

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

SCAN-HER2

**ANÁLISIS COMPARATIVO DE *SINGLE CELL RNA SEQUENCING* EN CARCINOMAS DE MAMA
RECEPTORES DE HORMONA POSITIVO HER2-0 FRENTE A HER2-LOW**

DATOS INFORMATIVOS:

- **Equipo de Investigación:**
 - **Silvia González Martínez, PhD (Investigador principal)**
 - Javier Cortés, MD, PhD
 - José Palacios, MD, PhD
 - Belén Pérez Mies, MD, PhD
 - Irene Carretero Barrio, MD

- **Centro de Investigación:** Hospital Universitario Ramón y Cajal
- **Presupuesto:** 110.911,01 €
- **Duración:** 2 años
- **Inicio tentativo:** enero 2025

MEMORIA CIENTÍFICA:

Resumen

Los tumores HER2-negativos se clasifican tradicionalmente según la expresión de receptores hormonales (RH); sin embargo, muchos de estos tumores aún presentan niveles detectables de proteína HER2 en la membrana celular, caracterizados por una puntuación inmunohistoquímica (IHC) de HER2 1+ o 2+/FISH no amplificado (HER2-low). La aparición de los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) ha demostrado una actividad clínica significativa en pacientes con cáncer de mama metastásico HER2-negativo que presentan expresión HER2-low, lo que ha provocado un cambio de paradigma en el tratamiento de este grupo.

Actualmente, no está claro si el cáncer de mama HER2-low debe considerarse una entidad molecular distinta con características genómicas únicas en comparación con los tumores HER2-0. Algunos estudios moleculares y pronósticos sugieren que el cáncer de mama HER2-low podría no representar un subtipo molecular separado, sino más bien un grupo heterogéneo de tumores cuya biología y comportamiento están influenciados predominantemente por la expresión de

RH. Sin embargo, se necesita más investigación, especialmente a nivel de expresión génica, para confirmar estas observaciones.

Nuestro objetivo es llevar a cabo un análisis integral de las variaciones en la expresión génica entre las diferentes poblaciones celulares presentes en tumores HER2-0 y HER2-low utilizando *single cell RNA sequencing* (scRNAseq). Este enfoque nos permitirá identificar y comparar las firmas moleculares de los distintos tipos celulares dentro de estos tumores, arrojando luz sobre las posibles diferencias en los perfiles de expresión génica y las dinámicas celulares entre el cáncer de mama HER2-0 y HER2-low.

A través de este análisis detallado, buscamos mejorar la comprensión de las diferencias biológicas subyacentes y las implicaciones clínicas potenciales asociadas con las clasificaciones de tumores HER2-low y HER2-0.

Antecedentes

La relevancia biológica y clínica de la expresión de HER2 ha influido significativamente en el panorama del tratamiento del cáncer de mama (1,2). Aproximadamente el 15-20% de todos los tumores mamarios presentan amplificación o sobreexpresión del gen *ERBB2*, conocido como cáncer de mama HER2-positivo, asociado a un fenotipo más agresivo y un pronóstico más desfavorable en comparación con los cánceres de mama HER2-negativos, que representan el 80-85% de los casos (3,4). Los cánceres HER2-positivos han sido tratados eficazmente con terapias dirigidas contra HER2, transformando los resultados clínicos para estos pacientes (5,6).

Los tumores HER2-negativos se han clasificado tradicionalmente según la expresión de receptores de hormonas (RH), diferenciándose entre cánceres de mama positivos para RH y triple negativos (7). Aunque se clasifiquen como HER2-negativos, la mayoría de estos tumores muestran niveles detectables de proteína HER2 en la membrana celular. Aproximadamente dos tercios de los tumores RH-positivos y un tercio de los cánceres triple negativos presentan una baja expresión de HER2, con una puntuación de IHC HER2 1+ o 2+/FISH no amplificado (8).

