



## Análisis de célula única en cáncer: aplicaciones clínicas y hoja de ruta para su implementación

### Single-cell analysis in cancer: clinical applications and roadmap for implementation

»Juan Manuel Garzon-Dangond<sup>1</sup>

»Mariana Nino López<sup>2</sup>

»Andres F. Cardona<sup>3</sup>



<sup>1</sup> Departamento de Medicina Interna, Atlantic Health System / Overlook Medical Center, Summit, New Jersey, USA.

<sup>2</sup> Sección de Neumología Intervencionista, División de Cirugía Torácica y Neumología Intervencionista, Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, Massachusetts, Estados Unidos.

<sup>3</sup> Dirección de Investigación y Educación, Centro de Tratamiento e Investigación sobre cáncer Luis Carlos Sarmiento Angulo (CTIC), Bogotá, Colombia.

Recibido el 6 de septiembre de 2025. Aceptado el 16 de enero de 2026

<https://doi.org/10.51643/22562915.841>

## Resumen

**Introducción:** el análisis de célula única comprende un conjunto de tecnologías que permiten estudiar múltiples capas ómicas, como genómica, transcriptómica, epigenómica y proteómica a nivel individual. Este enfoque ofrece una resolución celular superior a la secuenciación bulk, que integra señales heterogéneas en perfiles moleculares promedio. La incorporación de estas plataformas en oncología ha transformado la comprensión de la heterogeneidad tumoral, la plasticidad celular y los procesos evolutivos que subyacen al desarrollo del cáncer.

**Métodos:** se llevó a cabo una revisión narrativa de la literatura. La búsqueda bibliográfica se realizó en las bases de datos PubMed/MEDLINE, EMBASE, Web of Science y Scopus. Los criterios de inclusión priorizaron investigaciones relacionadas con aplicaciones clínicas, particularmente aquellas enfocadas en inmunoterapia, mecanismos de resistencia a fármacos, heterogeneidad tumoral y estratificación de pacientes.

**Resultados:** esta revisión resume las tecnologías emergentes de secuenciación de célula única y los avances recientes en la investigación del cáncer obtenidos mediante esta, incluyendo información relacionada con el panorama de las células malignas y las células inmunitarias, la heterogeneidad

\* **Autor para correspondencia:** Juan Manuel Garzon-Dangond, MD. Departamento de Medicina Interna, Atlantic Health System / Overlook Medical Center, Summit, New Jersey, USA.

**Dirección:** 99 Beauvoir Ave, Summit, NJ 07901, Estados Unidos.

**Correo electrónico:** jmgdanresearch@gmail.com

<https://doi.org/10.51643/22562915.841>

Asociación Colombiana de Hematología y Oncología. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

tumoral, las células tumorales circulantes y los mecanismos subyacentes del comportamiento biológico tumoral.

**Conclusión:** en conjunto, la evidencia disponible indica que los enfoques unicelulares pueden aportar valor clínico en el diagnóstico, la selección de terapias dirigidas y la estimación pronóstica en distintos tipos de tumores. En un futuro próximo, los avances en esta modalidad mejorarán nuestra comprensión de las características biológicas de los tumores y destacarán posibles dianas terapéuticas para los pacientes.

**Palabras clave:** secuenciación de ARN de una sola célula; microambiente tumoral; evolución clonal; resistencia a fármacos; enfermedad residual mínima.

## Abstract

**Introduction:** single cell analysis comprises a set of technologies that enable the characterization of multiple omic layers including genomics, transcriptomics, epigenomics and proteomics at the level of individual cells. This approach provides a higher cellular resolution than bulk sequencing, which integrates heterogeneous signals into averaged molecular profiles. The incorporation of these platforms into oncology has reshaped the understanding of tumor heterogeneity, cellular plasticity and evolutionary processes underlying cancer development.

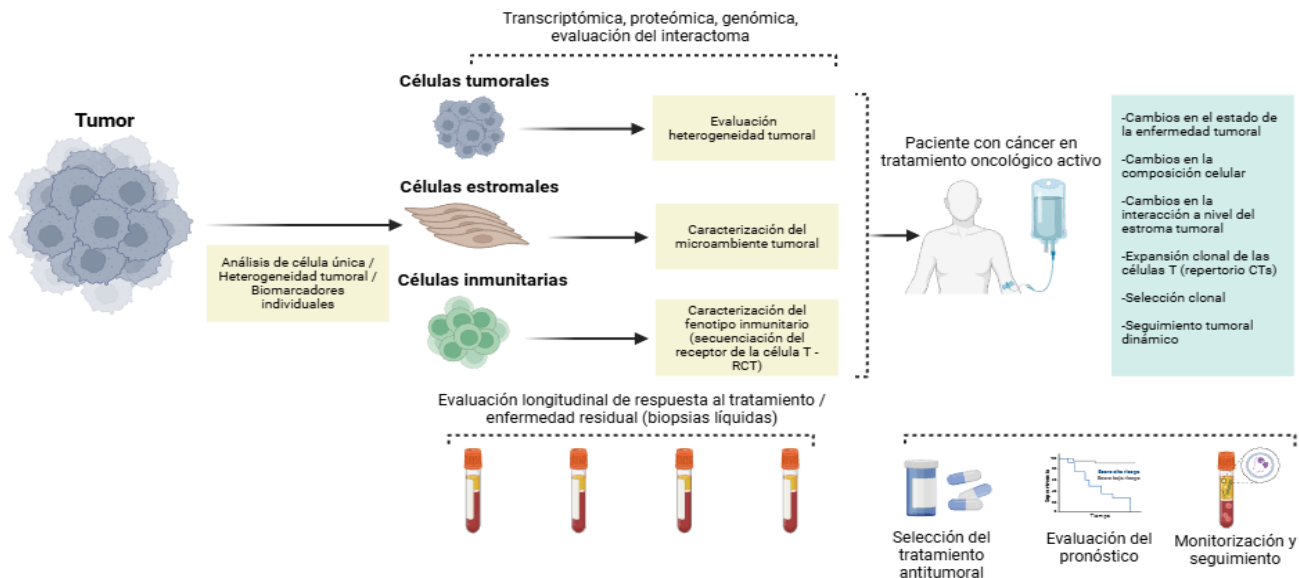
**Methods:** a narrative review of the literature was conducted. The bibliographic search was performed in PubMed/MEDLINE, EMBASE, Web of Science and Scopus. Inclusion criteria prioritized studies addressing clinical applications, particularly those related to immunotherapy, mechanisms of drug resistance, tumor heterogeneity and patient stratification.

