señalado que pacientes con niveles superiores a determinados umbrales (por ejemplo, 1825 atomoles (amol)/microgramo (μg)) logran resultados clínicos significativamente superiores con trastuzumab, incluso dentro de subgrupos clasificados como positivos por IHQ/ISH, lo que denota la importancia de la valoración cuantitativa sobre la cualitativa en oncología molecular (189). Adicionalmente, el método de monitoreo de reacción paralela por espectrometría de masas (PRM-MS, por sus siglas en inglés) también ha demostrado alta

sensibilidad, y reproducibilidad para la cuantificación de HER2 y otros marcadores en muestras clínicas (190,191). En estudios recientes, estos métodos han permitido establecer puntos de corte cuantitativos para la selección de pacientes candidatos a terapias anti-HER2, y han mostrado alta concordancia con los métodos convencionales (190–193).

A esto se suma la utilidad de la NGS y el análisis del ADN tumoral circulante (ctDNA), herramientas que permiten identificar la amplificación génica de *ERBB2* con una buena sensibilidad y especificidad. La evidencia actual señala que una alta amplificación génica se traduce en una mejor respuesta a terapias anti-HER2, mientras que los casos de amplificación de bajo nivel experimentan beneficios considerablemente menores. Este hallazgo refuerza la hipótesis de que el espectro de la activación de HER2 es, en sí mismo, heterogéneo y que la selección estricta basada en un umbral cuantitativo podría mejorar los resultados clínicos (194,195).

Por otra parte, el concepto de resistencia primaria a terapias anti-HER2 ha cobrado relevancia con la identificación de co-alteraciones genéticas en genes incluidos en el denominado panel AMNESIA—tales como EGFR, MET, KRAS y elementos de la vía PI3K, cuya presencia se asocia sistemáticamente con una menor probabilidad de respuesta, mientras que su ausencia confiere mayor sensibilidad al tratamiento dirigido (196). Además, la investigación traslacional se está volcando en la caracterización de nuevos perfiles de expresión génica; en particular, niveles elevados de HAS2 y SHB se están evaluando como prometedores predictores de sensibilidad a trastuzumab, aunque tales aproximaciones precisan de una mayor validación en cohortes independientes (197).

En el terreno de la IHQ avanzada, la exploración específica del epítipo de la región extracelular de HER2, reconocida por trastuzumab, está emergiendo como estrategia complementaria que podría incrementar la precisión predictiva sobre las técnicas convencionales. A diferencia de la IHQ convencional, que suele emplear anticuerpos dirigidos contra el dominio intracelular de HER2, la IHQ basada en el epítipo de trastuzumab evalúa directamente la fracción proteica que es el blanco terapéutico, permitiendo una correlación más estrecha con la respuesta clínica al tratamiento anti-HER2 (198). La IHQ con anticuerpos que mimetizan el sitio de unión de trastuzumab ha demostrado que la intensidad de la tinción ($\geq 2+$) se asocia significativamente con mejor

supervivencia libre de progresión y supervivencia global en pacientes tratados con trastuzumab, superando la capacidad predictiva de las técnicas convencionales basadas en IHQ estándar o ISH (198).

Desde una perspectiva integral, estos biomarcadores están siendo sometidos a una investigación intensiva, y ya influyen de manera progresiva en la selección de pacientes y en la optimización de las estrategias terapéuticas personalizadas en pacientes con CG avanzado HER2+. Paralelamente, la revolución de la oncología traslacional se apoya cada vez más en la integración de enfoques moleculares como el perfil de expresión del mRNA de *ERBB2*, el cual promete ofrecer una estratificación de pacientes más afinada y fundamentar decisiones verdaderamente individualizadas (76,156,199).

Un claro ejemplo de la tendencia hacia la personalización y la precisión en el diagnóstico molecular es la introducción del test HER2DX, desarrollado en 2022. Este innovador test no solo analiza la expresión de 27 genes clave, sino que también integra diversas características clínicas del paciente, lo que permite una evaluación más integral y precisa del perfil tumoral. HER2DX fue diseñado y validado inicialmente en el contexto del cáncer de mama HER2+, proponiendo una cuantificación continua y ortogonal de la expresión de mRNA de *ERBB2*. Esta técnica muestra una correlación robusta con los niveles proteicos de HER2 determinados por las técnicas convencionales. Gracias a esta aproximación multifacética, HER2DX puede reflejar con mayor fidelidad la biología tumoral y ayudarnos tanto en la predicción de respuesta terapéutica como en el pronóstico clínico de los pacientes (163,174–176,178,180,181,200).

Los puntos de corte para el score de HER2DX se definieron utilizando una cohorte sólida de 637 pacientes con cáncer de mama, que incluía tanto casos HER2-positivos como HER2-negativos y empleó los criterios diagnósticos internacionalmente aceptados por ASCO/CAP. Según esta clasificación, un valor por debajo de 33 en el score HER2DX *ERBB2* indica una expresión baja del gen *ERBB2* (“HER2DX *ERBB2*-bajo”), mientras que un valor por encima de 51 corresponde a una expresión alta (“HER2DX *ERBB2*-alto”). Por su parte, los pacientes cuyos resultados se encuentran en el intervalo medio (entre 33 y 51) se consideran de expresión intermedia. Esta estratificación facilita una interpretación más matizada del estatus HER2, permitiendo identificar grupos de

pacientes con diferentes perfiles biológicos y potenciales de respuesta a las terapias dirigidas (174,175).

La aplicabilidad clínica de esta estratificación reside en que los tumores HER2DX *ERBB2*-bajo presentan menor sensibilidad a terapia anti-HER2, mientras que los subgrupos medio y alto muestran un beneficio superior y, por tanto, son los candidatos ideales para el tratamiento dirigido.

En el contexto del cáncer de mama metastásico, HER2DX ha demostrado que la expresión de *ERBB2* mRNA, medida por esta prueba, se asocia de manera significativa con la respuesta objetiva y la supervivencia tras el tratamiento con T-DM1. Los pacientes que presentan niveles elevados de *ERBB2* mRNA experimentan tasas superiores de respuesta y mejores desenlaces en cuanto a SLP y SG, independientemente de los resultados de la IHQ para HER2, el estado hormonal, la edad, la presencia de metástasis cerebrales o la línea de tratamiento administrada (163).

Además, el test HER2DX incorpora la evaluación de siete genes inmunorelacionados—CD8A, CXCL9, CCL5, CXCL13, IGKC, CD274 (que codifica PD-L1) y STAT1—, los cuales conforman una firma molecular asociada al infiltrado inmune tumoral. Esta firma inmune se combina en la prueba con otras firmas genéticas relevantes, como las relacionadas con la proliferación celular, la diferenciación luminal, y la expresión del amplicón *ERBB2*. Gracias a esta integración de múltiples dimensiones biológicas, HER2DX permite una estratificación pronóstica mucho más precisa y mejora la capacidad de predecir qué pacientes responderán favorablemente a las terapias anti-HER2. Aunque el desarrollo y validación clínica del test se ha centrado principalmente en el cáncer de mama HER2+, sus fundamentos y utilidad ofrecen un enorme potencial para ampliar su aplicación en otros tumores HER2+, incluido el CG, donde la caracterización molecular y la respuesta a tratamientos dirigidos siguen siendo un desafío clínico importante (163,174,175).

En nuestra cohorte de pacientes, no se identificaron asociaciones estadísticamente significativas entre la expresión de la firma inmune incluida en HER2DX y los desenlaces clínicos analizados, como la respuesta al tratamiento o supervivencia. Al examinar de manera individual la expresión de PD-1, tampoco se observaron correlaciones relevantes

con los resultados clínicos. Estos hallazgos sugieren que, al menos en nuestra población, ni la firma inmune de la prueba HER2DX ni la expresión aislada de PD-1 parecen aportar valor predictivo o pronóstico. Una posible explicación para esta ausencia de significación estadística podría estar relacionada con el tamaño limitado de la muestra analizada, lo que puede reducir la potencia estadística y dificultar la detección de asociaciones robustas. Por tanto, será necesario realizar estudios en cohortes más grandes y variadas que permitan validar estos resultados y definir el verdadero aporte de la firma inmune del HER2DX y de PD-1 como biomarcadores clínicos en este contexto.

A pesar de estos hallazgos, es fundamental resaltar que la integración de estos genes inmunológicos en el panel permite capturar la compleja heterogeneidad biológica y la dinámica de la interacción tumor-inmunidad, elementos considerados claves para la selección de estrategias terapéuticas personalizadas. Este enfoque multidimensional podría ser particularmente relevante a medida que se desarrollan nuevas combinaciones o secuencias de tratamientos dirigidos e inmunoterapias, lo que subraya la importancia de seguir investigando estos marcadores en distintos contextos clínicos poblacionales (174–176).

No obstante, aunque la validez pronóstica y predictiva del score HER2DX *ERBB2* se ha confirmado extensamente en cáncer de mama, su extrapolación al CG HER2+ plantea interrogantes aún no resueltos.

Esta investigación representa el primer análisis que explora la utilidad clínica de la medición de la expresión de mRNA de *ERBB2* mediante la prueba HER2DX, utilizando la plataforma nCounter, en una cohorte de pacientes con CG/UGE avanzado HER2+ tratados con la combinación de trastuzumab y quimioterapia. Este estudio aporta una perspectiva innovadora a la literatura existente, al aplicar una tecnología molecular de vanguardia en un contexto clínico real, permitiendo así evaluar el valor de la prueba HER2DX más allá del cáncer de mama y en una indicación donde la caracterización molecular y la selección óptima de pacientes siguen siendo retos significativos. Los resultados obtenidos contribuyen a orientar futuras estrategias de estratificación y personalización terapéutica en tumores HER2+.

Es relevante señalar que, aunque el cáncer de mama y el CG HER2+ difieren biológica y clínicamente, en ambos casos, los pacientes con niveles bajos de *ERBB2* (*ERBB2*-low) presentan un pronóstico desfavorable.

Asimismo, la distribución de grupos según score HER2DX en CG difiere significativamente del cáncer de mama: en el CG se observa una mayor proporción de casos en el grupo *ERBB2*-low, fenómeno congruente con la reconocida mayor heterogeneidad molecular del CG HER2+, lo que podría explicar en parte, la poca respuesta al tratamiento anti HER2 en CG frente al cáncer de mama.

En pacientes con CG HER2+, varios fármacos anti-HER2 han fallado en ensayos clínicos al no demostrar beneficio clínico significativo en supervivencia (66,67,69).

En pacientes con CG HER2+ en progresión a primera línea, la continuación del tratamiento con trastuzumab y paclitaxel no logró prolongar la supervivencia en comparación con paclitaxel en monoterapia (70). Asimismo, la combinación de pertuzumab con trastuzumab y quimioterapia en la primera línea terapéutica tampoco logró mejorar significativamente la supervivencia global ni la supervivencia libre de progresión (201).

De forma similar, el uso de lapatinib asociado a quimioterapia, tanto en pacientes que no habían recibido previamente trastuzumab como primera o segunda línea, no ofreció ventajas respecto a placebo o quimioterapia sola, respectivamente (68,69).

Por último, el uso de T-DM1 tampoco no mejoró la supervivencia ni la respuesta clínica respecto a los taxanos en pacientes con CG HER2+ previamente tratado (202).

Esta situación contrasta con el cáncer de mama HER2+, en el que numerosos agentes dirigidos contra HER2, como trastuzumab, pertuzumab, margetuximab, T-DM1, trastuzumab deruxtecan, lapatinib, neratinib y tucatinib, han demostrado de manera consistente beneficios clínicos significativos y han sido aprobados para su uso terapéutico (203).

La falta de beneficio de los fármacos anti HER2 mencionados en CG HER2+ se atribuye, en parte, a la heterogeneidad biológica y a mecanismos de resistencia específicos de este tumor (117,204–207).

Un ejemplo destacado es el ensayo clínico GATSBY, estudio internacional, aleatorizado y abierto de fase 2/3, que comparó T-DM1 con taxanos (docetaxel o paclitaxel) en pacientes con adenocarcinoma gástrico o de la UGE localmente avanzado o metastásico, HER2+ y previamente tratados. El objetivo primario fue evaluar la SG. Los resultados mostraron que T-DM1 no fue superior a los taxanos, con una mediana de SG de 7,9 meses para T-DM1 (2,4 mg/kg semanal) frente a 8,6 meses para los taxanos (HR 1,15; IC 95%: 0,87–1,51; p=0,86) (202).

Sin embargo, un análisis posterior del ensayo clínico GATSBY evidenció que, los pacientes con CG HER2+ que presentaban niveles elevados de mRNA de *ERBB2* lograban mayor beneficio en supervivencia con T-DM1 respecto a la quimioterapia convencional (202). Estos hallazgos subrayan la importancia de la cuantificación precisa de la expresión de HER2, ya que la heterogeneidad y la baja expresión de HER2 se asocian con resistencia y menor beneficio clínico de los fármacos anti-HER2 en CG avanzado HER2+.

De manera similar, en una publicación previa que realizamos durante el desarrollo de esta tesis y disponible en el **Anexo 2**, reportamos de forma retrospectiva el caso de un paciente masculino de 42 años diagnosticado de adenocarcinoma de la UGE, HER2+ (IHQ 3+). El paciente fue tratado inicialmente de forma quirúrgica mediante esofagectomía. En el postquirúrgico se identificó ascitis y derrame pleural que fueron positivos para metástasis de adenocarcinoma siendo valorado como adenocarcinoma de la UGE estadio IV. El tratamiento sistémico de primera línea fue cisplatino + 5-fluorouracilo + trastuzumab obteniendo una respuesta completa luego de 6 ciclos de tratamiento. Luego de 10 meses, el paciente progresó con metástasis pulmonares y óseas. En ese momento, el paciente fue incluido en el ensayo clínico GATSBY recibiendo tratamiento con T-DM1 a una dosis de 2,4 mg/kg/semanal, logrando una respuesta parcial confirmada y un tiempo hasta la progresión de 5,4 meses (210). Es relevante destacar que, en el brazo de T-DM1 del estudio GATSBY, se observó una SLP media de 2,7 meses y una tasa de respuesta del 20,6% (171).

En este paciente, se analizaron de forma retrospectiva los niveles de mRNA de *ERBB2* en el tumor primario y se encontraron niveles elevados de *ERBB2*, que se correlacionaron con la eficacia registrada al tratamiento anti HER2 (171).

Los hallazgos del artículo complementario resultan especialmente relevantes para esta tesis por dos razones fundamentales. Primero, demostramos que existe una proporción no despreciable de pacientes con adenocarcinoma gástrico y de la UGE que presentan niveles elevados de expresión de *ERBB2*, lo que amplía el marco clásico de la “positividad HER2” basada en IHQ/ISH hacia una definición más cuantitativa y potencialmente más precisa para la estratificación terapéutica. Segundo, aportamos evidencia del mundo real mediante un caso clínico de un paciente con adenocarcinoma de la UGE HER2+ con alta expresión de *ERBB2* que obtuvo una respuesta parcial prolongada a T-DM1, subrayando que la cuantificación de la expresión génica puede actuar como un biomarcador predictivo de respuesta al tratamiento anti-HER2.

En la misma línea, el estudio prospectivo VARIANZ, de diseño multicéntrico, encontró que solo los pacientes con CG o UGE avanzado con alta expresión de HER2, medida por PCR cuantitativa y traducida en elevados niveles de mRNA, obtenían un beneficio en supervivencia significativo tras el tratamiento con trastuzumab (156).

Resulta también fundamental destacar que la discrepancia entre los métodos de evaluación local y central de HER2, sobre todo en casos límite, conlleva decisiones terapéuticas equivocadas y resultados subóptimos para el paciente, reafirmando la necesidad de criterios cuantitativos robustos para optimizar la selección y el abordaje terapéutico.

Pese a estos avances, todavía existen consideraciones clave que deben ser abordadas al considerar la expresión génica de *ERBB2* como biomarcador de selección y respuesta al tratamiento anti-HER2 en pacientes con CG avanzado HER2+.

Primero, la validación de los puntos de corte para *ERBB2*, medidos por HER2DX y previamente definidos en cáncer de mama, necesita una confirmación específica en CG, debido a las diferencias biológicas entre ambos tumores. La estructura molecular, la heterogeneidad intratumoral y los patrones de expresión de HER2 pueden variar

considerablemente entre cáncer de mama y gástrico, lo que puede impactar tanto en la sensibilidad como en la especificidad de los puntos de corte determinados. Es probable que el establecimiento de puntos de corte exclusivos para CG permita una mejor discriminación entre los distintos subgrupos de pacientes y ayude a optimizar el rendimiento predictivo de la herramienta.

El punto de corte propuesto en este estudio para pacientes con CG HER2+ constituye una primera aproximación en este contexto y abre la puerta a una posibilidad de personalización de las estrategias de estratificación. Sin embargo, para garantizar su relevancia clínica y utilidad pronóstica, se requiere la validación adicional de este umbral en cohortes independientes y más extensas. Este proceso de validación ayudará a confirmar la solidez del punto de corte y a definir su impacto en los resultados clínicos, como la respuesta al tratamiento y la supervivencia. Además, la inclusión de diferentes contextos clínicos y grupos étnicos contribuirá a confirmar su aplicabilidad en escenarios reales.

En segundo lugar, la notoria heterogeneidad de la expresión de HER2 en CG indica que el uso de un único biomarcador podría ser insuficiente para una estratificación precisa de los pacientes. Esta variabilidad, puede limitar la capacidad de predicción y clasificación de las herramientas actuales, si se utilizan de manera aislada. Por ello, el abordaje óptimo probablemente se sustente en la integración de múltiples biomarcadores, combinando la información aportada por la expresión génica de *ERBB2* con otros perfiles, como marcadores genómicos y biomarcadores inmunológicos (153,161).

En tercer lugar, es necesario realizar más estudios en pacientes tratados con nuevas estrategias terapéuticas, tales como trastuzumab deruxtecan y la combinación de terapias anti-HER2 con inmunoterapia. Esto es especialmente relevante en el contexto actual, donde estas opciones se están consolidando como estándares de tratamiento en las primeras líneas para el CG HER2+. La evidencia emergente sugiere que la eficacia y el perfil de seguridad de estos abordajes podrían diferir de los tratamientos convencionales, y plantean interrogantes sobre la selección óptima de pacientes, el manejo de la resistencia y el papel de biomarcadores predictivos (62,71,188).

Un cuarto aspecto relevante es la posible implementación de la prueba HER2DX en la práctica clínica habitual de pacientes con CG HER2+. Aunque esta herramienta

diagnóstica supone un mayor coste que los métodos convencionales (IHQ/ISH), ofrece información molecular adicional, lo que podría evitar la administración de tratamientos ineficaces y sus efectos adversos, redundando en potenciales ahorros en recursos sanitarios y mejorando los resultados clínicos. En cáncer de mama, la validación e incorporación de HER2DX ha mostrado clara utilidad clínica y repercusión positiva en la eficiencia del sistema sanitario (182); en CG, aunque faltan análisis formalmente coste-efectividad, el potencial es considerable, particularmente ante escenarios de ambigüedad diagnóstica y heterogeneidad tumoral.

En quinto lugar, es importante destacar el papel de la firma inmune y de genes inmunes individuales, como PD-1, especialmente ahora que la inmunoterapia se ha incorporado como parte del tratamiento de primera línea en el CG HER2+. El análisis de la expresión de genes inmunorelacionados aporta información clave sobre el microambiente tumoral, lo que puede influir directamente en el pronóstico y en la respuesta clínica tanto a la inmunoterapia, a los tratamientos dirigidos contra HER2, como a las estrategias combinadas de ambas modalidades terapéuticas.

