

Trabajo Fin de Máster

Título del trabajo:

Vesículas extracelulares de parénquima pulmonar:
Nuevas perspectivas en el cáncer de pulmón.

English title:

*Extracellular Vesicles from Lung Parenchyma:
New Insights in Lung Cancer.*

Autor:

Jorge Rodríguez-Sanz

Directores:

David Sanz-Rubio
José María Marín Trigo

Máster de Iniciación a la Investigación en Medicina
FACULTAD DE MEDICINA
Curso 2020/2021

Índice

1. RESUMEN/ ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 Epidemiología	3
2.2 Factores de riesgo	3
2.3 Presentación clínica	5
2.4 Diagnóstico	6
2.5 Tratamiento.....	7
2.6 Seguimiento.....	8
2.7 Nuevas perspectivas y líneas de avance	9
2.8 Objetivos e Hipótesis.....	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
3.1 Población a estudio	13
3.2 Procesamiento primario de muestras	14
3.2.1 Tejido pulmonar	14
3.2.2 Sangre periférica	14
3.3 Aislamiento de exosomas.....	15
3.3.1 Parénquima pulmonar.....	15
3.3.2 Plasma periférico	16
3.4 Caracterización de exosomas.....	17
3.4.1 Caracterización proteica: ELISA.....	17
3.4.2 Caracterización morfológica: Microscopía electrónica de transmisión.....	18
3.4.3 Cuantificación de exosomas: NTA	19
3.5 Análisis de secuenciación del RNA	19
3.6 Análisis estadístico.....	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1 Características de la muestra del estudio ExVeLP	21
4.2 Subpoblación de estudio RNA-Seq.....	23
4.3 Caracterización de exosomas de parénquima pulmonar	24
4.3.1 Caracterización Proteica.....	24
4.3.2 Caracterización Morfológica	24
4.3.3 Cuantificación de exosomas	24
4.4 Análisis de RNA-Seq	25
4.4.1 Diferencias en la composición de RNA exosomal	26
4.4.2 Evaluación de la presencia de miRNAs y tRNAs en plasma y parénquima pulmonar	29
4.4.3 Cambios cuantitativos en el RNA exosomal de pacientes con cáncer	31
5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	34
6. CONCLUSIONES	36
7. ANEXO	37
8. BIBLIOGRAFÍA	38

ABREVIATURAS

BMI – *Body Mass Index* – Índice de Masa Corporal

CTCs – *Circulating Tumor Cells* – Células Tumores Circulantes

ctDNA – *Circulating tumor Desoxirribonucleic Acid* – Ácido desoxirribonucleico circulante

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA – *Desoxirribonucleic acid* – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido Etilendiaminotetraacético

EPOC - Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

ESCRT – *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*

EVs – *Extracellular Vesicles* – Vesículas extracelulares

FDR – *False Discovery Rate* – Tasa de descubrimiento falso

FEV1 – *Forced Expiratory Volume in one second* – Volumen espiratorio forzado en un segundo

FVC – *Forced Vital Capacity* – Capacidad Vital Forzada

HPV – *Human Papillomavirus* – Virus del Papiloma Humano

IPA – Índice Paquetes-Año

LID – Lóbulo Inferior Derecho

LII – Lóbulo Inferior Izquierdo

LM – Lóbulo Medio

LncRNA – *Long non-coding RNA* – RNA de cadena larga no codificante

LSD – Lóbulo Superior Derecho

LSI - Lóbulo Superior Izquierdo

miRNA – *Micro Ribonucleic Acid* – micro ácido ribonucleico

mRNA – Ácido ribonucleico mensajero

MVB – *Multi-Vesicular Body* – Cuerpo Multivesicular

Nm – Nanómetros

PBS – *Phosphate Buffered Saline* – Tampón fosfato salino

PCR – *Polymerase Chain Reaction* - Reacción en cadena de la polimerasa

RNA – *Ribonucleic acid* – ácido ribonucleico

Rpm – Revoluciones por minuto

SIADH – Síndrome de Secreción Inadecuada de la hormona antidiurética

TAC – Tomografía Axial Computarizada

TEP – *Tumor-Educated Platelet*

tRNA – Ácido ribonucleico de transferencia

VATS – *Video-Assisted Thoracic Surgery*

WHO – World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)