**Results:** this review summarizes emerging single cell sequencing technologies and recent advances in cancer research derived from their application. The evidence synthesized includes findings related to malignant and immune cell landscapes, tumor heterogeneity, circulating tumor cells and biological mechanisms that shape tumor behavior.

**Conclusion:** collectively, available evidence indicates that unicellular approaches can provide clinically relevant value in diagnosis, therapeutic selection and prognostic assessment across multiple tumor types. Ongoing advances in this field are expected to further refine the biological characterization of tumors and to identify clinically actionable therapeutic targets.

**Keywords:** single cell RNA sequencing; tumor microenvironment; clonal evolution; drug resistance; minimal residual disease.

## Resumen gráfico



### Puntos clave

- Valorar la heterogeneidad tumoral: el análisis de célula única (scRNA-seq) descubre la heterogeneidad intratumoral perfilando la expresión génica, las características genómicas y el estado epigenético a nivel celular, identificando subclones que favorecen la progresión y la resistencia. Por ejemplo, en el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) revela mutaciones conductoras infrecuentes (diversas variantes del oncogén EGFR) no detectables por la secuenciación de siguiente generación, ayudando en la determinación de biomarcadores con capacidad pronóstica y predictiva.
- Elucidar el microambiente tumoral (TME): la secuenciación de célula única mapea interacciones entre las células tumorales y el TME, incluyendo la infiltración de células del sistema inmunitario, efectoras y reguladoras (permite evaluar el agotamiento de las células T en tumores PD-L1 positivos). Estas aplicaciones incluyen la predicción de la respuesta a la inmunoterapia en algunas enfermedades como el melanoma y el CPCNP, donde la scRNA-seq identifica células T agotadas, guiando el uso de inhibidores de PD-1.
- Identificar mecanismos de resistencia a fármacos: la scRNA-seq detecta subpoblaciones resistentes a diferentes tratamientos. Por ejemplo, en cáncer de mama permite evaluar la activación de vías de señalización (PI3K/AKT) relacionadas con la resistencia en pacientes con tumores HER2 positivos y con expresión de receptores hormonales.
- Habilitar oncología de precisión y estratificación de pacientes: la scRNA-seq clasifica y estratifica múltiples subtipos basados en el análisis de célula única (por ejemplo, Grupo 3 vs SHH en meduloblastoma), apoyando la instauración de tratamientos personalizados.
- Facilitar el monitoreo de enfermedad residual mínima (MRD): el análisis de la scRNA-seq en biopsia líquida (ctDNA de células tumorales circulantes) rastrea la MRD postcirugía o terapias como la quimiorradiación, permitiendo valorar el pronóstico perfilando el riesgo de recaída.

## Introducción

La oncología de precisión ha avanzado notablemente gracias a la genómica de promedio (bulk), pero la heterogeneidad intratumoral y la plasticidad celular siguen socavando el valor pronóstico y predictivo de muchos biomarcadores<sup>1</sup>. La biología de una muestra tumoral no está contenida en un único perfil estable, en cambio, emerge de estados celulares que coexisten, compiten y evolucionan en nichos tisulares concretos<sup>2,3</sup>. En este contexto, las tecnologías de célula única (p. ej., scRNAseq, scATACseq, scDNAseq, CITEseq y modalidades multiómicas), junto con la transcriptómica/proteómica espacial, permiten desagregar esa diversidad y situarla in situ, generando mapas funcionales del tumor y su microambiente<sup>4,5</sup>.

En los últimos años, estos enfoques han pasado de describir cartografías celulares a ofrecer señales con potencial clínico: subtipado refinado más allá de paneles estáticos, firmas asociadas a respuesta o resistencia a inmunoterapia y terapias dirigidas, y pistas para combinaciones racionales basadas en interacciones ligando–receptor o programas de estrés adaptativo<sup>6-10</sup>. Sin embargo, la traslación a la práctica clínica no ha sido óptima. Persisten brechas en la preanalítica (tiempos de ischemia, disociación celular, elección células vs. núcleos vs. FFPE)<sup>11-13</sup>, en la calidad (RNA ambiente, dobles)<sup>14,15</sup>, en la reproducibilidad analítica (versionado de pipelines, integración de lotes)<sup>16</sup>, en la interpretación clínica (informes accionables, niveles de evidencia)<sup>17,18</sup> y en la factibilidad operativa (costos, TAT, requisitos regulatorios y de gobernanza de datos)<sup>6</sup>.

En este marco, nuestro objetivo principal es delimitar los escenarios asistenciales en los que la información de célula única y/o espacial aporta valor incremental que modifica la conducta frente al standard of care. Como obje-

tivos secundarios, destacamos los patrones y programas con mejor respaldo para la clínica, medido por replicación externa, validación en cohortes independientes e integración espacial con correlación de resultados. Además, proponemos una guía operativa para hospitales que recorre el proceso desde la muestra hasta el informe para el comité molecular (muestra → preparación de biblioteca → análisis → informe clínico → comité), con una lista de verificación para reducir riesgos técnicos y de privacidad. Sostenemos que una implementación focalizada, con estándares básicos de calidad, uso de análisis espacial cuando la localización celular importa e informes claros, es posible hoy y aporta valor clínico.

## Métodos

Se llevó a cabo una revisión narrativa de la literatura con el objetivo de sintetizar la evidencia disponible sobre el uso de tecnologías de análisis de célula única y tecnologías espaciales en cáncer, con especial énfasis en su relevancia clínica.

La búsqueda bibliográfica se realizó en las bases de datos PubMed/MEDLINE, EMBASE, Web of Science y Scopus, incluyendo publicaciones disponibles hasta septiembre de 2025. Se consideraron estudios publicados en revistas científicas indexadas, sin restricción por tipo de diseño, siempre que abordaran aplicaciones de tecnologías de célula única y/o espaciales en el contexto oncológico.