En nuestra cohorte, no se observaron asociaciones significativas entre la firma inmune evaluada por HER2DX ni la expresión de PD-1 y los desenlaces clínicos. Sin embargo, este resultado debe interpretarse con precaución debido al limitado tamaño muestral, y será necesario validar estos hallazgos en estudios más amplios y multicéntricos. En conjunto, la integración de perfiles inmunes, marcadores genómicos y expresión de *ERBB2* podría favorecer una estratificación mucho más precisa de los pacientes y contribuir al desarrollo de estrategias terapéuticas verdaderamente personalizadas en el CG HER2+.

Por último, es importante reconocer que la presente investigación aporta evidencia retrospectiva basada en una muestra limitada de pacientes procedentes de dos instituciones, circunstancia que recalca la necesidad de investigaciones prospectivas y multicéntricas que permitan validar si la expresión de mRNA de *ERBB2* puede, efectivamente, guiar de manera fiable las decisiones terapéuticas en tiempo real en pacientes con CG HER2+. Las investigaciones hoy en curso y las futuras se orientan justamente a establecer puntos de corte específicos para CG y validar estos resultados en cohortes independientes y de mayor tamaño, con vistas a consolidar el papel de los

biomarcadores moleculares como eje en la medicina personalizada del futuro en oncología gastrointestinal.

7. Conclusiones

1. La cuantificación del ácido ribonucleico mensajero de *ERBB2* mediante nCounter/HER2DX mejora la estratificación biológica del cáncer gástrico avanzado receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano positivo en comparación con inmunohistoquímica e hibridación in situ.
2. El ácido ribonucleico mensajero de *ERBB2* constituye un biomarcador con valor pronóstico y predictivo independiente, asociado con mayor supervivencia libre de progresión, supervivencia global y tasa de respuesta al tratamiento anti-receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.
3. La heterogeneidad molecular del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano en el cáncer gástrico explica parte de la variabilidad clínica observada y limita el rendimiento de los métodos tradicionales.
4. Los puntos de corte derivados del HER2DX para cáncer gástrico permiten una clasificación molecular más precisa y clínicamente útil que la basada exclusivamente en inmunohistoquímica e hibridación in situ.
5. Los tumores con receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano inmunohistoquímica 3 positivo muestran niveles superiores de *ERBB2*, pero mantienen una heterogeneidad significativa que solo puede resolverse mediante métodos cuantitativos.
6. El contraste con el cáncer de mama evidencia diferencias biológicas importantes en la expresión de *ERBB2*, subrayando la necesidad de biomarcadores específicos por tipo tumoral.
7. La expresión del gen *PDCDI* (que codifica la proteína de muerte programada 1), muestra una asociación inversa con la expresión de *ERBB2*, tanto en el Atlas del Genoma del Cáncer como en la cohorte del estudio, lo que sugiere interacciones relevantes entre la señalización del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano y el microambiente inmune.

8. La expresión del gen *PDCDI* (que codifica la proteína de muerte programada 1), no se asoció con la supervivencia libre de progresión, la supervivencia global ni la tasa de respuesta en pacientes con cáncer gástrico receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano positivo, lo que indica que su papel clínico en este contexto es limitado.

9. El análisis de firmas moleculares de HER2DX muestra que solo el amplicón del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano se asocia significativamente con la supervivencia, mientras que las firmas inmunes e inflamatorias no muestran impacto en esta cohorte.

En conjunto, los resultados respaldan la implementación clínica de la cuantificación del ácido ribonucleico mensajero *ERBB2* mediante nCounter/HER2DX para optimizar la selección de pacientes con cáncer gástrico avanzado receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano positivo candidatos a terapias anti-receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

8. Bibliografia

1. Thrift AP, Wenker TN, El-Serag HB. Global burden of gastric cancer: epidemiological trends, risk factors, screening and prevention. *Nat Rev Clin Oncol*.2023;20(5):338-49.
2. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024;74(3):229-63.
3. Sundar R, Nakayama I, Markar SR, Shitara K, van Laarhoven HWM, Janjigian YY, et al. Gastric cancer. *Lancet*. 2025;405(10494):2087-2102.
4. Pradhan SP, Gadnayak A, Pradhan SK, Epari V. Epidemiology and prevention of gastric cancer: A comprehensive review. *Semin Oncol*. 2025;52(3):152341.
5. Balakrishnan M, George R, Sharma A, Graham DY. Changing Trends in Stomach Cancer Throughout the World. *Curr Gastroenterol Rep*. 2017;19(8):36.
6. Lin Y, Zheng Y, Wang H liang, Wu J. Global Patterns and Trends in Gastric Cancer Incidence Rates (1988–2012) and Predictions to 2030. *Gastroenterology*. 2021;161(1):116-127.e8.
7. Lin D, Khan U, Goetze TO, Reizine N, Goodman KA, Shah MA, et al. Gastroesophageal Junction Adenocarcinoma: Is There an Optimal Management? *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2019;39:e88-e95.
8. Mégraud F, Bessède E, Varon C. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(11):984-90.
9. Ko KP. Risk Factors of Gastric Cancer and Lifestyle Modification for Prevention. *J Gastric Cancer*. 2024;24(1):99.
10. Kim S, Kim MS, Kwon Y, Min JS, Alromi A, Kim JY, et al. Environmental Protective and Risk Factors for Gastric Cancer: An Umbrella Review and Reanalysis of Meta-Analyses. *J Gastric Cancer*. 2025;25(2):285.
11. Ryan CE, Fasaye GA, Gallanis AF, Gamble LA, McClelland PH, Duemler A, et al. Germline *CDHI* Variants and Lifetime Cancer Risk. *JAMA*. 2024;332(9):722.
12. Usui Y, Taniyama Y, Endo M, Koyanagi YN, Kasugai Y, Oze I, et al. *Helicobacter pylori* , Homologous-Recombination Genes, and Gastric Cancer. *N Engl J Med*. 2023;388(13):1181-90.
13. Mazurek M, Szewc M, Sitarz MZ, Dudzińska E, Sitarz R. Gastric Cancer: An Up-to-Date Review with New Insights into Early-Onset Gastric Cancer. *Cancers (Basel)*. 2024;16(18):3163.
14. Katoh H, Ishikawa S. Lifestyles, genetics, and future perspectives on gastric cancer in east Asian populations. Vol. 66, *Journal of Human Genetics*. Springer Nature; 2021. p. 887-99.
15. Schistosomes, liver flukes and helicobacter pylori. World Health Organization; 1994. 270 p.
16. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Biological Agents (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC. 2012;100B.
17. Zamani M, Ebrahimitabar F, Zamani V, Miller WH, Alizadeh-Navaei R, Shokri-Shirvani J, et al. Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018;47(7):868-76.
18. Shirani M, Shariati S, Bazdar M, Sojoudi Ghamnak F, Moradi M, Shams Khozani R, et al. The immunopathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer: a narrative review. *Front Microbiol*. 2024;15.

19. Duan Y, Xu Y, Dou Y, Xu D. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: mechanisms and new perspectives. *J Hematol Oncol.* 2025;18(1):10.
20. Chmiela M, Karwowska Z, Gonciarz W, Allushi B, Stączek P. Host pathogen interactions in *Helicobacter pylori* related gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2017;23(9):1521.
21. Reyes VE. *Helicobacter pylori* and Its Role in Gastric Cancer. *Microorganisms.* 2023;11(5):1312.
22. Mommersteeg MC, Yu J, Peppelenbosch MP, Fuhler GM. Genetic host factors in *Helicobacter pylori* -induced carcinogenesis: Emerging new paradigms. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2018;1869(1):42-52.
23. Hardbower DM, Peek RM, Wilson KT. At the Bench: *Helicobacter pylori* , dysregulated host responses, DNA damage, and gastric cancer. *J Leukoc Biol.* 2014;96(2):201-12.
24. Asaka M, Takeda H, Sugiyama T, Kato M. What Role Does *Helicobacter pylori* Play in Gastric Cancer? *Gastroenterology.* 1997;113(6):S56-60.
25. Zhang Z, Chen S, Li S, Zheng Y, Mai L, Zhang X. Association of *Helicobacter pylori* related chronic atrophic gastritis and gastric cancer risk: a literature review. *Front Med (Lausanne).* 2025;12.
26. Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, Freedman ND, Kamangar F. Gastric cancer: Descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention. Vol. 23, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(5):700-13.
27. Praud D, Rota M, Pelucchi C, Bertuccio P, Rosso T, Galeone C, et al. Cigarette smoking and gastric cancer in the Stomach Cancer Pooling (StoP) Project. *Eur J Cancer Prev.* 2018;27(2):124-33.
28. Rota M, Pelucchi C, Bertuccio P, Matsuo K, Zhang Z, Ito H, et al. Alcohol consumption and gastric cancer risk—A pooled analysis within the StoP project consortium. *Int J Cancer.* 2017;141(10):1950-62.
29. Ma K, Baloch Z, He TT, Xia X. Alcohol consumption and gastric cancer risk: A meta-analysis. *Med Sci Monit.* 2017;23:238-46.
30. Han X, Xiao L, Yu Y, Chen Y, Shu HH. Alcohol consumption and gastric cancer risk: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Oncotarget.* 2017;8(47):83237-83245.
31. Bouras E, Tsilidis KK, Triggs M, Siargkas A, Chourdakis M, Haidich AB. Diet and Risk of Gastric Cancer: An Umbrella Review. *Nutrients.* 2022;14(9):1764.
32. Maddineni G, Xie JJ, Brahmabhatt B, Mutha P. Diet and carcinogenesis of gastric cancer. *Curr Opin Gastroenterol.* 2022;38(6):588-591.
33. Norwood DA, Montalvan-Sanchez E, Dominguez RL, Morgan DR. Gastric Cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* 2022;51(3):501-18.
34. Oberoi M, Noor MdS, Abdelfatah E. The Multidisciplinary Approach and Surgical Management of GE Junction Adenocarcinoma. *Cancers (Basel).* 2024;16(2):288.
35. Venerito M, Link A, Rokkas T, Malfertheiner P. Review: Gastric cancer—Clinical aspects. *Helicobacter.* 2019; 24 Suppl 1:e12643.
36. Shah SC, Wang AY, Wallace MB, Hwang JH. AGA Clinical Practice Update on Screening and Surveillance in Individuals at Increased Risk for Gastric Cancer in the United States: Expert Review. *Gastroenterology.* 2025;168(2):405-416.e1.
37. Ajani JA, D'Amico TA, Bentrem DJ, Cooke D, Corvera C, Das P, et al. Esophageal and Esophagogastric Junction Cancers, Version 2.2023, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2023;21(4):393-422.

38. Chevally M, Bollschweiler E, Chandramohan SM, Schmidt T, Koch O, Demanzoni G, et al. Cancer of the gastroesophageal junction: a diagnosis, classification, and management review. *Ann N Y Acad Sci.* 2018;1434(1):132-8.
39. Smyth EC, Nilsson M, Grabsch HI, van Grieken NC, Lordick F. Gastric cancer. *Lancet.* 2020;396(10251):635-48.
40. Imamura Y, Watanabe M, Oki E, Morita M, Baba H. Esophagogastric junction adenocarcinoma shares characteristics with gastric adenocarcinoma: Literature review and retrospective multicenter cohort study. *Ann Gastroenterol Surg.* 2021;5(1):46-59.
41. Alsina M, Arrazubi V, Diez M, Taberero J. Current developments in gastric cancer: from molecular profiling to treatment strategy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2023;20(3):155-70.
42. Poston LM, Gupta S, Alvarado CE, Sinopoli J, Vargas LT, Linden PA, et al. Contemporary outcomes of esophageal and gastroesophageal junction neuroendocrine tumors. *Dis Esophagus.* 2023;36(8).
43. Nakauchi M, Vos EL, Carr RA, Barbetta A, Tang LH, Gonen M, et al. Distinct Differences in Gastroesophageal Junction and Gastric Adenocarcinoma in 2194 Patients. *Ann Surg.* 2023;277(4):629-36.
44. Tang CT, Zeng L, Yang J, Zeng C, Chen Y. Analysis of the Incidence and Survival of Gastric Cancer Based on the Lauren Classification: A Large Population-Based Study Using SEER. *Front Oncol.* 2020;10:1212.
45. Cisło M, Filip AA, Arnold Offerhaus GJ, Ciseł B, Rawicz-Pruszyński K, Skierucha M, et al. Distinct molecular subtypes of gastric cancer: from Laurén to molecular pathology. *Oncotarget.* 2018;9(27):19427-42.
46. Vauhkonen M, Vauhkonen H, Sipponen P. Pathology and molecular biology of gastric cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2006;20(4):651-74.
47. Ma J, Shen H, Kapesa L, Zeng S. Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer. *Oncol Lett.* 2016;11(5):2959-64.
48. Schirren R, Novotny A, Slotta-Huspenina J, Friess H, Reim D. Novel Histologic Categorization Based on Lauren Histotypes Conveys Prognostic Information for Gastroesophageal Junction Cancers—Analysis from a Large Single Center Cohort in Germany. *Cancers (Basel).* 2021;13(6):1303.
49. Flucke U, Mönig SP, Baldus SE, Zirbes TK, Bollschweiler E, Thiele J, et al. Differences between Biopsy- or Specimen-related Laurén and World Health Organization Classification in Gastric Cancer. *World J Surg.* 2002;26(2):137-40.
50. Ajani JA, Lee J, Sano T, Janjigian YY, Fan D, Song S. Gastric adenocarcinoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3(1):17036.
51. Chabner BA, Roberts TG. Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(1):65-72.
52. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet.* 2010;376(9742):687-97.
53. Kang YK, Chin K, Chung HC, Kadowaki S, Oh SC, Nakayama N, et al. S-1 plus leucovorin and oxaliplatin versus S-1 plus cisplatin as first-line therapy in patients with advanced gastric cancer (SOLAR): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2020;21(8):1045-56.
54. Hall PS, Swinson D, Cairns DA, Waters JS, Petty R, Allmark C, et al. Efficacy of Reduced-Intensity Chemotherapy With Oxaliplatin and Capecitabine on Quality

- of Life and Cancer Control Among Older and Frail Patients With Advanced Gastroesophageal Cancer. *JAMA Oncol.* 2021;7(6):869.
55. Shitara K, Takashima A, Fujitani K, Koeda K, Hara H, Nakayama N, et al. Nab-paclitaxel versus solvent-based paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric cancer (ABSOLUTE): an open-label, randomised, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017;2(4):277-87.
 56. Shitara K, Doi T, Dvorkin M, Mansoor W, Arkenau HT, Prokharau A, et al. Trifluridine/tipiracil versus placebo in patients with heavily pretreated metastatic gastric cancer (TAGS): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2018;19(11):1437-48.
 57. Kong F, Yao Y, Deng R, Li X, Jia Y. Hopes and failures in front-line advanced HER2-positive gastric cancer therapy. *Anticancer Drugs.* 2021;32(7):675-80.
 58. Bonomi M, Spada D, Baiocchi GL, Celotti A, Brighenti M, Grizzi G. Targeting HER2 in Gastroesophageal Adenocarcinoma: Molecular Features and Updates in Clinical Practice. *Int J Mol Sci.* 2024;25(7):3876.
 59. Kawakami T, Yamazaki K. Recent Progress in Treatment for HER2-Positive Advanced Gastric Cancer. *Cancers (Basel).* 2024;16(9):1747.
 60. Lee C kun, Rha SY, Kim HS, Jung M, Kang B, Che J, et al. A single arm phase Ib/II trial of first-line pembrolizumab, trastuzumab and chemotherapy for advanced HER2-positive gastric cancer. *Nat Commun.* 2022;13(1):6002.
 61. Janjigian YY, Kawazoe A, Yañez P, Li N, Lonardi S, Kolesnik O, et al. The KEYNOTE-811 trial of dual PD-1 and HER2 blockade in HER2-positive gastric cancer. *Nature.* 2021;600(7890):727-30.
 62. Shitara K, Van Cutsem E, Gümüş M, Lonardi S, de la Fouchardière C, Coutzac C, et al. Trastuzumab Deruxtecan or Ramucirumab plus Paclitaxel in Gastric Cancer. *N Engl J Med.* 2025;393(4):336-48.
 63. Abrahao-Machado LF, Scapulatempo-Neto C. HER2 testing in gastric cancer: An update. *World J Gastroenterol.* 2016;22(19):4619.
 64. Shah MA, Kennedy EB, Alarcon-Rozas AE, Alcindor T, Bartley AN, Malowany AB, et al. Immunotherapy and Targeted Therapy for Advanced Gastroesophageal Cancer: ASCO Guideline. *J Clin Oncol.* 2023;41(7):1470-91.
 65. Qin S, Ji J, Xu RH, Wang W, Tang Y, Bi F, et al. Treatment Patterns and Outcomes in Chinese Patients with Gastric Cancer by HER2 Status: A Noninterventional Registry Study (EVIDENCE). *Oncologist.* 2021;26(9):e1567-80.
 66. Tabernero J, Hoff PM, Shen L, Ohtsu A, Shah MA, Cheng K, et al. Pertuzumab plus trastuzumab and chemotherapy for HER2-positive metastatic gastric or gastro-oesophageal junction cancer (JACOB): final analysis of a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2018;19(10):1372-84.
 67. Thuss-Patience PC, Shah MA, Ohtsu A, Van Cutsem E, Ajani JA, Castro H, et al. Trastuzumab emtansine versus taxane use for previously treated HER2-positive locally advanced or metastatic gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (GATSBY): an international randomised, open-label, adaptive, phase 2/3 study. *Lancet Oncol.* 2017;18(5):640-53.
 68. Satoh T, Xu RH, Chung HC, Sun GP, Doi T, Xu JM, et al. Lapatinib Plus Paclitaxel Versus Paclitaxel Alone in the Second-Line Treatment of *HER2* -Amplified Advanced Gastric Cancer in Asian Populations: TyTAN—A Randomized, Phase III Study. *J Clin Oncol.* 2014;32(19):2039-49.
 69. Hecht JR, Bang YJ, Qin SK, Chung HC, Xu JM, Park JO, et al. Lapatinib in Combination With Capecitabine Plus Oxaliplatin in Human Epidermal Growth

- Factor Receptor 2–Positive Advanced or Metastatic Gastric, Esophageal, or Gastroesophageal Adenocarcinoma: TRIO-013/LOGiC—A Randomized Phase III Trial. *J Clin Oncol*. 2016;34(5):443-51.
70. Makiyama A, Sukawa Y, Kashiwada T, Kawada J, Hosokawa A, Horie Y, et al. Randomized, Phase II Study of Trastuzumab Beyond Progression in Patients With HER2-Positive Advanced Gastric or Gastroesophageal Junction Cancer: WJOG7112G (T-ACT Study). *J Clin Oncol*. 2020;38(17):1919-27.
 71. Shitara K, Bang YJ, Iwasa S, Sugimoto N, Ryu MH, Sakai D, et al. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Positive Gastric Cancer. *N Engl J Med*. 2020;382(25):2419-30.
 72. Guan WL, He Y, Xu RH. Gastric cancer treatment: recent progress and future perspectives. *J Hematol Oncol*. 2023;16(1):57.
 73. Cai J, Wang W, Cong D, Bai Y, Zhang W. Development of treatment strategies for advanced HER2-positive gastric cancer: Insights from clinical trials. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2025;207:104617.
 74. Korpan M, Puhr HC, Berger JM, Friedrich A, Prager GW, Preusser M, et al. Current Landscape of Molecular Biomarkers in Gastroesophageal Tumors and Potential Strategies for Co-Expression Patterns. *Cancers (Basel)*. 2025;17(3):340.
 75. Röcken C. Predictive biomarkers in gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2023;149(1):467-81.
 76. Nakamura Y, Kawazoe A, Lordick F, Janjigian YY, Shitara K. Biomarker-targeted therapies for advanced-stage gastric and gastro-oesophageal junction cancers: an emerging paradigm. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021;18(8):473-87.
 77. Yu J, Mehta R. Biomarker-Driven Approach to the Treatment of Metastatic Gastric or Gastroesophageal Adenocarcinoma. *J Natl Compr Canc Netw*. 2025;23(5).
 78. Ajani JA, D'Amico TA, Bentrem DJ, Chao J, Cooke D, Corvera C, et al. Gastric Cancer, Version 2.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2022;20(2):167-92.
 79. Varadan V, Gilmore H, Miskimen KLS, Tuck D, Parsai S, Awadallah A, et al. Immune Signatures Following Single Dose Trastuzumab Predict Pathologic Response to Preoperative Trastuzumab and Chemotherapy in HER2-Positive Early Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2016;22(13):3249-59.
 80. Walch HS, Borpatragohain R, Jee J, Chatila W, Fong C, Maron SB, et al. Clinical Implications of The Cancer Genome Atlas Molecular Classification System in Esophagogastric Cancer. *Clin Cancer Res*. 2025;31(10):1912-21.
 81. Vanderwalde A, Spetzler D, Xiao N, Gatalica Z, Marshall J. Microsatellite instability status determined by next-generation sequencing and compared with PD-L1 and tumor mutational burden in 11,348 patients. *Cancer Med*. 2018;7(3):746-56.
 82. Pietrantonio F, Randon G, Di Bartolomeo M, Luciani A, Chao J, Smyth EC, et al. Predictive role of microsatellite instability for PD-1 blockade in patients with advanced gastric cancer: a meta-analysis of randomized clinical trials. *ESMO Open*. 2021;6(1):100036.
 83. Sato Y, Okamoto K, Kawano Y, Kasai A, Kawaguchi T, Sagawa T, et al. Novel Biomarkers of Gastric Cancer: Current Research and Future Perspectives. *J Clin Med*. 2023;12(14):4646.
 84. Smyth EC, Kim KM, Rha SY, Wainberg ZA, Honeycutt H, Sommermann E, et al. FGFR2b protein overexpression: An emerging biomarker in gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma. *Cancer Treat Rev*. 2025;139:102971.