El tratamiento con anticuerpos monoclonales dirigidos contra HER2, como trastuzumab, no ha mostrado beneficios clínicos en tumores HER2-negativos (9,10). Sin embargo, el desarrollo de conjugados anticuerpo-fármaco (ADCs) potentes dirigidos a HER2 ha permitido recientemente atacar eficazmente incluso niveles bajos de expresión de HER2. De hecho, varios ADCs, como el trastuzumab deruxtecan (T-DXd), han demostrado actividad antitumoral en ensayos clínicos con pacientes con cáncer de mama metastásico con baja expresión de HER2 (11–15). Actualmente, T-DXd puede ofrecerse a pacientes con cáncer metastásico HER2-low, aunque no se considera tratamiento estándar para pacientes con HER2-0. Sin embargo, sigue siendo incierto si el cáncer HER2-low constituye una entidad molecular distinta con características genómicas únicas en comparación con el cáncer HER2-0 (16,17), a pesar de los esfuerzos de varios estudios para abordar esta cuestión.

Diversos estudios han analizado los patrones moleculares intrínsecos de los cánceres HER2-low y HER2-0. La mayoría indica una mayor prevalencia de tumores RH-positivos en las poblaciones HER2-low en comparación con los subgrupos HER2-0 (8,14,18–20). En un estudio de 3.689

pacientes con cáncer de mama HER2-negativo clasificados según el subtipo intrínseco PAM50, el 58,9% de los tumores RH-positivos HER2-low eran luminal A, el 33,4% luminal B, el 3% HER2-enriquecido, el 1,9% basal-like y el 2,8% de tipo normal. En el mismo estudio, los tumores HER2-low expresaron niveles más altos de genes relacionados con la diferenciación luminal y niveles más bajos de genes relacionados con la proliferación en comparación con los tumores HER2-0 RH-positivos. Entre los tumores triple negativos, no se encontraron diferencias en la expresión génica entre los HER2-low y HER2-0 (8). Estos hallazgos sugieren que las diferencias observadas entre los cánceres HER2-low y HER2-0 pueden atribuirse principalmente a la expresión de RH más que a los niveles de expresión de HER2.

Al analizar diferencias moleculares a nivel de mutaciones y variaciones en el número de copias (CNV), Tarantino et al. (21) compararon los resultados de NGS entre tumores HER2-low y HER2-0 ($n > 1.000$). Los cinco genes más mutados en ambos subgrupos fueron *TP53*, *PIK3CA*, *CDH1*, *ESR1* y *GATA3*, con incidencias similares al conjunto general. Las CNVs mostraron un patrón consistente, con amplificaciones en *CCND1*, *FGFR1* y *MYC* como las alteraciones más comunes. Tras ajustar por el factor de confusión de la expresión de receptor de estrógenos (RE), no se identificaron diferencias significativas en las mutaciones génicas. La única alteración genómica estadísticamente significativa fue un mayor promedio de alelos *ERBB2* en los tumores HER2-low, aunque no se encontraron diferencias significativas en la carga mutacional tumoral entre los tumores HER2-low y HER2-0.

Estos resultados coinciden con otros estudios genómicos recientes, que destacan diferencias marginales en el paisaje genómico entre HER2-low y HER2-0 tras corregir por la expresión de RE (22,23). Tampoco se encontraron diferencias en la frecuencia de alteraciones génicas entre los tumores triple negativos HER2-low y HER2-0, independientemente del estadio. De manera similar, no se observaron diferencias significativas entre los tumores HER2-low y HER2-0 HR-positivos en etapas tempranas. La única observación destacada fue una mayor tasa de mutaciones en *TP53* en tumores metastásicos HER2-low RH-positivos en comparación con HER2-0 (23).

Clínicamente, los tumores HER2-low no parecen mostrar diferencias pronósticas significativas en comparación con los HER2-0, como se demostró en un estudio de cohorte de Tarantino et al. (20) ($n=5.235$) y en múltiples estudios similares (8,24–34). En conjunto, los datos moleculares y clínicos sugieren que el cáncer de mama HER2-low no constituye una entidad molecular distinta, sino más bien un grupo heterogéneo de tumores cuya biología y comportamiento están impulsados principalmente por la expresión de RH. Sin embargo, se necesitan más estudios, especialmente los centrados en perfiles de expresión génica, para confirmar estos hallazgos.

