



MEMORIA CIENTÍFICA DEL PROYECTO

MAMARET

PAPEL DE LA SOBREENEXPRESIÓN DE RET COMO BIOMARCADOR Y DIANA TERAPÉUTICA EN CÁNCER DE MAMA LUMINAL AVANZADO RESISTENTE A TERAPIA ENDOCRINA E INHIBIDORES DE CDK4/6

DATOS INFORMATIVOS

Equipo de Investigación:

- **Dr. José Manuel Pérez. Investigador Principal**
- **Dr. Miguel Ángel Molina Vila. Co- Investigador Principal**
- Dr. Xavier González
- Dr. Alejandro Martínez Bueno
- Dra. Ana Maria Giménez Capitán
- Dra. Cristina Aguado

Fecha de Inicio tentativo: Primer trimestre 2026

Duración tentativa: 12 meses

Presupuesto: 71.680 €

RESUMEN

El proyecto MAMARET busca mejorar las opciones de tratamiento para personas con cáncer de mama hormonal avanzado cuando la enfermedad deja de responder a los tratamientos habituales. En este tipo de cáncer, la terapia hormonal y los fármacos llamados inhibidores de CDK4/6 han supuesto un gran avance, pero en algunos casos el tumor acaba desarrollando resistencia y vuelve a crecer.

Este estudio se centra en una proteína llamada RET, que actúa como un “interruptor” que puede favorecer el crecimiento de las células tumorales. Investigaciones previas sugieren que RET

puede estar especialmente activa en algunos cánceres de mama hormonales y que su activación podría contribuir a que los tratamientos dejen de funcionar. Sin embargo, todavía no se sabe bien en qué pacientes ocurre ni cómo aprovechar esta información para tratarlos mejor.

El proyecto analizará muestras reales de tumores de mama para identificar en qué casos RET está más activa y cómo cambia a lo largo de la enfermedad. Además, se realizarán estudios en laboratorio para comprobar si bloquear RET con medicamentos ya existentes puede ayudar a frenar el cáncer, incluso cuando otros tratamientos han dejado de ser eficaces.

El objetivo final es avanzar hacia tratamientos más personalizados, identificando mejor a las pacientes que podrían beneficiarse de nuevas terapias y ofreciendo nuevas opciones cuando las actuales ya no funcionan.

DESCRIPCIÓN

Introducción y justificación:

El cáncer de mama continúa siendo el tumor más frecuente entre las mujeres a nivel mundial y representa un importante desafío de salud pública. En las últimas décadas se han alcanzado notables avances en la detección precoz, el abordaje multidisciplinar y el desarrollo de nuevos tratamientos, lo que ha permitido mejorar de forma significativa el pronóstico en muchos casos. Sin embargo, en los estadios metastásicos la supervivencia a cinco años sigue siendo limitada, reflejando la necesidad de innovar en nuevas estrategias de tratamiento. Comprender en profundidad los mecanismos de resistencia a las terapias actuales resulta clave para identificar biomarcadores que orienten la selección de pacientes y faciliten un abordaje más personalizado.

Lejos de ser una única enfermedad, el cáncer de mama se clasifica en distintos subtipos biológicos definidos por características moleculares y la expresión de receptores hormonales y HER2. Los principales subtipos incluyen: luminal A y luminal B (dependientes del receptor de estrógeno), HER2 positivo y triple negativo. El pronóstico y la elección del tratamiento en el cáncer de mama dependen de forma crítica tanto del subtipo biológico como del estadio clínico de la enfermedad.

La terapia endocrina constituye el eje terapéutico en el cáncer de mama luminal, al bloquear la señalización mediada por receptores hormonales responsables de la proliferación tumoral. Sin embargo, la eficacia de la terapia endocrina en pacientes con estadios avanzados se ve limitada por la aparición de mecanismos de resistencia, que pueden ser primarios o adquiridos. Entre los más relevantes se encuentran las alteraciones en el receptor de estrógeno (como mutaciones en ESR1), la activación de vías de señalización alternativas (PI3K/AKT/mTOR, MAPK) y cambios en el ciclo celular^{1, 2}.

