



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

ESTUDIO MEDIANTE SINGLE-CELL RNA SEQUENCING DEL CÁNCER DE MAMA HER2 POSITIVO EN ESTADIOS II/III TRAS TRATAMIENTO NEOADYUVANTE BASADO EN TCHP O AC-THP

HER2-SCENE

Datos Informativos

- **Equipo de Investigación:**
 - **Javier Cortés, MD, PhD. Co-investigador Principal** (IBCC & IOB, Madrid, Hospital Beata María Ana)
 - **Silvia González Martínez, PhD. Co-investigador Principal** (Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid)
 - José Palacios, MD, PhD (Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid)
 - Belén Pérez Mies, MD, PhD (Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid)
 - María Gión, MD (Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid)
 - Cristina Saavedra, MD (Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid)
 - Laura García Estévez, MD, PhD (Hospital MD Anderson, Madrid)
 - Lucía Sanz, MD (IOB, Madrid, Hospital Beata María Ana)
 - Patricia Cortez, MD (IOB, Madrid, Hospital Beata María Ana)
 - María Jesús Baldeon, MD (IOB, Madrid, Hospital Beata María Ana)
 - José Manuel Pérez, MD, PhD (IBCC, Barcelona)
 - Laia Garrigós, MD, PhD (IBCC, Barcelona)
 - Juan José Mosquera, MD (IOR, Barcelona)
 - Laura García Estévez (MDACC, Madrid)
 - Antonio Llombart (Arnau de Vilanova, Valencia)
- **Presupuesto:** 178.079,00 €
- **Duración estimada:** 3 años

Resumen Divulgativo

El cáncer de mama HER2 positivo es un subtipo clínicamente agresivo que representa aproximadamente el 15-20% de todos los casos de cáncer de mama. Afortunadamente, en los últimos años se han desarrollado tratamientos dirigidos muy eficaces, como trastuzumab y pertuzumab, que han mejorado notablemente el pronóstico de las pacientes. Sin embargo, no todas responden de la misma manera a los tratamientos neoadyuvantes (aquellos que se administran antes de la cirugía), y algunas pueden presentar recaídas o enfermedad residual tras la intervención quirúrgica.

Este proyecto tiene como objetivo comprender mejor los mecanismos celulares y moleculares que determinan la respuesta o resistencia al tratamiento neoadyuvante en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo. Para ello, se utilizará una tecnología de última generación llamada secuenciación de ARN a nivel de célula única (scRNA-seq), que permite analizar individualmente cada célula del tumor y descubrir subpoblaciones celulares que podrían ser responsables de la resistencia terapéutica.

Se estudiarán muestras tumorales obtenidas antes del tratamiento, tras la cirugía y, cuando sea posible, de metástasis. Esta estrategia permitirá comparar las células tumorales de pacientes que responden completamente al tratamiento con las de aquellas que no logran una respuesta total, además de analizar las diferencias entre los tumores antes y después del tratamiento en pacientes con respuesta incompleta, para identificar las células que resisten y caracterizarlas en profundidad.

Los hallazgos de este estudio permitirán identificar patrones celulares asociados a la falta de respuesta y proponer nuevos biomarcadores y posibles dianas terapéuticas, con el objetivo final de avanzar hacia tratamientos más personalizados y eficaces para las pacientes con cáncer de mama HER2 positivo.

Abstract

En este proyecto se caracterizarán, mediante transcriptómica de célula única (scRNA-seq), la heterogeneidad celular y los perfiles de expresión génica en tumores de mama HER2 positivo en estadios II–III tratados con esquemas terapéuticos neoadyuvantes estándar (TCHP o AC-THP). Se analizarán un total de 32 muestras tumorales: 10 tumores primarios pretratamiento de pacientes con respuesta patológica completa (pCR), 10 tumores primarios pretratamiento de pacientes sin pCR, 10 tumores residuales postquirúrgicos de este último grupo, y 2 metástasis recogidas en pacientes con recaída tras tratamiento neoadyuvante.