85. Sato S, Rhodes SL, Aoki Y, Nakayama I, Hashimoto T, Hawkins J, et al. Clinical characterization of FGFR2b expression in patients with advanced gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma. *ESMO Open*. 2025;10(7):105322.
86. Liu Y, Hu P, Xu L, Zhang X, Li Z, Li Y, et al. Current Progress on Predictive Biomarkers for Response to Immune Checkpoint Inhibitors in Gastric Cancer: How to Maximize the Immunotherapeutic Benefit? *Cancers (Basel)*. 2023;15(8):2273.
87. Hou W, Zhao Y, Zhu H. Predictive Biomarkers for Immunotherapy in Gastric Cancer: Current Status and Emerging Prospects. *Int J Mol Sci*. 2023;24(20):15321.
88. Zhang D, He W, Wu C, Tan Y, He Y, Xu B, et al. Scoring System for Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Its Prognostic Value for Gastric Cancer. *Front Immunol*. 2019;10:71.
89. Zheng X, Song X, Shao Y, Xu B, Chen L, Zhou Q, et al. Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in gastric cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(34):57386-98.
90. Pereira MA, Ramos MFKP, Cardili L, de Moraes RDR, Dias AR, Szor DJ, et al. Prognostic implications of tumor-infiltrating lymphocytes within the tumor microenvironment in gastric cancer. *J Gastrointest Surg*. 2024;28(2):151-7.
91. Lee JS, Won HS, Sun DS, Hong JH, Ko YH. Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in gastric cancer. *Medicine*. 2018;97(32):e11769.
92. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(1):24-37.
93. Nakazawa N, Sohda M, Katayama A, Ide M, Shimoda Y, Tateno K, et al. Infiltration of Gastric Cancer Stroma by Tumor-Infiltrating Lymphocytes Correlates with Mechanistic Target of Rapamycin Signaling. *Oncology*. 2023;101(8):520-6.
94. van der Sluis K, van Sandick JW, van Dieren JM, Vollebergh MA, Grootsholten C, van den Berg JG, et al. The clinical impact of testing for biomarkers in gastric cancer patients: a real-world cohort. *Histopathology*. 2023;82(6):826-36.
95. Tafe LJ, Tsongalis GJ. The human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). *Clin Chem Lab Med*. 2012;50(1):23-30.
96. Gusterson BA. Identification and interpretation of epidermal growth factor and c-erbB-2 overexpression. *Eur J Cancer*. 1992;28(1):263-7.
97. Rubin E, Shan KS, Dalal S, Vu DUD, Milillo-Naraine AM, Guaqueta D, et al. Molecular Targeting of the Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER2) Genes across Various Cancers. *Int J Mol Sci*. 2024; 25(2):1064.
98. Rubin I, Yarden Y. The basic biology of HER2. *Ann Oncol*. 2001;12:S3-8.
99. Meric-Bernstam F, Hung MC. Advances in Targeting Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 Signaling for Cancer Therapy. *Clin Cancer Res*. 2006;12(21):6326-30.
100. Ma C, Wang X, Guo J, Yang B, Li Y. Challenges and future of HER2-positive gastric cancer therapy. *Front Oncol*. 2023;13:1080990.
101. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(5):341-54.
102. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(2):127-37.
103. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2/ *neu* Oncogene. *Science*. 1987;235(4785):177-82.

104. Cheng X. A Comprehensive Review of HER2 in Cancer Biology and Therapeutics. *Genes (Basel)*. 2024;15(7):903.
105. Cooke T, Reeves J, Lanigan A, Stanton P. HER2 as a prognostic and predictive marker for breast cancer. *Ann Oncol*. 2001;12:S23-8.
106. Ménard S, Pupa SM, Campiglio M, Tagliabue E. Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer. *Oncogene*. 2003;22(42):6570-8.
107. Strickler JH, Yoshino T, Graham RP, Siena S, Bekaii-Saab T. Diagnosis and Treatment of ERBB2-Positive Metastatic Colorectal Cancer. *JAMA Oncol*. 2022;8(5):760-769.
108. Kim EK, Kim KA, Lee CY, Shim HS. The frequency and clinical impact of HER2 alterations in lung adenocarcinoma. *PLoS One*. 2017;12(2):e0171280.
109. Majumder A, Sandhu M, Banerji D, Steri V, Olshen A, Moasser MM. The role of HER2 and HER3 in HER2-amplified cancers beyond breast cancers. *Sci Rep*. 2021;11(1):9091.
110. Cen S, Liu Z, Pan H, Han W. Clinicopathologic features and treatment advances in cancers with HER2 alterations. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2021;1876(2):188605.
111. Siena S, Sartore-Bianchi A, Marsoni S, Hurwitz HI, McCall SJ, Penault-Llorca F, et al. Targeting the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) oncogene in colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2018;29(5):1108-19.
112. Shayeb AM, Kurzrock R, Adashek JJ, Kato S. Comprehensive Analysis of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Through DNA, mRNA, and Protein in Diverse Malignancies. *JCO Precis Oncol*. 2023;(7).
113. Tapia C, Glatz K, Novotny H, Lugli A, Horcic M, Seemayer CA, et al. Close association between HER-2 amplification and overexpression in human tumors of non-breast origin. *Mod Pathol*. 2007;20(2):192-8.
114. Yan M, Schwaederle M, Arguello D, Millis SZ, Gatalica Z, Kurzrock R. HER2 expression status in diverse cancers: review of results from 37,992 patients. *Cancer Metastasis Rev*. 2015;34(1):157-64.
115. Nasioudis D, Gysler S, Latif N, Cory L, Giuntoli RL, Kim SH, et al. Molecular landscape of ERBB2/HER2 gene amplification among patients with gynecologic malignancies; clinical implications and future directions. *Gynecol Oncol*. 2024;180:1-5.
116. Raghav KPS, Moasser MM. Molecular Pathways and Mechanisms of HER2 in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res*. 2023;29(13):2351-61.
117. Palle J, Rochand A, Pernot S, Gallois C, Taïeb J, Zaanan A. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Advanced Gastric Cancer: Current Knowledge and Future Perspectives. *Drugs*. 2020;80(4):401-15.
118. Sukawa Y. Alterations in the human epidermal growth factor receptor 2-phosphatidylinositol 3-kinase-v-Akt pathway in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2012;18(45):6577-86.
119. Han S, Park S, An J, Yang JY, Chung JW, Kim YJ, et al. HER2 as a potential biomarker of lymph node metastasis in undifferentiated early gastric cancer. *Sci Rep*. 2020;10(1):5270.
120. Bartley AN, Washington MK, Colasacco C, Ventura CB, Ismaila N, Benson AB, et al. *HER2* Testing and Clinical Decision Making in Gastroesophageal Adenocarcinoma: Guideline From the College of American Pathologists, American Society for Clinical Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*. 2017;35(4):446-64.

121. Jørgensen JT. Role of human epidermal growth factor receptor 2 in gastric cancer: Biological and pharmacological aspects. *World J Gastroenterol.* 2014;20(16):4526-35.
122. Aoki Y, Nakayama I, Shitara K. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Positive Advanced Gastric or Esophagogastric Adenocarcinoma: Reflecting on the Past to Gain a New Insights. *Curr Oncol Rep.* 2025;27(1):15-29.
123. Subasinghe D, Acott N, Kumarasinghe MP. A survival guide to HER2 testing in gastric/gastroesophageal junction carcinoma. *Gastrointest Endosc.* 2019;90(1):44-54.
124. Pietrantonio F, Caporale M, Morano F, Scartozzi M, Gloghini A, De Vita F, et al. HER2 loss in HER2-positive gastric or gastroesophageal cancer after trastuzumab therapy: Implication for further clinical research. *Int J Cancer.* 2016;139(12):2859-64.
125. Vakiani E. HER2 Testing in Gastric and Gastroesophageal Adenocarcinomas. *Adv Anat Pathol.* 2015;22(3):194-201.
126. Bartley AN, Washington MK, Ventura CB, Ismaila N, Colasacco C, Benson AB, et al. HER2 Testing and Clinical Decision Making in Gastroesophageal Adenocarcinoma: Guideline From the College of American Pathologists, American Society for Clinical Pathology, and American Society of Clinical Oncology. *Arch Pathol Lab Med.* 2016;140(12):1345-63.
127. Hofmann M, Stoss O, Shi D, Büttner R, Van De Vijver M, Kim W, et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology.* 2008;52(7):797-805.
128. Rüschoff J, Hanna W, Bilous M, Hofmann M, Osamura RY, Penault-Llorca F, et al. HER2 testing in gastric cancer: a practical approach. *Mod Pathol.* 2012;25(5):637-50.
129. Rüschoff J, Dietel M, Baretton G, Arbogast S, Walch A, Monges G, et al. HER2 diagnostics in gastric cancer—guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Virchows Archiv.* 2010;457(3):299-307.
130. Robertson SA, Cimino-Mathews A, Cornish TC. HER2 Status in Gastroesophageal Adenocarcinomas: Correlation Between Immunohistochemistry and Fluorescence In Situ Hybridization Methodologies. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2018;26(1):35-9.
131. Bass AJ, Thorsson V, Shmulevich I, Reynolds SM, Miller M, Bernard B, et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature.* 2014;513(7517):202-9.
132. Janjigian YY, Cecchini M, Shitara K, Enzinger PC, Wainberg ZA, Chau I, et al. Genomic Landscape of Late-Stage Gastric Cancer: Analysis From KEYNOTE-059, KEYNOTE-061, and KEYNOTE-062 Studies. *JCO Precis Oncol.* 2025;(9).
133. Chia NY, Tan P. Molecular classification of gastric cancer. *Ann Oncol.* 2016;27(5):763-9.
134. Ushiku T, Ishikawa S, Kakiuchi M, Tanaka A, Katoh H, Aburatani H, et al. RHOA mutation in diffuse-type gastric cancer: a comparative clinicopathology analysis of 87 cases. *Gastric Cancer.* 2016;19(2):403-11.
135. Satala CB, Jung I, Stefan-van Staden RI, Kovacs Z, Molnar C, Bara T, et al. HER2 Heterogeneity in Gastric Cancer: A Comparative Study, Using Two Commercial Antibodies. *J Oncol.* 2020;2020:1-10.

136. Evaluation of Expression of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Gastric and Gastroesophageal Junction Adenocarcinoma Using IHC and Dual-ISH. *Anticancer Res.* 2018;38(1):367-372.
137. Kanayama K, Imai H, Yoneda M, Hirokawa YS, Shiraishi T. Significant intratumoral heterogeneity of human epidermal growth factor receptor 2 status in gastric cancer: A comparative study of immunohistochemistry, FISH, and dual-color *in situ* hybridization. *Cancer Sci.* 2016;107(4):536-42.
138. Wang K, Yuen ST, Xu J, Lee SP, Yan HHN, Shi ST, et al. Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat Genet.* 2014;46(6):573-82.
139. Kakiuchi M, Nishizawa T, Ueda H, Gotoh K, Tanaka A, Hayashi A, et al. Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. *Nat Genet.* 2014;46(6):583-7.
140. Tanaka A, Ishikawa S, Ushiku T, Yamazawa S, Katoh H, Hayashi A, et al. Frequent *CLDN18-ARHGAP* fusion in highly metastatic diffuse-type gastric cancer with relatively early onset. *Oncotarget.* 2018;9(50):29336-50.
141. Blair VR, McLeod M, Carneiro F, Coit DG, D'Addario JL, van Dieren JM, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical practice guidelines. *Lancet Oncol.* 2020;21(8):e386-97.
142. van Roy F. Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(2):121-34.
143. Sahasrabudhe R, Lott P, Bohorquez M, Toal T, Estrada AP, Suarez JJ, et al. Germline Mutations in PALB2, BRCA1, and RAD51C, Which Regulate DNA Recombination Repair, in Patients With Gastric Cancer. *Gastroenterology.* 2017;152(5):983-986.e6.
144. Fewings E, Larionov A, Redman J, Goldgraben MA, Scarth J, Richardson S, et al. Germline pathogenic variants in PALB2 and other cancer-predisposing genes in families with hereditary diffuse gastric cancer without CDH1 mutation: a whole-exome sequencing study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2018;3(7):489-98.
145. Fukai S, Nakajima S, Saito M, Saito K, Kase K, Nakano H, et al. Down-regulation of stimulator of interferon genes (STING) expression and CD8⁺ T-cell infiltration depending on HER2 heterogeneity in HER2-positive gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2023;26(6):878-90.
146. Chen Y, Jia K, Chong X, Xie Y, Jiang L, Peng H, et al. Implications of PD-L1 expression on the immune microenvironment in HER2-positive gastric cancer. *Mol Cancer.* 2024;23(1):169.
147. Qu H, Zhou P, Yang Z, Wang H, Deng K, Wang N, et al. Comprehensive analysis of prognosis and drug sensitivity of programmed cell death pattern-related genes in gastric cancer patients. *Sci Rep.* 2025;15(1):22535.
148. Ito S, Masuda T, Noda M, Hu Q, Shimizu D, Kuroda Y, et al. Prognostic Significance of PD-1, PD-L1 and CD8 Gene Expression Levels in Gastric Cancer. *Oncology.* 2020;98(7):501-11.
149. Xue Z, Wang Z, Liu D, Li B, Sun Z, Zhao J, et al. T-cell activation enhances anti-HER2-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in gastric cancer. *Immunol Res.* 2025;73(1):88.
150. Hu HH, Wang SQ, Zhao H, Chen ZS, Shi X, Chen XB. HER2⁺ advanced gastric cancer: Current state and opportunities (Review). *Int J Oncol.* 2024;64(4):36.
151. Kwon HJ, Park Y, Nam SK, Kang E, Kim K, Jeong I, et al. Genetic and immune microenvironment characterization of HER2-positive gastric cancer: Their

- association with response to trastuzumab-based treatment. *Cancer Med.* 2023;12(9):10371-84.
152. Zhang H, Wang Y, Wang Y, Wu D, Lin E, Xia Q. Intratumoral and intertumoral heterogeneity of HER2 immunohistochemical expression in gastric cancer. *Pathol Res Pract.* 2020;216(11):153229.
 153. Grillo F, Fassan M, Sarocchi F, Fiocca R, Mastracci L. HER2 heterogeneity in gastric/gastroesophageal cancers: From benchside to practice. *World J Gastroenterol.* 2016;22(26):5879.
 154. Rogers JE, Yamashita K, Sewastjanow-Silva M, Trail A, Waters RE, Ajani J. Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 Gastric Adenocarcinoma: Expanding Therapy of a Recognized Target. *Cancers (Basel).* 2023;15(21):5180.
 155. Wakatsuki T, Yamamoto N, Sano T, Chin K, Kawachi H, Takahari D, et al. Clinical impact of intratumoral HER2 heterogeneity on trastuzumab efficacy in patients with HER2-positive gastric cancer. *J Gastroenterol.* 2018;53(11):1186-95.
 156. Haffner I, Schierle K, Raimúndez E, Geier B, Maier D, Hasenauer J, et al. HER2 Expression, Test Deviations, and Their Impact on Survival in Metastatic Gastric Cancer: Results From the Prospective Multicenter VARIANZ Study. *J Clin Oncol.* 2021;39(13):1468-78.
 157. Kanayama K, Imai H, Usugi E, Matsuda C, Ichishi M, Hirokawa YS, et al. Cancer-related gene mutations and intratumoral genetic heterogeneity in human epidermal growth factor receptor 2 heterogeneous gastric cancer. *Pathol Int.* 2020;70(11):865-70.
 158. Li Z, Metzger Filho O, Viale G, dell'Orto P, Russo L, Goyette MA, et al. HER2 heterogeneity and treatment response-associated profiles in HER2-positive breast cancer in the NCT02326974 clinical trial. *J Clin Invest.* 2024;134(7).
 159. Hou Y, Nitta H, Li Z. HER2 Intratumoral Heterogeneity in Breast Cancer, an Evolving Concept. *Cancers (Basel).* 2023;15(10):2664.
 160. Lee HE, Park KU, Yoo SB, Nam SK, Park DJ, Kim HH, et al. Clinical significance of intratumoral HER2 heterogeneity in gastric cancer. *Eur J Cancer.* 2013;49(6):1448-57.
 161. Valenza C, Guidi L, Battaiotto E, Trapani D, Sartore Bianchi A, Siena S, et al. Targeting HER2 heterogeneity in breast and gastrointestinal cancers. *Trends Cancer.* 2024;10(2):113-23.
 162. Kim B, Nam SK, Seo SH, Park KU, Ahn SH, Park DJ, et al. Comparative analysis of HER2 copy number between plasma and tissue samples in gastric cancer using droplet digital PCR. *Sci Rep.* 2020;10(1):4177.
 163. Brasó-Maristany F, Griguolo G, Chic N, Pascual T, Paré L, Maues J, et al. HER2DX ERBB2 mRNA expression in advanced HER2-positive breast cancer treated with T-DM1. *JNCI: J Natl Cancer Inst.* 2023;115(3):332-6.
 164. Goytain A, Ng T. NanoString nCounter Technology: High-Throughput RNA Validation. *Methods Mol Biol.* 2020;2079:125-139.
 165. Veldman-Jones MH, Brant R, Rooney C, Geh C, Emery H, Harbron CG, et al. Evaluating Robustness and Sensitivity of the NanoString Technologies nCounter Platform to Enable Multiplexed Gene Expression Analysis of Clinical Samples. *Cancer Res.* 2015;75(13):2587-93.
 166. M'Boutchou MN, van Kempen LC. Analysis of the Tumor Microenvironment Transcriptome via NanoString mRNA and miRNA Expression Profiling. *Methods Mol Biol.* 2016;1458:291-310.