La tecnología de *single cell RNA sequencing* (scRNAseq) ha revolucionado nuestra comprensión de la heterogeneidad celular y la complejidad dentro de los tumores, ofreciendo conocimientos sin precedentes sobre los mecanismos moleculares que impulsan la progresión del cáncer y la resistencia terapéutica (35). En este proyecto, se investigarán las diferencias de expresión génica entre las diversas poblaciones celulares de tumores HER2-0 y HER2-low utilizando scRNAseq. Se incluirán 8 casos HER2-0 y 8 casos HER2-low, centrándose en un análisis detallado de las poblaciones tumorales y del microambiente tumoral. Al aplicar scRNAseq, se espera diseccionar

la heterogeneidad celular y proporcionar una comprensión más profunda de las características moleculares de estos tumores, contribuyendo al debate sobre la relevancia clínica y biológica de la clasificación HER2-low.

Hipótesis

Sigue sin estar claro si el cáncer de mama HER2-low debe considerarse una entidad molecular distinta con características genómicas únicas en comparación con el cáncer de mama HER2-0. Algunos datos publicados apoyan la idea de que los tumores HER2-low, tal como se definen actualmente, no deben considerarse un subtipo molecular distinto de cáncer de mama, ya que las diferencias observadas entre ambos grupos pueden estar relacionadas con la mayor frecuencia de positividad de RH en los tumores HER2-low en comparación con los HER2-0.

Nuestra hipótesis es que la baja expresión de HER2 (HER2-low frente a HER2-0) no altera significativamente los perfiles generales de expresión génica en carcinomas de mama HER2-negativos y positivos para RH. Además, nuestro objetivo es investigar si la baja expresión de HER2 afecta a poblaciones celulares específicas o si está influenciada por alteraciones cromosómicas particulares.

Objetivos

1. **Analizar y comparar los perfiles de expresión génica, la heterogeneidad celular y la comunicación intercelular en tumores HER2-0 y HER2-low (HER2++/FISH negativo) de carcinoma mamario invasivo no especial (NST-IBC) utilizando scRNAseq.** Este objetivo tiene como fin determinar si la presencia o ausencia de baja expresión de HER2 impacta significativamente la expresión génica global en los tumores, la heterogeneidad dentro de las diferentes poblaciones celulares de cada tumor, y los patrones de comunicación célula a célula.
2. **Identificar y caracterizar poblaciones celulares específicas (células epiteliales, estromales e inmunes) en tumores HER2-0 y HER2-low, evaluando sus diferencias funcionales mediante análisis de enriquecimiento de ontología génica (GO).** Este objetivo busca explorar cómo la baja expresión de HER2 influye en el comportamiento de las células tumorales y de los distintos tipos celulares dentro del microambiente tumoral.
3. **Evaluar alteraciones cromosómicas en las células epiteliales tumorales HER2-0 y HER2-low utilizando scRNAseq.** Este objetivo implica inferir CNVs a partir de datos de scRNAseq y analizar las posibles diferencias en la inestabilidad cromosómica entre los dos grupos tumorales, que podrían estar influyendo en su comportamiento.

Metodología

- **Adquisición de muestras:** Se incluirán bloques de tejido tumoral fijado en formalina e incrustado en parafina (FFPE) de 16 pacientes con carcinoma mamario HR-positivo y HER2-negativo, diagnosticados en el Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid, España). Ocho muestras serán HER2-0 y las otras ocho HER2++/FISH negativo. El comité

ético aprobó el uso de estas muestras para análisis de expresión génica unicelular (259-22).

