



MEMORIA CIENTÍFICA DEL PROYECTO

Estudio mediante single-cell RNA sequencing del cáncer de mama triple negativo en estadios II/III tras tratamiento neoadyuvante basado en quimioterapia + pembrolizumab

SINGNEO-TC

Equipo de Investigación

- **Javier Cortés, MD, PhD (IBCC & IOB, Madrid, Hospital Beata María Ana). IP**
- **Silvia González Martínez, PhD (Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid)- IP**
- 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)
- 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)

Resumen divulgativo

El cáncer de mama triple negativo (CMTN) es uno de los tipos más agresivos de cáncer de mama y afecta principalmente a mujeres jóvenes. A diferencia de otros tipos, este no responde a tratamientos dirigidos, lo que hace que su manejo sea más difícil.

Este proyecto busca entender por qué algunas pacientes no responden completamente al tratamiento estándar, que incluye quimioterapia combinada con inmunoterapia, y descubrir cómo mejorar las terapias en el futuro. Para ello, se analizarán muestras de tumores usando una tecnología muy avanzada llamada secuenciación de ARN a nivel de célula única (scRNA-seq). Esta técnica permite estudiar el comportamiento de cada célula individual dentro del tumor, revelando detalles que antes no se podían ver.

El estudio se centrará en comparar tumores que responden completamente a la terapia con tumores que no lo hacen, y en estos últimos se analizará el tumor antes y después del tratamiento, además de algunas muestras metastásicas (en caso de ser posible). Al observar cómo cambian las células y cuáles sobreviven al tratamiento, se espera encontrar subpoblaciones celulares resistentes que podrían ser el origen de las recaídas. Estos hallazgos permitirán identificar nuevos objetivos terapéuticos y mejorar los tratamientos actuales para que sean más efectivos y personalizados.

Además, este trabajo utiliza muestras conservadas de manera especial (en parafina), lo que lo hace más viable y accesible en el entorno clínico real.

En resumen, este proyecto busca entender mejor los mecanismos de resistencia al tratamiento en el CMTN para poder ofrecer en un futuro nuevas terapias a pacientes que hoy en día tienen menos opciones.

Abstract

En este proyecto se caracterizarán mediante el uso de transcriptómica de célula única (scRNA-seq) la heterogeneidad celular y los perfiles de expresión génica en tumores de mama triple negativo (CMTN) tratados con el esquema terapéutico estándar (quimioterapia + pembrolizumab). Se analizarán 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 estos últimos y 2 metástasis de pacientes de este último grupo. El estudio busca identificar diferencias en la composición celular y en los perfiles transcriptómicos entre los distintos grupos, así como caracterizar las poblaciones celulares resistentes que persisten tras el tratamiento. Los objetivos incluyen la identificación de nuevas dianas terapéuticas y biomarcadores de resistencia que permitan optimizar futuras estrategias terapéuticas. Las muestras serán procesadas mediante la tecnología de single cell gene expression de 10X Genomics, y la secuenciación se realizará en la plataforma NovaSeq de Illumina. El análisis bioinformático incluirá la identificación de tipos celulares, perfiles de expresión diferencial y enriquecimiento funcional. Los resultados de este proyecto podrían aportar información clave para el desarrollo de estrategias terapéuticas más personalizadas y eficaces, dirigidas a mejorar las tasas de respuesta patológica completa en pacientes con CMTN.

Introducción

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en mujeres a nivel mundial y una de las principales causas de mortalidad en esta población¹. Dentro de los distintos subtipos moleculares de cáncer de mama, el cáncer de mama triple negativo (CMTN) se caracteriza por la ausencia de expresión del receptor de estrógeno, el receptor de progesterona y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2)^{2,3}. Esta falta de receptores convierte al CMTN en una enfermedad carente de dianas terapéuticas dirigidas, lo que ha dificultado históricamente su tratamiento.

Además, el CMTN presenta un comportamiento clínico más agresivo en comparación con otros subtipos de cáncer de mama^{4,5}, siendo más frecuente en mujeres jóvenes y

asociado a un mayor riesgo de recurrencias tempranas, predominantemente a distancia, así como una menor supervivencia global, incluso bajo regímenes de quimioterapia con intención curativa basada en antraciclinas y taxanos^{4,6,7}.

En este contexto, el estudio Keynote-522 demostró por primera vez una menor recurrencia del CMTN, con el uso del inhibidor del receptor de muerte programada 1 (PD-1), pembrolizumab (Keytruda, Merck Sharp & Dohme), neoadyuvante y adyuvante, sumado al régimen estándar de quimioterapia y cirugía, en los estadios II y III de estos tumores. Aumentó significativamente la tasa de respuesta patológica completa (pCR) en estadios tempranos del CMTN, siendo de cerca del 65%^{8,9}.