1. RESUMEN/ *ABSTRACT*

El cáncer de pulmón es la primera causa de muerte por cáncer en el mundo. La presentación clínica paucisintomática y la ausencia de métodos adecuados de screening favorecen un diagnóstico tardío y son la causa de los malos resultados y mal pronóstico. Todas estas razones hacen necesaria la búsqueda de un nuevo biomarcador que permita un diagnóstico precoz y un abordaje temprano. Los exosomas son vesículas celulares de entre 40 y 150 nm, pudiendo contener RNA, proteínas y lípidos y participan en la comunicación intercelular y están involucrados en numerosas vías metabólicas fisiológicas y patológicas. Se ha demostrado su papel en el crecimiento tumoral, en la angiogénesis, en la formación de metástasis y en otras muchas vías, por lo que su conocerlos en profundidad es vital. Su papel en el cáncer de pulmón es desconocido. En el trabajo que se presenta se expone el análisis de una cohorte de pacientes intervenidos quirúrgicamente de lesiones sospechosas de cáncer de pulmón. Se seleccionaron 10 pacientes, 6 con cáncer y 4 con lesiones no cancerosas y se analizaron sus exosomas tanto en tejido pulmonar en fresco alejado de la zona tumoral como de plasma sanguíneo. Es la primera vez que se realiza un análisis de este tipo en tejido pulmonar. El análisis que se realizó fue cuantitativo y del contenido dichas vesículas. Se demostró una mayor presencia de exosomas en paciente con cáncer y se encontró contenido genético diferencial entre paciente afecto y paciente control, lo que subraya la importancia del trabajo y la necesidad de ampliar los estudios en esta dirección.

Palabras clave: cáncer de pulmón, exosomas, biomarcador, RNA, parénquima pulmonar.

Lung cancer is the main cause of cancer-related death. The mild clinical presentation and the lack of adequate screening methods favor the late diagnosis and lead to poor results and premature death. All these factors make necessary the search of a novel biomarker that allows clinicians to assess patients promptly. Exosomes are cellular vesicles measuring between 40 and 100 nm, they could contain RNA, protein and lipids and they participate in intercellular communication. Exosomes are linked to tumor growth, angiogenesis, metastasis and many other scenarios, which makes their knowledge profoundly crucial. Their role in lung cancer remains unknown. We present the analysis of a cohort of patients who underwent surgery to remove nodules suggestive of malignancy. We took 10 patients, 6 of them with cancer and 4 of them with non-cancer findings and we analyzed their exosomes in fresh lung parenchyma and in blood plasma. It's the first time that lung parenchyma is analyzed in this manner. We analyzed the vesicles quantitatively and then we assessed its contents. We demonstrated a higher presence of exosomes in cancer patients and a differential genetic content, which highlights the importance of our work and the necessity of further investigations.

Keywords: lung cancer, exosomes, biomarker, RNA, lung parenchyma.

2. INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es hoy en día la causa más frecuente de muerte por cáncer. Los esfuerzos en investigación han arrojado luz recientemente sobre la genética de la enfermedad y han clarificado el papel del sistema inmune, ofreciendo nuevas terapias que alargan la vida de los pacientes. Sin embargo, es común que la enfermedad avance a pesar de las intervenciones por lo que la mortalidad y la pérdida de años de vida siguen siendo muy elevadas (1,2).

2.1 Epidemiología

Según GLOBOCAN (*Global Cancer Statistics 2020*), en 2020 en el mundo se diagnosticaron 19.3 millones de casos de cáncer, siendo el cáncer de pulmón el segundo en frecuencia de diagnóstico con 2.2 millones de personas afectadas (11.4% de los casos), y el primero en causa de muerte (un 18%, 1.8 millones de personas) (3).

En hombres es la principal causa de morbilidad y mortalidad. En mujeres, supone la tercera causa en incidencia, tras el cáncer de mama y el cáncer colorrectal y la segunda causa de mortalidad, tras el cáncer de mama (3).