Los criterios de inclusión priorizaron investigaciones relacionadas con aplicaciones clínicas, particularmente aquellas enfocadas en inmunoterapia, mecanismos de resistencia a fármacos, heterogeneidad tumoral y estratificación de pacientes. Se excluyeron estudios puramente

metodológicos sin implicaciones clínicas claras, así como literatura no revisada por pares.

La información seleccionada fue analizada y sintetizada de forma cualitativa, organizando los hallazgos según ejes temáticos y aplicaciones clínicas. Se dio prioridad a resultados reproducidos en múltiples estudios, a enfoques de integración multimodal de datos y a aquellos con potencial impacto en la toma de decisiones clínicas, con el fin de ofrecer una visión comprensiva y actualizada del estado del conocimiento en este campo.

## Resultados

### Valor clínico del análisis de célula única en comparación con el enfoque bulk

La secuenciación bulk combina dos fenómenos distintos: variaciones en la composición celular del tejido y cambios en el estado funcional de cada tipo celular. El análisis de célula única (p. ej., scRNA-seq, por *single-cell RNA sequencing*) y las plataformas espaciales (transcriptómica/proteómica *in situ*) separan esas dos dimensiones. En consecuencia permiten: a) refinar subtipos más allá de paneles fijos, b) distinguir cambios inducidos por tratamiento, y c) revelar programas celulares que condicionan pronóstico y respuesta terapéutica. La transición desde mediciones promediadas (bulk) hacia una caracterización con resolución celular y espacial del tumor y su microambiente, constituye un objetivo central de la oncología traslacional actual<sup>4,19,20</sup>.

**Componente tumoral:** en el compartimento tumoral, la unicelularidad identifica subpoblaciones raras y estados dinámicos (p. ej., *epithelial-mesenchymal transition*, EMT parcial) que coexisten dentro y entre pacientes y pasan inadvertidos en el promedio bulk. Su recono-

cimiento permite estrategias terapéuticas orientadas al estado, más allá del genotipo<sup>4</sup>.

**Microambiente inmune:** en el microambiente inmune, scRNA-seq emparejado con TCR/BCR-seq (secuenciación del receptor de células T/B) delimita jerarquías funcionales de linfocitos, como por ejemplo CD8<sup>+</sup> progenitor-exhausted (TCF7<sup>+</sup>) y CD8<sup>+</sup> TRM (*tissue-resident memory*) y su relación con beneficio a ICI (*immune checkpoint inhibitors*). Además, cuantifica clonotipos y su dinámica bajo presión terapéutica, integrando tres ejes (abundancia, estado y clonalidad) que explican respuesta o fracaso clínico<sup>20-22</sup>.

**Capa espacial:** la capa espacial añade el dónde, esto es, localiza nichos (borde invasivo, vasos, estructuras linfoides terciarias) y expone interacciones ligando-receptor que operan *in situ*. En cáncer colorrectal, la transcriptómica espacial de alta definición situó macrófagos SPP1<sup>+</sup> y SELENOP<sup>+</sup> en el perímetro tumoral, cuantificó sus interacciones (SPP1-CD44) con tumor y linfocitos T, y mostró clonotipos CD8 expandidos en focos CXCL9/10/11 cercanos a tumor y zonas linfoides, convalidado por hibridación *in situ* de alto plexo<sup>23</sup>.

**Multimodalidad e integración:** la multimodalidad resuelve las ambigüedades biológicas del bulk. Los enfoques multiome (RNA+ATAC por célula; ATAC = *Assay for Transposase-Accessible Chromatin*) conectan programas de expresión con su regulación cromatínica, CITE-seq (*Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by sequencing*) agrega proteómica de superficie para anclar fenotipos inmunes, y los benchmarks recientes de integración multiómica (40 algoritmos, 65 tareas) orientan qué métodos son más robustos y escalables para RNA+ATAC o RNA+ADT (proteína), estandarizando rutas analíticas que facilitan convertir estas señales en biomarcadores clínicos<sup>24-25</sup>. El acceso longitudinal a sangre periférica y médula ósea permite