Recientemente, se publicaron los resultados finales de supervivencia global del ensayo KEYNOTE-522, que confirman un beneficio significativo en supervivencia global en el grupo tratado con pembrolizumab, en comparación con quimioterapia sola¹⁰.

A pesar de estos avances, un porcentaje significativo de pacientes no alcanza una pCR, lo cual representa un desafío clínico relevante. Entender la base biológica de esta resistencia es fundamental para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

En los últimos años, la transcriptómica de célula única (scRNA-seq) ha transformado el estudio de la biología tumoral, permitiendo analizar la expresión génica a nivel individual en miles de células y descomponer así la complejidad del microambiente tumoral. Esta tecnología ha aportado información clave sobre interacciones tumor-inmunidad y ha facilitado la identificación de poblaciones celulares asociadas a la respuesta o resistencia terapéutica¹¹.

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 desarrollado y validado protocolos de scRNA-seq tanto en muestras frescas como en tejido fijado en formol e incluido en parafina (FFPE). 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 electrónica¹².

Nuestro estudio recientemente publicado en *Cells*¹², junto con los resultados preliminares de scRNA-seq obtenidos de 72 muestras FFPE en nuestro laboratorio, incluidas dos biopsias de CMTN tomadas en momentos distintos (ver anexo), no solo refuerzan la robustez de esta técnica, sino que también subrayan nuestra amplia experiencia en su aplicación.

En este proyecto se propone aplicar scRNA-seq a muestras de CMTN tratadas con el esquema terapéutico estándar de quimioterapia + pembrolizumab, con el objetivo de identificar diferencias en la composición celular entre tumores que responden completamente al tratamiento y aquellos que no, así como caracterizar las poblaciones

celulares que persisten en los tumores residuales postquirúrgicos. Esta información podría revelar mecanismos de resistencia y posibles nuevas dianas terapéuticas orientadas a lograr respuestas completas en la totalidad de las pacientes tratadas.

Justificación científica y clínica

Este proyecto se centra en el CMTN, un subtipo particularmente agresivo que carece de dianas terapéuticas dirigidas y presenta tasas de recaída y mortalidad más altas que otros tipos de cáncer de mama. A pesar de los avances terapéuticos recientes, como la incorporación de pembrolizumab al tratamiento neoadyuvante, una proporción significativa de pacientes no alcanza pCR, lo que se asocia con mal pronóstico.

La comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que determinan la respuesta o resistencia al tratamiento sigue siendo limitada. En este contexto, la transcriptómica de célula única ofrece una herramienta de análisis poderosa para estudiar la heterogeneidad tumoral con una resolución sin precedentes. Sin embargo, la aplicación de esta tecnología en CMTN tratado en contexto clínico real ha sido escasa, principalmente debido a las limitaciones en el acceso a tejido fresco.

Nuestro grupo ha desarrollado y validado protocolos de scRNA-seq en muestras FFPE de mama, lo que abre las puertas al uso de colecciones retrospectivas bien caracterizadas. Esta metodología nos permite analizar las poblaciones celulares y sus perfiles de expresión génica en tumores pretratamiento y en tejido residual postquirúrgico, con el objetivo de identificar subpoblaciones celulares resistentes y nuevas dianas terapéuticas.

Hipótesis

Las diferencias en la composición y el perfil transcriptómico de las poblaciones celulares presentes en los tumores primarios de pacientes con CMTN tratadas con quimioterapia e inmunoterapia (pembrolizumab) determinan la respuesta al tratamiento. En particular, existen subpoblaciones celulares específicas asociadas a la resistencia terapéutica que persisten en el tumor residual de pacientes sin 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 completa patológica.

Objetivos

Objetivo principal

Caracterizar y comparar las poblaciones celulares y sus perfiles de expresión génica en tumores de mama triple negativo tratados con el tratamiento estándar de quimioterapia + pembrolizumab, analizando tanto las muestras tumorales pretratamiento de pacientes que presentan 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 al tratamiento 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 que alcanzan pCR y aquellos que no responden al tratamiento con quimioterapia + pembrolizumab.
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 al tratamiento.
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 CMTN.
4. Explorar, de forma preliminar, las poblaciones celulares presentes en muestras metastásicas (M1) 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 metástasis.

Metodología

Novedad del estudio

Este proyecto propone un enfoque novedoso al aplicar scRNA-seq a muestras de CMTN tratadas bajo el régimen de tratamiento estándar. Este enfoque permitirá una caracterización detallada de las subpoblaciones celulares, sus perfiles de expresión génica, posibles alteraciones genómicas y su relación con la respuesta o resistencia al tratamiento, con implicaciones clínicas relevantes.