El conocimiento de estos mecanismos ha permitido desarrollar terapias dirigidas y combinaciones racionales que buscan superar la resistencia y prolongar el beneficio clínico. Entre ellas, los inhibidores de CDK4/6 se han consolidado como el estándar en combinación con terapia endocrina, al demostrar de manera consistente una reducción del riesgo de progresión

y una mejora de la supervivencia en pacientes con cáncer de mama luminal avanzado, posicionándose como una estrategia fundamental para superar parte de la resistencia endocrina³⁻⁵. A pesar de ello, existen también mecanismos de resistencia a los inhibidores de CDK4/6 como las mutaciones en RB1, la activación de vías de señalización alternativas (PI3K/AKT/mTOR, MAPK) o la sobreexpresión de ciclinas, lo que permite la proliferación celular independiente del bloqueo terapéutico^{6,7}.

El protooncogén RET codifica para un receptor tirosina quinasa implicado en el desarrollo del sistema nervioso y en diferenciación celular y es activado por ligandos de la familia de GDNF⁸. Alteraciones en este gen, incluyendo mutaciones activadoras y traslocaciones, han sido descritas en diversos tumores sólidos^{9,10}. En los últimos años, la identificación de estas alteraciones ha permitido el desarrollo de terapias dirigidas, destacando la aprobación de selpercatinib, un inhibidor selectivo de RET, para el tratamiento de tumores avanzados con dichas alteraciones moleculares¹¹.

En cáncer de mama, las traslocaciones en el gen RET son muy poco frecuentes, representando alrededor del 0,7% de los casos¹². Sin embargo, varios estudios han correlacionado la expresión de RET con la de expresión del receptor de estrógeno, mostrando que su sobreexpresión favorece el crecimiento tumoral y promueve la resistencia a terapias endocrinas¹³⁻¹⁵. Además, la inhibición de RET potencia el efecto antitumoral del tamoxifeno en modelos murinos¹⁶, apoyando su papel en la respuesta a terapia endocrina en estudios preclínicos.

No obstante, el rol de RET en la resistencia a la combinación de terapia endocrina e inhibidores de CDK4/6 permanece poco definido y constituye un área de investigación emergente. Hasta la fecha, solo se ha publicado un estudio que analiza esta relación en dos modelos celulares resistentes y en un modelo derivado de paciente¹⁷. Estos hallazgos preliminares sugieren una posible participación de RET en los mecanismos de escape terapéutico, aunque se requieren más investigaciones preclínicas y clínicas que confirmen su relevancia biológica y su valor potencial como diana terapéutica en este contexto.

Referencias:

1. Barraud S, Vacher S, Schiffler C, et al. Genomic landscape of estrogen receptor-positive HER2-negative advanced breast cancer with acquired resistance to aromatase inhibitors: Identification of an ESR1 alteration-related gene signature. *Br J Cancer* 2025;133:464-472.
2. Pan H, Gray R, Braybrooke J, et al. 20-Year Risks of Breast-Cancer Recurrence after Stopping Endocrine Therapy at 5 Years. *N Engl J Med* 2017;377:1836-1846.
3. Goetz MP, Toi M, Huober J, et al. Abemaciclib plus a nonsteroidal aromatase inhibitor as initial therapy for HR+, HER2- advanced breast cancer: final overall survival results of MONARCH 3. *Ann Oncol* 2024;35:718-727.
4. Finn RS, Martin M, Rugo HS, et al. Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* 2016;375:1925-1936.