- **Inmunohistoquímica (IHC):** Se prepararán secciones de 3 μm de tejido FFPE para estudiar la expresión de receptores hormonales (ER, PR), HER2 y Ki67, siguiendo las pautas de ASCO-CAP.
- **FISH (Hibridación Fluorescente In Situ):** Se realizarán análisis de alteraciones cromosómicas en muestras HER2++ mediante el kit HER2/17q para detectar amplificación de HER2.
- **Procesamiento de muestras FFPE:** Se procesarán secciones de 25 μm para scRNAseq utilizando el protocolo de 10X Genomics. Las células serán disociadas y congeladas a -80°C .
- **Preparación y secuenciación de bibliotecas 10X:** Se preparará la biblioteca de una célula siguiendo el protocolo de 10X Genomics, utilizando la plataforma Chromium para generar gotas de emulsión (GEMs) y luego se secuenciarán en un sistema NovaSeq 6000 (Illumina).
- **Procesamiento de datos scRNA-seq:** Los datos de secuenciación se alinearán con el transcriptoma de referencia GRCh38, y los identificadores de moléculas únicas (UMIs) se cuantificarán usando Cell Ranger. Las células serán anotadas manualmente utilizando genes marcadores canónicos. Los datos de células inmunes serán anotados con el paquete SingleR.
- **Análisis de enriquecimiento funcional:** Se realizará un análisis de enriquecimiento de ontología génica (GO) para caracterizar procesos biológicos asociados a los genes expresados en los grupos de interés.
- **Otros análisis de scRNAseq:** Se llevarán a cabo estudios de comunicación celular y análisis de trayectorias de pseudotiempo para estudiar los tumores en cada grupo de estudio.
- **Inferencia de CNV:** Se inferirán CNVs de las células epiteliales tumorales usando el paquete inferCNV, comparando con células no malignas como referencia.
- **Análisis comparativo:** Se compararán las poblaciones celulares entre los grupos HER2-0 y HER2-low tanto a nivel de expresión génica como en CNVs.
- **Factibilidad y plan de contingencia:** El equipo tiene experiencia en scRNAseq, bioinformática, IHC y el equipo necesario. Las muestras con baja celularidad serán excluidas para garantizar la calidad del análisis. Se demuestra la fiabilidad de usar muestras FFPE para scRNAseq en una publicación previa (DOI: 10.1101/2024.10.04.616471), con resultados que podrían incluirse en el estudio propuesto.

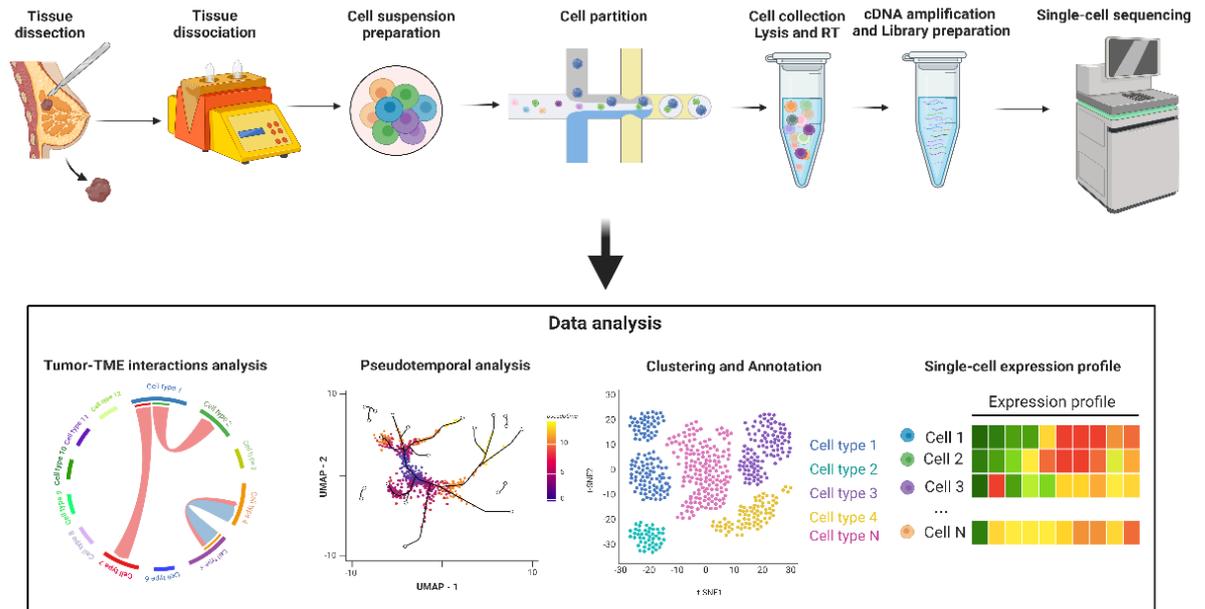


Figura 1. *Workflow* del proceso de *single-cell RNA sequencing*. Creada en BioRender.com.

