

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

ANÁLISIS DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL MEDIANTE *SINGLE CELL-RNA* SEQ EN CARCINOMAS LOBULILLARES

MEMORIA CIENTÍFICA

Equipo de Investigación:

Hospital Ramón y Cajal

- José Palacios Calvo (Investigador Principal)
- Silvia González Martínez
- Belén Pérez Mies
- Cristina Saavedra
- María Gión
- María Concepción Martínez
- Sonia Rivas

Hospital Ruber Internacional

- Javier Cortés Castán (Responsable en Ruber)
- Patricia Cortez

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el cáncer más diagnosticado a nivel mundial y la principal causa de muerte por cáncer en mujeres [1,2]. En el cáncer de mama se distinguen distintos tipos histológicos, con distintas características inmunofenotípicas y moleculares, siendo el más predominante el carcinoma ductal infiltrante (CDI). El carcinoma lobulillar infiltrante (CLI), caracterizado por la pérdida de la molécula de adhesión E-cadherina codificada por el gen *CDH1*, es el segundo tipo más común de cáncer de mama invasivo y supone entre el 10-15% del total [3].

La mayoría de los CLI son receptores hormonales (RH) positivos y de grado histológico 2. Clínicamente, el CLI se trata de forma similar al CDI con RH positivos. Sin embargo, el CLI difiere claramente del CDI en sus características clínico-patológicas, en sus alteraciones moleculares y en su patrón de infiltración local y metastásico. Además, el CLI también difiere en la respuesta a la terapia sistémica, con estudios que muestran que el CLI es menos sensible a la quimioterapia, y tiene peores resultados clínicos con recurrencias más tardías [3,4].

Haciendo referencia al microambiente tumoral, también se conocen ciertas diferencias en los CLI respecto a otros tumores de mama, una prueba de ello son los estudios de linfocitos infiltrantes de tumores (TILs). En los CDI con receptores de estrógeno (RE) negativos, los TILs se asocian a un buen pronóstico, en cambio, los TILs representan un biomarcador morfológico asociado a un mal pronóstico de los CLI [5]. Además, se han descrito varias diferencias en cuanto a la composición y localización inmunitaria entre los CLI y los CDI, lo que sugiere un fenotipo de exclusión inmunitaria. En general, estas observaciones sugieren que la infiltración inmunitaria podría desempeñar un papel diferente en los CLI en comparación con los CDI [6].

A nivel molecular, la consulta de la base de datos del Atlas del Genoma del Cáncer muestra aberraciones moleculares distintivas en los CLI en comparación con los CDI, como la pérdida de E-cadherina (66% frente al 3%), mutaciones en *FOXA1* (7% frente al 2%) y mutaciones en *GATA3* (5% frente al 20%). En conjunto, esto sugiere que el CLI es biológicamente distinto, lo que puede influir en las estrategias terapéuticas [4].

En cuanto a la supervivencia global de los pacientes con CLI, esta es favorable en comparación con el CDI en los primeros 5 años del diagnóstico, pero el resultado es peor después de 5 años en comparación con pacientes con CDI en el mismo estadio y grado [4,7]. Una de las razones es la presencia de células cancerosas diseminadas que permanecen dormidas durante períodos prolongados (período de “dormancy”) y pueden provocar una recaída tardía en lugares metastásicos distantes. Las células cancerosas que se diseminan desde el tumor primario antes de la cirugía existen como enfermedad mínima residual durante un largo período de tiempo antes de pasar a la metástasis manifiesta y al crecimiento agresivo [8]. En un estudio genómico comparativo entre CLI y CDI, describieron tasas más bajas de traducción y metabolismo de proteínas en los CLI en comparación con los CDI, que son características conocidas de la latencia tumoral [9].

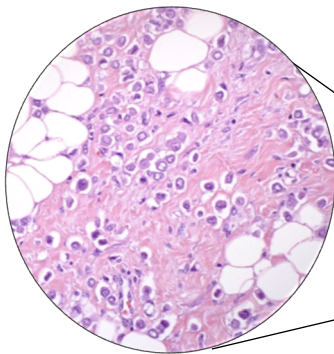
Para comprender en profundidad el comportamiento biológico de los CLI sería interesante conocer el perfil transcriptómico tanto de las células tumorales como de las que conforman el microambiente tumoral. La tecnología *single cell RNA-seq* presenta ventajas sobre los métodos de secuenciación tradicionales a la hora de diseccionar la heterogeneidad de las poblaciones celulares ocultas en los análisis masivos y de explorar tipos celulares raros asociados con la tumorigénesis y la metástasis [10]. Esta tecnología también se ha utilizado para explicar la heterogeneidad del microambiente tumoral mediante la identificación de distintos subconjuntos de células inmunitarias que pueden estar asociados a la inmunovigilancia y son posibles objetivos de la inmunoterapia. Además de explorar la heterogeneidad, *single cell RNA-seq* tiene diversas aplicaciones en la investigación del cáncer de mama, incluyendo el análisis de las comunicaciones célula-célula, los estados reguladores de una sola célula, la distribución de las células inmunes, etc [10].