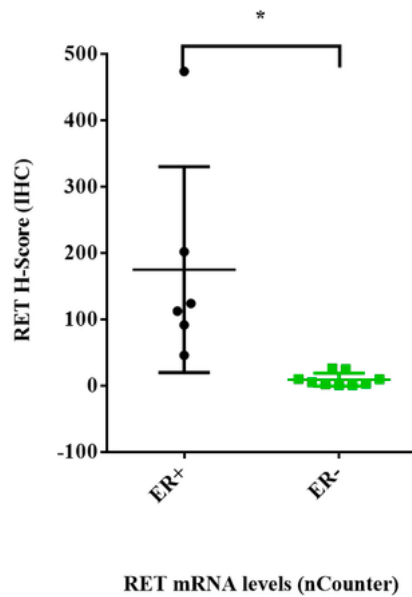
5. Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA, et al. Ribociclib as First-Line Therapy for HR-Positive, Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* 2016;375:1738-1748.
6. Condorelli R, Spring L, O'Shaughnessy J, et al. Polyclonal RB1 mutations and acquired resistance to CDK 4/6 inhibitors in patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2018;29:640-645.
7. O'Leary B, Cutts RJ, Liu Y, et al. The Genetic Landscape and Clonal Evolution of Breast Cancer Resistance to Palbociclib plus Fulvestrant in the PALOMA-3 Trial. *Cancer Discov* 2018;8:1390-1403.
8. Baloh RH, Tansey MG, Johnson EM, Jr., et al. Functional mapping of receptor specificity domains of glial cell line- derived neurotrophic factor (GDNF) family ligands and production of GFRalpha1 RET-specific agonists. *J Biol Chem* 2000;275:3412-3420.
9. Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, et al. Exomic sequencing of medullary thyroid cancer reveals dominant and mutually exclusive oncogenic mutations in RET and RAS. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:E364-369.
10. Wang R, Hu H, Pan Y, et al. RET fusions define a unique molecular and clinicopathologic subtype of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2012;30:4352-4359.
11. Subbiah V, Wolf J, Konda B, et al. Tumour-agnostic efficacy and safety of selpercatinib in patients with RET fusion- positive solid tumours other than lung or thyroid tumours (LIBRETTO-001): a phase 1/2, open-label, basket trial. *The Lancet Oncology* 2022;23:1261-1273.
12. Paratala BS, Chung JH, Williams CB, et al. RET rearrangements are actionable alterations in breast cancer. *Nat Commun* 2018;9:4821.
13. Morandi A, Martin LA, Gao Q, et al. GDNF-RET signaling in ER-positive breast cancers is a key determinant of response and resistance to aromatase inhibitors. *Cancer Res* 2013;73:3783-3795.
14. Boulay A, Breuleux M, Stephan C, et al. The Ret receptor tyrosine kinase pathway functionally interacts with the ERalpha pathway in breast cancer. *Cancer Res* 2008;68:3743-3751.
15. Horibata S, Rice EJ, Mukai C, et al. ER-positive breast cancer cells are poised for RET-mediated endocrine resistance. *PLoS One* 2018;13:e0194023.
16. Spanheimer PM, Park JM, Askeland RW, et al. Inhibition of RET increases the efficacy of antiestrogen and is a novel treatment strategy for luminal breast cancer. *Clin Cancer Res* 2014;20:2115-2125.
17. Kindt CK, Ehmsen S, Traynor S, et al. RET inhibition overcomes resistance to combined CDK4/6 inhibitor and endocrine therapy in ER+ breast cancer. *Front Oncol* 2024;14:1497093.

Datos preliminares:

En una cohorte piloto de 15 muestras de cáncer de mama se evaluó la expresión de ARN mediante hibridación masiva con tecnología nCounter, y proteína de RET mediante inmunohistoquímica, además de realizar la secuenciación de genes asociados al cáncer de

mama, incluyendo HER2 y PIK3CA. Nueve casos correspondieron a tumores triple negativos, mientras que los seis restantes fueron tumores con expresión del receptor de estrógeno.

La expresión de RET fue significativamente mayor en los tumores con positividad del receptor de estrógeno en comparación con los tumores triple negativos, lo que sugiere una asociación con la señalización estrogénica como previamente se había reportado (Figura 1).



* $p < 0.05$ (Student's t test).