El estudio busca identificar diferencias en la composición celular y en los perfiles transcriptómicos entre los distintos grupos, así como caracterizar subpoblaciones celulares que podrían estar asociadas a la resistencia terapéutica. Los objetivos incluyen la identificación de nuevos biomarcadores de resistencia y posibles dianas terapéuticas que contribuyan a optimizar el manejo clínico del cáncer de mama HER2 positivo. Las muestras serán procesadas mediante la tecnología de expresión génica de célula única de 10X Genomics, utilizando el protocolo adaptado para muestras FFPE (CG000632), y la secuenciación se realizará en la plataforma

NovaSeq de Illumina. El análisis bioinformático incluirá la identificación de tipos celulares, análisis de expresión diferencial, inferencia de variaciones en el número de copias génicas, inferencia de programas reguladores y enriquecimiento funcional. Los resultados de este proyecto podrían aportar información clave para avanzar hacia terapias más eficaces y personalizadas en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo en enfermedad localmente avanzada.

Introducción

El cáncer de mama es la neoplasia más común en mujeres a nivel mundial y una de las principales causas de mortalidad en esta población¹. Dentro de los subtipos moleculares, el cáncer de mama HER2 positivo se caracteriza por la sobreexpresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). Esta alteración está presente en aproximadamente el 15–20% de todos los tumores mamarios y se asocia con un fenotipo más agresivo y un peor pronóstico en comparación con los cánceres de mama HER2 negativos, que constituyen el 80–85% de los casos^{2,3}. La relevancia biológica y clínica de HER2 ha transformado el panorama terapéutico del cáncer de mama^{4,5}. El desarrollo de terapias dirigidas contra esta diana, como trastuzumab y pertuzumab, ha mejorado significativamente la supervivencia global y libre de enfermedad en pacientes con este subtipo^{6,7}.

En el contexto neoadyuvante, la incorporación de trastuzumab a la quimioterapia citotóxica ha demostrado mejorar significativamente tanto la tasa de respuesta patológica completa (pCR) como la supervivencia libre de enfermedad⁸. La adición posterior de pertuzumab a este esquema representó un avance sustancial, con mejoras significativas en la supervivencia global, especialmente en el contexto metastásico^{9,10}. Diversos ensayos clínicos han consolidado la eficacia de la combinación trastuzumab–pertuzumab junto con quimioterapia en el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo, independientemente del estadio o del contexto terapéutico^{9,11,12}. Los regímenes combinados de quimioterapia con inhibidores de HER2, como TCHP (docetaxel, carboplatino, trastuzumab y pertuzumab) o AC-THP (doxorubicina y ciclofosfamida seguido de docetaxel, trastuzumab y pertuzumab), han logrado tasas de pCR superiores al 60%^{13,14}, lo que se traduce en mejores resultados a largo plazo.

Sin embargo, un porcentaje relevante de pacientes no alcanza una pCR, y estas pacientes presentan un mayor riesgo de recaída y peor pronóstico. Comprender las bases celulares y moleculares de la resistencia al tratamiento sigue siendo un reto clave en la investigación del cáncer de mama HER2 positivo.

La tecnología de transcriptómica de célula única (scRNA-seq) permite estudiar la expresión génica a nivel individual en miles de células, revelando con gran precisión la heterogeneidad celular y la dinámica del microambiente tumoral. Esta herramienta ha demostrado su utilidad para identificar subpoblaciones celulares asociadas a la respuesta terapéutica o a la resistencia, proporcionando información valiosa para el desarrollo de tratamientos personalizados¹⁵.

Tradicionalmente, la aplicación de scRNA-seq se ha limitado al uso de muestras frescas o congeladas, lo que dificulta su implementación en estudios clínicos debido a la limitada disponibilidad de este tipo de tejido. Para superar esta limitación, nuestro laboratorio ha

validado protocolos de scRNA-seq tanto en muestras frescas como en tejido fijado en formol e incluido en parafina (FFPE) de tumores ginecológicos. Nuestros estudios han demostrado la fiabilidad de esta tecnología en muestras FFPE de cáncer de mama, habilitando así el análisis retrospectivo de cohortes tumorales con información clínica y molecular asociada. De hecho, hemos logrado identificar poblaciones celulares previamente no descritas, como células ciliadas en cáncer de mama, cuya presencia fue confirmada mediante técnicas complementarias como inmunohistoquímica y microscopía electrónica¹⁶.