Diseño del estudio

Se trata de un estudio traslacional en el que se caracterizará la heterogeneidad celular y molecular del CMTN 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. La selección se basará en el diagnóstico, tratamiento y la disponibilidad de tejido adecuado. Se recopilarán datos clínicos y patológicos relevantes (edad, tipo de tumor, 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 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 *HER2*, *MDM4*, *MYC*, *CCND1*, *FGFR1* y *GATA3*. El microambiente inmunológico tumoral será caracterizado adicionalmente mediante inmunohistoquímica (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.

Impacto esperado

Los resultados de este proyecto tienen el potencial de generar un conocimiento clave sobre los mecanismos de resistencia al tratamiento en CMTN, lo que podría conducir a mejoras sustanciales en las estrategias terapéuticas actuales. La identificación de poblaciones celulares específicas asociadas a la falta de pCR permitirá avanzar hacia un tratamiento más personalizado y efectivo.

Además, los datos generados podrán servir como base para el diseño de futuros ensayos clínicos centrados en subgrupos de pacientes con alto riesgo de recaída, que actualmente carecen de opciones terapéuticas adicionales una vez que el tratamiento estándar falla.

Plan de difusión

Los hallazgos del proyecto serán difundidos a través de diversas vías con el objetivo de maximizar su impacto científico, clínico y social. Se prevé la publicación de los resultados en revistas científicas internacionales de alto impacto y acceso abierto, así como su presentación en congresos especializados en oncología, patología y biología molecular.

A nivel local, se organizarán actividades de divulgación en colaboración con asociaciones de pacientes y jornadas de puertas abiertas en varios hospitales. Asimismo, se incluirán materiales informativos accesibles para pacientes y público general, en coordinación con iniciativas como la Escuela de Pacientes. Estas acciones permitirán transferir el conocimiento generado a la sociedad y visibilizar la importancia de la investigación en tumores difíciles de tratar.

Cronograma

Tarea	Año 1				Año 2				Año 3			
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
Selección de casos y evaluación histológica												
Procesamiento de muestras y preparación de librerías para scRNAseq												
Secuenciación												
Análisis bioinformático y estadístico												
Validación de resultados												
Comunicación												

Presupuesto detallado

Concepto	Precio (€)
1. Consumibles para scRNA-seq (32 muestras)	
PROTECTOR RNase Inhibitor 2000 U x2	2.262
LIBERASE TH Research Grade 100 mg	940
MACS SmartStrainer, 30 µm	145
Filtros de pre-separación, 30 µm	285
Tubos GentleMACS T25 C x2	438
Medios, PBS, agua libre de nucleasas, Tris, xilol, BSA	300
Yoduro de propidio, 1.0 mg	88
Cámaras para conteo celular (C10228) - 50 portaobjetos x2	325
Dual Index Plate TS Set A, 96 reacciones	1.476
SPRIselect - 60 mL	1.868
Chromium Chip Q Single Cell Kit x2	2.154
Chromium Fixed RNA Kit – Transcriptoma humano (4 rxns x 4 BC) x2	49.144
Chromium X & Kit de accesorios – 15 días	4.538
Consumibles generales (tubos Eppendorf, tubos PCR, Falcon 15/50 ml, puntas con filtro doble, etc.)	4.000
2. Secuenciación externa de librerías (CNAG – tarifa 2024)	22.000

Total para scRNA-seq (32 muestras)	89.963
3. Reactivos para inmunohistoquímica	
Anticuerpos y sistema de detección (300 slides x 13 €)	3.900
4. Reactivos para hibridación fluorescente in situ (FISH)	
Reactivos para FISH (90 slides x 40 €)	3.600
5. Investigador postdoctoral (tiempo parcial)	42.000
6. Publicación artículo en Open Access	3.000
7. Gestión de proyecto (20% Hospital público)	35.616
Total Proyecto	178.080