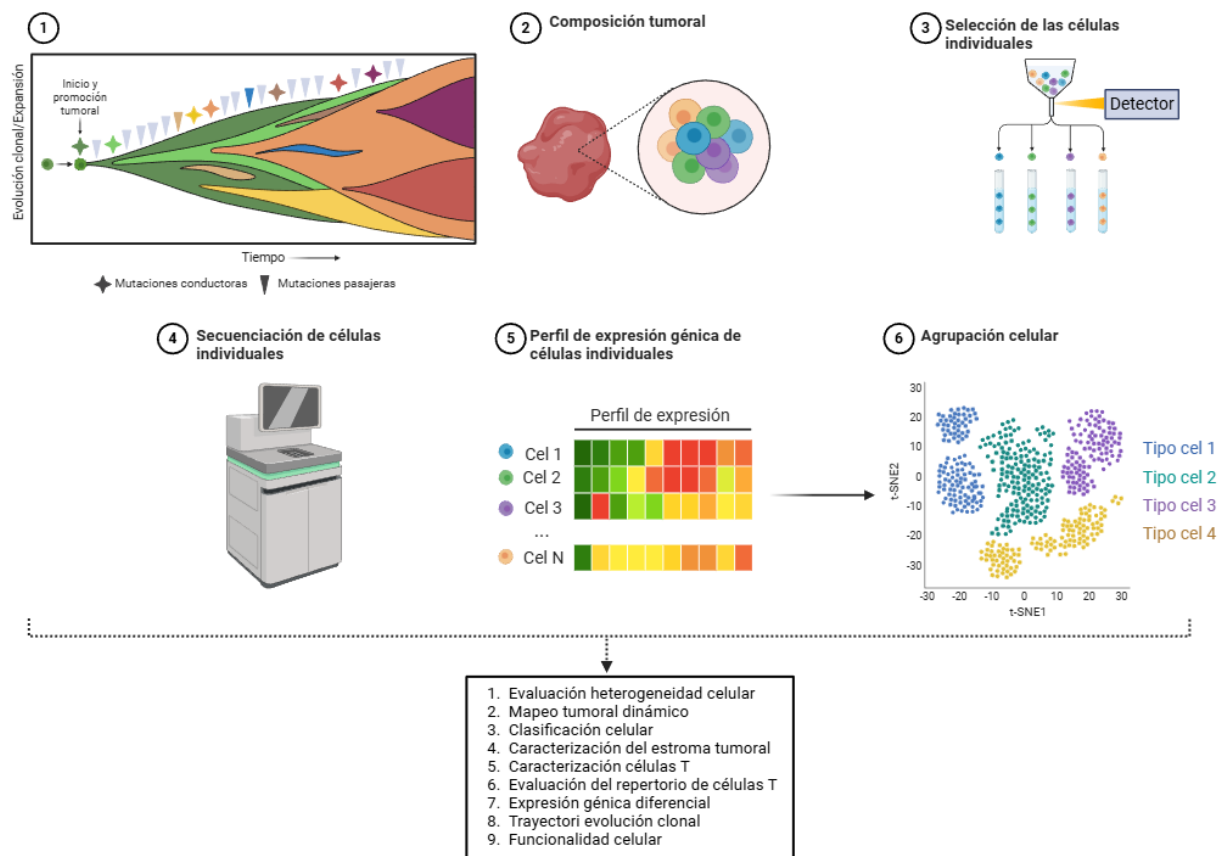


aplicar análisis unicelulares para perfilar progenitores, trayectorias y subclonalidad con una resolución no alcanzable por el enfoque bulk, y anclar estos hallazgos a sustitutos clínicos

(citometría de flujo, IHQ/ISH)<sup>4,26</sup>. La Figura 1 describe la secuencia para la secuenciación de células únicas y su utilidad clínica.

**Figura 1.**

Ciclo para la secuenciación y utilidad del análisis de célula única.



### Evidencia traslacional: señales con asociación consistente a respuesta o resistencia

**Inmunoterapia (ICI):** diversos estudios unicelulares y atlas en contexto de ICI reportan asociaciones consistentes entre:

- **Respuesta:** mayor proporción de CD8 progenitor-exhausted TCF7+, enriqueci-

miento de NK activadas (FGFBP2+) y aumento de células B/memoria, especialmente en escenarios neoadyuvantes.

- **No respuesta / resistencia:** incremento de Tregs (CCR8+) y de programas mieloides SPP1+ con polaridad angiogénica/inmunosupresora.

- Estas asociaciones emergen al integrar la composición, el estado y la clonalidad (scRNA-seq + TCR-seq)<sup>20-22</sup>.

**Organización espacial del microambiente:** la capa espacial localiza nichos y ejes de interacción asociados a eficacia inmune: en cáncer colorrectal se observa enriquecimiento de macrófagos SPP1+/SELENOP+ en territorio tumoral, interacción SPP1-CD44 con tumor y focos CXCL9/10/11 próximos a clonotipos CD8 expandidos; esta geometría sugiere combinaciones como antiangiogénicos con ICI en escenarios de exclusión T mediada por estroma/vasos<sup>23</sup>.

**Terapias dirigidas y dianas accionables:** integraciones de bulk + unicelular + espacial en NSCLC han permitido priorizar dianas funcionales no evidentes mediante enfoques agregados, con validación experimental y potencial traslacional hacia combinaciones racionales<sup>26</sup>.

**Nivel de evidencia, reproducibilidad y proxies clínicos:** para priorización traslacional se recomiendan señales con: replicación externa, validación cruzada entre modalidades (bulk/unicelular/espacial), robustez computacional en integraciones multimodales y posibilidad de proxies clínicos (IHC/ISH/citometría) para adopción hospitalaria<sup>4,24,26</sup>. El control de artefactos de disociación y otros sesgos técnicos es requisito para la interpretación comparativa entre centros<sup>25</sup>.

### Implementación en práctica clínica

**Preanalítica para elegir bien la muestra y llegar a tiempo:** el mayor cuello de botella es logístico, esto se debe a que obtener tejido viable en momentos clínicamente oportunos (metástasis o durante tratamiento) añade variabilidad. Cuando la célula íntegra es inviable, el snRNA-seq en tejido congelado o FFPE amplía de forma realista el número de casos anali-

zables. La capa espacial preserva el contexto tisular y ayuda a corregir los sesgos de captura en el scRNA-seq. En conjunto, estas opciones hacen factible el muestreo en la práctica clínica sin sacrificar la interpretabilidad<sup>4,23</sup>.

### Buenas prácticas de obtención y preservación:

- Para snRNA-seq: congelación inmediata en OCT y almacenamiento a -80 °C, disociación en frío previa a la carga.
- Para scRNA-seq en fresco: transporte inmediato en un medio adecuado y procesamiento sin demoras.

Estas medidas sostienen la viabilidad y la calidad del RNA y son transferibles a la rutina hospitalaria con apoyo de patología<sup>24</sup>.

### Control de calidad con criterios explícitos: propuesta en cuatro puntos:

- Filtros por célula (genes/UMIs y % de mitocondrial) para excluir la baja complejidad.
- Detección de dobletes antes de cualquier inferencia.
- Corrección de RNA ambiente (SoupX).
- Vigilancia de estrés por disociación y genes problemáticos (ribosomales, IG, HLA). Compendios clínicos muestran flujos reproducibles con pseudobulk para armonizar lotes. SoupX documenta la ubicuidad de la contaminación y su corrección por célula<sup>15-20</sup>.

Integración de lotes y multimodalidad: documentar el lote y elegir integradores validados es clave. Recursos curados en ICI emplean hSEGs y pseudobulk y publican scripts/objetos para auditoría. En multiómica (RNA/ATAC/ADT/espacial), benchmarks 2025 comparan decenas

de métodos en exactitud, robustez y escalabilidad, y estandarizan pasos como el Gene Activity Matrix para ATAC<sup>24</sup>.

**Cuándo añadir capa espacial:** se debe añadir capa espacial, especialmente cuando la decisión depende del entorno (proximidad inmune al tumor, barreras de estroma/vasos, estructuras linfoides). La lectura in situ permite distinguir nichos pro y antitumor, asignar interacciones ligando–receptor a regiones concretas y explicar discordancias entre abundancia inmune y eficacia clínica<sup>23</sup>.