Los estudios de *single cell RNA-seq* realizados en los últimos años en el campo de la investigación del cáncer de mama han agrupado poblaciones celulares con diferentes subtipos moleculares para identificar poblaciones distintas que pueden correlacionarse con un mal pronóstico y la resistencia a los fármacos [10]. El cáncer de mama comprende un conjunto diverso de enfermedades caracterizadas por la heterogeneidad que influye en la respuesta al tratamiento y en el resultado de las pacientes [11]. Pero aún no se ha descrito esta heterogeneidad transcripcional en los CLI, ni se ha evaluado sistemáticamente esta diferencia entre CLI y CDI, mediante esta tecnología se podría investigar cómo afecta el microambiente al estado de “dormancy”, el porqué de la metástasis tardía o se podría conocer mejor el mecanismo específico de infiltración local de los CLI.

En resumen, a pesar de las diferencias que existen entre los CLI y CDI, los ensayos clínicos tratan los cánceres de mama RH positivo como una sola enfermedad, y existe una necesidad insatisfecha de estudios que aborden los desafíos únicos a los que se enfrentan las pacientes diagnosticadas con CLI [3,4]. Se necesitan herramientas de diagnóstico y opciones de tratamiento específicas para los CLI, para mejorar los resultados generales de los pacientes. La falta de grandes estudios que ayuden a tener una mayor comprensión del patrón de infiltración específico, del nicho latente, del mecanismo molecular específico que despierta a estas células e induce su proliferación es crucial para el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento y nuevos protocolos adaptados a la biología única de los CLI.

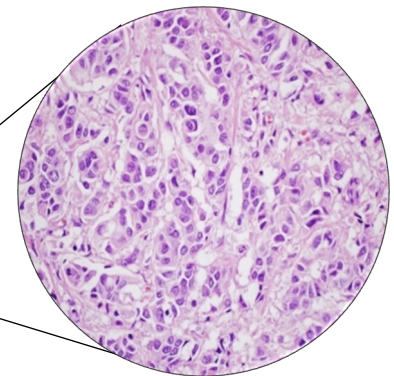
Basándonos en todo lo anteriormente descrito, proponemos realizar este proyecto, que tiene como propósito principal estudiar en los CLI de mama el perfil transcriptómico tumoral y del microambiente en tejido primario mediante *single-cell RNA seq*, comparando los resultados con una cohorte control de CDI.

Carcinoma lobulillar clásico

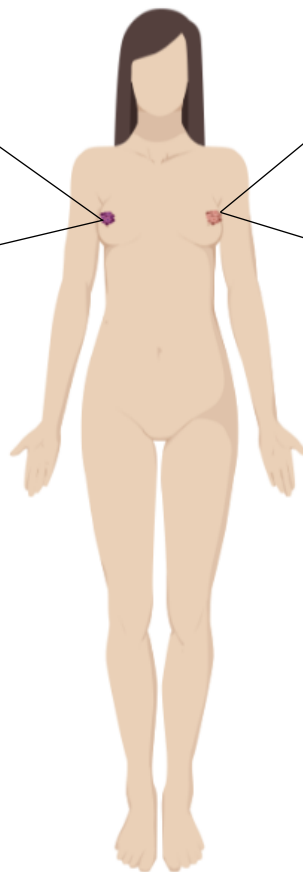


- Patrón de infiltración difuso de células discohesivas
- Pérdida de E-cadherina 66%
- Mutaciones en *FOXA1* 7%
- Mutaciones en *GATA3* 5%
- Recaídas tardías (“dormancy”)
- Tasas bajas de traducción y metabolismo de proteínas
- Mayor número de CTCs
- TILs asociados a mal pronóstico
- Menor sensibilidad a quimioterapia

Carcinoma ductal invasivo



- Patrón de infiltración en glándulas y nidos tumorales
- Pérdida de E-cadherina 3%
- Mutaciones en *FOXA1* 2%
- Mutaciones en *GATA3* 20%
- Recaídas más tempranas
- Tasas más altas de traducción y metabolismo de proteínas
- Menor número de CTCs
- TILs asociados a un buen pronóstico
- Mayor sensibilidad a quimioterapia



HIPÓTESIS

Los CLI tienen un perfil transcripcional específico tanto en las células tumorales como en las que conforman el microambiente tumoral que difiere de los CDI.