En España, la mortalidad por cáncer de pulmón supone el 19.5 % de la mortalidad por cáncer en total. En hombres es la causa principal, pero en mujeres es la segunda, superado por el cáncer de mama. En 2017 la mortalidad en mujeres aumentó un 2.2%, mientras que en hombres descendió un 0.4%, fiel reflejo del hábito tabáquico en España. El pico de tabaquismo en hombres se alcanzó en los nacidos entre 1950 y 1959, mientras que en mujeres es poco frecuente hasta llegar a 1960 (4,5).

2.2 Factores de riesgo

El desarrollo de un carcinoma pulmonar exige de la exposición a un factor de riesgo y de la presencia de susceptibilidad genética al mismo. Existe una clara agregación familiar (6) en la presentación de los casos, pero hoy en día los mecanismos detrás de la patogenia son desconocidos.

El factor de riesgo más importante es el humo del tabaco. Estudios epidemiológicos de principios del siglo XX mostraron una relación clara entre el aumento de la prevalencia del hábito tabáquico y la aparición de carcinoma broncogénico años después, pudiendo aparecer incluso 10 años tras el abandono del hábito (7).

Según la Encuesta Nacional de Salud más reciente (2017), en España el 22.1% de la población era fumadora, el 2.3% fumaba de forma esporádica, el 24.9% eran exfumadores y el 50.7% nunca había fumado. En cuanto a la diferencia entre sexos, el hábito estaba más extendido entre hombres, 25,6% de hombres respecto a 18.8% de mujeres. Sin embargo, la caída en la proporción de hombres fumadores entre 1993 y 2017 cayó 18 puntos, mientras que el porcentaje de mujeres sólo descendió un 2% (8).

Se atribuye el potencial carcinogénico del tabaco a los hidrocarburos aromáticos policíclicos y a las nitrosaminas presentes en el humo. A pesar de aumentar el riesgo entre 10 y 30 veces, y que el 80% de los casos ocurran en fumadores, tan sólo el 20% de los fumadores sufren esta enfermedad (7,9), por lo que, como se ha mencionado, existen condicionantes individuales y factores de riesgo no conocidos por el momento que favorecen la transformación maligna.

Otros factores de riesgo ambientales incluyen la exposición a combustión de biomasa, la polución ambiental, la exposición a uranio, radio, radón, cromo, arsénico, níquel y la exposición ocupacional a asbesto (6). Existe asimismo un componente genético en la patogenia del cáncer, tanto a la hora de desarrollarlo como en cuanto a la capacidad de respuesta terapéutica (7). Se han descrito multitud de genes implicados en la patogenia de la enfermedad, que implicarían un aumento del riesgo, que sin duda se potencia por la exposición al tabaco.

Dentro de la patología crónica pulmonar, el riesgo de padecer cáncer de pulmón es 6 veces mayor en paciente EPOC y 2 veces mayor en paciente con deficiencia de alfa1-antitripsina (7). También se relaciona al cáncer de pulmón con infecciones, entre los agentes causales, y objeto actual de debate, se encuentran el HPV en cáncer escamoso, el citomegalovirus, el virus de la Hepatitis B y el virus de Epstein-Barr, éste último

responsable del linfoma de Burkitt, del carcinoma nasofaríngeo y de un tumor pulmonar raro, del carcinoma *linfoepitelioma-like* (7).

2.3 Presentación clínica

A nivel clínico, la presentación suele ser inespecífica y a menudo se presenta de forma paucisintomática. La aparición e intensidad de los síntomas se ha relacionado a menudo con la extensión de la enfermedad. Hasta el 25% de los pacientes se encontraban asintomáticos en el momento del diagnóstico (10).

La presencia de tos persistente en un paciente fumador, una pérdida inexplicable de peso y neumonías recurrentes en el mismo lugar anatómico o exacerbaciones frecuentes en paciente EPOC podrían alertarnos sobre una causa neoplásica subyacente (9,10). En torno a un tercio de los pacientes afectados suelen presentar disnea, y otras presentaciones contemplan la presencia de dolor torácico, hemoptisis, tromboembolismo pulmonar, neumotórax y derrame pleural o pericárdico (9).