Cronograma

Tareas	Año 1				Año 2			
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
Selección de casos y evaluación histológica de muestras tumorales HER2-0 y HER2 ++.								
Procesamiento de muestras y preparación de bibliotecas de scRNAseq								
Secuenciación								
Análisis bioinformáticos y estadísticos								
Comunicación								

Presupuesto

Item	Coste
Solicitud de muestras al biobanco	87.36
Procesamiento de muestras	2,000.00
scRNAseq	48,000.00
Publicaciones científicas	3,000.00
Investigador Postdoctoral	41,187.00
Overheads	16,636.65
TOTAL	110,911.01

Referencias:

1. Burstein HJ. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *N Engl J Med* (2005) 353:1652–1654. doi: 10.1056/NEJMp058197
2. Loibl S, Gianni L. HER2-positive breast cancer. *Lancet* (2017) 389:2415–2429. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32417-5
3. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* (1989) 244:707–712. doi: 10.1126/science.2470152
4. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* (1987) 235:177–182. doi: 10.1126/science.3798106
5. Pernas S, Tolane SM. Management of Early-Stage Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer. *JCO Oncol Pract* (2021) 17:320–330. doi: 10.1200/OP.21.00020
6. Martínez-Sáez O, Prat A. Current and Future Management of HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *JCO Oncol Pract* (2021) 17:594–604. doi: 10.1200/OP.21.00172
7. Loibl S, Poortmans P, Morrow M, Denkert C, Curigliano G. Breast cancer. *Lancet* (2021) 397:1750–1769. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32381-3
8. Schettini F, Chic N, Brasó-Maristany F, Paré L, Pascual T, Conte B, Martínez-Sáez O, Adamo B, Vidal M, Barnadas E, et al. Clinical, pathological, and PAM50 gene expression features of HER2-low breast cancer. *NPJ Breast Cancer* (2021) 7:1. doi: 10.1038/s41523-020-00208-2
9. Fehrenbacher L, Cecchini RS, Geyer CE, Rastogi P, Costantino JP, Atkins JN, Crown JP, Polikoff J, Boileau J-F, Provencher L, et al. NSABP B-47/NRG Oncology Phase III Randomized Trial Comparing Adjuvant Chemotherapy With or Without Trastuzumab in High-Risk Invasive Breast Cancer Negative for HER2 by FISH and With IHC 1+ or 2. *J Clin Oncol* (2020) 38:444–453. doi: 10.1200/JCO.19.01455
10. Gianni L, Lladó A, Bianchi G, Cortes J, Kellokumpu-Lehtinen P-L, Cameron DA, Miles D, Salvagni S, Wardley A, Goeminne J-C, et al. Open-Label, Phase II, Multicenter, Randomized Study of the Efficacy and Safety of Two Dose Levels of Pertuzumab, a Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Dimerization Inhibitor, in Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Negative Metastatic Breast Cancer. *JCO* (2010) 28:1131–1137. doi: 10.1200/JCO.2009.24.1661
11. Modi S, Park H, Murthy RK, 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. *JCO* (2020) 38:1887–1896. doi: 10.1200/JCO.19.02318
12. Banerji U, Van Herpen CML, Saura C, Thistlethwaite F, Lord S, Moreno V, Macpherson IR, Boni V, Rolfo C, De Vries EGE, 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. *The Lancet Oncology* (2019) 20:1124–1135. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30328-6
13. Wang J, Liu Y, Zhang Q, Feng J, Fang J, Chen X, Han Y, Li Q, Zhang P, Yuan P, et al. RC48-ADC, a HER2-targeting antibody-drug conjugate, in patients with HER2-positive and HER2-low expressing advanced or metastatic breast cancer: A pooled analysis of two studies. *JCO* (2021) 39:1022–1022. doi: 10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.1022
14. Denkert C, Seither F, Schneeweiss A, Link T, Blohmer J-U, Just M, Wimberger P, Forberger A, Tesch H, Jackisch C, et al. Clinical and molecular characteristics of HER2-low-positive breast cancer: pooled analysis of individual patient data from four prospective,