OBJETIVOS

Objetivo principal

Estudiar el perfil transcripcional mediante *single cell RNA-seq* de las células tumorales y de las que conforman el microambiente tumoral en tumores primarios de CLI y CDI. Comparación de resultados entre ambos tipos de tumores.

Objetivos secundarios

- Caracterizar los subtipos celulares de los CLI y de los CDI.
- Determinar perfiles de expresión génica como biomarcadores pronósticos en los CLI.
- Identificar dianas terapéuticas en células tumorales o en células estromales que tengan un papel en la comunicación intercelular y en el desarrollo del CLI.

METODOLOGÍA

Serie de estudio y serie control

- Se incluirán un total de 30 tumores primarios de pacientes recién diagnosticadas de cáncer de mama RH+ HER2- en estadios I-II, sin tratamiento neoadyuvante:
 - o CLI: 15
 - o CDI: 15

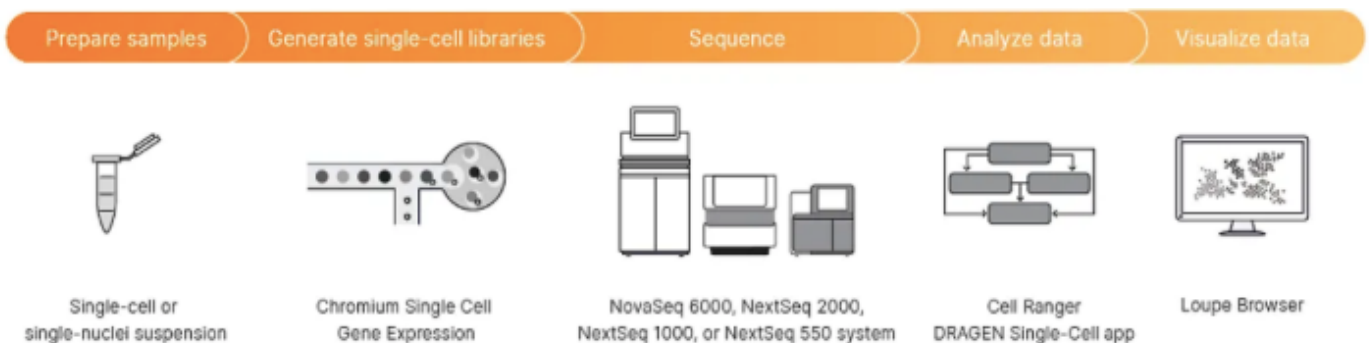
Métodos

- Las muestras necesarias para el proyecto serán solicitadas al Biobanco que tiene establecido el “Fondo de muestras biológicas para el estudio de Neoplasias Mamarias. Biobanco” que facilita la gestión y preparación preanalítica de tejidos, así como los datos asociados. El Biobanco del Hospital Universitario Ramón y Cajal-IRYCIS facilitará la participación de otros centros formalizando la incorporación de muestras con el correspondiente acuerdo de depósito entre el Biobanco y los distintos centros colaboradores. Como centro colaborador contaremos con el hospital Ruber International.
- Se evaluarán las características anatómo-patológicas todos los tumores.

Single cell RNA seq

- Solicitaremos las muestras de tumor primario en fresco al Biobanco del hospital. Las muestras para diagnóstico siempre serán prioritarias y solo se incluirán al estudio pacientes cuyas muestras de tejido en fresco sean de un tamaño suficiente para obtener muestra para investigación garantizando el material para diagnóstico.