167. Li X, Lee JH, Gao Y, Zhang J, Bates KM, Rimm DL, et al. Correlation of HER2 Protein Level With mRNA Level Quantified by RNAscope in Breast Cancer. *Mod Pathol*. 2024;37(2):100408.
168. Lee H, Ryu JM, Lee SK, Chae BJ, Yu J, Lee JE, et al. HER2 mRNA Score From Quantitative ERBB2 mRNA Expression of Oncotype Dx. *Am J Surg Pathol*. 2025;49(8):807-17.
169. Baez-Navarro X, van Bockstal MR, van der Made A, van Deurzen CHM. A Comparison Between Immunohistochemistry and mRNA Expression to Identify Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Low Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2025;149(7):635-42.
170. Xu K, Bayani J, Mallon E, Pond GR, Piper T, Hasenburg A, et al. Discordance between Immunohistochemistry and Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2 mRNA to Determine Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Low Status for Breast Cancer. *J Mol Diagn*. 2022;24(7):775-83.
171. Griguolo G, Brasó-Maristany F, González-Farré B, Pascual T, Chic N, Saurí T, et al. Erbb2 mrna expression and response to ado-trastuzumab emtansine (T-dm1) in her2-positive breast cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12(7):1-25.
172. Warren S. Simultaneous, Multiplexed Detection of RNA and Protein on the NanoString® nCounter® Platform. *Methods Mol Biol*. 2018;1783:105-120.
173. Eastel JM, Lam KW, Lee NL, Lok WY, Tsang AHF, Pei XM, et al. Application of NanoString technologies in companion diagnostic development. *Expert Rev Mol Diagn*. 2019;19(7):591-8.
174. Prat A, Guarneri V, As Pascual T, Bras O-Maristany F, Sanfeliu E, Par L, et al. Development and validation of the new HER2DX assay for predicting pathological response and survival outcome in early-stage HER2-positive breast cancer. *EBioMedicine*. 2022;75:103801.
175. Tolaney SM, Tung N, Wolff AC, DeMichele A, Cejalvo JM, Martínez-Sáez O, et al. HER2DX genomic test in early-stage HER2-positive breast cancer. *ESMO Open*. 2024;9(12):103987.
176. Marín-Aguilera M, Jares P, Sanfeliu E, Villacampa G, Hernández-Illán E, Martínez-Puchol AI, et al. Analytical validation of HER2DX genomic test for early-stage HER2-positive breast cancer. *ESMO Open*. 2024;9(3):102903.
177. Villacampa G, Pascual T, Brasó-Maristany F, Paré L, Martínez-Sáez O, Cortés J, et al. Prognostic value of HER2DX in early-stage HER2-positive breast cancer: a comprehensive analysis of 757 patients in the Sweden Cancerome Analysis Network—Breast dataset (SCAN-B). *ESMO Open*. 2024;9(3):102388.
178. Villacampa G, Pascual T, Tarantino P, Cortés J, Perez-García J, Llombart-Cussac A, et al. HER2DX and survival outcomes in early-stage HER2-positive breast cancer: an individual patient-level meta-analysis. *Lancet Oncol*. 2025;26(8):1100-12.
179. Nozawa K, Sawaki M, Uemura Y, Tsuneizumi M, Takano T, Gondo N, et al. HER2DX prognostic value in older patients with HER2-positive early breast cancer: A correlative analysis from the RESPECT phase III trial. *J Clin Oncol*. 2025;43(16_suppl):532-532.
180. Torres ES, Villacampa G, Pascual T, Oliveira M, Losada MJV, Bellet-Ezquerria M, et al. 7P Independent validation of HER2DX ERBB2 mRNA score to predict HER2-positive (HER2+), HER2-low and HER2-0 status in breast cancer. *ESMO Open*. 2023;8(1):101231.
181. Sánchez-Bayona R, Martínez-Sáez O, Romero-Romero D, Seguí E, Carcelero E, Tolosa P, et al. HER2DX ERBB2 mRNA score in first-line advanced HER2-

- positive breast cancer treated with chemotherapy, trastuzumab, and pertuzumab. *NPJ Breast Cancer*. 2025;11(1):37.
182. Martínez-Sáez O, Tapia M, Marín-Aguilera M, Hernández-Illán E, Tébar C, Martínez-Puchol AI, et al. Clinical decision impact of HER2DX, an algorithm-powered genomic diagnostic in early-stage HER2-positive breast cancer: results from a prospective real-world study. *ESMO Real World Data Digit Oncol*. 2025;8:100123.
 183. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2013;31(31):3997-4013.
 184. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490(7418):61-70.
 185. Cortés J, Brasó-Maristany F, Villacampa G, et al. HER2DX ERBB2 mRNA Score in First-Line Metastatic HER2-Positive Breast Cancer Treated with Docetaxel, Trastuzumab and Pertuzumab: Correlative Analysis from CLEOPATRA Phase III. *Clin Can Res*. 2025. 31(12_Supplement) PS4-06.
 186. Ricci AD, Rizzo A, Rojas Llimpe FL, Di Fabio F, De Biase D, Rihawi K. Novel HER2-Directed Treatments in Advanced Gastric Carcinoma: Another Paradigm Shift? *Cancers (Basel)*. 2021;13(7):1664.
 187. Hacking SM, Yakirevich E, Wang Y. From Immunohistochemistry to New Digital Ecosystems: A State-of-the-Art Biomarker Review for Precision Breast Cancer Medicine. *Cancers (Basel)*. 2022;14(14):3469.
 188. Shitara K, Bang YJ, Iwasa S, Sugimoto N, Ryu MH, Sakai D, et al. Trastuzumab deruxtecan in HER2-positive advanced gastric cancer: exploratory biomarker analysis of the randomized, phase 2 DESTINY-Gastric01 trial. *Nat Med*. 2024;30(7):1933-42.
 189. An E, Ock CY, Kim TY, Lee KH, Han SW, Im SA, et al. Quantitative proteomic analysis of HER2 expression in the selection of gastric cancer patients for trastuzumab treatment. *Ann Oncol*. 2017;28(1):110-5.
 190. Guerin M, Gonçalves A, Toiron Y, Baudalet E, Pophillat M, Granjeaud S, et al. Development of parallel reaction monitoring (PRM)-based quantitative proteomics applied to HER2-Positive breast cancer. *Oncotarget*. 2018;9(73):33762-77.
 191. Park J, Oh HJ, Han D, Wang JI, Park IA, Ryu HS, et al. Parallel Reaction Monitoring-Mass Spectrometry (PRM-MS)-Based Targeted Proteomic Surrogates for Intrinsic Subtypes in Breast Cancer: Comparative Analysis with Immunohistochemical Phenotypes. *J Proteome Res*. 2020;19(7):2643-53.
 192. Xu B, Chen H, Zhang J, Cong Y, Ning L, Chen L, et al. A comparative study of gastric adenocarcinoma HER2 IHC phenotype and mass spectrometry-based quantification. *Front Oncol*. 2023;13:1152895.
 193. Catenacci DVT, Liao WL, Zhao L, Whitcomb E, Henderson L, O'Day E, et al. Mass-spectrometry-based quantitation of Her2 in gastroesophageal tumor tissue: comparison to IHC and FISH. *Gastric Cancer*. 2016;19(4):1066-79.
 194. Wang H, Li B, Liu Z, Gong J, Shao L, Ren J, et al. HER2 copy number of circulating tumour DNA functions as a biomarker to predict and monitor trastuzumab efficacy in advanced gastric cancer. *Eur J Cancer*. 2018;88:92-100.
 195. Kim ST, Banks KC, Pectasides E, Kim SY, Kim K, Lanman RB, et al. Impact of genomic alterations on lapatinib treatment outcome and cell-free genomic

- landscape during HER2 therapy in HER2+ gastric cancer patients. *Ann Oncol.* 2018;29(4):1037-48.
196. Pietrantonio F, Fucà G, Morano F, Gloghini A, Corso S, Aprile G, et al. Biomarkers of Primary Resistance to Trastuzumab in HER2-Positive Metastatic Gastric Cancer Patients: the AMNESIA Case-Control Study. *Clin Cancer Res.* 2018;24(5):1082-9.
 197. Ebert K, Haffner I, Zwingenberger G, Keller S, Raimúndez E, Geffers R, et al. Combining gene expression analysis of gastric cancer cell lines and tumor specimens to identify biomarkers for anti-HER therapies-the role of HAS2, SHB and HBEGF. *BMC Cancer.* 2022;22(1):254.
 198. Koh J, Nam SK, Lee YW, Kim JW, Lee KW, Ock CY, et al. Trastuzumab Specific Epitope Evaluation as a Predictive and Prognostic Biomarker in Gastric Cancer Patients. *Biomolecules.* 2019;9(12):782.
 199. Zhao D, Klempner SJ, Chao J. Progress and challenges in HER2-positive gastroesophageal adenocarcinoma. *J Hematol Oncol.* 2019;12(1):50.
 200. Waks AG, Ogayo ER, Paré L, Marín-Aguilera M, Brasó-Maristany F, Galván P, et al. Assessment of the HER2DX Assay in Patients With *ERBB2* -Positive Breast Cancer Treated With Neoadjuvant Paclitaxel, Trastuzumab, and Pertuzumab. *JAMA Oncol.* 2023;9(6):835-840.
 201. Taberero J, Hoff PM, Shen L, Ohtsu A, Shah MA, Siddiqui A, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and chemotherapy in HER2-positive gastric/gastroesophageal junction cancer: end-of-study analysis of the JACOB phase III randomized clinical trial. *Gastric Cancer.* 2023;26(1):123-31.
 202. Shah MA, Kang YK, Thuss-Patience PC, Ohtsu A, Ajani JA, Van Cutsem E, et al. Biomarker analysis of the GATSBY study of trastuzumab emtansine versus a taxane in previously treated HER2-positive advanced gastric/gastroesophageal junction cancer. *Gastric Cancer.* 2019;22(4):803-16.
 203. Giordano SH, Franzoi MAB, Temin S, Anders CK, Chandarlapaty S, Crews JR, et al. Systemic Therapy for Advanced Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer: ASCO Guideline Update. *J Clin Oncol.* 2022;40(23):2612-35.
 204. Kudo T. Advances in the treatment of human epidermal growth factor receptor 2-positive gastric cancer. *Int J Clin Oncol.* 2024;29(9):1220-7.
 205. Rha SY, Chung HC. Breakthroughs in the Systemic Treatment of HER2-Positive Advanced/Metastatic Gastric Cancer: From Singlet Chemotherapy to Triple Combination. *J Gastric Cancer.* 2023;23(1):224-249.
 206. Ariga S. History and Future of HER2-Targeted Therapy for Advanced Gastric Cancer. *J Clin Med.* 2023;12(10):3391.
 207. Scheck MK, Hofheinz RD, Lorenzen S. HER2-Positive Gastric Cancer and Antibody Treatment: State of the Art and Future Developments. *Cancers (Basel).* 2024;16(7):1336.

9. ANEXO 1

9.1. Artículo publicado en ESMO OPEN.



ORIGINAL ARTICLE

HER2DX *ERBB2* score in advanced HER2-positive gastric cancer treated with trastuzumab and chemotherapy

D. Pesántez^{1,2,3†}, F. Brasó-Maristany^{2,4,5‡}, T. Pascual^{1,2,3,5}, L. Angelats^{1,2,5}, A. Indacochea^{1,2,5}, M. Cuatrecasas^{3,5,6,7}, S. López^{3,6}, E. Sanfeliu^{1,2,6}, G. Fernández-Esparrach^{3,5,8}, L. Notario⁹, I. Méndez¹⁰, D. Momblan^{5,11}, L. Candia^{1,2,5}, I. Macías^{1,2,5}, A. Prat^{1,2,3,4,5†*} & T. Sauri^{1,2,3,5†}

¹Department of Medical Oncology, Hospital Clínic Barcelona, Barcelona; ²Translational Genomics and Targeted Therapies in Solid Tumors, August Pi i Sunyer Biomedical Research Institute (IDIBAPS), Barcelona; ³Faculty of Medicine, University of Barcelona, Barcelona; ⁴Reveal Genomics, Barcelona; ⁵Clinic Barcelona Comprehensive Cancer Center, Barcelona; ⁶Pathology Department, Hospital Clínic Barcelona, Barcelona; ⁷Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Madrid; ⁸Endoscopy Unit, Department of Gastroenterology, IDIBAPS, CIBEREHD, Hospital Clínic Barcelona, Barcelona; ⁹Department of Medical Oncology, Hospital of Granollers, Granollers; ¹⁰Department of Pathology, Hospital of Granollers, Granollers; ¹¹Department of Gastrointestinal Surgery, Hospital Clínic Barcelona, Barcelona, Spain



Available online xxx

Background: Response to trastuzumab combined with chemotherapy (T-chemo) in human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive advanced gastric cancer (AGC) varies widely, highlighting the need for more precise biomarkers beyond conventional HER2 assessment with immunohistochemistry (IHC) and *in situ* hybridization (ISH). The HER2DX *ERBB2* messenger RNA (mRNA) assay, a clinically validated genomic test initially developed for early-stage HER2-positive breast cancer, quantitatively measures *ERBB2* expression and may improve patient selection for T-chemo in AGC.

Patients and methods: In a retrospective cohort of 134 patients with AGC, including 58 who received T-chemo, we evaluated whether the HER2DX *ERBB2* score defines more accurately HER2 status and correlates with treatment response and survival outcomes in HER2-positive AGC, compared with standard pathology-based methods.

Results: Our findings demonstrate that a high HER2DX *ERBB2* score was significantly associated with improved progression-free survival [hazard ratio (HR) 0.81, 95% confidence interval (CI) 0.69-0.95, $P = 0.012$] and overall survival (HR 0.43, 95% CI 0.23-0.81, $P = 0.008$).

Conclusions: These results suggest that *ERBB2* mRNA expression, as measured by HER2DX, may help refine selection for T-chemo and guide more personalized treatment strategies in HER2-positive AGC.

Key words: HER2DX, *ERBB2*, HER2-positive, gastric cancer, genomics

INTRODUCTION

Gastric cancer (GC) is a significant global health burden, with ~1 089 000 new cases diagnosed annually and an age-standardized incidence rate of 11.1 per 100 000 people. It accounts for 7.7% of all cancer-related mortality, with 800 000 deaths each year, being the fourth leading cause of cancer death worldwide.^{1,2}

HER2-positive advanced GC (AGC) represents 15%-20% of cases and is characterized by distinct biological features and aggressive clinical behavior, often associated with poor prognosis. This highlights the critical need for precise diagnostic tools and targeted therapeutic strategies.³⁻⁷ While trastuzumab-based chemotherapy (T-chemo) has

improved outcomes in HER2-positive AGC, responses remain variable, with a median overall survival (OS) of 13.8 months and an overall response rate (ORR) of <50%.^{6,7}

The addition of pembrolizumab to trastuzumab-based chemotherapy has reshaped the standard of care for patients with unresectable HER2-positive AGC and a programmed death-ligand 1 (PD-L1) combined positive score (CPS) ≥ 1 , achieving an ORR of 72.6% and a median OS of 20.1 months.⁸ However, despite these improvements, a substantial proportion of patients do not respond to targeted therapy.⁹

AGC has high genomic and phenotypic heterogeneity, even within individual tumors, which is a major challenge for biomarker-driven clinical trials and contributes to treatment resistance.^{10,11} Current diagnostic methods, such as immunohistochemistry (IHC) and *in situ* hybridization (ISH), have limitations in accurately capturing the complexity of HER2 expression, underscoring the need for more advanced methods.¹² A deeper molecular understanding of HER2-positive AGC could enable more precise patient stratification and individualized therapy.

*Correspondence to: Dr Aleix Prat, Clínic Barcelona Comprehensive Cancer Center, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. Tel: +34932275400
E-mail: alprat@clinic.cat (A. Prat).

†These authors contributed equally to the work.

‡Co-senior authors.

2059-7029/© 2025 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of European Society for Medical Oncology. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

multivariate model were selected based on clinical relevance and known associations with outcomes in HER2-positive AGC, even if not statistically significant in univariate analyses to avoid potential confounding factors. Agreement between HER2 IHC/ISH status and *ERBB2* mRNA expression levels was assessed using Cohen's kappa coefficient. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was used to identify a new preliminary HER2DX *ERBB2* cut-off for GC. All statistical analyses were carried out using R software (version 4.2.2).

RESULTS

Patient characteristics

A total of 134 consecutive patients diagnosed with AGC were analyzed. Demographic and disease characteristics for the entire cohort are summarized in Supplementary Table S1, available at <https://doi.org/10.1016/j.esmooop.2025.105563>, while details specific to patients treated with T-chemo are provided in Table 1. Overall, 78% of patients were male, with a median age of 70 years at diagnosis. Regarding HER2 status, 41% of patients exhibited IHC 3+ expression. Among those treated with T-chemo (Table 1), the majority were male (81%), with a median age of 70 years, and a higher proportion (72%) displayed HER2 IHC 3+ expression.

ERBB2 mRNA expression in AGC

ERBB2 mRNA expression was assessed in all tumor samples, regardless of HER2 status. A broad range of *ERBB2* mRNA expression levels was observed [log₂ median -0.75 , interquartile range (IQR) 1.26]. As expected, *ERBB2* expression varied according to HER2 IHC expression categories (0, 1+, 2+, and 3+). Among HER2-positive AGC cases, significantly higher *ERBB2* levels were observed in tumors with IHC 3 expression compared with other categories, with a 2.15-fold difference ($P < 0.001$). Notably, considerable heterogeneity in *ERBB2* expression was also observed within the HER2 IHC 3+ AGC subgroup (IQR 2.75) (Figure 1A). Representative images illustrating HER2 expression levels analyzed by IHC and ISH are shown in Figure 1B.

Comparison of ERBB2 expression across cancer types

To further contextualize *ERBB2* expression in AGC, we analyzed data from 12 cancer types included in The Cancer Genome Atlas Program (TCGA). GC exhibited the second-highest *ERBB2* mRNA expression following BC (Supplementary Figure S1, available at <https://doi.org/10.1016/j.esmooop.2025.105563>).

Finally, when comparing HER2 IHC 3+ tumors between the two cancer types, *ERBB2* expression was significantly higher in BC than in GC, with a 4.6-fold difference ($P < 0.001$) (Supplementary Figure S2, available at <https://doi.org/10.1016/j.esmooop.2025.105563>).

Clinical outcomes in HER2-positive AGC treated with T-chemo

Among the 134 patients with AGC, 58 (43%) were classified as HER2-positive and received first-line T-chemo. Baseline

Table 1. Demographic and disease characteristics for patients with HER2-positive AGC treated with T-chemo

	N = 58
Sex: male, n (%)	48 (81)
Median age at GC diagnosis, years (range)	70 (28-86)
ECOG performance status, n (%)	
0-1	39 (66)
2	18 (31)
3	2 (3)
Tumor location, n (%)	
GC	37 (63)
Gastroesophageal junction	22 (27)
Lauren subtypes, n (%)	
Intestinal	52 (88)
Diffuse	7 (12)
HER2 status, n (%)	
IHC 2+/ISH+	15 (26)
IHC 3+	42 (72)
IHC NA/ISH+	1 (2)
First line with T-chemo, n (%)	58 (100)
Metastatic disease at start of T-chemo, n (%)	58 (100)

GC, gastric cancer; HER2, human epidermal growth factor 2; IHC, immunohistochemistry; ISH, *in situ* hybridization; NA, not available; T-chemo, trastuzumab combined with chemotherapy.

patient characteristics are summarized in Tables 2 and 3. The median follow-up from T-chemo initiation was 8.77 months. Median PFS and OS were 5.87 months (95% CI 1.43-8.1 months) and 9.33 months (95% CI 7.97-13.4 months), respectively. The ORR was 38.6%.

