



MEMORIA

25.º RETORNO SOCIAL DE LA INVESTIGACIÓN
CÁNCER

FIRMA GENÉTICA E INMUNE PARA LA PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA A QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE EN PACIENTES CON CÁNCER DE VEJIGA

Dra. Cecilia Cabrera Navarro

IrsiCaixa Institut de Recerca de la Sida - IIGTiP Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol

Dr. Alejo Rodríguez-Vida Rodríguez

IMIM Institut de Recerca Hospital del Mar

1. Resumen

El cáncer de vejiga es uno de los cánceres más comunes y una de las principales causas de muerte por cáncer en hombres. La quimioterapia neoadyuvante con cisplatino (NAC) antes de la extracción posterior de la vejiga (llamada *cistectomía radical*) es el tratamiento estándar en pacientes con cáncer de vejiga músculo-invasivo (MIBC). Desafortunadamente, hay un gran número de pacientes (más del 50%) que no responden al tratamiento. La identificación de biomarcadores fiables que permitan clasificar a los pacientes que no responderán al tratamiento es importante para agilizar la cirugía, reducir los costes y disminuir la morbilidad.

El objetivo de este estudio es identificar un biomarcador que pueda predecir la respuesta a la NAC en pacientes con MIBC. Para alcanzar este objetivo, se ha reclutado una cohorte de pacientes de los cuales se ha obtenido sangre periférica y tejido tumoral, tanto fresco como preservado en parafina, en los que se ha llevado a cabo una caracterización en profundidad de la respuesta inmunológica

2. Resultados

Hemos reclutado a 45 pacientes con un carcinoma urotelial de vejiga músculo-invasivo (MIBC) T2-4N0M0 y candidatos a quimioterapia neoadyuvante con muestras de sangre y tejido fresco. Además, también hemos reclutado a 20 pacientes con MIBC T2-4N0M0 y candidatos a quimioterapia neoadyuvante con muestras de parafina. También se han reclutado controles sin tumor. Se realizó un análisis multiparamétrico de citometría de flujo en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y tejido de vejiga de pacientes con MIBC pT2-T4N0 en el pretratamiento ($n = 17$) y después del tratamiento neoadyuvante [cirugía de cistectomía radical (RC), $n = 21$]. Se disponía de muestras emparejadas de pre- y postratamiento para 8 pacientes. Se incluyeron 7 individuos sin cáncer como controles. La falta de respuesta se determinó en la cistectomía y los pacientes se clasificaron como no respondedores o respondedores.

Hemos encontrado que la respuesta inmunológica en respondedores y no respondedores es diferente.

- La expresión de la ATPasa de membrana CD39 en células T CD4+ de sangre periférica se expresó de manera diferencial en respondedores y no respondedores al tratamiento neoadyuvante. El porcentaje de células CD4+ CD39+ circulantes fue significativamente mayor en pacientes que no respondieron al tratamiento neoadyuvante en el momento de la TURBT, y mostraron la misma tendencia en la RC en comparación con los respondedores, lo que sugiere que estas células podrían desempeñar un papel en la resistencia tumoral. La proporción de estas células en individuos no respondedores en la TURBT también fue mayor que en pacientes con MIBC respondedores, pacientes con MIBC no músculo-invasivo (NMIBC) y la población de control. En las PBMC, CD39 está particularmente enriquecido en células T CD4+ de memoria efectora y memoria central, y las diferencias entre respondedores y no respondedores fueron aún más significativas si se comparaban estas células de memoria central y efectora. Las células T CD4+ que expresan CD39 tienen una mayor expresión del inhibidor de punto de control inmunológico PD-1 y enzimas citolíticas reducidas, como granzima-1 (GrzB) y perforina, en comparación con los niveles encontrados en la población CD39-. Además, en las células CD4+T de sangre, CD39 se correlacionó positivamente con FoxP3+ y TIGIT+, y negativamente con GrzB y perforina. Estos resultados también fueron similares en el compartimento inmunológico del tejido de vejiga de pacientes con MIBC, ya que la frecuencia de células CD4+T CD39+ intratumorales fue significativamente mayor en pacientes tratados con neoadyuvancia que no respondieron en comparación con los que respondieron, y estas células CD39+ también mostraron una correlación positiva con las células CD4+T tumorales que expresan TIGIT, ICOS y FoxP3. Por lo tanto, hemos identificado la expresión de CD39 en subconjuntos totales y de maduración diferentes de células T CD4+ como un biomarcador prometedor para predecir la respuesta al tratamiento neoadyuvante en pacientes con MIBC. Además, nuestros datos sugieren que dirigirse a CD39 podría proporcionar una nueva estrategia terapéutica para mejorar los resultados clínicos en individuos con MIBC.
- La expresión de otros marcadores en células T CD8+, como el marcador inhibidor NKG2A o PD-1 en las células de memoria efectora temprana, también fue diferente entre los respondedores y los no respondedores.