Pipeline versionado y reporte auditable: para cumplir un estándar clínico, el pipeline debe: a) fijar versiones y parámetros, b) conservar objetos procesados (matrices corregidas, embeddings, anotaciones) y c) emitir un reporte mínimo con metadatos de procedencia (muestra→biblioteca→corrida→análisis). Las guías minSCe definen metadatos mínimos y los compendios clínicos que publican código y data records facilitan la trazabilidad<sup>20,27</sup>.

**Del informe al comité molecular:** se recomienda la realización de un informe clínico que contenga:

- **Hallazgos accionables** (subtipo por estados, firmas validadas, interacciones relevantes, programas de resistencia/estrés y niveles de evidencia).
- **Anexo técnico** (pre-analítica, QC, integración, control de versión, limitaciones). Con SOPs claros, uso de snRNA-seq en tejidos difíciles y pipelines estabilizados, un TAT ≈14 días desde la biopsia es alcanzable. La coordinación entre patología (triage/preservación), biología molecular (bibliotecas), bioinformática (QC→integración→reporte) y comité molecular (decisión) es esencial<sup>4,20</sup>.

## Calidad y reproducibilidad

Esta sección define estándares transversales que auditan y documentan cada paso del flujo operativo descrito en la Sección 4. En análisis unicelular, la calidad no es un único filtro, más bien es una cadena de decisiones repetibles (desde la obtención de la muestra hasta el reporte) que determina si los hallazgos son confiables y reutilizables. Las revisiones clínicas y manuales recientes coinciden en dos puntos: a) las principales fuentes de variabilidad provienen del manejo de la muestra y de los efectos de lote (almacenamiento, disociación, preparación de bibliotecas) y b) es indispensable estandarizar un flujo QC → análisis → reporte con criterios explícitos y trazables<sup>4</sup>.

Capas mínimas de control de calidad:

- **Métricas por célula.** Número de genes/UMIs detectados y % mitocondrial para excluir células de baja calidad, son el primer filtro antes de cualquier modelado, y se recomienda ajustar por ciclo celular/UMIs cuando corresponda<sup>4,27,28</sup>.
- **Contaminación por RNA “ambiente”.** Transcritos libres procedentes de células dañadas o gotas vacías sesgan anotaciones y comparaciones; deben corregirse o, al menos, monitorizarse. SoupX estima la fracción de contaminación a partir de gotas vacías y aplica una corrección por célula, mejorando la interpretabilidad, en especial en tejidos complejos o necróticos<sup>15,28</sup>.
- **Genes problemáticos y “estrés” de disociación.** Vigilar/filtrar ribosomales, inmunoglobulinas, HLA y ciertos lncRNA que inducen artefactos de *clustering*; reconocer firmas reproducidas de estrés por disociación (~200 genes) y aplicar criterio para no eliminar biología real<sup>25,28</sup>.



- **Dobletes (*multiplets*).** Detectarlos y excluirllos antes de la inferencia biológica; su presencia altera *clustering* y análisis de expresión diferencial<sup>28</sup>.
- **Heurísticas por tejido.** En tumores sólidos, la señal de hemoglobina en el fondo ayuda a estimar contaminación por eritrocitos<sup>15</sup>.

**Efectos de lote e integración:** la variación atribuible a almacenamiento, disociación y protocolos de biblioteca puede simular diferencias biológicas. Documentar el lote y elegir integradores validados es clave. Los *benchmarks* 2025 en multiómica (RNA/ATAC/ADT y espacial) comparan múltiples métodos en exactitud biológica, remoción de lote, usabilidad y escalabilidad, ofreciendo una guía práctica según modalidad y tamaño de cohorte. Además, estandarizan pasos de preprocesamiento (p. ej., *Gene Activity Matrix* para ATAC con *Signac/Seurat*) y definen límites de escalabilidad que conviene considerar al planificar análisis clínicos<sup>24</sup>.

**Reproducibilidad formal:** metadatos y reporte (minSCe). La reproducibilidad se logra con publicar matrices, y adicionalmente hay que preservar metadatos mínimos (aislamiento, RT, amplificación, biblioteca, corrida), parámetros y versiones de software. Las guías minSCe definen esta lista de verificación para scRNA-seq, de forma análoga a MIAME/MINSEQE en bulk, habilitando comparaciones entre estudios<sup>27</sup>. En práctica clínica esto implica versionar pipelines y parámetros, entregar objetos procesados (conteos corregidos, embeddings, anotaciones) junto al crudo, acompañar con código ejecutable/cuadernos y un reporte mínimo orientado al comité molecular.

**Transparencia y privacidad:** las matrices unicelulares humanas con metadatos clínicos pueden permitir reidentificación mediante ataques de

enlace basados en eQTLs; se ha demostrado que es posible vincular individuos con alta precisión, incluso tras preprocesamientos mínimos. Por ello, la publicación debe balancearse con gobernanza de datos (accesos controlados, seudonimización y consentimiento informado específico para *data sharing*)<sup>27,29</sup>.

## Regulación y privacidad

Marco ético y legal previo al análisis: toda obtención y uso de datos unicelulares deben estar cubiertos por un protocolo aprobado por IRB/CEI con un consentimiento que describa con claridad: naturaleza de los análisis ómicos, posibilidad de uso secundario e intercambio de datos, transferencia internacional si aplica, gestión de incidentalomas y política de recontacto. Para reportes con intención clínica, el flujo debe operar bajo un marco acreditado (CLIA/CAP o equivalente) con SOP y auditorías vigentes<sup>4</sup>. También es recomendable alinear el registro electrónico y la trazabilidad con buenas prácticas compatibles con 21 CFR Part 11 cuando corresponda<sup>4</sup>.

**Reproducibilidad y documentación mínima:** La reproducibilidad clínica exige versionar pipelines, conservar objetos procesados (matrices corregidas, embeddings, anotaciones), registrar parámetros y versiones, y emitir un reporte mínimo orientado al comité molecular. Las guías minSCe definen metadatos y campos obligatorios que facilitan auditoría y comparabilidad entre centros<sup>27</sup>. En el informe, distinguir de forma explícita resultados para decisión clínica de exploraciones de investigación<sup>4,27</sup>.