Figura 1: Niveles de RET mRNA en 15 muestras de cáncer de mama. Cada punto representa una muestra

Además, la sobreexpresión de ARN de RET se correlacionó con un aumento en la expresión proteica, confirmado mediante inmunohistoquímica (Figura 2)

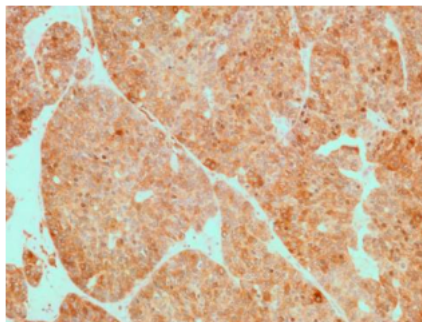


Figura 2: Imagen microscópica de la expresión proteica de RET mediante inmunohistoquímica en una muestra tumoral con sobreexpresión de ARN de RET

Finalmente, se lograron establecer cultivos primarios derivados de estas muestras, constituyendo una herramienta experimental valiosa para el desarrollo de estudios funcionales adicionales orientados a caracterizar el papel de RET en la biología del cáncer de mama.

Hipótesis:

La sobreexpresión de RET en cáncer de mama se observa con mayor frecuencia en los subtipos con expresión del receptor de estrógeno, en los que su presencia parece estar estrechamente relacionada con la dependencia de la señalización hormonal.

Esta alteración puede adquirir especial relevancia en el contexto de progresión bajo terapia endocrina combinada con inhibidores de CDK4/6, un escenario clínico que representa una necesidad terapéutica no cubierta en la práctica oncológica. En este marco, la detección de RET no solo resulta de interés como biomarcador biológico, sino que también constituye una alteración molecular potencialmente accionable, susceptible de ser tratada mediante inhibidores de tirosina quinasa selectivos. Estos fármacos han mostrado resultados alentadores en otros tumores sólidos con alteraciones en RET, lo que refuerza la hipótesis de su aplicabilidad en cáncer de mama.

En conjunto, esta evidencia abre la posibilidad de incorporar estrategias terapéuticas dirigidas contra RET en pacientes con cáncer de mama luminal avanzado, especialmente en aquellos con progresión tras los esquemas actuales de tratamiento.

Objetivos:

1. Determinar la prevalencia de la sobreexpresión de RET en tumores primarios de mama con expresión del receptor de estrógeno mediante el análisis de muestras clínicas.
2. Evaluar, en muestras pareadas de tumores primarios y metástasis de cáncer de mama con expresión del receptor de estrógeno, los cambios en la expresión de RET.
3. Caracterizar los cambios en la expresión de RET en muestras pareadas de metástasis de cáncer de mama con expresión del receptor de estrógeno, comparando el estado pretratamiento y postratamiento con terapia endocrina en combinación con inhibidores de CDK4/6.
4. Explorar en modelos preclínicos (líneas celulares y cultivos primarios derivados de pacientes) de cáncer de mama con expresión del receptor de estrógeno, sensibles y resistentes a inhibidores de CDK4/6, combinaciones terapéuticas innovadoras que incorporen inhibidores selectivos de RET, con el objetivo de contrarrestar la resistencia a los tratamientos estándar.

Métodos:*Objetivos 1, 2 y 3:*

Para alcanzar este objetivo se emplearán tejidos fijados en parafina (N = 100 para el objetivo 1; N = 10 muestras pareadas para el objetivo 2; y N = 10 para el objetivo 3) procedentes de pacientes con cáncer de mama con expresión del receptor de estrógeno.

Se analizará la expresión de ARN de RET mediante un panel personalizado de hibridación masiva con tecnología nCounter y, en aquellos casos con sobreexpresión, se confirmará la expresión de la proteína total y fosforilada mediante inmunohistoquímica. Además, en las muestras sin genotipo previamente disponible, se realizará una caracterización molecular mediante secuenciación masiva, con el propósito de identificar alteraciones en genes relevantes para el cáncer de mama, incluyendo PIK3CA, HER2 y BRCA1/2.

Objetivo 4:

Se emplearán cuatro líneas celulares de cáncer de mama con expresión del receptor de estrógeno, dos de ellas con sobreexpresión de RET (MCF-7 y HCC1428). En estas líneas se evaluará la sensibilidad a inhibidores selectivos de RET en modelos 2D y 3D, tanto en suspensión como en Matrigel, así como a su combinación con terapia endocrina +/- inhibidores de CDK4/6.

Posteriormente, se generarán clones resistentes a la combinación de terapia endocrina e inhibidores de CDK4/6 en dos líneas celulares, una de ellas con sobreexpresión de RET, con el objetivo de determinar si la resistencia adquirida se asocia a un incremento en la expresión de RET. En estos modelos resistentes también se evaluará la capacidad de los inhibidores selectivos de RET para revertir la resistencia.