Nuestro estudio recientemente publicado en *Cells*¹⁶, junto con los resultados preliminares de scRNA-seq obtenidos en más de 70 muestras FFPE en nuestro laboratorio, no solo refuerzan la robustez de esta técnica, sino que también subrayan nuestra amplia experiencia en su aplicación. En este proyecto, proponemos aplicar scRNA-seq a muestras FFPE de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo en estadios II/III, tratadas con esquemas neoadyuvantes estándar (TCHP o AC-THP), con el objetivo de caracterizar las poblaciones celulares presentes en los tumores pretratamiento y en los tumores residuales postquirúrgicos de aquellas pacientes que no alcanzan una pCR.

Este análisis permitirá identificar y caracterizar perfiles celulares asociados a la resistencia terapéutica y proponer nuevas dianas moleculares para el diseño de estrategias más efectivas, dirigidas a lograr una respuesta completa al tratamiento en un mayor número de pacientes.

Justificación científica y clínica

Este proyecto se centra en el cáncer de mama HER2 positivo, un subtipo molecularmente definido que representa entre el 15–20% de los cánceres de mama y que, a pesar de los avances terapéuticos con fármacos dirigidos, sigue presentando un comportamiento clínico agresivo y riesgo de recaída. Los tratamientos neoadyuvantes estándar, como los esquemas TCHP o AC-THP, han mejorado significativamente la tasa de pCR; sin embargo, un porcentaje relevante de pacientes no alcanza esta respuesta, lo que se asocia con un pronóstico desfavorable.

La biología de la resistencia al tratamiento anti-HER2, así como los mecanismos celulares que subyacen a la falta de respuesta completa, aún no se comprenden completamente. En este contexto, scRNA-seq se presenta como una herramienta potente para desentrañar la heterogeneidad tumoral y caracterizar las distintas poblaciones celulares implicadas en la respuesta o resistencia terapéutica.

A diferencia de la mayoría de estudios previos que requieren tejido fresco, nuestro grupo ha optimizado y validado protocolos de scRNA-seq en muestras FFPE de mama, lo que permite aprovechar colecciones retrospectivas de casos clínicamente bien caracterizados. Esto hace posible un análisis más exhaustivo de tumores pretratamiento, postquirúrgicos y metastásicos.

Mediante esta estrategia, buscamos identificar subpoblaciones celulares asociadas a la resistencia terapéutica, caracterizar los programas transcripcionales que definen los distintos estados celulares tumorales y del microambiente, y proponer nuevas dianas terapéuticas que contribuyan a mejorar el manejo personalizado del cáncer de mama HER2 positivo.

Hipótesis

Las diferencias en la composición y el perfil transcriptómico de las poblaciones celulares presentes en los tumores primarios de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo tratadas con quimioterapia y terapia dirigida anti-HER2 (trastuzumab y pertuzumab) determinan la respuesta al tratamiento. En particular, existen subpoblaciones celulares específicas asociadas a la resistencia terapéutica que persisten en el tumor residual tras el tratamiento neoadyuvante en pacientes que no alcanzan respuesta patológica completa.

La identificación de estas poblaciones mediante análisis de transcriptómica de célula única permitirá proponer nuevas dianas terapéuticas dirigidas a eliminar dichas células resistentes y aumentar la tasa de respuesta patológica completa en este subtipo de cáncer de mama.

Objetivos

Objetivo principal

Caracterizar y comparar las poblaciones celulares y sus perfiles de expresión génica en tumores de mama HER2 positivo tratados con esquemas de quimioterapia y terapia dirigida anti-HER2 (TCHP o AC-THP), analizando tanto las muestras tumorales pretratamiento de pacientes que alcanzan respuesta patológica completa (pCR) como aquellas de pacientes que no la alcanzan, así como los tumores residuales postquirúrgicos y dos muestras metastásicas de estas últimas, con el fin de identificar diferencias asociadas a la respuesta terapéutica e investigar subpoblaciones celulares resistentes que podrían constituir nuevas dianas terapéuticas.