Gobernanza de datos: propiedad, acceso y ciclo de vida:

- **Propiedad y control:** los datos pertenecen al paciente y/o a la institución; los proveedores actúan como encargados del tratamiento.

- **Acceso controlado:** DUA específicos, comités de acceso, autenticación fuerte, registro de auditoría y cifrado en tránsito y en reposo.
- **Ciclo de vida:** políticas de retención y destrucción certificada para objetos analíticos; claves y copias de seguridad administradas con rotación definida.
- **Interoperabilidad:** formatos abiertos y cláusulas de salida para evitar la dependencia del proveedor; documentación de las transformaciones para la trazabilidad<sup>27</sup>.

Riesgo de reidentificación y mitigación: las matrices unicelulares con metadatos clínicos pueden permitir reidentificación mediante ataques de enlace basados en eQTL/genotipo implícito, inferencia de pertenencia o reconstrucción de rasgos, incluso tras preprocesamientos convencionales. Por ello se requiere:

- **Minimización de datos:** divulgar únicamente lo necesario para la reproducibilidad; separar identificadores y quasi-identificadores.
- **Espacios seguros y análisis federado:** preferir acceso en entorno controlado o *federated analysis* para colaboraciones multicentro.
- **Medidas técnicas:** anonimización robusta o seudonimización con gestión de llaves, enmascaramiento de celdas pequeñas y privacidad diferencial cuando se publiquen agregados.
- **Evaluación del impacto:** realizar un DPIA documentando los riesgos y las mitigaciones antes de compartir o publicar datasets<sup>29</sup>.

## Intercambio de datos y publicación responsable

- **Capas de acceso:** distinguir entre datos abiertos, restringidos y altamente sensibles; preferir accesos controlados para matrices con granularidad celular y metadatos clínicos.
- **Transparencia sin exposición:** publicar el código ejecutable y los objetos procesados con suficiente detalle para replicar los hallazgos sin exponer información que facilite la reidentificación<sup>27-29</sup>.
- **Licenciamiento y condiciones de uso:** definir ámbitos permitidos, prohibiciones de reidentificación y obligaciones de destrucción o devolución al final del proyecto.
- **Transferencia internacional:** verificar base legal (p. ej., HIPAA, GDPR o normativas locales) y mecanismos de transferencia cuando haya colaboración internacional<sup>4,29</sup>.

## Conclusiones y agenda mínima

La adopción clínica del análisis unicelular, idealmente integrado con capa espacial, es viable en escenarios definidos siempre que se apliquen estándares claros de calidad, trazabilidad y gobernanza. Aporta valor cuando la decisión depende de estados celulares y nichos tisulares que el enfoque bulk no distingue, como resistencia o progresión atípica, inmunoterapia con señales ambiguas y CUP. Las síntesis recientes respaldan una implementación selectiva basada en SOP e informes interpretables<sup>4,20</sup>.

## Criterios de indicación clínica

Solicitar análisis unicelular, preferentemente con lectura espacial, cuando la decisión terapéutica dependa de resolver tres dimensiones que el enfoque bulk no separa: composición celular, estado funcional y localización tisular. Aplicaciones típicas incluyen la exclusión T mediada por nichos mieloestromales que orienta a combinar anti-VEGF + ICI en cáncer de colon, ajuste de la intensidad de ICI según abundancia de CD8 TRM y precursores TCF7+ y, en hematología, detección de plasticidad clonal y programas de estrés que reordenan la secuencia terapéutica<sup>4,19,23,26</sup>.

## Condiciones de posibilidad

- **Calidad y trazabilidad.** QC por capas (dobletes, RNA ambiente, estrés de disociación, lote), versionado de pipelines y reporte mínimo; minSCE define metadatos esenciales y los recursos clínicos publican objetos y código para auditoría<sup>20,27</sup>.
- **Integración informada.** Selección de integradores multimodales guiada por *benchmarks* 2025 (RNA/ATAC/ADT/espacial) atendiendo a exactitud, robustez y escalabilidad computacional<sup>24</sup>.
- **Gobernanza y privacidad.** Datos bajo controles de acceso y acuerdos de uso de datos, con consentimientos que anticipen reidentificación por ataques de enlace basados en eQTL<sup>29</sup>.

## Agenda mínima

- **Pilotos por escenario.** Resistencias a ICI, CUP, progresión atípica y casos seleccionados en hematología, con *endpoints* clínicos explícitos (decisiones modificadas, tiempo a tratamiento, desenlaces tempranos). Emplear snRNA-seq en FFPE para ampliar elegibilidad sin comprometer TAT<sup>4</sup>.
- **Reporte estándar y checklist.** Informe de hallazgos accionables y nivel de evidencia; anexo técnico con QC, lotes y parámetros, SOPs preanalíticos por órgano y reutilización de *pseudobulk* y hSEGs con publicación de *scripts* y objetos; alinear con recomendaciones para comités moleculares<sup>18,20</sup>.
- **Priorizar firmas robustas.** Programas y estados validados de forma cruzada entre modalidades (bulk, unicelular, espacial) y medibles por técnicas dirigidas (IHC, ISH, paneles espaciales) como paso previo a validaciones prospectivas<sup>23-26</sup>.
- **Capacidad computacional.** Planificar recursos según límites de escalabilidad documentados en *benchmarks* (memoria, tiempo, GPU) para no comprometer plazos clínicos<sup>24</sup>. La Tabla 1 resume la utilidad y el proceso de implementación del análisis de célula única en cáncer.