Existen numerosas estructuras en el tórax sugestivas de ser invadidas y de provocar síntomas secundarios. Los lugares más frecuentes de metástasis local son los ganglios linfáticos, y aunque de por sí su invasión no produce clínica, pueden formar conglomerados que den lugar a síntomas por compresión, como son la obstrucción del flujo aéreo, el síndrome de vena cava superior o la disfagia.

Las metástasis a distancia, por su parte, pueden provocar un abanico muy amplio de síntomas (10), las óseas suelen ser intensamente dolorosas y las del sistema nervioso central son en su mayoría asintomáticas, aunque pueden provocar síndromes neurológicos, especialmente si afectan a trayectos nerviosos periféricos. Por último, el cáncer de pulmón es capaz de provocar síndromes paraneoplásicos como el SIADH, el síndrome de Eaton-Lambert o una hipercalcemia por metástasis óseas, entre otros (9).

2.4 Diagnóstico

Los síntomas poco expresivos dan lugar a una sospecha tardía. En la práctica clínica diaria es habitual la realización de radiografías del tórax ante diversos escenarios. Esta exploración es accesible, da gran cantidad de información y supone una radiación muy baja para el paciente. Sin embargo, *Bradley et al.* realizaron una revisión sistemática sobre la sensibilidad de ésta y se estimó que esta prueba en paciente que ya presentaban síntomas falló en la detección del cáncer hasta en un 20% de los casos (11).

La biopsia de tejido tumoral se considera el *gold standard* para el estudio de las lesiones, pero la pequeña cantidad de tejido que puede obtenerse es, a menudo, insuficiente para los estudios anatomopatológicos y moleculares. Asimismo, el tejido tumoral suele ser heterogéneo y tomar una biopsia puede ser un método incompleto de caracterizar el tejido (2,12). Hay que destacar también que la obtención de tejido para su estudio puede ser doloroso o provocar complicaciones potencialmente graves.

De igual forma, tomar biopsias sucesivas para monitorizar la progresión del tumor o sus cambios tras el tratamiento es inviable a pesar de la información que proporcionaría. Los pacientes con cáncer broncogénico presentan habitualmente limitación respiratoria al esfuerzo, lo que limita la cantidad de tejido que podemos obtener y, además, este tipo de toma de muestras puede ser compleja en tumores muy vascularizados o con zonas de necrosis.

Los tumores de pulmón se clasifican en estadios según la octava edición de la clasificación TNM, aprobada en enero de 2017 (13). La T se refiere al tamaño y a la extensión del tumor primario. La N habla de la extensión de la enfermedad a los ganglios linfáticos o nódulos y la M se refiere a si el cáncer ha metastatizado.

El tratamiento óptimo de los tumores englobados en los estadios I y II es la cirugía si no existen contraindicaciones formales, dado que son potencialmente curables. El estadio III es un grupo heterogéneo que engloba lesiones resecables, potencialmente resecables y localmente avanzadas no operables, que requieren de la evaluación de un comité de

expertos. El estadio IV engloba las lesiones con diseminación metastásica (14), no sugestivos de resección.

La organización mundial de la salud (WHO) propone asimismo una clasificación histológica de las lesiones pulmonares. Se recogen hasta 18 tipos de tumor pulmonar, siendo los más importantes el adenocarcinoma, el carcinoma escamoso, los tumores neuroendocrinos (dentro del que se engloba el carcinoma microcítico), los carcinomas de células grandes, los mesenquimales o las metástasis de otros tumores primarios (15,16).

Es necesario reseñar un tipo histológico concreto, el carcinoma microcítico. Se engloba dentro de los tumores neuroendocrinos y dada su agresividad y capacidad de proliferación, sin tratamiento es mortal en un periodo entre 2 y 4 meses (17). La supervivencia estimada a los 5 años del diagnóstico solo se consigue para entre el 10 y el 20% de los pacientes (17), y presenta una relación etiológica fuerte con el humo del tabaco. La mediana de supervivencia se encuentra entre 15 y 20 meses (17). Debido a su rápida capacidad de diseminación, encontrar esta lesión en estadios resecables es raro y se produce en menos del 5% de los casos (17). Por otro lado, es una neoplasia muy quimiosensible, pero que recidiva rápido.