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. Derakhshan, F. & Reis-Filho, J. S. Pathogenesis of Triple-Negative Breast Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **17**, 181–204 (2022).
3. Li, Y., Zhang, H., Merkher, Y., Chen, L., Liu, N., Leonov, S. et al. Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. *J Hematol Oncol* **15**, 121 (2022).
4. Howlader, N., Cronin, K. A., Kurian, A. W. & Andridge, R. Differences in Breast Cancer Survival by Molecular Subtypes in the United States. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **27**, 619–626 (2018).
5. Hudis, C. A. & Gianni, L. Triple-Negative Breast Cancer: An Unmet Medical Need. *The Oncologist* **16**, 1–11 (2011).
6. Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A. et al. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clinical Cancer Research* **13**, 4429–4434 (2007).
7. Arnedos, M., Bihan, C., Delaloge, S. & Andre, F. Triple-negative breast cancer: are we making headway at least? *Ther Adv Med Oncol* **4**, 195–210 (2012).
8. Schmid, P., Cortes, J., Bergh, J. C. S., Puztai, L., Denkert, C., Verma, S. et al. KEYNOTE-522: Phase III study of pembrolizumab (pembro) + chemotherapy (chemo) vs placebo + chemo as neoadjuvant therapy followed by pembro vs placebo as adjuvant therapy for triple-negative breast cancer (TNBC). *JCO* **36**, TPS602–TPS602 (2018).
9. Schmid, P., Cortes, J., Puztai, L., McArthur, H., Kümmel, S., Bergh, J. et al. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* **382**, 810–821 (2020).

10. Schmid, P., Cortes, J., Dent, R., McArthur, H., Puzsai, L., Kümmel, S. et al. Overall Survival with Pembrolizumab in Early-Stage Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* **391**, 1981–1991 (2024).
11. 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).
12. Gonzalez-Martinez, S., Carretero-Barrio, I., Perez-Mies, B., Fernandez-Lanza, V., Garcia-Cosio, 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. (2024) doi:10.1101/2024.10.04.616471.

Anexo

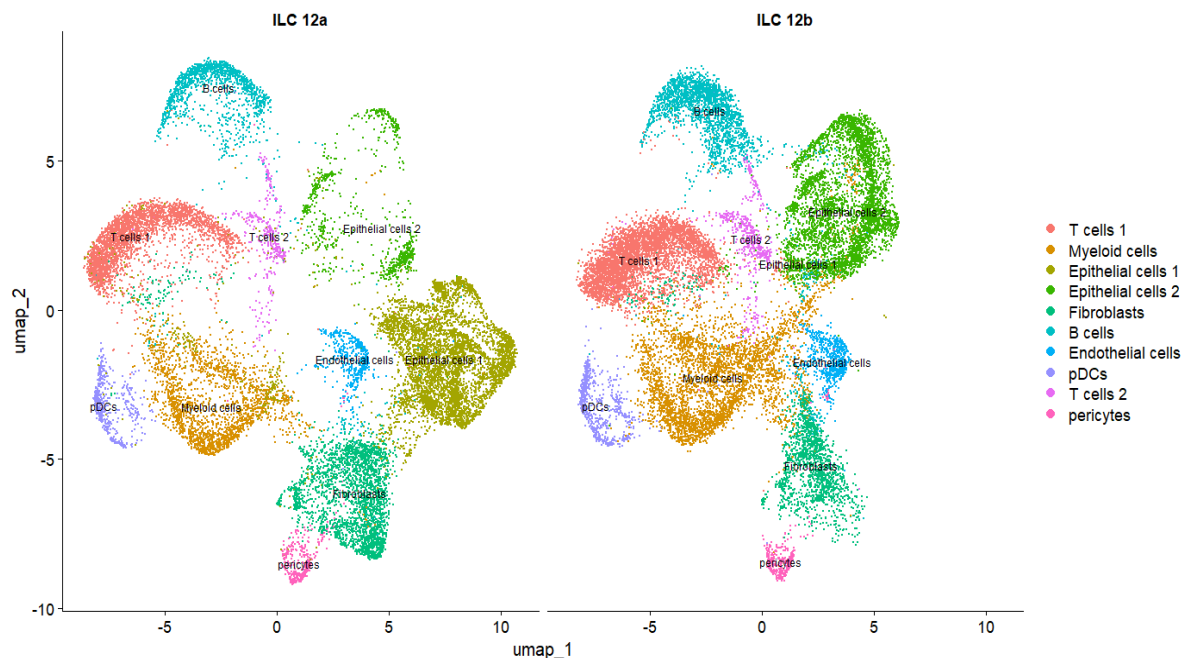


Figura anexa. UMAP de expresión génica a nivel de scRNA-seq de dos biopsias (ILC 12a e ILC 12b) obtenidas del mismo caso de CMTN en diferentes momentos temporales. Ambas muestras presentan una composición celular similar, con poblaciones de células inmunes (linfocitos T, células mieloides), fibroblastos y células endoteliales. No obstante, en la segunda biopsia (ILC 12b), tomada en un momento posterior, se observa una única población epitelial tumoral (*Epithelial cells 2*) claramente definida, mucho menos representada en la biopsia inicial (ILC 12a), en la que predominaba la *Epithelial cells 1*. Esta diferencia sugiere una posible selección o enriquecimiento de subpoblaciones tumorales durante la progresión del cáncer.