HER2DX ERBB2 expression categories in HER2-positive AGC

Among the 58 patients treated with T-chemo, 42 (72%) had HER2 IHC 3+ tumors, 15 (26%) had HER2 IHC 2+/ISH+ tumors, and one patient lacked HER2 IHC information but was ISH+. The distribution of HER2DX *ERBB2* expression categories, using the BC predefined cut-offs, was as follows: 44.8% low, 19.0% medium, and 36.2% high (Figure 2A). In HER2 IHC 3+ tumors, the proportion of HER2DX *ERBB2* low, medium, and high groups was 32.6%, 23.3%, and 44.2%, respectively. In contrast, among HER2 IHC 2+/ISH+ tumors, the distribution was 85.7% low, 7.1% medium, and 7.1% high (Figure 2B).

Association between HER2DX ERBB2 score and survival outcomes in HER2-positive AGC

Notably, HER2 status (i.e. HER2 3+ versus not) was not significantly associated with either PFS [hazard ratio (HR) 0.59, 95% confidence interval (CI) 0.31-1.14, $P = 0.117$] or OS (HR 0.58, 95% CI 0.30-1.10, $P = 0.093$) (Supplementary Figure S3, available at <https://doi.org/10.1016/j.esmooop.2025.105563>). In contrast, HER2DX *ERBB2* mRNA levels were significantly associated with PFS, both as a continuous variable (HR 0.81, 95% CI 0.69-0.95, $P = 0.012$) and as a categorical variable. Patients in the high *ERBB2* mRNA group had a median PFS of 8.1 months, compared with 2.9 months in the low-expression group (HR 0.38, 95% CI 0.19-0.72, $P = 0.003$) (Figure 3A). These associations remained statistically significant after adjusting for HER2 status and other clinical variables, including sex, age, tumor

	Univariate HR	95% CI	P value	Multivariable HR	95% CI	P value
HER2DX <i>ERBB2</i> score (continuous variable)	0.43	0.23-0.81	0.008	0.77	0.62-0.97	0.023
HER2 IHC (3+ versus 2+/ISH+)	0.58	0.30-1.10	0.093	1.04	0.47-2.31	0.928
Sex (male versus female)	1.03	0.50-2.13	0.931	0.49	0.20-1.18	0.109
Age	1.00	0.98-1.02	0.783	1.01	0.99-1.03	0.562
Localization (gastric versus GEJ)	1.28	0.73-2.28	0.392	0.84	0.42-1.69	0.632
ECOG	1.80	1.10-2.94	0.019	1.50	0.86-2.61	0.151

CI, confidence interval; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; GEJ, gastroesophageal junction; HR, hazard ratio; IHC, immunohistochemistry; T-chemo, trastuzumab combined with chemotherapy.

the low-expression group [odds ratio (OR) 4.07, 95% CI 1.18-15.35, $P = 0.030$]. When analyzed as a continuous variable, the HER2DX *ERBB2* score showed a trend toward higher response rates with increasing expression (OR 1.33, 95% CI 1.01-1.82, $P = 0.054$).

Additional molecular signatures from the HER2DX assay in HER2-positive AGC

Finally, we explored additional molecular features provided by the HER2DX assay, including the HER2 amplicon, immune/immunoglobulin G (IGG), and proliferation signatures. Among these, only the HER2 amplicon signature was significantly associated with PFS when analyzed as a continuous variable ($P = 0.024$) (Supplementary Figure S6, available at <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2025.105563>). The IGG and proliferation signatures were not significantly associated with PFS or OS (Supplementary Tables S2 and S3, available at <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2025.105563>).

DISCUSSION

The clinical landscape of HER2-targeted therapies is evolving rapidly, driven by the need for more precise biomarkers to

predict treatment response. This is particularly relevant in HER2-positive AGC, where significant genomic and phenotypic heterogeneity complicates treatment strategies. The high level of HER2 heterogeneity observed in GC impacts the efficacy of T-chemo, underscoring the limitations of conventional biomarkers such as IHC and ISH. In recent years, interest has grown in novel biomarkers that may predict response to anti-HER2 therapies in patients with HER2-positive AGC, beyond what is possible with traditional IHC and ISH. Quantitative assessment of HER2 protein levels by mass-spectrometry-based proteomics has been shown to stratify patients more precisely, with those exceeding defined thresholds (such as 1825 amol/ μ g) achieving significantly better outcomes with trastuzumab, even within IHC/ISH-positive subgroups.²² High-level *ERBB2* (HER2) gene amplification, as determined by next-generation sequencing or circulating tumor DNA, is also correlated with improved responsiveness to anti-HER2 therapy, whereas low-level amplification is linked to attenuated benefit.^{23,24} The absence of co-alterations in genes included in the AMNESIA panel (such as *EGFR*, *MET*, *KRAS*, and elements of the PI3K pathway) appears to predict enhanced response to trastuzumab, while the presence of such alterations is associated with primary resistance.²⁵ Emerging gene expression signatures,

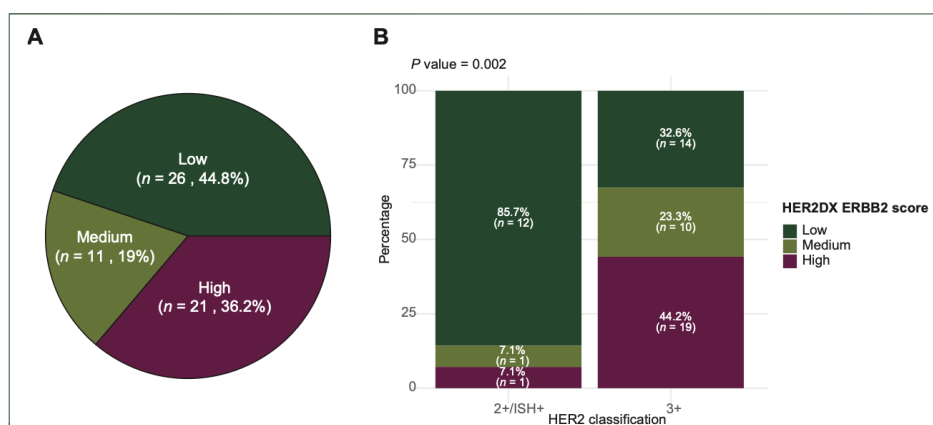


Figure 2. HER2DX *ERBB2* score in 58 patients with human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive advanced gastric cancer (AGC) treated with trastuzumab combined with chemotherapy (T-chemo). (A) Distribution of HER2DX *ERBB2* score groups according to the predefined cut-offs in breast cancer. (B) Distribution of HER2DX *ERBB2* score groups across HER2 IHC classification. ISH, *in situ* hybridization.

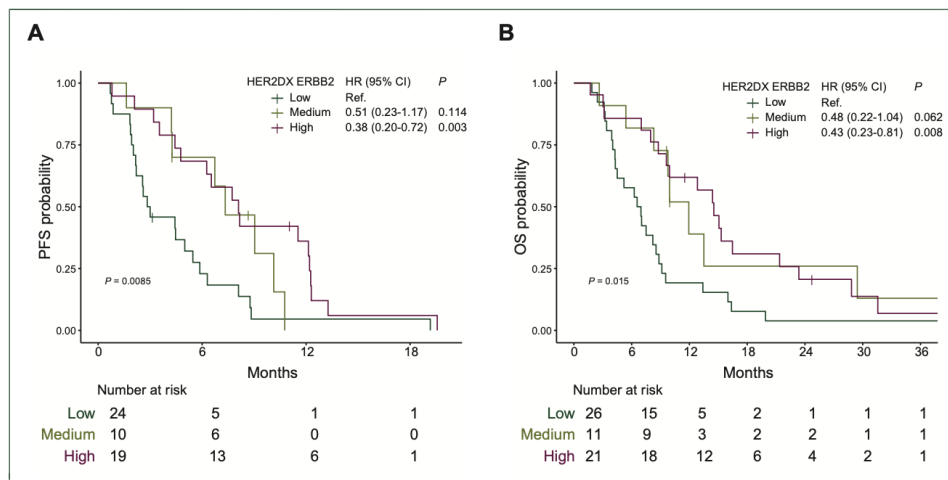


Figure 3. Association of HER2DX ERBB2 score groups with survival outcome. (A) Progression-free survival (PFS). (B) Overall survival (OS). CI, confidence interval; HR, hazard ratio; Ref, reference.

including high HAS2 and SHB expression, are being evaluated as potential predictors of trastuzumab response, though further validation is required.²⁶ Additionally, IHC assessment focused on the trastuzumab-specific epitope—targeting the HER2 extracellular domain—may provide more accurate response prediction than conventional IHC.²⁷

Collectively, these biomarkers are under active investigation and are increasingly informing patient selection and the optimization of anti-HER2 therapeutic strategies in AGC. Innovative molecular approaches, such as ERBB2 mRNA expression profiling, may offer improved patient stratification and more effective personalized treatment strategies.^{12,28,29}

The HER2DX ERBB2 score was originally developed and validated in BC to provide an orthogonal, continuous assessment of ERBB2 mRNA expression, which correlates with HER2 protein levels.¹³ HER2DX cut-offs were derived from a training cohort of 637 patients with HER2-negative and HER2-positive BC, according to ASCO/CAP guidelines.^{13,18} The lower cut-off at 33, which separates HER2DX ERBB2-low from ERBB2-medium/high, corresponds to the clinical HER2-negative threshold, meaning that none of the HER2-negative BC cases (IHC 0, 1+, or 2+/*ISH*-negative) were categorized as ERBB2-medium or high. The upper cut-off at 51, which differentiates ERBB2-medium from ERBB2-high, corresponds to the upper 33% of HER2-positive BC cases, which exhibit the highest ERBB2 mRNA expression levels. Notably, ~10%-15% of clinically HER2-positive BC are identified as HER2DX ERBB2-low, while 60%-70% fall into the HER2DX ERBB2-high category. These findings are clinically relevant, as HER2DX ERBB2-low tumors have been associated with reduced sensitivity to anti-HER2 therapies, whereas HER2DX ERBB2-medium and ERBB2-high tumors tend to derive greater benefit.¹⁸ Although the

HER2DX ERBB2 score has been extensively validated in BC, its applicability to HER2-positive AGC remains an open question. The new GC-specific cut-off identified using ROC curve analysis was also associated with improved survival outcomes. Nevertheless, this GC-specific threshold has not been validated due to the limited availability of GC samples and future validations are warranted.

Our study is the first to evaluate ERBB2 mRNA expression and the HER2DX assay in a real-world cohort of HER2-positive AGC patients. Although there are biological and clinical differences between HER2-positive BCs and GCs, the ERBB2-low group in both cancer types has a poor outcome. Interestingly, the distribution of HER2DX ERBB2 groups observed in HER2-positive AGC differs from HER2-positive BC, where a higher proportion of cases fall into the ERBB2-high category and fewer into ERBB2-low. This difference is consistent with the known biological and molecular heterogeneity of HER2-positive AGC, which is characterized by more frequent intratumoral HER2 heterogeneity compared with BC.^{6,10,11}

In metastatic BC, the HER2DX ERBB2 score has been validated in patients receiving first-line trastuzumab, pertuzumab, and taxane (THP), as well as trastuzumab emtansine (T-DM1) monotherapy, where it successfully stratified patients based on PFS and OS.^{14,30,31} Interestingly, translational analyses of the GATSBY trial,³² which compared T-DM1 with taxane chemotherapy in HER2-positive AGC, revealed that patients with higher ERBB2 mRNA expression exhibited a greater benefit from T-DM1 in terms of PFS.³³ Similarly, the prospective, multicenter VARIANZ study found that only patients with high HER2 expression, as measured by quantitative PCR and corresponding to elevated HER2 mRNA levels, derived significant survival benefit from trastuzumab in metastatic GC or gastroesophageal junction cancer. The study also demonstrated that

discrepancies between local and central HER2 testing, particularly in borderline cases, led to inappropriate treatment selection and poorer outcomes. These findings suggest that quantitative HER2 testing criteria should be considered to optimize patient selection for HER2-targeted therapy in metastatic gastric or gastroesophageal junction cancer, rather than relying solely on traditional IHC/ISH thresholds.^{12,34} Overall, these findings suggest that *ERBB2* mRNA expression could serve as a biomarker for identifying patients with HER2-positive AGC who are more likely to respond favorably to HER2-targeted therapies.

Several key considerations remain. Firstly, the HER2DX *ERBB2* cut-offs were established in BC, and further studies are necessary to confirm their applicability to HER2-positive AGC. Given the distinct biology of HER2-positive AGC, it is possible that different cut-offs may more effectively define HER2-positive subgroups in this disease. Secondly, the heterogeneity of HER2 in AGC suggests that a single biomarker may not fully capture the complexity of HER2-driven oncogenesis. Future studies should investigate combinations of the HER2DX *ERBB2* score with other genomic or immune-based biomarkers to refine treatment stratification. Thirdly, additional data on novel anti-HER2 therapies, such as trastuzumab deruxtecan, as well as combinations of trastuzumab with immunotherapy, are needed, as these are becoming standard of care.^{8,35}

Fourthly, the application of HER2DX in routine clinical practice of HER2-positive AGC remains to be evaluated. While HER2DX is currently more expensive than traditional IHC or ISH-based testing, it provides additional molecular resolution that may support more accurate patient selection. In BC, where the HER2DX test is already validated and used in clinical practice, it has been shown to reduce overall health care costs by minimizing the use of ineffective treatments and associated toxicities and resources.¹⁶ Although formal cost-effectiveness studies in AGC have not yet been conducted, the potential for similar health care savings exists, especially in scenarios where HER2 heterogeneity and ambiguous HER2 status complicate treatment decisions.

Finally, this study provides retrospective evidence derived from a limited sample size across two institutions, underscoring the need for further confirmatory research to determine whether *ERBB2* mRNA expression can reliably guide real-time treatment decisions in HER2-positive AGC. Ongoing and future studies aim to define GC-specific thresholds and validate these findings in larger, independent cohorts.

In conclusion, this study demonstrates that higher *ERBB2* mRNA expression, as measured by the standardized HER2DX *ERBB2* test, is significantly associated with improved PFS and OS in HER2-positive AGC treated with trastuzumab-based chemotherapy. Notably, the HER2DX *ERBB2*-low group, which represents ~45% of cases, exhibits very poor outcomes, highlighting the need for targeted approaches in future clinical trials. Moving forward, further validation in GC cohorts could enhance patient stratification and inform treatment selection.

ACKNOWLEDGEMENTS

Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM).

FUNDING

This work was supported by Fundación científica AECC Ayudas Investigador AECC 2021 [grant number INVES21943BRAS] and Fundación Contigo (HIMALAIA) (no grant number), to FBM; the Breast Cancer Research Foundation [grant numbers BCRF-22-198, BCRF-23-198, BCRF-24-198], Beca Marta Santamaría, Fundación CRIS contra el Cáncer [grant number PR_EX_2021-14], Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris I de Recerca 2021 [grant number SGR 01156], Fundación Fero [grant number BECA ONCOXXI21], Asociación Cáncer de Mama Metastásico IV Premios M. Chiara Giorgetti [grant number: CMM_CHIARAG22_001], to AP; and Sociedad Española de Oncología Médica [grant number: BECA SEOM_CANCER-GASTR22_1] to TS. In addition, PI22/01017 was supported by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and the European Union (AP), and RESCUER was supported by European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme [grant number 847912] AP.

DISCLOSURE

DP reports current full-time employment from AstraZeneca in Oncology Research and Development, Early Oncology Development. FBM reports part-time employment from Reveal Genomics, and has patents filed: PCT/EP2022/086493, PCT/EP2023/060810, EP23382703, and EP23383369. AP reports advisory and consulting fees from AstraZeneca, Roche, Pfizer, Novartis, Daiichi Sankyo, and Peptomyc; lecture fees from AstraZeneca, Roche, Novartis, and Daiichi Sankyo; institutional financial interests from AstraZeneca, Novartis, Roche, and Daiichi Sankyo; stockholder and employee of Reveal Genomics; and patents filed: PCT/EP2016/080056, PCT/EP2022/086493, PCT/EP2023/060810, EP23382703, and EP23383369. TP reports advisory/consulting fees from Roche, Gilead, Novartis, and AstraZeneca; lecture fees from Daiichi Sankyo, Novartis, Pfizer, Lilly, AstraZeneca, Gilead, and Veracyte; and travel expenses from Gilead, Daiichi Sankyo, and Roche. ES reports advisory fees from AstraZeneca and Sysmex; and consultant for Reveal Genomics. AI reports current full-time employment from AstraZeneca in Oncology Research and Development, Late Oncology Development. IM reports advisory and consulting fees from Amgen, Sanofi, Jazz Pharmaceuticals, and Pierre Fabre; speaking fees from AstraZeneca, Bristol Myers Squibb (BMS), Merck KGaA, Sanofi, Daiichi Sankyo, and Merck Sharp & Dohme (MSD); and travel expenses from AstraZeneca, Bristol Myers Squibb (BMS), Merck KGaA, and Merck Sharp & Dohme (MSD). TS reports advisory/consulting fees from Bristol Myers Squibb, BeONE Medicines, Amgen SA; lecture fees from MSD, AstraZeneca, Astellas, Jazz Pharmaceuticals and travel expenses MSD, Daiichi Sankyo, Bristol Myers Squibb. All other authors have declared no conflicts of interest.