- neoadjuvant clinical trials. *Lancet Oncol* (2021) 22:1151–1161. doi: 10.1016/S1470-2045(21)00301-6
15. Jiang Z, Sun T, Wang X, Liu Q, Yan M, Tong Z, Geng C, Tang J, Yin Y, Yu G, et al. A multiple center, open-label, single-arm, phase II clinical trial of MRG002, an HER2-targeted antibody-drug conjugate, in patients with HER2-low expressing advanced or metastatic breast cancer. *JCO* (2022) 40:1102–1102. doi: 10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.1102
 16. Tarantino P, Viale G, Press MF, Hu X, Penault-Llorca F, Bardia A, Batistatou A, Burstein HJ, Carey LA, Cortes J, et al. ESMO expert consensus statements (ECS) on the definition, diagnosis, and management of HER2-low breast cancer. *Annals of Oncology* (2023) 34:645–659. doi: 10.1016/j.annonc.2023.05.008
 17. Viale G, Basik M, Niikura N, Tokunaga E, Brucker S, Penault-Llorca F, Hayashi N, Sohn J, Teixeira De Sousa R, Brufsky AM, et al. Retrospective study to estimate the prevalence and describe the clinicopathological characteristics, treatments received, and outcomes of HER2-low breast cancer. *ESMO Open* (2023) 8:101615. doi: 10.1016/j.esmoop.2023.101615
 18. Agostinetti E, Debieu V, Marta GN, Lambertini M, Piccart-Gebhart M, de Azambuja E. CDK4/6 and PI3K inhibitors: A new promise for patients with HER2-positive breast cancer. *Eur J Clin Invest* (2021) 51:e13535. doi: 10.1111/eci.13535
 19. Ergun Y, Ucar G, Akagunduz B. Comparison of HER2-zero and HER2-low in terms of clinicopathological factors and survival in early-stage breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* (2023) 115:102538. doi: 10.1016/j.ctrv.2023.102538
 20. Tarantino P, Jin Q, Tayob N, Jeselsohn RM, Schnitt SJ, Vinciguilla J, Parker T, Tyekucheva S, Li T, Lin NU, et al. Prognostic and Biologic Significance of ERBB2-Low Expression in Early-Stage Breast Cancer. *JAMA Oncol* (2022) 8:1177–1183. doi: 10.1001/jamaoncol.2022.2286
 21. Tarantino P, Gupta H, Hughes ME, Files J, Strauss S, Kirkner G, Feeney A-M, Li Y, Garrido-Castro AC, Barroso-Sousa R, et al. Comprehensive genomic characterization of HER2-low and HER2-0 breast cancer. *Nat Commun* (2023) 14:7496. doi: 10.1038/s41467-023-43324-w
 22. Bansal R, McGrath J, Walker P, Bustos MA, Rodriguez E, Sammons SL, Accordino MK, Meisel J, Gatti-Mays M, Hsu E, et al. Abstract HER2-12: HER2-12 Genomic and Transcriptomic Landscape of HER2-Low Breast Cancer. *Cancer Research* (2023) 83:HER2-12-HER2-12. doi: 10.1158/1538-7445.SABCS22-HER2-12
 23. Marra A, Safonov A, Drago J, Ferraro E, Selenica P, Gazzo A, Curigliano G, Modi S, Razavi P, Reis-Filho J, et al. Abstract HER2-07: HER2-07 Genomic Characterization of Primary and Metastatic HER2-low Breast Cancers. *Cancer Research* (2023) 83:HER2-07-HER2-07. doi: 10.1158/1538-7445.SABCS22-HER2-07
 24. Peiffer DS, Zhao F, Chen N, Hahn OM, Nanda R, Olopade OI, Huo D, Howard FM. Clinicopathologic Characteristics and Prognosis of ERBB2-Low Breast Cancer Among Patients in the National Cancer Database. *JAMA Oncol* (2023) 9:500. doi: 10.1001/jamaoncol.2022.7476
 25. Spring LM, Barlow WE, Bardia A, Sharma P, Pusztai L, Hortobagyi GN, Kalinsky K. Abstract HER2-19: HER2-19 Impact of HER2 low status on clinical outcomes in participants with 1-3 positive lymph nodes, HR+/HER2- breast cancer with recurrence score ≤ 25 randomized to endocrine therapy +/- chemotherapy: results from SWOG S1007 (RxPONDER). *Cancer Research* (2023) 83:HER2-19-HER2-19. doi: 10.1158/1538-7445.SABCS22-HER2-19
 26. Di Cosimo S, La Rocca E, Ljevar S, De Santis MC, Bini M, Cappelletti V, Valenti M, Baili P, De Braud FG, Folli S, et al. Moving HER2-low breast cancer predictive and prognostic data from clinical trials into the real world. *Front Mol Biosci* (2022) 9:996434. doi: 10.3389/fmolb.2022.996434
 27. Mutai R, Barkan T, Moore A, Sarfaty M, Shochat T, Yerushalmi R, Stemmer SM, Goldvaser H. Prognostic impact of HER2-low expression in hormone receptor positive early breast cancer. *The Breast* (2021) 60:62–69. doi: 10.1016/j.breast.2021.08.016