Se han planteado programas de *screening* que permitan abordar las lesiones en estadios muy precoces y así aumentar la esperanza de vida. No existen estrategias nacionales organizadas en Europa en este sentido, pero sí que se recomienda en pacientes de muy alto riesgo. En Estados Unidos se realizan TACs (Tomografía Axial Computarizada) de baja dosis a pacientes entre 55 y 77 años, con historia de IPA (Índice Paquetes-Año) mayor de 30 paquetes/año y actualmente fumadores o exfumadores desde hace menos de 15 años (18). Europa presenta una prevalencia de fumadores alta, por lo que se cree que su población podría beneficiarse de estos programas (18,19).

2.5 Tratamiento

Casi un tercio de los tumores de pulmón diagnosticados en España son sugestivos de tratamiento quirúrgico. El tratamiento neoadyuvante, unido al abordaje por VATS

(*Video-Assisted Thoracic Surgery*), mucho menos invasivo que la toracotomía abierta, ha ampliado los criterios de operabilidad (4). A pesar de que la resección sea completa, es frecuente la recidiva de la enfermedad, por lo que el seguimiento a posteriori es clave y supone un reto para los clínicos (16).

El tratamiento con quimioterapia y/o radioterapia se rige por dos esquemas principales, diferenciando los tumores en microcíticos y no microcíticos por la extraordinaria agresividad de este tipo histológico.

2.6 Seguimiento

Los nuevos tratamientos han aumentado la esperanza de vida, apareciendo la figura del superviviente a largo plazo (mayor de 5 años desde el diagnóstico). Las guías españolas en cáncer de pulmón no microcítico sometido a tratamiento con intención curativa recomiendan un seguimiento con historia clínica, exploración física y TAC cada 6-12 meses durante los primeros 2 años, y anualmente tras ello, sin establecer un límite a largo plazo en ausencia de recidiva (14).

La realización de exploraciones de estas características, tanto como seguimiento de patología como en caso de realización de *screening*, puede suponer un problema por sí mismo. El intervalo en el que deben realizarse las exploraciones no está claro y expone al paciente a radiación ionizante (18,20).

En la medición estadística de la supervivencia de pacientes con cáncer, tradicionalmente se consideran los 5 años de supervivencia tras el diagnóstico como medida de mortalidad a medio plazo. En ocasiones, esta medida ha sido equiparada a curación. Las características intrínsecas del cáncer de pulmón y la experiencia clínica han demostrado que esta medición es imprecisa, dado que la recidiva puede ser muy posterior, y es necesario un seguimiento exhaustivo (14,17,21).

Hay que tener en cuenta que los tratamientos actuales pueden cronificar la enfermedad durante un periodo de tiempo. *Hubbard et al.* realizó un seguimiento a una gran cohorte de pacientes con cáncer de pulmón hasta 18 años tras el diagnóstico en el que se

constató que la supervivencia específica respecto a la enfermedad disminuye progresivamente con el tiempo. En este estudio, de los pacientes que superaron los 10 años libres de enfermedad, el 40,6% fallecieron de causas relacionadas directamente con el cáncer de pulmón. En cuanto a supervivencia en general, de esta muestra, sólo llegó al final del estudio el 24.3% de los pacientes (21).

Esta circunstancia, la enorme carga de la enfermedad y la pérdida de años de vida que supone hace necesaria la búsqueda de nuevas herramientas que nos permitan un diagnóstico precoz y un seguimiento estrecho que nos facilite anticiparnos a las recidivas.

2.7 Nuevas perspectivas y líneas de avance

Recientemente apareció el concepto de “biopsia líquida” como el estudio de líquidos corporales fácilmente accesibles (sangre, orina, derrames serosos o saliva) para superar las limitaciones de la biopsia tradicional. En las citadas muestras, se pueden estudiar células tumorales circulantes (CTCs), DNA tumoral circulante (ctDNA), plaquetas educadas por el tumor (TEPs) y vesículas extracelulares (EVs), así como RNA celular o micro RNAs (miRNA) (2).

Las vesículas extracelulares (EVs) son estructuras celulares heterogéneas formadas por membrana celular que intervienen en la comunicación de célula a célula. Entre ellas se pueden distinguir los exosomas, las microvesículas y los cuerpos apoptóticos (22). Han sido descritas en la mayoría de los fluidos corporales, encontrándose en mayor abundancia en plasma y suero (23,24).