REFERENCES

- Thrift AP, Wenker TN, El-Serag HB. Global burden of gastric cancer: epidemiological trends, risk factors, screening and prevention. *Nat Rev Clin Oncol*. 2023;20(5):338-349.
- Ilic M, Ilic I. Epidemiology of stomach cancer. *World J Gastroenterol*. 2022;28(12):1187-1203.
- Komatsu Y, Hironaka S, Tanizawa Y, Cai Z, Piao Y, Boku N. Treatment pattern for advanced gastric cancer in Japan and factors associated with sequential treatment: a retrospective administrative claims database study. *Adv Ther*. 2022;39(1):296-313.
- Li H, Li L, Zhang N, et al. Relationship between HER2 overexpression and long-term outcomes of early gastric cancer: a prospective observational study with a 6-year follow-up. *BMC Gastroenterol*. 2022;22(1):238.
- Ma C, Wang X, Guo J, Yang B, Li Y. Challenges and future of HER2-positive gastric cancer therapy. *Front Oncol*. 2023;13:1080990.
- Wang J, Sun N, Kunzke T, et al. Metabolic heterogeneity affects trastuzumab response and survival in HER2-positive advanced gastric cancer. *Br J Cancer*. 2024;130(6):1036-1045.
- Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2010;376:687-697.
- Janjigian YY, Kawazoe A, Bai Y, et al. Pembrolizumab in HER2-positive gastric cancer. *N Engl J Med*. 2024;391(14):1360-1362.
- Gomez-Martin C, Plaza JC, Pazo-Cid R, et al. Level of HER2 gene amplification predicts response and overall survival in HER2-positive advanced gastric cancer treated with trastuzumab. *J Clin Oncol*. 2013;31(35):4445-4452.
- Pectasides E, Stachler MD, Derks S, et al. Genomic heterogeneity as a barrier to precision medicine in gastroesophageal adenocarcinoma. *Cancer Discov*. 2018;8(1):37-48.
- Zhang M, Hu S, Min M, et al. Dissecting transcriptional heterogeneity in primary gastric adenocarcinoma by single cell RNA sequencing. *Gut*. 2021;70(3):464-475.
- Haffner I, Schierle K, Raimúndez E, et al. HER2 expression, test deviations, and their impact on survival in metastatic gastric cancer: results from the prospective multicenter VARIANZ study. *J Clin Oncol*. 2021;39:1468-1478.
- Prat A, Guarneri V, Pascual T, et al. Development and validation of the new HER2DX assay for predicting pathological response and survival outcome in early-stage HER2-positive breast cancer. *EBioMedicine*. 2022;75:103801.
- Brasó-Maristany F, Griguolo G, Chic N, et al. HER2DX ERBB2 mRNA expression in advanced HER2-positive breast cancer treated with T-DM1. *J Natl Cancer Inst*. 2023;115(3):332-336.
- Bartley AN, Washington MK, Colasacco C, et al. HER2 testing and clinical decision making in gastroesophageal adenocarcinoma: guideline from the College of American Pathologists, American Society for Clinical Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*. 2017;35(4):446-464.
- Martínez-Sáez O, Tapia M, Marín-Aguilera M, et al. Clinical decision impact of HER2DX, an algorithm-powered genomic diagnostic in early-stage HER2-positive breast cancer: results from a prospective real-world study. *ESMO Real World Data Digit Oncol*. 2025;8:100123.
- Griguolo G, Brasó-Maristany F, González-Farré B, et al. ERBB2 mRNA expression and response to Ado-trastuzumab emtansine (T-DM1) in HER2-positive breast cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12(7):1902.
- Tolaney SM, Tung N, Wolff AC, et al. HER2DX genomic test in early-stage HER2-positive breast cancer. *ESMO Open*. 2024;9(12):103987.
- Torres ES, Villacampa G, Pascual T, et al. 7P Independent validation of HER2DX ERBB2 mRNA score to predict HER2-positive (HER2+), HER2-low and HER2-0 status in breast cancer. *ESMO Open*. 2023;8(1):101231.
- Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov*. 2012;2(5):401-404.
- Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*. 2013;6(269):p1.
- An E, Ock CY, Kim TY, et al. Quantitative proteomic analysis of HER2 expression in the selection of gastric cancer patients for trastuzumab treatment. *Ann Oncol*. 2017;28(1):110-115.
- Wang H, Li B, Liu Z, et al. HER2 copy number of circulating tumour DNA functions as a biomarker to predict and monitor trastuzumab efficacy in advanced gastric cancer. *Eur J Cancer*. 2018;88:92-100.
- Kim ST, Banks KC, Pectasides E, et al. Impact of genomic alterations on lapatinib treatment outcome and cell-free genomic landscape during HER2 therapy in HER2+ gastric cancer patients. *Ann Oncol*. 2018;29(4):1037-1048.
- Pietrantonio F, Fucà G, Morano F, et al. Biomarkers of primary resistance to trastuzumab in HER2-positive metastatic gastric cancer patients: the AMNESIA case-control study. *Clin Cancer Res*. 2018;24(5):1082-1089.
- Ebert K, Haffner I, Zwingenberger G, et al. Combining gene expression analysis of gastric cancer cell lines and tumor specimens to identify biomarkers for anti-HER therapies—the role of HAS2, SHB and HBEGF. *BMC Cancer*. 2022;22(1):254.
- Koh J, Nam SK, Lee YW, et al. Trastuzumab specific epitope evaluation as a predictive and prognostic biomarker in gastric cancer patients. *Biomolecules*. 2019;9(12):782.
- Nakamura Y, Kawazoe A, Lordick F, Janjigian YY, Shitara K. Biomarker-targeted therapies for advanced-stage gastric and gastro-oesophageal junction cancers: an emerging paradigm. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021;18(8):473-487.
- Zhao D, Klempner SJ, Chao J. Progress and challenges in HER2-positive gastroesophageal adenocarcinoma. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):50.
- Cortés J, Brasó-Maristany F, Villacampa G, et al. PS4-06: HER2DX ERBB2 mRNA score in first-line metastatic HER2-positive breast cancer treated with docetaxel, trastuzumab and pertuzumab: correlative analysis from CLEOPATRA phase III trial. *Clin Cancer Res*. 2025;31(suppl 12):PS4-PS06.
- Sánchez-Bayona R, Martínez-Sáez O, Romero-Romero D, et al. HER2DX ERBB2 mRNA score in first-line advanced HER2-positive breast cancer treated with chemotherapy, trastuzumab, and pertuzumab. *NPJ Breast Cancer*. 2025;11(1):37.
- Thuss-Patience PC, Shah MA, Ohtsu A, et al. Trastuzumab emtansine versus taxane use for previously treated HER2-positive locally advanced or metastatic gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (GATSBY): an international randomised, open-label, adaptive, phase 2/3 study. *Lancet Oncol*. 2017;18(5):640-653.
- Shah MA, Kang YK, Thuss-Patience PC, et al. Biomarker analysis of the GATSBY study of trastuzumab emtansine versus a taxane in previously treated HER2-positive advanced gastric/gastroesophageal junction cancer. *Gastric Cancer*. 2019;22(4):803-816.
- Kolbe K, Haffner I, Schierle K, et al. Deviating HER2 test results in gastric cancer: analysis from the prospective multicenter VARIANZ study. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2023;149(3):1319-1329.
- Shitara K, Bang YJ, Iwasa S, et al. Trastuzumab deruxtecan in HER2-positive advanced gastric cancer: exploratory biomarker analysis of the randomized, phase 2 DESTINY-Gastric01 trial. *Nat Med*. 2024;30(7):1933-1942.

9.2. Artículo publicado en Cancers.



Article

ERBB2 mRNA Expression and Response to Ado-Trastuzumab Emtansine (T-DM1) in HER2-Positive Breast Cancer

Gaia Griguolo ^{1,2,†} , Fara Brasó-Maristany ^{3,4,†}, Blanca González-Farré ^{4,5}, Tomás Pascual ^{3,4,6} , Núria Chic ^{3,4}, Tamara Sauri ^{3,4}, Ronald Kates ⁷, Oleg Gluz ^{7,8,9}, Débora Martínez ^{3,4}, Laia Paré ⁶, Vassilena Tsvetkova ², David Pesantez ^{3,4}, Maria Vidal ^{3,4,6}, Barbara Adamo ^{3,4}, Montserrat Muñoz ^{3,4,6}, Patricia Galván ^{3,4}, Laura Barberá ^{3,4}, Miriam Cuatrecasas ⁵ , Mathias Christgen ¹⁰, Hans Kreipe ¹⁰, Inés Monge-Escartín ¹¹, Patricia Villagrasa ⁶, Dolors Soy ¹¹ , Tommaso Giarratano ¹, Maria Vittoria Dieci ^{1,2} , Pierfranco Conte ^{1,2} , Nadia Harbeck ¹², Valentina Guarneri ^{1,2} and Aleix Prat ^{3,4,6,*}

- ¹ Division of Medical Oncology 2, Istituto Oncologico Veneto IOV—IRCCS, 35128 Padova, Italy; gaia.griguolo@iov.veneto.it (G.G.); tommaso.giarratano@iov.veneto.it (T.G.); mariavittoria.dieci@unipd.it (M.V.D.); pierfranco.conte@unipd.it (P.C.); valentina.guarneri@unipd.it (V.G.)
 - ² Department of Surgery, Oncology and Gastroenterology, University of Padova, 35124 Padova, Italy; vassilena.tsvetkova@gmail.com
 - ³ Department of Medical Oncology, Hospital Clínic de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain; fbraso@clinic.cat (F.B.-M.); topascual@clinic.cat (T.P.); chic@clinic.cat (N.C.); sauri@clinic.cat (T.S.); demartinez@clinic.cat (D.M.); Pesantez@clinic.cat (D.P.); MJVIDAL@clinic.cat (M.V.); ADAMO@clinic.cat (B.A.); MMUNOZ@clinic.cat (M.M.); galvan@clinic.cat (P.G.); LBARBERA@clinic.cat (L.B.)
 - ⁴ Translational Genomics and Targeted Therapeutics in Solid Tumors, August Pi i Sunyer Biomedical Research Institute (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain; MBGONZAL@clinic.cat
 - ⁵ Department of Pathology, Hospital Clínic de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain; MCUATREC@clinic.cat
 - ⁶ SOLTI breast cancer cooperative group, 08008 Barcelona, Spain; Laia.pare@gruposolti.org (L.P.); patricia.villagrasa@gruposolti.org (P.V.)
 - ⁷ The West German Study Group, 41061 Mönchengladbach, Germany; ronald.kates@t-online.de (R.K.); oleg.gluz@wsg-online.com (O.G.)
 - ⁸ Ev. Hospital Bethesda, Breast Center Niederrhein, 41061 Mönchengladbach, Germany
 - ⁹ University Clinics Cologne, 50937 Cologne, Germany
 - ¹⁰ Medical School Hannover, Institute of Pathology, 30625 Hannover, Germany; christgen.matthias@mh-hannover.de (M.C.); Kreipe.Hans@mh-hannover.de (H.K.)
 - ¹¹ Pharmacy Department, Division of Medicines, Hospital Clínic de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain; monge@clinic.cat (I.M.-E.); DSOY@clinic.cat (D.S.)
 - ¹² Breast Center, Department of Gynecology and Obstetrics, University of Munich (LMU) and CCCLMU, 80337 Munich, Germany; Nadia.Harbeck@med.uni-muenchen.de
- * Correspondence: alprat@clinic.cat
 † These authors contributed equally to this work.

Received: 13 June 2020; Accepted: 8 July 2020; Published: 14 July 2020



Abstract: Trastuzumab emtansine (T-DM1) is approved for the treatment of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive (HER2+) metastatic breast cancer (BC) and for residual disease after neoadjuvant therapy; however, not all patients benefit. Here, we hypothesized that the heterogeneity in the response seen in patients is partly explained by the levels of human epidermal growth factor receptor 2 gene (*ERBB2*) mRNA. We analyzed *ERBB2* expression using a clinically applicable assay in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumors (primary or metastatic) from a retrospective series of 77 patients with advanced HER2+ BC treated with T-DM1. The association of *ERBB2* levels and response was further validated in 161 baseline tumors from the West German Study (WGS) Group ADAPT phase II trial exploring neoadjuvant T-DM1 and 9 in vitro BC cell lines. Finally,

ERBB2 expression was explored in 392 BCs from an in-house dataset, 368 primary BCs from The Cancer Genome Atlas (TCGA) dataset and 10,071 tumors representing 33 cancer types from the PanCancer TCGA dataset. High *ERBB2* mRNA was found associated with better response and progression-free survival in the metastatic setting and higher rates of pathological complete response in the neoadjuvant setting. *ERBB2* expression also correlated with in vitro response to T-DM1. Finally, our assay identified 0.20–8.41% of tumors across 15 cancer types as *ERBB2*-high, including gastric and esophagus adenocarcinomas, urothelial carcinoma, cervical squamous carcinoma and pancreatic cancer. In particular, we identified high *ERBB2* mRNA in a patient with HER2+ advanced gastric cancer who achieved a long-lasting partial response to T-DM1. Our study demonstrates that the heterogeneity in response to T-DM1 is partly explained by *ERBB2* levels and provides a clinically applicable assay to be tested in future clinical trials of breast cancer and other cancer types.

Keywords: *ERBB2* mRNA; HER2-positive breast cancer; T-DM1; antibody–drug conjugates

1. Introduction

Trastuzumab emtansine (T-DM1) is an antibody–drug conjugate (ADC) linking the anti-HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) monoclonal antibody trastuzumab to a microtubule inhibitor, DM1. T-DM1 is approved in several countries as single-agent treatment for HER2+ metastatic breast cancer (BC) patients previously treated with trastuzumab and a taxane. In the phase III randomized EMILIA trial, T-DM1 was compared with capecitabine plus lapatinib in previously treated (trastuzumab and taxane) HER2+ metastatic BC patients [1]. In the phase III randomized TH3RESA trial, enrolling patients previously treated with trastuzumab and lapatinib in the advanced setting, T-DM1 was compared with treatment of physician’s choice [2]. Treatment with T-DM1 was associated with a significant improvement in both progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) in both trials. Recently, trastuzumab emtansine (T-DM1) has also been approved (Food and Drug Administration and European Medicines Agency) for the treatment of residual invasive disease after neoadjuvant treatment for HER2+ BC. In fact, the phase III randomized KATHERINE trial, which enrolled HER2+ BC who were found to have residual invasive disease (breast or axilla) after receiving neoadjuvant therapy containing at least a taxane and trastuzumab, demonstrated a clear improvement in invasive disease-free survival for patients who were switched to T-DM1 instead of continuing trastuzumab [3].

HER2-positivity is currently defined by semi-quantitative methods such as immunohistochemistry (IHC) and in situ hybridization (ISH). This definition was originally designed to predict benefit from trastuzumab in advanced and adjuvant trials [4,5], and has remained the definition for the development of the rest of anti-HER2 therapies, including T-DM1. However, the classic definition of HER2-positive breast cancer has been recently been challenged. For example, the presence of HER2 intratumor heterogeneity plays a significant role in modulating response to anti-HER2 treatments and is associated with worse patient outcomes, in terms of shorter disease free survival and overall survival [6–8], an aspect scarcely accounted for by semi-quantitative evaluations; at the same time, new HER2-targeted ADCs approved [9] or currently under investigation in phase III trials for HER2+ advanced BC have been reported to be active in HER2-low BC (defined as IHC 1+ or 2+/non amplified) [10–12], thus raising the question if different definitions of HER2-positivity should be adopted for each HER2-targeted agent.

Here, we hypothesized that quantitative measurements of HER2, such as *ERBB2* mRNA expression, might further help better identify within HER2+ metastatic BC patients those who will benefit from T-DM1.

2. Results

2.1. *ERBB2* mRNA in Advanced HER2+ BC Treated with T-DM1

Seventy-seven consecutive patients diagnosed with HER2+ advanced BC and treated with T-DM1 at Hospital Clínic of Barcelona (HCB) and Istituto Oncologico Veneto (IOV) in Padova were evaluated. Demographic and disease characteristics of these patients are presented in Table 1. Briefly, all patients were pre-treated with trastuzumab in the (neo)adjuvant or metastatic setting and most had received at least 1 line of HER2-targeted treatment for metastatic disease (median 1, range 0–4). In addition, twenty-eight patients (36%) presented brain metastases at time of initiation of T-DM1. Regarding T-DM1 efficacy, overall response rate (ORR) was 47% (6 complete and 30 partial responses) and median progression-free survival (PFS) was 5.3 months (95% CI 4.4–10.7).

Table 1. Patient characteristics.

Characteristics	n = 77
Median age at BC diagnosis, years (range)	49 (27–88)
Median age at start of T-DM1, years (range)	51 (35–93)
Histology: Ductal	71 (92%)
Lobular/other	5 (6%)
NA	1 (1%)
Histologic Grade: G1	2 (3%)
G2	10 (13%)
G3	28 (36%)
NA	37 (48%)
Hormone-receptor: positive	46 (60%)
negative	31 (40%)
HER2 IHC status: IHC 0	5 (6%)
IHC 1+	3 (4%)
HC 2+	16 (21%)
IHC 3+	50 (65%)
NA *	3 (4%)
HER2 ISH status in HER2 IHC 2+ cases: Amplified	15 (94%)
Not evaluable *	1 (6%)
HER2 ISH status in HER2 IHC 0/1+ cases: Amplified	3 (38%)
Non-amplified *	1 (12%)
Not available *	4 (50%)
Previous (neo)adjuvant treatment	44 (57%)
Median number previous lines HER2-targeted treatment for metastatic disease (range)	1 (0–4)
Previously received:	
Pertuzumab-trastuzumab	31 (40%)
Trastuzumab	41 (53%)
Lapatinib	14 (24%)
Visceral metastases at start of T-DM1	66 (86%)
Brain metastases at start of T-DM1	28 (36%)
Concomitant endocrine treatment during T-DM1	17 (22%)

* These cases were confirmed to be HER2-positive in other tumor samples and treated with T-DM1 according to clinical practice.

ERBB2 mRNA expression was assessed in 77 tumor samples from patients with advanced HER2+ BC treated with T-DM1. After determination of an *ERBB2* mRNA cutoff predictive of response to T-DM1, several cohorts were evaluated. On one hand, the *ERBB2* mRNA assay was validated in 161 patients recruited in the WSG-ADAPT phase II neoadjuvant trial of T-DM1. On the other, *ERBB2* mRNA expression and response was evaluated in 9 in vitro BC cell lines. Finally, *ERBB2* mRNA expression was explored in 392 BCs from an in-house dataset, 368 primary BCs from the TCGA BC dataset, and 10,071 tumors representing 33 cancer types from the PanCancer TCGA dataset (Figure 1).

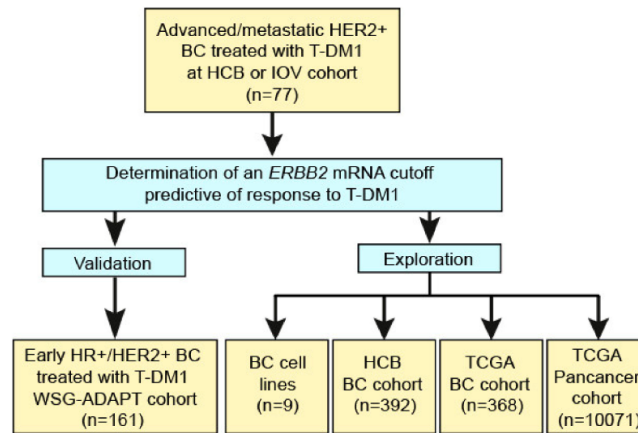


Figure 1. Workflow of the study.

A large range of *ERBB2* mRNA expression was observed (log₂ median 2.98; interquartile range 1.60–3.91). As expected, the expression of *ERBB2* varied according to HER2 IHC expression (0, 1+, 2+ and 3+) (Figure S1). Compared to 0–2+, the expression in 3+ tumor samples was increased by 5.7-fold. Of note, although all patients were classified as HER2+ tumors by guidelines [4], based on clinical history and previous assessment of HER2 status on tumor samples, and were eligible for treatment with T-DM1, 8 of the 74 samples that were re-analyzed for HER2 had an IHC HER2 result of 0 ($n = 5$) or 1+ ($n = 3$). Four of these 8 samples were tested for HER2 amplification by ISH, and HER2 was found amplified in 3 cases and non-amplified in 1 sample.

The clinicopathological variables associated with response (i.e., partial and complete) to T-DM1 were: negative hormone-receptor status, lower number of prior lines of HER2-targeted therapy in the metastatic setting, higher HER2 IHC expression (i.e., 3+ vs. 0–2+) and higher *ERBB2* mRNA as a continuous variable (Table 2). The overall response rate in HER2 3+ was 62.0% compared to 20.8% in the 0–2+ group (odds ratio = 1.84, 95% confidence interval [CI] 1.26–2.69, $p = 0.002$). However, only *ERBB2* mRNA expression (as a continuous variable) and number of prior HER2-targeted lines, but not HER2 IHC expression or hormone-receptor status, were found independently associated with response (Table 2).

Table 2. Univariable and multivariable logistic regression analyses of overall response.

Clinicopathological Variable		Univariate		Multivariable	
		Odds Ratio (95%CI)	<i>p</i>	Odds Ratio (95%CI)	<i>p</i>
Hormone-receptor status	negative	ref	0.038	ref	0.152
	positive	0.37 (0.14–0.95)		0.39 (0.11–1.41)	
De-novo metastatic disease	no	ref	0.990		
	yes	0.99 (0.40–2.49)			
Visceral disease	no	ref	0.577		
	yes	0.69 (0.19–2.50)			
Brain involvement	no	ref	0.966		
	yes	0.98 (0.39–2.49)			
HER2 IHC	≤2+	ref	0.002	ref	0.257
	3+	1.84 (1.26–2.69)		1.32 (0.82–2.13)	
<i>ERBB2</i> (continuous)		1.73 (1.25–2.39)	0.001	1.95 (1.22–3.12)	0.006
Prior lines HER2-targeted therapy	0–1	ref	0.009	ref	0.002
	≥2	0.06 (0.01–0.50)		0.02 (0.002–0.23)	

2.2. Identification of an Optimized ERBB2 mRNA Cutoff

Using T-DM1 response data in advanced HER2+ BC (i.e., PR and CR vs. stable disease [SD] and progression of disease [PD]), an optimized *ERBB2* mRNA cutoff was identified based on Fisher's exact test. This cutoff maximized the area under the curve (AUC) of the receiver operating characteristic (ROC) curve (AUC = 0.701, sensitivity: 100%, specificity: 41.5%) (Figure 2a). The cutoff was *ERBB2* log₂ value = 1.483 and it classified 60 tumors (77.9%) as *ERBB2*-high and 17 (22.1%) as *ERBB2*-low (Figure 2b). As expected, the *ERBB2*-high group had a response rate of 60%, whereas the response rate in the *ERBB2*-low group was 0%. *ERBB2*-high, as compared to *ERBB2*-low, was significantly associated with higher response rates, both in the HER2 IHC 3+ subgroup (67% vs. 0%, Fisher exact $p = 0.017$) and in the HER2 IHC 0–2+ subgroup (42% vs. 0%, Fisher exact $p = 0.037$).