Asimismo, se analizará la sensibilidad a inhibidores selectivos de RET, en monoterapia y en combinación (terapia endocrina +/- CDK4/6), en cultivos primarios derivados de pacientes con cáncer de mama con expresión del receptor de estrógeno, obtenidos en progresión tras tratamiento con terapia endocrina e inhibidores de CDK4/6.

Finalmente, en caso de obtener resultados positivos, se caracterizará mediante Western blot la expresión y activación de proteínas clave de señalización (ERK, AKT) en los modelos celulares utilizados.

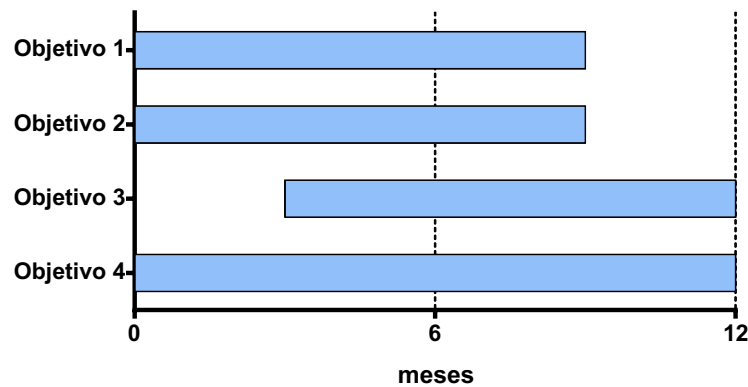
Impacto Clínico:

Si los resultados de este estudio confirman que la sobreexpresión de RET se asocia con una mayor sensibilidad a los inhibidores selectivos de RET en el cáncer de mama con expresión del receptor de estrógeno, esta alteración podría consolidarse como una diana terapéutica novedosa en subgrupos seleccionados de pacientes.

La validación de RET como biomarcador predictivo abriría la posibilidad de implementar estrategias de tratamiento personalizadas en escenarios clínicos relevantes, como la progresión

tras terapia endocrina e inhibidores de CDK4/6. En este contexto, los inhibidores selectivos de RET podrían representar una alternativa eficaz para superar la resistencia a estos tratamientos, ampliando el arsenal terapéutico disponible.

Cronograma y Presupuesto:



Ítem	Coste €
1 Personal	18.500
2 Fungible	42.500
3 Publicaciones	2.000
4 Viajes y congresos	1.000
5 Costes indirectos	7.680
TOTAL	71.680

Justificación del presupuesto:

1. Investigador responsable de la ejecución del proyecto. Desarrollo y validación de estudios, análisis e interpretación de datos, así como elaboración de resultados e informes científicos derivados de la investigación.
2. El fungible incluirá entre otros reactivos; medios de cultivo (RPMI 1640 medium, Fetal Bovine Serum), fármacos para sensibilidad frente a fármacos (selpercatinib, fulvestrant, abemaciclib, palbociclib), líneas celulares (T-47D, MDA-MB-134-IV) reactivos para hibridación masiva de ARN (nCounter elements 144plex tagset, nCounter elements master kit 192 assays), paneles de secuenciación (panel custom Qiagen 30 genes), reactivos para inmunohistoquímica y western blot (anticuerpo RET (Anti-Ret antibody EPR2871)) y anticuerpos fosfoRET (Phospho-Ret (Tyr905) Antibody).

3. La publicación en una revista científica garantiza la validación por pares, aporta rigor y credibilidad a los resultados y permite difundir el conocimiento a la comunidad científica, favoreciendo su aplicación clínica y el avance en la atención a los pacientes.
4. Asistencia a congresos científicos, necesarios para la presentación y difusión de resultados (costes de inscripción, desplazamiento, alojamiento).
5. Actividades necesarias para el desarrollo científico del proyecto, coordinación técnica, preparación y gestión de documentación regulatoria, elaboración y presentación de protocolos ante el CEIM, seguimiento del cumplimiento ético y normativo, apoyo metodológico, entre otros.