Los exosomas tienen un diámetro entre 40 y 150 nanómetros y fueron descritos en primer lugar por *Johnstone et al.* (25). En la Figura 1 se presenta esquemáticamente su biogénesis y contenido. Se forman por la invaginación de la membrana celular, y se fusionan con las vesículas intracelulares. Producto de esta fusión, el contenido que presentan puede degradarse o formar un endosoma maduro. Los endosomas resultantes se denominan endosomas maduros o tardíos y si contienen vesículas en su interior se denominan cuerpos multivesiculares (o MVB por sus siglas en inglés) (2).

Los MVB se regulan por el complejo clasificador requerido para el transporte (o ESCRT por sus siglas en inglés) y sus proteínas asociadas. Asimismo, los MVBs pueden, de nuevo, unirse a lisosomas que degradan sus contenidos o fusionarse con la membrana plasmática liberando los exosomas al espacio extracelular (2,26).

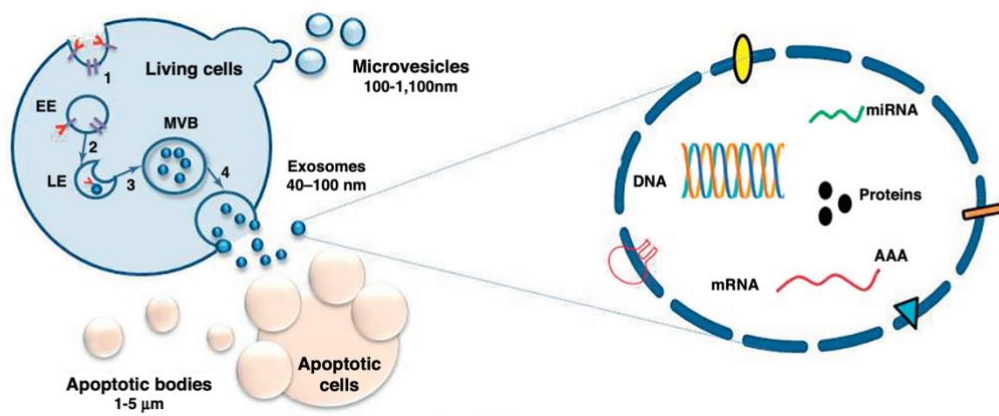


Figura 1. Formación y contenido de los exosomas. Adaptado de Vanni et al. *Exosomes: a new horizon in lung cancer*(27). (EE): early endosome, (LE): late endosome.

Los exosomas, regulados por las proteínas que contienen en su membrana, son capaces de fusionarse de nuevo con la membrana e interactuar con otras células (26). Su contenido final es diverso, y puede incluir ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, aminoácidos y metabolitos (24). Este contenido se encuentra regulado selectivamente por el ESCRT, que se encuentra alterado en las células tumorales y que puede dar lugar a contenidos vesiculares diferentes a los fisiológicos y por tanto alterar las funciones de las vesículas y por ende de las células con las que contactan (2).

La interacción intercelular mediante exosomas puede producirse por fusión, endocitosis, y unión mediada por receptor (26). La función del exosoma, como se ha descrito, depende de su célula de origen y de su contenido. La mayoría de ellos se encargan del mantenimiento de la homeostasis, aunque también se asocian con la respuesta inmune, la patogénesis viral, el embarazo, las enfermedades cardiovasculares, enfermedades del sistema nervioso central y la progresión del cáncer entre otras (22,24).

Más específicamente, y atendiendo al campo que nos ocupa en su papel en el cáncer de pulmón, influyen en el origen neoplásico, en el crecimiento del tumor, en la aparición de metástasis, en la angiogénesis, en la disregulación inmune, en la creación de un microambiente tumoral idóneo, en los síndromes paraneoplásicos y en la resistencia a la terapia (24,26).

Existen estudios como el de *Rabinowits et al.* que demostraron un aumento en los niveles de exosomas en plasma sanguíneo en los pacientes con adenocarcinoma de pulmón respecto al grupo control sano (28). Por otro lado, en otro estudio de *Rodríguez et al.* se demostró que los niveles de exosomas también estaban elevados significativamente en muestras de lavado broncoalveolar de sujetos con cáncer respecto a pacientes sanos (29).