- También se han observado diferencias funcionales. Las células de los pacientes que responden al tratamiento secretan una mayor producción de IL4 tanto en las células T CD4+ como en las células T CD8+ que en los pacientes que no responden. Esto sugiere una asociación entre la respuesta y la presencia de células con un fenotipo Th2. Por el contrario, las células NK de estos pacientes respondedores produjeron menos IL-21. La IL-21 actúa previniendo la activación de las células NK, por lo que podríamos suponer que en este caso los pacientes con una buena respuesta podrían tener un compartimento NK más activado. Esta idea se refuerza con los resultados observados con la IL-17. Los pacientes no respondedores tienen niveles más altos de IL-17 y se ha descrito que la IL-17 promueve la tumorigénesis y la metástasis al limitar la actividad antitumoral y antiviral de las células NK mediante la inhibición de la maduración de las células NK. Los pacientes con una buena respuesta también tienen células T CD8+ más polifuncionales (que secretan más de una citoquina) que los pacientes sin respuesta. La respuesta inmunológica también se midió en función de la activación de las células T y la expresión de diferentes receptores en la superficie. Este ensayo detecta células que se activan como resultado de la estimulación específica del antígeno mediante la regulación al alza de los marcadores de superficie inducidos por la activación CD137 y OX40. Estos análisis muestran que los pacientes no respondedores tienen significativamente menos activación inmunológica que aquellos pacientes que tienen una buena respuesta tanto en las células T CD4+ como en las células T CD8+. En general, el análisis funcional indicó que el perfil de activación de ciertas poblaciones de células inmunológicas en sangre también podría utilizarse para diferenciar la respuesta de los pacientes con MIBC al tratamiento neoadyuvante. Aunque se necesita una comprensión más profunda de los mecanismos biológicos involucrados en estas diferencias, nuestros resultados parecen indicar que las células de los respondedores tienden a tener una mayor activación inmunológica, lo que podría ser otro factor para explicar por qué estos pacientes obtienen mejores resultados clínicos.

Además, se han almacenado suspensiones de células individuales viables criopreservadas de sangre periférica (PBMC) y muestras de tumor en nitrógeno líquido, y se ha realizado la secuenciación de ARN de células individuales en un total de 16 muestras de tejido [9 muestras en el momento de la detección del tumor mediante resección transuretral del tumor de vejiga (RTU) y 6 muestras emparejadas de RTU y cistectomía, así como 1 tejido no tumoral]. En 2 de estos individuos, se realizó la secuenciación de ARN de células individuales en muestras emparejadas de PBMC (tanto

en el momento de la RTU como en el de la cistectomía). Nuestros datos preliminares muestran lo siguiente:

- Después del proceso de anotación celular (utilizando Seurat), hemos podido identificar un gran número de poblaciones inmunológicas, tanto del sistema inmunológico innato como del adaptativo, de células T y no T, así como diferentes fenotipos como células agotadas, reguladoras o proliferativas. También hemos podido detectar células no inmunológicas como células endoteliales, células musculares o fibroblastos. Utilizando la puntuación del ciclo celular de Seurat, pudimos calcular los puntajes del ciclo celular y observar las células inmunológicas que estaban proliferando. Observamos muy poca proliferación en las células epiteliales debido al bajo rendimiento obtenido con estas células tumorales.
- Se realizó un análisis de abundancia diferencial para los respondedores a la RTU-cistectomía y los no respondedores a la RTU-cistectomía. Hemos observado que los respondedores tienen cambios significativos ($p. \text{ adj.} < 0,1$) en varios tipos de células, mientras que no se pueden observar cambios significativos en los no respondedores. Las diferencias en las diferentes poblaciones se están analizando con más profundidad.
- Análisis de ARN de células individuales y secuenciación de TCR de células individuales: en 2 pacientes (en el momento de la RTU y en la cistectomía), y en tejido y PBMC, se llevó a cabo una secuenciación de ARN y TCR de células individuales. En estas muestras, podemos observar que se detectó al menos una secuencia de TCR y, como era de esperar, hay una muy buena superposición entre las células con TCR y las células anotadas como células T. Evaluamos la clonalidad de los TCR en muestras de tejido y PBMC, tanto en el momento de la RTU (PRE) como en el de la cistectomía (POST) y, curiosamente, en ambos pacientes observamos un aumento en la clonalidad después del tratamiento. Además, observamos que las células T infiltrantes del tumor tienen un mayor cambio en la clonalidad que las células T periféricas. Esto es consistente con la expansión de células T asociada con una respuesta antitumoral. Si evaluamos el perfil de TCR en el tejido en el momento de la RTU y en la cistectomía utilizando un UMAP, podemos observar que en el postratamiento (en la cistectomía) la distribución de clonotipos entre los estados celulares cambia drásticamente en ambos individuos. Lo que se puede observar en ambos pacientes es una expansión de los efectores CD8 que ya están presentes en el tumor antes del tratamiento (RTU).