Objetivos específicos

1. Identificar diferencias en la composición celular y en los perfiles transcriptómicos entre tumores primarios pretratamiento de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo que alcanzan pCR y aquellos que no responden al tratamiento con quimioterapia y terapia dirigida anti-HER2 (trastuzumab y pertuzumab).
2. Caracterizar las poblaciones celulares y su expresión génica en los tumores residuales postquirúrgicos de pacientes sin pCR, con el objetivo de detectar subpoblaciones asociadas a la resistencia terapéutica.
3. Identificar posibles dianas terapéuticas dentro de las poblaciones celulares resistentes, orientadas a optimizar futuras estrategias de tratamiento e incrementar la tasa de respuesta patológica completa en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo.
4. Explorar, de forma preliminar, las poblaciones celulares presentes en muestras metastásicas de dos pacientes sin pCR, y compararlas con las poblaciones celulares detectadas en los tumores residuales correspondientes, con el fin de identificar posibles patrones de progresión tumoral o selección clonal asociada a la metástasis.

Metodología

Novedad del estudio

Este proyecto propone un enfoque innovador al aplicar la tecnología de scRNA-seq a muestras de cáncer de mama HER2 positivo en estadios II/III, tratadas con regímenes neoadyuvantes estándar que combinan quimioterapia con terapia dirigida anti-HER2 (trastuzumab y pertuzumab). Este abordaje permitirá una caracterización detallada de las subpoblaciones celulares, sus perfiles de expresión génica, posibles alteraciones genómicas y su asociación con la respuesta terapéutica. El uso de scRNA-seq en muestras FFPE cuidadosamente seleccionadas abre nuevas posibilidades para identificar mecanismos de resistencia y potenciales dianas terapéuticas en este subtipo tumoral.

Diseño del estudio

Se trata de un estudio traslacional en el que se caracterizará la heterogeneidad celular y molecular del cáncer de mama HER2 positivo utilizando scRNA-seq. Se analizarán un total de 32 muestras tumorales FFPE. Las muestras se dividirán en: 10 tumores primarios antes del tratamiento de pacientes con pCR, 10 tumores primarios antes del tratamiento de pacientes sin pCR, 10 tumores residuales tras cirugía del grupo sin pCR y 2 muestras metastásicas de este último grupo. Todos los casos seleccionados corresponderán a pacientes con tumores HER2+++ confirmados por inmunohistoquímica (IHC), tratados con esquemas neoadyuvantes estándares basados en quimioterapia y terapia dirigida anti-HER2 (TCHP o AC-THP). La selección se basará en el diagnóstico, el tratamiento recibido y la disponibilidad de tejido adecuado. Se recopilarán datos clínicos y patológicos relevantes (edad, tipo histológico, estadio, tratamiento) a partir de los historiales médicos electrónicos.

Protocolo de scRNA-seq

1. **Adquisición y procesamiento de muestras:** Los bloques FFPE serán seccionados (10 cortes de 25 μ m) y procesados utilizando el protocolo Chromium Fixed RNA Profiling de 10X Genomics. La disociación del tejido se realizará con el dispositivo gentleMACS Octo Dissociator. Las suspensiones unicelulares serán criopreservadas a -80 °C hasta la creación de las librerías y posterior secuenciación.
2. **Preparación de librerías y secuenciación:** Las librerías se prepararán con los kits Chromium Fixed RNA Profiling Reagent Kits (10X Genomics) y se secuenciarán en un sistema Illumina NovaSeq 6000. Las lecturas se alinearán al transcriptoma de referencia GRCh38 y se cuantificarán los UMI utilizando Cell Ranger.
3. **Análisis bioinformático:**
 - **Anotación de tipos celulares:** Se realizará manualmente usando genes marcadores canónicos y SingleR con la referencia Monaco Immune Data.
 - **Enriquecimiento funcional:** Análisis de enriquecimiento GO con el paquete *clusterProfiler*.
 - **Inferencia de alteración en el número de copias (CNVs):** Con *inferCNV*, utilizando células no malignas como referencia.