Dentro del rango de contenido de los exosomas, se han estudiado particularmente los miRNAs. Existen estudios que han identificado diversos miRNAs, podemos citar el miR-205-5p y el miR200b, que fueron estadísticamente significativos en una muestra como marcadores diagnósticos para distinguir entre cáncer y neumonía (30)

Además de lo expuesto, los exosomas tienen el potencial terapéutico de servir como vehículo, dado que se pueden diseñar para interaccionar con una diana concreta. Son altamente biocompatibles, estables en la circulación sistémica y su uso puede suponer una disminución de la toxicidad de los tratamientos. Son capaces de transportar RNAs de cadena corta, oligonucleótidos, agentes quimioterápicos y moduladores inmunes (2,24,26).

2.8 Objetivos e Hipótesis

El estudio ExVeLP, sobre cuyos resultados preliminares versa este trabajo, compara muestras procedentes de lobectomías y resecciones atípicas en pacientes con imágenes radiológicas sugestivas de cáncer. Tras el pertinente estudio anatomopatológico, se compararon los exosomas procedentes de 6 pacientes con diagnóstico de carcinoma broncogénico con 4 pacientes con lesiones no cancerosas.

El objetivo principal del trabajo es conocer si existen diferencias significativas en cantidad de exosomas celulares en pacientes con cáncer broncopulmonar y sin él en tejido pulmonar en fresco. Tras ello se compara su presencia en sangre periférica de los mismos pacientes, de forma que podamos conocer si el ambiente celular *in situ* en el tejido tiene una correlación en sangre, mucho más accesible.

Basado en lo anterior, la hipótesis que se plantea es que al igual que en los fluidos, en los que se ha demostrado la presencia de vesículas extracelulares, existen vesículas en los tejidos porque son liberados a los fluidos biológicos por las propias células tisulares. Además, nos planteamos que tanto la cantidad de exosomas como su contenido podría variar entre pacientes con lesión cancerosa respecto a pacientes sanos. Por último, se cree que los resultados de las vesículas procedentes del pulmón se correlacionarán con las aisladas en el plasma.

A largo plazo, este conocimiento puede llevarnos a conocer las diferencias en forma y contenido de los exosomas y de esta forma, poder llevarnos a establecer nuevos biomarcadores precoces obtenidos de forma no invasiva.

Esta investigación tiene un gran potencial como se ha expuesto en las líneas anteriores y puede suponer un cambio muy importante en el control y manejo de la enfermedad que se traduce directamente en un aumento de la esperanza de vida en una enfermedad muy prevalente y con una mortalidad muy elevada.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

En relación con los objetivos expuestos del trabajo que se plantea, la metodología empleada para la elaboración de la cohorte de estudio y los análisis de biología molecular fue la siguiente:

3.1 Población a estudio

Los objetivos incluidos en este trabajo se encuentran englobados en el estudio ExVeLP, (*Extracellular Vesicles from Lung Parenchyma*). Los pacientes reclutados para este estudio fueron incluidos por parte del Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Universitario Miguel Servet, de manera previa a su intervención quirúrgica.

Estos pacientes se encontraban en estudio diagnóstico por imágenes radiológicas obtenidas mediante TAC sugestivas de malignidad y abordables quirúrgicamente con intención curativa. El estudio diagnóstico se realizó de forma conjunta por los Servicios de Neumología y Radiología de los diversos hospitales que forman el Servicio Aragonés de Salud, con la colaboración de los Centros de Salud adscritos. Tras la pertinente evaluación de indicación de cirugía y viabilidad estimada de la misma, todos ellos fueron intervenidos por el Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Universitario Miguel Servet y estudiados histopatológicamente por el Servicio de Anatomía Patológica de dicho hospital.