- Perfil de TCR (secuenciación de la cadena beta variable del TCR) en muestras de FFPE: se ha realizado la secuenciación de las regiones CDR3 de las cadenas TCR β humanas utilizando el ensayo ImmunoSEQ® (Adaptive Biotechnologies) a partir de ADN obtenido de parafina de 10 individuos secuenciales (en el momento de la RTU y la cistectomía) con diferentes respuestas al tratamiento. Estamos analizando todas las secuencias y, preliminarmente, podemos observar que las secuencias de TCR no se comparten con alta frecuencia entre los individuos en las muestras de RTU o cistectomía. Por el contrario, y como mostró el análisis de células individuales, un alto número de TCR se comparten en el mismo paciente en la muestra de RTU y la de cistectomía. Un análisis más profundo está en proceso.
- Transcriptómica espacial en muestras de FFPE: para completar el análisis de la caracterización celular en muestras de RTU y cistectomía de manera más profunda y específica, se están analizando 8 muestras de esta cohorte de pacientes utilizando transcriptómica espacial.

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

Las implicaciones clínicas de los resultados obtenidos en el proyecto global aún no se pueden extrapolar, ya que se está procesando una gran cantidad de datos y se está realizando el análisis integrado de todos ellos. Sin embargo, los resultados preliminares del proyecto indican que podremos obtener una caracterización en profundidad tanto de la composición (fenotipo) como de la funcionalidad de las células inmunológicas presentes tanto en la sangre periférica como en el tejido antes y después del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante. Estos datos muestran que la respuesta inmunológica (fenotipo y funcionalidad) de los pacientes respondedores y no respondedores es diferente. Una de las vías que podría desempeñar un papel importante en la patogénesis del cáncer de vejiga y en la respuesta al tratamiento es la vía CD39/CD73. Esta vía, que es la vía ATP-adenosina, ha surgido en los últimos años como un objetivo prometedor para la terapia del cáncer en otros tipos de tumores. En este sentido, hemos identificado la expresión de CD39 en subconjuntos totales y de maduración diferentes de las células T CD4 como un biomarcador prometedor para predecir la respuesta a la quimioterapia en pacientes con MIBC, lo que tiene el potencial de utilizarse en la clínica tras estudios de validación adicionales. Además,

nuestros datos sugieren que CD39 podría desempeñar un papel en la resistencia tumoral y, por lo tanto, la inhibición de CD39 podría proporcionar nuevas estrategias terapéuticas para dirigirse al MIBC y su resistencia a la quimioterapia. Los datos de transcriptómica de células individuales y espaciales, así como el perfil de TCR, nos permitirán corroborar nuestros datos de citometría, así como otras vías celulares que participan en la respuesta al tratamiento y que podrían ayudar potencialmente a conseguir una mejor gestión clínica de los pacientes. En este sentido, observamos que en los pacientes con cáncer de vejiga y en el tejido tumoral hay una expansión de células T, probablemente asociada con una respuesta antitumoral, y que estas células respondedoras ya están presentes en la muestra de RTU. Estos datos sugieren que las respuestas antitumorales no se generan *de novo* después del tratamiento y, por lo tanto, estas células inmunes infiltrantes podrían expandirse y utilizarse como posibles estrategias terapéuticas.

4. Bibliografía científica generada

Los resultados de este proyecto se han presentado en los congresos siguientes:

- Senserrich J, Buisan O, Servian P, Clotet B, Cabrera C.

CD4 T-cell CD39 as a predictive biomarker of response to neoadjuvant chemotherapy in muscle-invasive bladder cancer patients.

ASEICA 40th Anniversary Congress, La Coruña, 14-16 de noviembre de 2023.

- Buisan Rueda O, Senserrich Velasco J, Servian Vives P, Sanchez Rodriguez M, Garcia Rodriguez E, Pagés Oliveras J, Freixa Sala R, Colomer Gallardo A, García Puche M, Segura Alabart M, Ferreiro Pareja C, Vigues Julia F, Areal Calama J, Clotet Sala B, Bellmunt Molins J, Cabrera Navarro C.

Role of the CD39 pathway in modulating the response to neoadjuvant therapy in muscle invasive bladder cancer patients.

XXXVII Reunión Nacional del Grupo de Urología Oncológica, Santander, 25 y 26 de abril. Premio al mejor póster sobre vejiga.

Los resultados de este proyecto se presentarán en la reunión de la ASCO 2024:

- Bellmunt J, Hully M, Epstein I, Liria Veiga S, Xie Y, Kukreja S, Muñoz M, Garoz Martínez P, Fernández Martínez N, Cabrera C, Choueiri TK, Long H, Cejas P.

Combined high resolution H3K27ac epigenomic and single cell transcriptional profiling identifies a signature predictive of response to neoadjuvant immune checkpoint inhibitors (ICI) in Urothelial Cancer (UC).

Se ha enviado una comunicación con los resultados al congreso ESMO 2024:

- Buisan O, Senserrich J, Servian P, Sánchez M, Garcia E, Pagès J, Freixa R, Colomer A, García M, Segura M, Cervera J, Ferreiro C, Vignes F, Areal JJ, Clotet B, Bellmunt J, Cabrera C.

Role of the CD39 pathway in modulating the response to neoadjuvant therapy in muscle-invasive bladder cancer patients.