- **Análisis comparativo:** Se compararán poblaciones celulares, perfiles de expresión génica y CNVs entre los tres grupos.
- **Análisis de trayectorias:** Se utilizará el algoritmo Palantir para inferir trayectorias pseudotemporales.

Validación de resultados

Para validar los CNVs identificados por scRNA-seq, se utilizará hibridación fluorescente in situ (FISH), con sondas dirigidas a *ERBB2*, *MDM4*, *MYC*, *CCND1*, *FGFR1* y *GATA3*. El microambiente inmunológico tumoral será caracterizado adicionalmente mediante IHC para CD3, CD4, CD8, CD20, CD68 y CD117.

Limitaciones y mitigación de sesgos

- **Limitaciones:** La baja celularidad o la degradación del ARN pueden afectar el análisis. Solo se incluirán muestras adecuadamente conservadas.
- **Mitigación de sesgos:** La selección de casos se basará en el diagnóstico clínicopatológico. La estandarización de los protocolos y el uso de muestras control contribuirán a reducir la variabilidad técnica.

Riesgos y plan de contingencia

- **Riesgos:** Mala calidad del ARN en muestras antiguas; retrasos técnicos en el procesamiento o la secuenciación.
- **Plan de contingencia:** Se excluirán muestras con más de 4 años de antigüedad.

Alineación entre hipótesis, objetivos y metodología

La metodología está directamente alineada con la hipótesis y los objetivos del proyecto. El uso de scRNA-seq permite un perfilado profundo de la composición celular tumoral y su asociación con la respuesta al tratamiento. La validación mediante técnicas ortogonales (FISH, IHC) garantiza la aplicabilidad clínica y la solidez de los hallazgos.

Justificación del tamaño muestral

Dado el carácter exploratorio del scRNA-seq y la alta resolución de los datos celulares obtenidos, 32 muestras son suficientes para capturar la variabilidad biológica e identificar patrones clínicamente relevantes. Cada muestra proporcionará datos transcriptómicos de unas 10.000 células individuales, lo que permitirá comparaciones robustas entre grupos.

Perspectiva de género

El estudio se centra en el cáncer de mama, una enfermedad que afecta predominantemente a mujeres. Contribuye a abordar las desigualdades de género en la investigación oncológica y busca mejorar las estrategias diagnósticas y terapéuticas en la salud femenina.

[illegible]

Presupuesto:

ÍTEM	COSTE
1. Consumibles para scRNA-seq (32 muestras)	67,963.00 €
PROTECTOR RNase Inhibitor 2000 U x2	2,262.00 €
LIBERASE TH Research Grade 100 mg	940.00 €
MACS SmartStrainer, 30 µm	145.00 €
Filtros de pre-separación, 30 µm	285.00 €
Tubos GentleMACS T25 C x2	438.00 €
Medios, PBS, agua libre de nucleasas, Tris, xilol, BSA	300.00 €
Yoduro de propidio, 1.0 mg	88.00 €
Cámaras para conteo celular (C10228) - 50 portaobjetos x2	325.00 €
Dual Index Plate TS Set A, 96 reacciones	1,476.00 €
SPRIselect - 60 mL	1,868.00 €
Chromium Chip Q Single Cell Kit x2	2,154.00 €
Chromium Fixed RNA Kit – Transcriptoma humano (4 rxns x 4 BC) x2	49,144.00 €
Chromium X & Kit de accesorios – 15 días	4,538.00 €
Consumibles generales (tubos Eppendorf, tubos PCR, Falcon 15/50 ml, puntas con filtro doble, etc.)	4,000.00 €
2. Secuenciación externa de librerías (CNAG – tarifa 2024)	22,000.00 €
3. Reactivos para inmunohistoquímica	3,900.00 €
Anticuerpos y sistema de detección (300 slides x 13 €)	
4. Reactivos para hibridación fluorescente in situ (FISH)	3,600.00 €
Reactivos para FISH (90 slides x 40 €)	
5. Investigador postdoctoral (tiempo parcial)	42,000.00 €
6. Publicación artículo en Open Access	3,000.00 €
7. Gestión de proyecto (20% Hospital público)	35,616.00 €
TOTAL	178,079.00 €