Finally, the *ERBB2*-high group had a better PFS compared to the *ERBB2*-low group (median PFS 6.2 months vs. 2.93 months; hazard ratio = 0.36, 95% CI 0.20–0.65, $p = 0.001$) (Figure 2c), even after correction by number of prior lines of HER2-targeted therapy in the metastatic setting (hazard ratio = 0.38, 95% CI 0.21–0.70, $p = 0.002$).

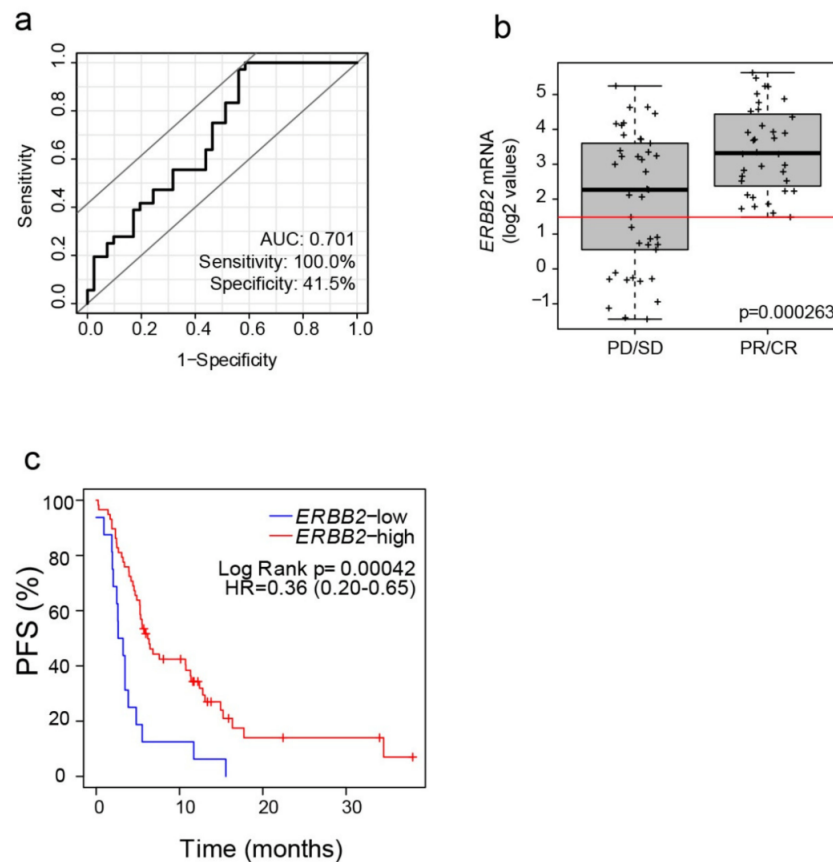


Figure 2. *ERBB2* mRNA expression predicts T-DM1 response and survival in metastatic HER2+ BC. (a) ROC curve to identify *ERBB2* mRNA cutoff of response to T-DM1. (b) *ERBB2* mRNA levels in patients with progressive disease (PD) or stable disease (SD) ($n = 41$) vs. patients achieving complete response (CR) or partial response (PR) ($n = 36$). p -value was determined using a two-tailed unpaired t -test. The *ERBB2* mRNA cutoff is shown as a red line. (c) Kaplan–Meier estimate of progression-free survival (PFS) using the *ERBB2* mRNA cutoff.

2.3. Validation of *ERBB2* mRNA Expression in Early-Stage HER2+ BC Treated with Neoadjuvant T-DM1

To further validate the *ERBB2*-based assay as a predictor of response to T-DM1 in the neoadjuvant setting, we assessed gene expression and pCR data from 158 patients treated with T-DM1 (alone or in combination with endocrine therapy) in the WSG-ADAPT HER2+/hormone receptor-positive (HR+) Phase II Trial [13]. Since gene expression in the WSG-ADAPT trial was determined using a different nCounter CodeSet and house-keeping gene list, we estimated where our *ERBB2* cutoff would fall. To accomplish this, we first determined the percentile of *ERBB2* mRNA expression corresponding to our *ERBB2* cutoff (i.e., 1.483) in 77 HER2+/HR+ primary tumors from our previously published PAMELA trial [14], since this cohort is similar to the WSG-ADAPT cohort. Our *ERBB2* cutoff corresponded to the 50th percentile in primary HER2+/HR+ tumors.

We then applied the 50th percentile of *ERBB2* mRNA expression as the cutpoint to define *ERBB2*-high from *ERBB2*-low in the 161 patients of WSG-ADAPT trial. The overall pCR rate was 34.8%

(56/161). When the *ERBB2* cutoff was evaluated, the pCR rate in the *ERBB2*-high group was 42.9% (33/77) and in the *ERBB2*-low group was 27.4% (23/84) (sensitivity = 58.9%; specificity = 58.1%; odds ratio = 2.0; *p*-value = 0.041). Altogether, these results confirmed a significant association between *ERBB2* mRNA levels and response to neoadjuvant T-DM1.

2.4. Exploring *ERBB2* mRNA Expression and In Vitro Response to T-DM1

Next, we evaluated the expression of *ERBB2* and the effects of T-DM1 across 6 HER2+ (HCC1954, ZR-75-30, BT-474, SK-BR3, HCC1569 and MDA-MB-453) and 3 HER2-negative BC cell lines (MCF7, T-47D and MDA-MB-468) (Figure 3a,b). *ERBB2* mRNA expression varied substantially across cell lines and similarly to patient's tumors (interquartile range of 6.16 across all cell lines and 0.60 within the HER2+ cell lines). As expected, HER2+ cell lines showed higher *ERBB2* expression than the HER2-negative cell lines (mean 1.39 vs. -4.64 , $p = 0.0002$) (Figure S2A). HER2+ cell lines were also more responsive to T-DM1 than HER2-negative cell lines (Figure 3c and Figure S2B), consistently with findings reported by others [15,16]. Response was defined as the decrease in cell viability (%) at 72 h of T-DM1 treatment. HER2+ cell lines showed greater response to T-DM1 than HER2-negative cell lines (mean response 54.71% vs. 5.24%, $p = 0.008$) (Figure S2C). Importantly, we observed response to T-DM1 in all cell lines with *ERBB2* mRNA levels above the cutoff. In addition, correlation between *ERBB2* mRNA and T-DM1 response was observed across the 9 cell lines (coefficient = 0.7, $p = 0.05$) (Figure 3d). This correlation coefficient suggests that 76.6% of the differences in response across cell lines may be explained by *ERBB2* levels.

2.5. *ERBB2* mRNA Expression in BC across the HER2 IHC-Based Groups

To determine the proportion of *ERBB2*-high tumors across the HER2 IHC groups, we analyzed a retrospective dataset of 392 tumor samples from HCB with both HER2 IHC status and gene expression data. As HER2 protein increased, *ERBB2* mRNA levels increased as well, and all possible comparisons (except for 1+ vs. 2+/non-amplified) of *ERBB2* expression between groups were statistically significant. According to our pre-established cutoff, the proportion of *ERBB2*-high across 0, 1+, 2+/ISH-negative, 2+/ISH-positive and 3+ was 0%, 1.1%, 0%, 9.38% and 76.17%, respectively (Figure 4a).

To provide more evidence of the association of *ERBB2* and HER2 IHC expression in BC, we explored 368 BCs from the TCGA dataset including *ERBB2* mRNA expression and HER2 IHC. Since the methodology to assess *ERBB2* mRNA expression in our dataset (nCounter) was different to the TCGA dataset (RNAseq), the range of *ERBB2* mRNA expression was different for each cohort. Therefore, we estimated where the pre-established cutoff would fall in the TCGA cohort. To do so, we calculated the median *ERBB2* mRNA log₂ values for each IHC group in HCB and TCGA cohorts (Figure S3A) and the Pearson correlation between the two cohorts (Figure S3B). The proportion of *ERBB2*-high across 0, 1+, 2+/ISH-negative, 2+/ISH-positive and 3+ was 0%, 0.59%, 0%, 25% and 74.04%, respectively (Figure 4b). The correlation coefficient between these *ERBB2*-high proportions and the proportions found in our in-house dataset was 0.975.

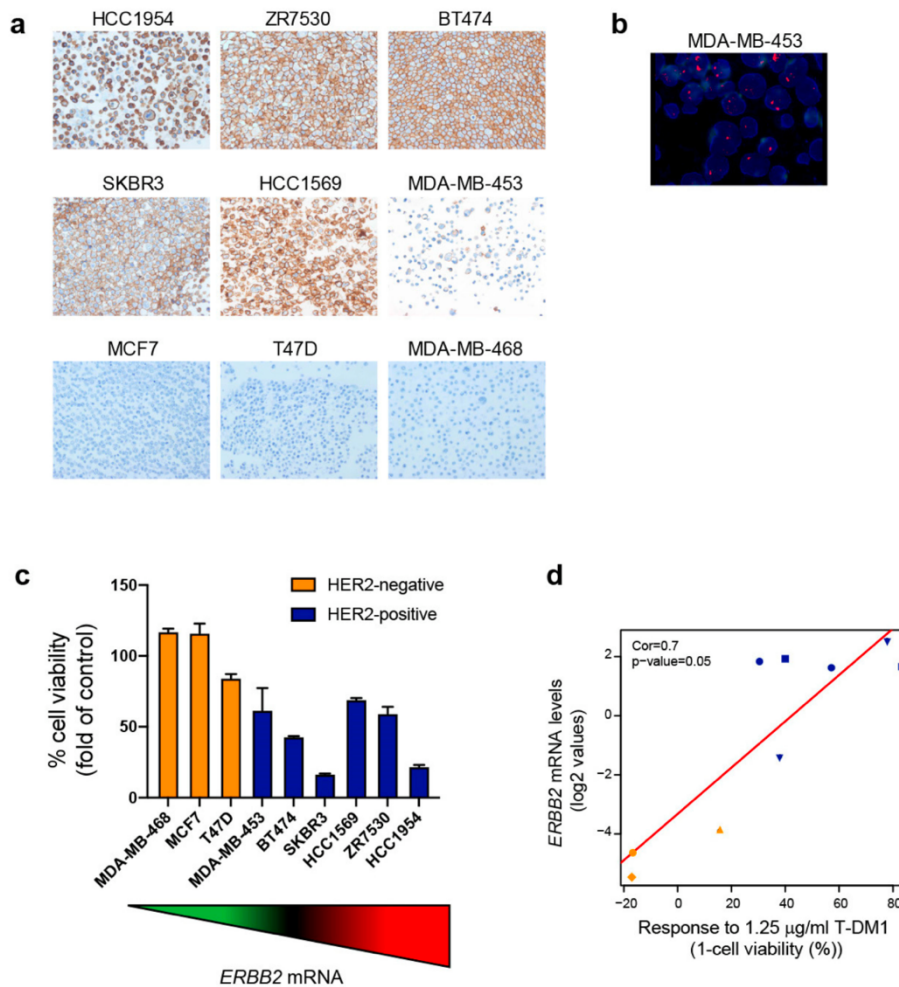


Figure 3. *ERBB2* mRNA expression correlates with response to T-DM1 in cell lines. (a) Images of HER2 expression by IHC in 9 BC cell lines (40×). (b) Image of HER2 amplification by ISH (100×). (c) Cell viability of 9 BC cell lines upon 72 h of treatment with 1.25 µg/mL T-DM1. Data points represent the mean; error bars represent the standard error of the mean of 3 independent experiments. (d) Spearman correlation between *ERBB2* mRNA expression and response to 1.25 µg/mL T-DM1 expressed as 1-cell viability (%).

2.7. *ERBB2* mRNA Expression in HER2+ Gastric Cancer Treated with T-DM1

We retrospectively studied the case of a 42-year-old male with a gastroesophageal adenocarcinoma diagnosed at HCB. In September 2011, a total esophagectomy and cervical esophago-gastric anastomosis was performed. Ascites and pleural effusion positive cytology adenocarcinoma were observed after surgery, and the patient was diagnosed with a HER2 3+ pT2pN3pM1 stage IV gastroesophageal junction adenocarcinoma. The patient subsequently received 6 cycles of first-line treatment with cisplatin plus 5-fluorouracil and trastuzumab achieving a radiological CR.

After 10 months, the patient presented with lung and bone PD and was enrolled in the GATSBY phase II/III trial [17] and treated with T-DM1 (2.4 mg/kg weekly) monotherapy. Since July 2013, he received 8 cycles of T-DM1 and obtained a PR (Table 3 and Figure S4) and a time-to-progression of 5.4 months. Of note, median PFS and ORR in GATSBY's T-DM1 arm was 2.7 months and 20.6%, respectively [17]. Concordant with the efficacy results obtained in our patient, *ERBB2* mRNA levels measured in the primary tumor were high (i.e., 2.99). Upon PD, the patient received third-line docetaxel monotherapy achieving SD until July 2014 when he presented with a central nervous system PD. The patient was lost to follow-up in November 2014.

Table 3. Response evaluation criteria in solid tumors (RECIST) table for a gastric cancer case before and during T-DM1 treatment.

Target Lesion	Screening	Pre Cycle 3	Pre Cycle 5	Pre Cycle 7	Pre Cycle 9
Right upper lobe lung metastasis	14 mm	8 mm	8 mm	8 mm	10 mm
Left upper lobe lung metastasis	10 mm	10 mm	10 mm	10 mm	12 mm
Mesenteric adenopathy	17 mm	11 mm	11 mm	11 mm	18 mm
Retroperitoneal adenopathy	18 mm	9 mm	9 mm	9 mm	17 mm
Total	59 mm	38 mm	38 mm	38 mm	57 mm
Response	NA	39% reduction	39% reduction	39% reduction	36% increase
	NA	PR	Maintained PR	Maintained PR	PD

3. Discussion

As an increasing number of HER2-targeted agents are becoming available in clinical practice, biomarkers are increasingly needed that can predict the response to specific anti-HER2 agents beyond the classic IHC/ISH definition of HER2-positivity. In this context, HER2 3+ tumors have been reported to benefit more from T-DM1 than other IHC groups in retrospective and prospective studies [7,18]. Moreover, benefit associated with the use of post-neoadjuvant T-DM1 as compared to trastuzumab in the KATHERINE trial appeared to more marked in HER2 3+ than in HER2 2+ tumors [19]. Greater benefit to T-DM1 in HER2 3+ tumors has also been reported in the KATE2 trial [20] and other cancer types [21,22].

ERBB2 mRNA expression has been previously associated with a more pronounced T-DM1 benefit in several randomized clinical trials which tested the use of T-DM1 as compared to other HER2-targeted treatments in HER2+ metastatic BC [23–25]. In the randomized EMILIA trial, which compared T-DM1 and capecitabine-lapatinib (CL) for pretreated metastatic HER2+ BC patients, patients with tumor *ERBB2* mRNA levels above median showed a greater benefit from the use of T-DM1 in terms of ORR and overall survival (OS). However, T-DM1 treatment, compared with CL, reduced the risk of PD to a similar degree regardless of tumor *ERBB2* mRNA levels and tests for interaction between treatment and *ERBB2* mRNA levels were not statistically significant ($p = 0.07$). However, tests were exploratory and not powered to detect an interaction [23].

Moreover, data from the randomized TH3RESA trial, which compared T-DM1 vs. treatment of physician choice for pretreated metastatic HER2+ BC patients, confirmed that patients with higher *ERBB2* mRNA levels benefited more from T-DM1 than patients with lower *ERBB2* mRNA levels [24]. Similar results confirming an association between higher *ERBB2* mRNA levels and increased T-DM1

benefit, both in terms of ORR and PFS, were also reported for several randomized phase II trials [25–27]. Furthermore, the impact of *ERBB2* mRNA levels on T-DM1 benefit has been reported in other cancers beyond BC. A translational study [21] evaluating gastric cancer samples of the GATSBY trial [17] demonstrated more benefit to T-DM1 in terms of PFS in patients with tumors with higher *ERBB2* mRNA levels [21].

In addition, recently presented biomarker data from the post-neoadjuvant KATHERINE trial have been reported showing that patients with high *ERBB2* mRNA levels (above median) at surgery have a worse outcome than patients with low *ERBB2* mRNA levels when treated with adjuvant trastuzumab, but not when treated with adjuvant T-DM1. In fact, while both patients with *ERBB2* mRNA levels above and below median levels benefited from switching to T-DM1, those with higher *ERBB2* mRNA levels (above median) benefited more from T-DM1 than those with lower *ERBB2* mRNA levels, potentially questioning the use of median mRNA expression value as cutoff in this setting [28].

Our results not only confirm the association between *ERBB2* mRNA expression and T-DM1 benefit in a more heterogeneous real-world setting, but also highlight the relevance of a quantitative method as a better method to predict response to T-DM1 by proposing a cutoff for selecting patients responsive to T-DM1 both in the metastatic and neoadjuvant settings. Other HER2-targeted ADCs are entering clinical practice, for instance DS-8201, which has shown activity in HER2-low advanced BC [12,29]. Therefore, we might expect that different *ERBB2* cutoffs will be needed for different ADCs. In this context, the use of a quantitative method such as *ERBB2* mRNA expression, which offers the opportunity to identify different cutoffs, might potentially improve treatment personalization. Moreover, a quantitative method as *ERBB2* mRNA expression might recapitulate tumor heterogeneity in a single, easily manageable assay.

Our study has several limitations. First, the study cohort is retrospective and only involved a limited number of patients who were treated according to everyday clinical practice, thus being heterogeneous, both in previous lines of treatment received and in the kind of histological samples available (primary tumor vs. metastasis). Despite this, our analysis was able to clearly identify *ERBB2* mRNA expression as the main predictor of responsiveness together with number of previous lines of HER2-targeted treatment. Moreover, we validated *ERBB2* mRNA as a predictor of response in the neoadjuvant setting. This highlights the clinical importance of *ERBB2* mRNA expression. Second, we could not address if the biomarker works better when primary or metastatic tumor samples are used. Third, our data in non-BC-types is currently in the hypothesis-generating stage.

4. Materials and Methods

4.1. Patient Datasets and Tumor Samples

This study analyzed a retrospective cohort of 77 HER2+ (as defined by standard guidelines [4]) advanced/metastatic BC patients treated with T-DM1 between January 2013 and November 2019 in two independent institutions: Hospital Clínic of Barcelona (HCB) ($n = 26$) and Istituto Oncologico Veneto (IOV) in Padova ($n = 51$). One formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor sample per patient was selected: if available, a biopsy of metastatic site nearest in time to start of T-DM1 was preferred ($n = 38$); otherwise primary tumor sample was used ($n = 39$), favouring pre-treatment biopsy over surgical sample for patients treated with neoadjuvant therapy. Gene expression was also assessed in 77 primary HER2+/HR+ BC of the PAMELA trial [14], and gene expression and pathological complete response (pCR) data was evaluated in 161 HER2+ primary samples of the T-DM1 arms (A&B) of the WSG-ADAPT HER2+/HR+ Phase II Trial [13]. In addition, we evaluated 392 primary BCs from HCB with available HER2 IHC status and gene expression data evaluated at the nCounter platform; 368 primary BCs from The Cancer Genome Atlas (TCGA) with HER2 IHC status and *ERBB2* RNASeqv2 data; and 10,071 TCGA pan-cancers with *ERBB2* RNASeqv2 data. Finally, we analyzed a primary tumor sample of a patient with advanced gastric cancer treated with T-DM1 in the GATSBY trial [17] at HCB.