**Tabla 1.**

Implementación clínica del análisis unicelular/espacial (ruta resumida)

| Tabla 1. Implementación clínica de análisis unicelular/espacial (ruta resumida)                                                                                                                                                                                                          |                                       |                                                                                                                                                                      |                                                                                                                               |                             |                                                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------------------|
| Etapas                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Objetivo                              | Criterios / acciones clave                                                                                                                                           | Métricas / umbrales mínimos                                                                                                   | Responsable                 | Entregable / TAT objetivo                        |
| 1. Selección de muestra y triaje                                                                                                                                                                                                                                                         | Garantizar material útil y oportuno   | Indicación clínica definida; triaje por viabilidad, celularidad, necrosis y fracción tumoral; decidir fresco vs snRNA-seq en congelado/FFPE; registrar pre-analítica | Tiempo de isquemia registrado; fracción tumoral $\geq$ criterio local; marcar espacial si la localización condiciona decisión | Patología + Equipo tratante | Orden y plan de muestreo (Día 0)                 |
| 2. Preservación y transporte                                                                                                                                                                                                                                                             | Conservar integridad                  | Fresco en medio adecuado y traslado inmediato; para núcleos, congelación en OCT a $-80^{\circ}\text{C}$                                                              | Tiempo a laboratorio dentro de SOP; cadena de frío documentada                                                                | Patología                   | Recepción y checklist pre-analítico (Día 0)      |
| 3. Biblioteca (wet-lab)                                                                                                                                                                                                                                                                  | Preparar librerías de calidad         | Kits validados; controles internos; lotes documentados                                                                                                               | Tasa de librerías repetidas $< 5-10\%$                                                                                        | Biología molecular          | Librerías listas (Días 1-3)                      |
| 4. Secuenciación                                                                                                                                                                                                                                                                         | Profundidad adecuada al objetivo      | Multiplexación razonada; reads/célula según composición vs estado                                                                                                    | Q30 $\geq$ criterio local; reads/célula y n° células/caso según SOP                                                           | Plataforma genómica         | FASTQ/CRAM (Días 3-6)                            |
| 5. QC por capas                                                                                                                                                                                                                                                                          | Asegurar interpretabilidad            | Filtros por célula (genes/UMIs, % mitocondrial); dobletes; RNA ambiente; estrés de disociación; genes problemáticos; lote                                            | Genes/UMIs $\geq$ umbral por tejido; % mito $< 10-20\%$ ; dobletes $< 5-10\%$ ; contaminación corregida                       | Bioinformática              | Reporte QC y objeto procesado (Días 5-8)         |
| 6. Integración y anotación                                                                                                                                                                                                                                                               | Evitar confundir técnica con biología | Integración guiada por benchmarks; pseudobulk/hSEGs; versiones fijadas; trazabilidad completa                                                                        | Efecto de lote residual bajo; parámetros y versiones registrados                                                              | Bioinformática              | Objeto final y notebook reproducible (Días 7-10) |
| 7. Capa espacial (si aplica)                                                                                                                                                                                                                                                             | Localizar nichos e interacciones      | Añadir panel espacial cuando el 'dónde' cambie la decisión (exclusión T, barreras vaso-estroma, nichos mieloides)                                                    | Densidad/vecindad cuantificada; control técnico por región                                                                    | Patología + Bioinformática  | Mapa espacial con métricas (Días 9-12)           |
| 8. Informe clínico                                                                                                                                                                                                                                                                       | Traducir a decisión                   | 2 páginas: hallazgos accionables y nivel de evidencia; anexo técnico (QC, lote, parámetros, limitaciones)                                                            | Terminología consistente; proxies IHC/ISH propuestos                                                                          | Bioinfo + Clínica           | Informe para comité (Días 10-13)                 |
| 9. Comité molecular                                                                                                                                                                                                                                                                      | Tomar decisión trazable               | Discusión de opciones, beneficios y límites; registrar decisión y plan                                                                                               | Acta con referencia a señales y evidencia                                                                                     | Comité                      | Decisión/plan terapéutico ( $\leq$ Día 14-21)    |
| <b>Abreviaturas:</b> snRNA-seq = single-nucleus RNA sequencing; FFPE = formalina fijada e incluida en parafina; SOP = standard operating procedure; UMI = unique molecular identifier; QC = quality control; IHC = inmunohistoquímica; ISH = hibridación in situ; TAT = turnaround time. |                                       |                                                                                                                                                                      |                                                                                                                               |                             |                                                  |

**Financiamiento**

Ninguno.

**Conflicto de interés**

Andrés F. Cardona informa haber recibido subvenciones de Merck Sharp & Dohme, Boehringer Ingelheim, Roche, Bristol-Myers Squibb, Pfizer, Astra Zeneca, Celldex y de la Fundación para la Investigación Clínica y Molecular Aplicada del Cáncer (FICMAC). También informa haber recibido honorarios personales de Merck Sharp & Dohme, Boehringer Ingelheim, Roche, Bristol-Myers Squibb, Pfizer, Novartis, Celldex Therapeutics, Foundation Medicine, Eli Lilly, AstraZeneca y de la Fundación para la Investigación Clínica y Aplicada del Cáncer – FICMAC, fuera del presente trabajo.

**Contribución de autoría**

Los autores declaran la originalidad del manuscrito y su contribución equitativa en el diseño, la ejecución y la revisión del texto final.



## Referencias

1. Hinohara K, Polyak K. Intratumoral Heterogeneity: More Than Just Mutations. *Trends Cell Biol.* [Internet] 2019;29:569–79. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.03.003>
2. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature.* [Internet] 2012;481:306–13. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nature10762>
3. Merlo LMF, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer.* [Internet] 2006;6:924–35. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nrc2013>
4. Boxer E, Feigin N, Tschernichovsky R, Darnell NG, Greenwald AR, Hoefflin R, et al. Emerging clinical applications of single-cell RNA sequencing in oncology. *Nat Rev Clin Oncol.* [Internet] 2025;22:315–26. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41571-025-01003-3>
5. Tian J, Bai X, Quek C. Single-Cell Informatics for Tumor Microenvironment and Immunotherapy. *Int J Mol Sci.* [Internet] 2024;25:4485. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms25084485>
6. Skinnider MA, Courtine G, Bloch J, Squair JW. A clinical road map for single-cell omics. *Cell.* [Internet] 2025;188:3633–47. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2025.06.009>
7. Xu L, Saunders K, Huang S-P, Knutsdottir H, Martinez-Algarin K, Terrazas I, et al. A comprehensive single-cell breast tumor atlas defines epithelial and immune heterogeneity and interactions predicting anti-PD-1 therapy response. *Cell Rep Med.* [Internet] 2024;5:101511. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2024.101511>
8. Chu Y, Dai E, Li Y, Han G, Pei G, Ingram DR, et al. Pan-cancer T cell atlas links a cellular stress response state to immunotherapy resistance. *Nat Med.* [Internet] 2023;29:1550–62. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02371-y>
9. Aissa AF, Islam ABMMK, Ariss MM, Go CC, Rader AE, Conrardy RD, et al. Single-cell transcriptional changes associated with drug tolerance and response to combination therapies in cancer. *Nat Commun.* [Internet] 2021;12:1628. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21884-z>
10. Griffiths JI, Cosgrove PA, Medina EF, Nath A, Chen J, Adler FR, et al. Cellular interactions within the immune microenvironment underpins resistance to cell cycle inhibition in breast cancers. *Nat Commun.* [Internet] 2025;16:2132. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41467-025-56279-x>
11. Madissoon E, Wilbrey-Clark A, Miragaia RJ, Saeb-Parsy K, Mahbubani KT, Georgakopoulos N, et al. scRNA-seq assessment of the human lung, spleen, and esophagus tissue stability after cold preservation. *Genome Biol.* [Internet] 2019;21:1. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1906-x>
12. Denisenko E, Guo BB, Jones M, Hou R, de Kock L, Lassmann T, et al. Systematic assessment of tissue dissociation and storage biases in single-cell and single-nucleus RNA-seq workflows. *Genome Biol.* [Internet] 2020;21:130. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02048-6>
13. Wang T, Roach MJ, Harvey K, Morlanes JE, Kiedik B, Al-Eryani G, et al. snPATHO-seq,