Referencias

1. Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA A Cancer J Clinicians* **74**, 229–263 (2024).
2. Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E. et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244**, 707–712 (1989).
3. Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A. & McGuire, W. L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu

oncogene. *Science* **235**, 177–182 (1987).

4. Burstein, H. J. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *N Engl J Med* **353**, 1652–1654 (2005).
5. Loibl, S. & Gianni, L. HER2-positive breast cancer. *Lancet* **389**, 2415–2429 (2017).
6. Pernas, S. & Tolaney, S. M. Management of Early-Stage Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer. *JCO Oncol Pract* **17**, 320–330 (2021).
7. Martínez-Sáez, O. & Prat, A. Current and Future Management of HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *JCO Oncol Pract* **17**, 594–604 (2021).
8. Gianni, L., Eiermann, W., Semiglazov, V., Lluch, A., Tjulandin, S., Zambetti, M. et al. Neoadjuvant and adjuvant trastuzumab in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (NOAH): follow-up of a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *The Lancet Oncology* **15**, 640–647 (2014).
9. Baselga, J., Cortés, J., Kim, S.-B., Im, S.-A., Hegg, R., Im, Y.-H. et al. Pertuzumab plus Trastuzumab plus Docetaxel for Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med* **366**, 109–119 (2012).
10. Swain, S. M., Baselga, J., Kim, S.-B., Ro, J., Semiglazov, V., Campone, M. et al. Pertuzumab, Trastuzumab, and Docetaxel in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med* **372**, 724–734 (2015).
11. Von Minckwitz, G., Procter, M., De Azambuja, E., Zardavas, D., Benyunes, M., Viale, G. et al. Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* **377**, 122–131 (2017).
12. Swain, S. M., Ewer, M. S., Viale, G., Delaloge, S., Ferrero, J.-M., Verrill, M. et al. Pertuzumab, trastuzumab, and standard anthracycline- and taxane-based chemotherapy for the neoadjuvant treatment of patients with HER2-positive localized breast cancer (BERENICE): a phase II, open-label, multicenter, multinational cardiac safety study. *Annals of Oncology* **29**, 646–653 (2018).
13. Kim, J.-Y., Nam, S. J., Lee, J. E., Yu, J., Chae, B. J., Lee, S. K. et al. Real World Evidence of Neoadjuvant Docetaxel/Carboplatin/Trastuzumab/Pertuzumab (TCHP) in Patients with HER2-Positive Early or Locally Advanced Breast Cancer: A Single-Institutional Clinical Experience. *Cancer Res Treat* **54**, 1091–1098 (2022).
14. Singh, J. C., Mamtani, A., Barrio, A., Morrow, M., Sugarman, S., Jones, L. W. et al. Pathologic Complete Response with Neoadjuvant Doxorubicin and Cyclophosphamide Followed by Paclitaxel with Trastuzumab and Pertuzumab in Patients with HER2-Positive Early Stage Breast Cancer: A Single Center Experience. *The Oncologist* **22**, 139–143 (2017).
15. Wang, S., Sun, S.-T., Zhang, X.-Y., Ding, H.-R., Yuan, Y., He, J.-J. et al. The Evolution of Single-Cell RNA Sequencing Technology and Application: Progress and Perspectives. *IJMS* **24**, 2943 (2023).
16. González-Martínez, S., Palacios, J., Carretero-Barrio, I., Lanza, V. F., García-Cosío Piqueras, M., Caniego-Casas, T. et al. Single-Cell RNA Sequencing on Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded (FFPE) Tissue Identified Multi-Ciliary Cells in Breast Cancer. *Cells* **14**, 197 (2025).