4.2. *In Vitro* Cell Lines and T-DM1

The BC cell lines BT-474, HCC1569, HCC1954, MCF7, MDA-MB-453, MDA-MB-468, SK-BR3, T-47D and ZR-75-30 were purchased from the American Type Culture Collection. All cell lines were maintained as recommended by the suppliers. T-DM1 was provided as remnant of the product used in common clinical practice by the oncology pharmacy Service at HCB.

4.3. *HER2 Immunohistochemistry and Fluorescent In Situ Hybridization*

HER2 status was re-assessed in 74 of 77 FFPE tumors of the T-DM1 HCB/IOV cohort and FFPE BC cell line pellets by either IHC and/or in situ hybridization (ISH) according to the American Society of Clinical Oncologists (ASCO)/College of American Pathologists (CAP) guidelines. IHC was performed on 2- μ m-thick sections using anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody kit (Ventana Medical Systems Inc., Oro Valley, AZ, USA) and ISH for HER2 was performed on 4- μ m-thick sections using the FDA-approved XL ERBB2 (HER2/NEU) AMP (MetaSystems Probes, Altlußheim, Germany) according to manufacturer's instructions.

4.4. *In Vitro* Cell Viability Assay

BC cell lines were plated in triplicate at 4000 cells/well in 96-well plates. Cells were then treated with 1.25 μ g/mL T-DM1. Cell viability was determined 72 h after treatment using CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) following the manufacturer's instructions, and quantified using the Gen5 Microplate Reader and Imager Software (BioTek, Winooski, VT, USA). Data were analyzed using GraphPad Prism 5 software (GraphPad, San Diego, CA, USA).

4.5. *RNA Extraction*

RNA samples were extracted from biopsy and surgical tumor FFPE material using the High Pure FFPE RNA isolation kit (Roche) following manufacturer's protocol. FFPE slides with at least 10% tumor cells and 4 mm² of tissue were used for each tumor specimen, and macrodissection was performed to avoid contamination with normal breast tissue if needed. Cell line RNA samples were extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA samples were quantified at the NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

4.6. *Gene Expression Analysis*

The nCounter platform (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA) was used to analyze RNA samples from tumors and cell lines. A minimum of 100 ng of total RNA was used to measure the expression of 50 genes of the PAM50 intrinsic subtype predictor assay and 5 housekeeping genes (*ACTB*, *MRPL19*, *PSMC4*, *RPLP0*, and *SF3A1*). Expression counts were then normalized using the nSolver 4.0 software (nanoString, Seattle, WA, USA) and custom scripts in R 3.4.3 (R Foundation, Vienna, Austria) [30].

4.7. *Statistical Analysis*

Univariate and multivariable logistic regression analyses were used to investigate the association of each variable with overall response. Odds ratios and 95% confidence intervals (CIs) were calculated for each variable. An optimized cutoff of gene expression was identified to predict overall response. Univariate and multivariable Cox proportional hazard regression analyses were performed to investigate the association of each variable with PFS. All statistical analyses were carried out using the R software version 3.4.3.

5. Conclusions

To conclude, our study presents a clinically applicable assay to help identify patients most likely to benefit from T-DM1, regardless of HER2 status. In addition, the assay could help identify patients most likely to benefit from other HER2-targeted ADCs across cancer types.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/7/1902/s1>, Table S1: Proportions of *ERBB2*-high tumors across cancer types, Table S2: Table of abbreviations, Figure S1: Distribution of *ERBB2* mRNA levels across HER2 IHC subgroups of tumors of the T-DM1 cohort, Figure S2: *ERBB2* mRNA levels and T-DM1 response in BC cell lines, Figure S3: Determination of an *ERBB2* mRNA cutoff for the TCGA dataset, Figure S4: Partial response to T-DM1 in gastric cancer patient.

Author Contributions: Experimental study design: G.G., F.B.-M. and A.P. Data acquisition and analysis: G.G., F.B.-M., B.G.-F., T.P., N.C., T.S., R.K., O.G., D.M., V.T., D.P., P.G., L.B., M.C. (Miriam Cuatrecasas), M.C. (Mathias Christgen), H.K., T.G. Data interpretation: G.G., F.B.-M., B.G.-F., T.P., N.C., T.S., R.K., O.G., D.M., L.P., V.T., D.P., M.V.D., B.A., M.M., P.G., L.B., M.C. (Miriam Cuatrecasas), M.C. (Mathias Christgen), H.K., I.M.-E., P.V., D.S., T.G., M.V.D., P.C., N.H., V.G., A.P.; Writing of the manuscript: G.G., F.B.-M. and A.P. Review of the manuscript: all authors. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study has received funding from Instituto de Salud Carlos III—PI16/00904 and PI19/01846 (to A.P.), Breast Cancer Now—2018NOVPCC1294 (to A.P.), Breast Cancer Research Foundation-AACR Career Development Awards for Translational Breast Cancer Research 19-20-26-PRAT (to A.P.), Fundació La Marató TV3 201935-30 (to A.P.), the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme H2020-SC1-BHC-2018-2020 (to A.P.), Pas a Pas (to A.P.), Save the Mama (to A.P.), Fundación Científica Asociación Española Contra el Cáncer AECC_Postdoctoral17-1062 (to F. B-M), Generalitat de Catalunya Peris PhD4MD 2019 SLT008/18/00122 (to N.C.), DiSCOG—University of Padova DOR 1721185/17 and DOR 1830512/18 (to M.V.D.), Conquer Cancer Foundation/Shanken Family Foundation -YIA in Breast Cancer 2019 (to G.G.).

Conflicts of Interest: Potential conflicts of interest are the following: A.P. reports consulting fees from Nanostring Technologies Roche, Pfizer, Novartis and Daiichi Sankyo outside the submitted work. A.P. is listed as an inventor on a patent application on HER2 as a predictor of response to dual HER2 blockade in the absence of cytotoxic therapy (WO2018/103834A1). M.V.D. reports lecture fees and honoraria for participation on advisory boards from Roche, Genomic Health, Eli Lilly, and Celgene outside the submitted work. P.F.C. reports honoraria for participation on advisory boards from Eli Lilly, Novartis, AstraZeneca, Tesaro, Roche Genentech, Daiichi Sankyo, and BMS, and research grants to the Institution from Novartis, Roche Genentech, Merck KGaA, and BMS outside the submitted work. V.G. reports lecture fees and honoraria for participation on advisory boards from Eli Lilly, Roche Genentech and Novartis, honoraria for participation on Speakers bureau from Eli Lilly and Novartis outside the submitted work. N.H. reports fees for consulting and/or lectures Novartis and Roche outside the submitted work and minority ownership in WSG (Westdeutsche Studiengruppe).

References

- Verma, S.; Miles, D.; Gianni, L.; Krop, I.E.; Welslau, M.; Baselga, J.; Pegram, M.; Oh, D.-Y.; Diéras, V.; Guardino, E.; et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *New Engl. J. Med.* **2012**, *367*, 1783–1791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Krop, I.E.; Kim, S.-B.; González-Martín, A.; Lorusso, P.M.; Ferrero, J.-M.; Smitt, M.; Yu, R.; Leung, A.C.F.; Wildiers, H. Trastuzumab emtansine versus treatment of physician’s choice for pretreated HER2-positive advanced breast cancer (TH3RESA): A randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2014**, *15*, 689–699. [[CrossRef](#)]
- Von Minckwitz, G.; Huang, C.-S.; Mano, M.S.; Loibl, S.; Mamounas, E.P.; Untch, M.; Wolmark, N.; Rastogi, P.; Schneeweiss, A.; Redondo, A.; et al. Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. *New Engl. J. Med.* **2019**, *380*, 617–628. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wolff, A.C.; Hammond, M.E.H.; Hicks, D.G.; Dowsett, M.; McShane, L.M.; Allison, K.H.; Allred, D.C.; Bartlett, J.; Bilous, M.; Fitzgibbons, P.; et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 3997–4013. [[CrossRef](#)]
- Slamon, D.J.; Leyland-Jones, B.; Shak, S.; Fuchs, H.; Paton, V.; Bajamonde, A.; Fleming, T.; Eiermann, W.; Wolter, J.; Pegram, M.D.; et al. Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *New Engl. J. Med.* **2001**, *344*, 783–792. [[CrossRef](#)]
- Lee, H.J.; Na Seo, A.; Kim, E.J.; Jang, M.H.; Suh, K.J.; Ryu, H.S.; Kim, Y.J.; Kim, J.H.; Im, S.-A.; Gong, G.; et al. HER2 Heterogeneity Affects Trastuzumab Responses and Survival in Patients With HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* **2014**, *142*, 755–766. [[CrossRef](#)]

7. Filho, O.M.; Viale, G.; Trippa, L.; Li, T.; Yardley, D.A.; Mayer, I.A.; Abramson, V.G.; Arteaga, C.L.; Spring, L.; Waks, A.G.; et al. HER2 heterogeneity as a predictor of response to neoadjuvant T-DM1 plus pertuzumab: Results from a prospective clinical trial. *J. Clin. Oncol.* **2019**, *37*, 502. [[CrossRef](#)]
8. Hou, Y.; Nitta, H.; Wei, L.; Banks, P.M.; Portier, B.; Parwani, A.V.; Li, Z. HER2 intratumoral heterogeneity is independently associated with incomplete response to anti-HER2 neoadjuvant chemotherapy in HER2-positive breast carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.* **2017**, *166*, 447–457. [[CrossRef](#)]
9. Modi, S.; Saura, C.; Yamashita, T.; Park, Y.H.; Kim, S.-B.; Tamura, K.; Andre, F.; Iwata, H.; Ito, Y.; Tsurutani, J.; et al. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Positive Breast Cancer. *New Engl. J. Med.* **2019**, *382*, 610–621. [[CrossRef](#)]
10. Shitara, K.; Iwata, H.; Takahashi, S.; Tamura, K.; Park, H.; Modi, S.; Tsurutani, J.; Kadowaki, S.; Yamaguchi, K.; Iwasa, S.; et al. Trastuzumab deruxtecan (DS-8201a) in patients with advanced HER2-positive gastric cancer: a dose-expansion, phase 1 study. *Lancet Oncol.* **2019**, *20*, 827–836. [[CrossRef](#)]
11. Banerji, U.; Van Herpen, C.M.L.; Saura, C.; Thistlethwaite, F.; Lord, S.; Moreno, V.; MacPherson, I.R.; Boni, V.; Rolfo, C.; E De Vries, E.G.; et al. Trastuzumab duocarmazine in locally advanced and metastatic solid tumours and HER2-expressing breast cancer: a phase 1 dose-escalation and dose-expansion study. *Lancet Oncol.* **2019**, *20*, 1124–1135. [[CrossRef](#)]
12. Modi, S.; Park, H.; Murthy, R.K.; Iwata, H.; Tamura, K.; Tsurutani, J.; Moreno-Aspitia, A.; Doi, T.; Sagara, Y.; Redfern, C.; et al. Antitumor Activity and Safety of Trastuzumab Deruxtecan in Patients With HER2-Low-Expressing Advanced Breast Cancer: Results From a Phase Ib Study. *J. Clin. Oncol.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Harbeck, N.; Gluz, O.; Christgen, M.; Kates, R.E.; Braun, M.; Küemmel, S.; Schumacher, C.; Potenberg, J.; Kraemer, S.; Kleine-Tebbe, A.; et al. De-Escalation Strategies in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)-Positive Early Breast Cancer (BC): Final Analysis of the West German Study Group Adjuvant Dynamic Marker-Adjusted Personalized Therapy Trial Optimizing Risk Assessment and Therapy Response Prediction in Early BC HER2- and Hormone Receptor-Positive Phase II Randomized Trial—Efficacy, Safety, and Predictive Markers for 12 Weeks of Neoadjuvant Trastuzumab Emtansine With or Without Endocrine Therapy (ET) Versus Trastuzumab Plus ET. *J. Clin. Oncol.* **2017**, *35*, 3046–3054. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Llombart, A.; Cortés, J.; Paré, L.; Galván, P.; Bermejo, B.; Martínez, N.; Vidal, M.; Pernas, S.; López, R.; Muñoz, M.; et al. HER2-enriched subtype as a predictor of pathological complete response following trastuzumab and lapatinib without chemotherapy in early-stage HER2-positive breast cancer (PAMELA): an open-label, single-group, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **2017**, *18*, 545–554. [[CrossRef](#)]
15. Lambert, J.M.; Chari, R.V. Ado-trastuzumab Emtansine (T-DM1): An Antibody–Drug Conjugate (ADC) for HER2-Positive Breast Cancer. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 6949–6964. [[CrossRef](#)]
16. Phillips, G.D.L.; Li, G.; Dugger, D.L.; Crocker, L.M.; Parsons, K.L.; Mai, E.; Lambert, J.M.; Chari, R.V.; Lutz, R.J.; Wong, W.L.T.; et al. Targeting HER2-Positive Breast Cancer with Trastuzumab-DM1, an Antibody-Cytotoxic Drug Conjugate. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 9280–9290. [[CrossRef](#)]
17. Thuss-Patience, P.C.; A Shah, M.; Ohtsu, A.; Van Cutsem, E.; Ajani, J.A.; Castro, H.; Mansoor, W.; Chung, H.C.; Bodoky, G.; Shitara, K.; et al. Trastuzumab emtansine versus taxane use for previously treated HER2-positive locally advanced or metastatic gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (GATSBY): an international randomised, open-label, adaptive, phase 2/3 study. *Lancet Oncol.* **2017**, *18*, 640–653. [[CrossRef](#)]
18. Yazaki, S.; Hashimoto, J.; Ogita, S.; Nakano, E.; Yamauchi, T. Lower response to T-DM1 in metastatic breast cancer patients with HER2 IHC score of 2 and FISH positive compared with IHC score of 3. *Ann. Oncol.* **2017**, *28*, v102–v103. [[CrossRef](#)]
19. Geyer, C.; Huang, C.-S.; Mano, M.; Loibl, S.; Mamounas, E.; Untch, M.; Wolmark, N.; Rastogi, P.; Fischer, H.; Redondo, A.; et al. Abstract GS1-10: Phase III study of trastuzumab emtansine (T-DM1) vs trastuzumab as adjuvant therapy in patients with HER2-positive early breast cancer with residual invasive disease after neoadjuvant chemotherapy and HER2-targeted therapy including trastuzumab: Primary results from KATHERINE. *Gen. Sess. Abstr.* **2019**, *79*, GS1–GS10. [[CrossRef](#)]
20. Emens, L.; Esteva, F.; Beresford, M.; Saura, C.; De Laurentiis, M.; Kim, S.-B.; Im, S.-A.; Patre, M.; Wang, Y.; Mani, A.; et al. Abstract PD3-01: Results from KATE2, a randomized phase 2 study of atezolizumab (atezo)+trastuzumab emtansine (T-DM1) vs placebo (pbo)+T-DM1 in previously treated HER2+ advanced breast cancer (BC). *Poster Discuss. Abstr.* **2019**, *79*. [[CrossRef](#)]

21. Shah, M.A.; Kang, Y.-K.; Thuss-Patience, P.C.; Ohtsu, A.; Ajani, J.A.; Van Cutsem, E.; Hoersch, S.; Harle-Yge, M.-L.; De Haas, S.L. Biomarker analysis of the GATSBY study of trastuzumab emtansine versus a taxane in previously treated HER2-positive advanced gastric/gastroesophageal junction cancer. *Gastric Cancer* **2019**, *22*, 803–816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Peters, S.; Stahel, R.A.; Bubendorf, L.; Bonomi, P.; Villegas, A.; Kowalski, D.M.; Baik, C.S.; Isla, D.; Carpeño, J.D.C.; Garrido, P.; et al. Trastuzumab Emtansine (T-DM1) in Patients with Previously Treated HER2-Overexpressing Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: Efficacy, Safety, and Biomarkers. *Clin. Cancer Res.* **2018**, *25*, 64–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Baselga, J.; Phillips, G.D.L.; Verma, S.; Ro, J.; Huober, J.; Guardino, A.E.; Samant, M.K.; Olsen, S.; De Haas, S.L.; Pegram, M.D. Relationship between Tumor Biomarkers and Efficacy in EMILIA, a Phase III Study of Trastuzumab Emtansine in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 3755–3763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kim, S.-B.; Wildiers, H.; Krop, I.E.; Smitt, M.; Yu, R.; De Haas, S.L.; Gonzalez-Martin, A. Relationship between tumor biomarkers and efficacy in TH3RESA, a phase III study of trastuzumab emtansine (T-DM1) versus treatment of physician's choice in previously treated HER2-positive advanced breast cancer. *Int. J. Cancer* **2016**, *139*, 2336–2342. [[CrossRef](#)]
25. A Perez, E.; Hurvitz, S.A.; Amler, L.C.; E Mundt, K.; Ng, V.W.; Guardino, E.; Gianni, L. Relationship between HER2 expression and efficacy with first-line trastuzumab emtansine compared with trastuzumab plus docetaxel in TDM4450g: a randomized phase II study of patients with previously untreated HER2-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.* **2014**, *16*, R50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Krop, I.E.; Lorusso, P.; Miller, K.D.; Modi, S.; Yardley, D.; Rodriguez, G.; Guardino, E.; Lu, M.; Zheng, M.; Girish, S.; et al. A Phase II Study of Trastuzumab Emtansine in Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Metastatic Breast Cancer Who Were Previously Treated With Trastuzumab, Lapatinib, an Anthracycline, a Taxane, and Capecitabine. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 3234–3241. [[CrossRef](#)]
27. Burris, H.A.; Rugo, H.S.; Vukelja, S.J.; Vogel, C.L.; Borson, R.A.; Limentani, S.; Tan-Chiu, E.; Krop, I.E.; Michaelson, R.A.; Girish, S.; et al. Phase II Study of the Antibody Drug Conjugate Trastuzumab-DM1 for the Treatment of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)-Positive Breast Cancer After Prior HER2-Directed Therapy. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 398–405. [[CrossRef](#)]
28. Denkert, C.; Lambertini, C.; Fasching, P.A.; Pogue-Geile, K.L.; Mano, M.S.; Untch, M.; Wolmark, N.; Huang, C.-S.; Loibl, S.; Mamounas, E.P.; et al. Biomarker data from KATHERINE: A phase III study of adjuvant trastuzumab emtansine (T-DM1) versus trastuzumab (H) in patients with residual invasive disease after neoadjuvant therapy for HER2-positive breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **2020**, *38*, 502. [[CrossRef](#)]
29. Doi, T.; Shitara, K.; Naito, Y.; Shimomura, A.; Fujiwara, Y.; Yonemori, K.; Shimizu, C.; Shimoi, T.; Kuboki, Y.; Matsubara, N.; et al. Safety, pharmacokinetics, and antitumour activity of trastuzumab deruxtecan (DS-8201), a HER2-targeting antibody–drug conjugate, in patients with advanced breast and gastric or gastro-oesophageal tumours: a phase 1 dose-escalation study. *Lancet Oncol.* **2017**, *18*, 1512–1522. [[CrossRef](#)]
30. Cejalvo, J.M.; De Dueñas, E.M.; Galvan, P.; García-Recio, S.; Gasión, O.B.; Paré, L.; Antolin, S.; Martinello, R.; Blancas, I.; Adamo, B.; et al. Intrinsic Subtypes and Gene Expression Profiles in Primary and Metastatic Breast Cancer. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 2213–2221. [[CrossRef](#)]