28. Denkert C, Liedtke C, Tutt A, von Minckwitz G. Molecular alterations in triple-negative breast cancer—the road to new treatment strategies. *The Lancet* (2017) 389:2430–2442. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32454-0
29. Guven DC, Kaya MB, Fedai B, Ozden M, Yildirim HC, Kosemehmetoglu K, Kertmen N, Dizdar O, Uner A, Aksoy S. HER2-low breast cancer could be associated with an increased risk of brain metastasis. *Int J Clin Oncol* (2022) 27:332–339. doi: 10.1007/s10147-021-02049-w
30. Gampenrieder SP, Rinnerthaler G, Tinchon C, Petzer A, Balic M, Heibl S, Schmitt C, Zabernigg AF, Egle D, Sandholzer M, et al. Landscape of HER2-low metastatic breast cancer (MBC): results from the Austrian AGMT_MBC-Registry. *Breast Cancer Res* (2021) 23:112. doi: 10.1186/s13058-021-01492-x
31. Agostinetto E, Rediti M, Fimereli D, Debien V, Piccart M, Aftimos P, Sotiriou C, De Azambuja E. HER2-Low Breast Cancer: Molecular Characteristics and Prognosis. *Cancers* (2021) 13:2824. doi: 10.3390/cancers13112824
32. De Moura Leite L, Cesca MG, Tavares MC, Santana DM, Saldanha EF, Guimarães PT, Sá DDS, Simões MFE, Viana RL, Rocha FG, et al. HER2-low status and response to neoadjuvant chemotherapy in HER2 negative early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* (2021) 190:155–163. doi: 10.1007/s10549-021-06365-7
33. Horisawa N, Adachi Y, Takatsuka D, Nozawa K, Endo Y, Ozaki Y, Sugino K, Kataoka A, Kotani H, Yoshimura A, et al. The frequency of low HER2 expression in breast cancer and a comparison of prognosis between patients with HER2-low and HER2-negative breast cancer by HR status. *Breast Cancer* (2022) 29:234–241. doi: 10.1007/s12282-021-01303-3
34. Jacot W, Maran-Gonzalez A, Massol O, Sorbs C, Mollevi C, Guiu S, Boissière-Michot F, Ramos J. Prognostic Value of HER2-Low Expression in Non-Metastatic Triple-Negative Breast Cancer and Correlation with Other Biomarkers. *Cancers* (2021) 13:6059. doi: 10.3390/cancers13236059
35. Wang S, Sun S-T, Zhang X-Y, Ding H-R, Yuan Y, He J-J, Wang M-S, Yang B, Li Y-B. The Evolution of Single-Cell RNA Sequencing Technology and Application: Progress and Perspectives. *IJMS* (2023) 24:2943. doi: 10.3390/ijms24032943