- Las muestras se procesarán, se fijarán y disgregarán según el protocolo CG000553 de 10X Genomics. En resumen, siguiendo los pasos de este protocolo, se pesará el tumor, se cortará en pequeños fragmentos, se fijarán y se disociarán. Finalmente se congelarán las células durante un periodo máximo de 3 meses.
- Con las muestras reclutadas durante los primeros meses continuaremos con el protocolo CG000527 de 10X Genomics alquilando durante un mes el equipo Chromium X, se repetirá el proceso con el alquiler del equipo hasta completar las secuenciaciones de célula única de las muestras del estudio. Esta parte del proceso se basa en: hibridación de una sonda para transcriptoma completo; generación de GEM y código de barras, con el equipo Chromium X se realizará la partición de un gran número de células, con una diversidad masiva de *barcodes* para generar > de 100.000 particiones marcadas con *barcodes* únicos; recuperación de GEM y preamplificación; construcción de las librerías; y secuenciación. Gracias a esta tecnología se capturarán y secuenciarán hasta 10.000 células por muestra.
- La secuenciación de las librerías y el análisis bioinformático se hará en colaboración con la Unidad de Apoyo de Genómica Traslacional y la de Bioinformática del hospital Ramón y Cajal. La secuenciación se realizará con tecnología Illumina con un *coverage* de 40k *reads/cell*. Y en referencia al análisis, el mapeo de los datos de secuenciación y los informes iniciales de control de calidad se realizarán con el pipeline estándar de 10X Genomics Cell Ranger. Se generará un archivo de datos cloupe para que podamos navegar por ellos con el 10X Genomics Loupe Browser, mediante el cual estudiaremos firmas de expresión génica y genes expresados diferencialmente en células tumorales y del microambiente entre los CLI y CDI.



NORMATIVA DE BUENA PRÁCTICA CLÍNICA Y DE PROTECCIÓN DE DATOS

Todos los procedimientos del estudio se llevarán a cabo según lo estipulado en la Ley 14/2007 de Investigación biomédica y el RD 1716/2011. La investigación no interferirá en la asistencia médica que siempre será prioritaria.

Durante la duración del proyecto (2 años) las muestras necesarias para su realización serán almacenadas en el Laboratorio de Patología Molecular del Cáncer (Servicio de Anatomía Patológica) del Hospital Ramón y Cajal. Solo se recogerán datos necesarios para el estudio y serán tratados con las medidas de seguridad establecidas en el Reglamento General de Protección de Datos europeo (Reglamento (UE) 2016/679) así como la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales. Las

muestras serán identificadas con un código, de modo que sólo el investigador principal/investigadores colaboradores, con acceso a sus datos identificativos podrán relacionarlas con el paciente, siendo responsables de garantizar la confidencialidad. Una vez finalizado el proyecto, el excedente de las muestras de tejido se archivará en el Laboratorio de Anatomía Patológica dentro de la práctica habitual de acuerdo con la legislación vigente Ley 14/2007, del 3 de julio y Real Decreto 1716/2011, del 18 de noviembre.

CONFIDENCIALIDAD

Cumpliendo con la LEY 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica y el RD 1716/2011, las muestras y los datos asociados a la enfermedad se utilizarán únicamente en este proyecto de manera científica y ética. En todo momento, se cumplirán los principios del Reglamento General de Protección de Datos europeo (Reglamento (UE) 2016/679) así como la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales. Una vez finalizado el proyecto, toda la información quedará codificada. Se garantiza por tanto el mantenimiento de la confidencialidad en todos sus aspectos, incluyendo las posibles publicaciones científicas derivadas del proyecto.

PLAN DE DIFUSIÓN Y/O PROTECCIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados relevantes obtenidos serán presentados en los diferentes congresos nacionales e internacionales, así como su publicación en revistas científicas.

Respecto a la protección de los datos, todos los casos estarán totalmente anonimizados. Se va a asignar un número consecutivo por caso, empezando por el 1, y solo el investigador principal/colaboradores tendrán acceso al número de historia clínica al que corresponderá cada número asignado.

PLAN DE TRABAJO

Este estudio tendrá una duración de 2 años.

- Selección de pacientes. Después del diagnóstico mediante BAG de CLI en el servicio de Anatomía Patológica, las pacientes serán contactadas por el servicio de Oncología, de Cirugía o de Ginecología para ser reclutadas en caso de firmar el CI.
- Firma del CI de Biobanco. Oncólogos, ginecólogos o cirujanos serán los encargados de explicar el proyecto a las pacientes y serán los que recojan las firmas de los CI.
- Solicitud a Biobanco para la petición de las muestras. José Palacios hará las solicitudes conforme se vayan incluyendo pacientes.
- Asignación de código a cada paciente y a cada muestra. En Biobanco las pacientes y muestras serán codificadas.
- Evaluación de características anatomo-patológicas de los tumores. José Palacios y Belén Pérez serán los encargados de esta tarea.
- Fijación, disgregación, congelación y almacenamiento de muestras. Silvia González se encargará de este proceso.
- *Single-cell RNA seq.* Silvia González se encargará de la parte técnica.