- a versatile FFPE single-nucleus RNA sequencing method to unlock pathology archives. *Commun Biol.* [Internet] 2024;7:1340. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s42003-024-07043-2>
14. Fleming SJ, Chaffin MD, Arduini A, Akkad A-D, Banks E, Marioni JC, et al. Unsupervised removal of systematic background noise from droplet-based single-cell experiments using CellBender. *Nat Methods.* [Internet] 2023;20:1323–35. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41592-023-01943-7>
  15. Luecken MD, Büttner M, Chaichoompu K, Danese A, Interlandi M, Mueller MF, et al. Benchmarking atlas-level data integration in single-cell genomics. *Nat Methods.* [Internet] 2022;19:41–50. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01336-8>
  16. Young MD, Behjati S. SoupX removes ambient RNA contamination from droplet-based single-cell RNA sequencing data. *GigaScience.* [Internet] 2020;9:giaa151. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/giga-science/giaa151>
  17. Horak P, Griffith M, Danos AM, Pitel BA, Madhavan S, Liu X, et al. Standards for the classification of pathogenicity of somatic variants in cancer (oncogenicity): Joint recommendations of Clinical Genome Resource (ClinGen), Cancer Genomics Consortium (CGC), and Variant Interpretation for Cancer Consortium (VICC). *Genet Med.* [Internet] 2022;24(5):986–98. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jgim.2022.01.001>
  18. Westphalen CB, Boscolo Bielo L, Aftimos P, Beltran H, Benary M, Chakravarty D, et al. ESMO Precision Oncology Working Group recommendations on the structure and quality indicators for molecular tumour boards in clinical practice. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* [Internet] 2025;36:614–25. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2025.02.009>
  19. Klughammer J, Abravanel DL, Segerstolpe Å, Blosser TR, Goltsev Y, Cui Y, et al. A multi-modal single-cell and spatial expression map of metastatic breast cancer biopsies across clinicopathological features. *Nat Med.* [Internet] 2024;30:3236–49. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41591-024-03215-z>
  20. Gondal MN, Cieslik M, Chinnaiyan AM. Integrated cancer cell-specific single-cell RNA-seq datasets of immune checkpoint blockade-treated patients. *Sci Data.* [Internet] 2025;12:139. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41597-025-04381-6>
  21. Li W, Pan L, Hong W, Ginhoux F, Zhang X, Xiao C, et al. A single-cell pan-cancer analysis to show the variability of tumor-infiltrating myeloid cells in immune checkpoint blockade. *Nat Commun.* [Internet] 2024;15:6142. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-50478-8>
  22. Sun X, Axelrod ML, Waks AG, Fu J, DiLullo M, Van Allen EM, et al. Dynamic single-cell systemic immune responses in immunotherapy-treated early-stage HR+ breast cancer patients. *NPJ Breast Cancer.* [Internet] 2025;11:65. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41523-025-00776-1>
  23. Oliveira MF de, Romero JP, Chung M, Williams SR, Gottscho AD, Gupta A, et al. High-definition spatial transcriptomic profiling of immune cell populations in colorectal cancer. *Nat Genet.* [Internet] 2025;57:1512–23. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41588-025-02193-3>

24. Fu S, Wang S, Si D, Li G, Gao Y, Liu Q. Benchmarking single-cell multi-modal data integrations [Internet]. *bioRxiv*; [Internet] 2025; p. 2025.04.01.646578. Disponible en: <https://doi.org/10.1101/2025.04.01.646578>
25. van den Brink SC, Sage F, Vértessy Á, Spanjaard B, Peterson-Maduro J, Baron CS, et al. Single-cell sequencing reveals dissociation-induced gene expression in tissue subpopulations. *Nat Methods*. [Internet] 2017;14:935–6. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nmeth.4437>
26. Cao K, Wei S, Ma T, Yang X, Wang Y, He X, et al. Integrating bulk, single-cell, and spatial transcriptomics to identify and functionally validate novel targets to enhance immunotherapy in NSCLC. *NPJ Precis Oncol*. [Internet] 2025;9:112. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41698-025-00893-x>
27. Füllgrabe A, George N, Green M, Nejad P, Aronow B, Fexova SK, et al. Guidelines for reporting single-cell RNA-seq experiments. *Nat Biotechnol*. [Internet] 2020;38:1384–6. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41587-020-00744-z>
28. Kim GD, Lim C, Park J. A practical handbook on single-cell RNA sequencing data quality control and downstream analysis. *Mol Cells*. [Internet] 2024;47:100103. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.mocell.2024.100103>
29. Walker CR, Li X, Chakravarthy M, Lounsbery-Scaife W, Choi YA, Singh R, et al. Private information leakage from single-cell count matrices. *Cell*. [Internet] 2024;187:6537–6549.e10. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.09.012>