- Secuenciación y análisis bioinformáticos. Se realizarán en colaboración con la Unidad Central de Apoyo de Genómica Traslacional y Bioinformática del Hospital Ramón y Cajal.
- Interpretación de resultados. José Palacios y Silvia González se encargarán de esta etapa final del estudio.

REFERENCIAS

1. Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D.M.; Forman, D.; Bray, F. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012: Globocan 2012. *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, E359–E386, doi:10.1002/ijc.29210.
2. The Global Cancer Observatory. *Breast Source: Globocan 2020* 2020.
3. Thomas, M.; Kelly, E.D.; Abraham, J.; Kruse, M. Invasive Lobular Breast Cancer: A Review of Pathogenesis, Diagnosis, Management, and Future Directions of Early Stage Disease. *Seminars in Oncology* **2019**, *46*, 121–132, doi:10.1053/j.seminoncol.2019.03.002.
4. Pramod, N.; Nigam, A.; Basree, M.; Mawalkar, R.; Mehra, S.; Shinde, N.; Tozbikian, G.; Williams, N.; Majumder, S.; Ramaswamy, B. Comprehensive Review of Molecular Mechanisms and Clinical Features of Invasive Lobular Cancer. *The Oncologist* **2021**, *26*, e943–e953, doi:10.1002/onco.13734.
5. Tille, J.-C.; Vieira, A.F.; Saint-Martin, C.; Djerroudi, L.; Furhmann, L.; Bidard, F.-C.; Kirova, Y.; Tardivon, A.; Reyal, F.; Carton, M.; et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes Are Associated with Poor Prognosis in Invasive Lobular Breast Carcinoma. *Mod Pathol* **2020**, *33*, 2198–2207, doi:10.1038/s41379-020-0561-9.
6. Desmedt, C.; Salgado, R.; Fornili, M.; Pruneri, G.; Van den Eynden, G.; Zoppoli, G.; Rothé, F.; Buisseret, L.; Garaud, S.; Willard-Gallo, K.; et al. Immune Infiltration in Invasive Lobular Breast Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **2018**, *110*, 768–776, doi:10.1093/jnci/djx268.
7. Chen, Z.; Yang, J.; Li, S.; Lv, M.; Shen, Y.; Wang, B.; Li, P.; Yi, M.; Zhao, X.; Zhang, L.; et al. Invasive Lobular Carcinoma of the Breast: A Special Histological Type Compared with Invasive Ductal Carcinoma. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0182397, doi:10.1371/journal.pone.0182397.
8. Montagner, M.; Sahai, E. In Vitro Models of Breast Cancer Metastatic Dormancy. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 37, doi:10.3389/fcell.2020.00037.
9. Du, T.; Zhu, L.; Levine, K.M.; Tasdemir, N.; Lee, A.V.; Vignali, D.A.A.; Houten, B.V.; Tseng, G.C.; Oesterreich, S. Invasive Lobular and Ductal Breast Carcinoma Differ in Immune Response, Protein Translation Efficiency and Metabolism. *Sci Rep* **2018**, *8*, 7205, doi:10.1038/s41598-018-25357-0.
10. Ding, S.; Chen, X.; Shen, K. Single-cell RNA Sequencing in Breast Cancer: Understanding Tumor Heterogeneity and Paving Roads to Individualized Therapy. *Cancer Communications* **2020**, *40*, 329–344, doi:10.1002/cac2.12078.
11. Pal, B.; Chen, Y.; Vaillant, F.; Capaldo, B.D.; Joyce, R.; Song, X.; Bryant, V.L.; Penington, J.S.; Di Stefano, L.; Tubau Ribera, N.; et al. A Single-cell RNA Expression Atlas of Normal, Preneoplastic and Tumorigenic States in the Human Breast. *The EMBO Journal* **2021**, *40*, doi:10.15252/embj.2020107333.

PRESUPUESTO

PRESUPUESTO (2 AÑOS)	
SOLICITUD DE MUESTRAS A BIOBANCO	163,80 €
FIJACIÓN/DISOCIACIÓN/CONGELACIÓN	2.500,00 €
ALQUILER CHROMIUM X	15.000,00 €
SINGLE CELL RNA SEQ	90.000,00 €
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	4.000,00 €
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS	3.000,00 €
INVESTIGADOR POSTDOCTORAL	82.374,00 €
TOTAL SIN OVERHEADS	197.037,80 €
OVERHEADS	34.771,38 €
TOTAL DEL PROYECTO	231.809,18 €