Los pacientes fueron informados de manera previa a su inclusión en el estudio ExVeLP y proporcionaron su aceptación mediante la firma del consentimiento informado. Los procedimientos incluidos en el estudio están recogidos y aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (CEICA) (C.P.-C.I. PI15/130; 29/04/2020, Acta 10/2020), que se adjunta en el Anexo I. Todos los procedimientos descritos y llevados a cabo tanto en el manejo de los pacientes, así como de sus muestras siguieron los principios éticos de la Declaración de Helsinki, las guías de Buenas Prácticas Clínicas y las guías de Buenas Prácticas de Laboratorio.

Tras la cirugía y resección completa con márgenes, se nos proporcionó una pieza de parénquima pulmonar sano de 2x2 cm² alejada de la zona tumoral, pero habitualmente del mismo lóbulo, para su estudio.

Además, se realizó la extracción de sangre periférica mediante venopunción de los mismos pacientes a estudio, de manera previa a la intervención y anestesia.

No todas las lesiones se trataban de lesiones cancerosas o malignas, lo que nos permitió establecer dos grupos a estudio dentro de nuestra muestra, pacientes con cáncer y pacientes sin cáncer.

3.2 Procesamiento primario de muestras

Una vez obtenido el tejido y la sangre que será objeto de estudio, se siguió el protocolo de procesamiento establecido para su criopreservación y posterior análisis.

3.2.1 Tejido pulmonar

El fragmento de tejido pulmonar recibido del Servicio de Cirugía Torácica fue procesado de manera inmediata tras la cirugía. El proceso se llevó a cabo en campana y en condiciones de esterilidad. Se tomó una imagen macroscópica del fragmento antes de proceder a su división en pequeños trozos que se dividieron en dos tubos de microcentrífuga (o tubos *eppendorf*) de 5 ml. Estos tubos se introdujeron rápidamente en el congelador, a -80°C, para su preservación hasta el momento de análisis.

3.2.2 Sangre periférica

Al igual que en el caso de la muestra de parénquima pulmonar, la muestra de sangre periférica se procesó de manera inmediata tras la cirugía. La muestra había sido obtenida en un tubo de vacío (sistema Vacutainer®) con EDTA. Para la separación de las diferentes fracciones sanguíneas se centrifugó la muestra durante 15 minutos y 3000 rpm (revoluciones por minuto). De esta manera, transcurrida esta centrifugación, se alícuotó en primer lugar la muestra de plasma, posteriormente el anillo de células blancas y finalmente se recogieron los eritrocitos. Todas las alícuotas fueron congeladas a -80 °C a la espera de su análisis.

3.3 Aislamiento de exosomas

El aislamiento de vesículas extracelulares, específicamente exosomas, se llevó a cabo utilizando una metodología similar, la precipitación mediante polímero artificial, para ambos orígenes de muestra. A continuación, se detalla el procedimiento empleado para cada tipo de muestra.

3.3.1 Parénquima pulmonar

Este origen presenta una particularidad respecto al tipo de muestra descrito en la bibliografía y en los kits de aislamiento preestablecidos, por lo que, en primer lugar, fue necesario la adecuación de la muestra a un estado de suspensión mediante una digestión enzimática y posteriormente, fueron necesarias ciertas adaptaciones del protocolo recomendado por la casa comercial para la aplicación del kit comercial de precipitación.

En primer lugar, el tejido se descongeló y se pesó con el objetivo de preparar las enzimas que constituyen el medio de digestión. El medio de digestión constó de medio de DMEM junto con colagenasa, DNasa y dispasa. Como se muestra en la Figura 2, el tejido descongelado se colocó en una placa y se cortó con una tijera sumergido en el medio, con el objetivo de exponer la máxima superficie a la solución.

Tras ello se incubó a 37°C durante dos horas en agitación. Una vez terminado este proceso, se neutralizó la reacción con medio de DMEM suplementado al 1% con b27 y se dividió el líquido resultante en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml. El suplemento b27 es una mezcla de Vitamina E, acetato de vitamina E, superóxido dismutasa, catalasa, glutatión, y vitamina A.

Tras el proceso de homogeneización, se procedió al aislamiento de exosomas. En primer lugar, se realizaron dos centrifugaciones. La primera a 6000 rpm (2000 g) durante 20 minutos a 20°C, la segunda a 12000 rpm (10000 g) durante otros 20 minutos a 20°C. y se descartaron en ambas ocasiones el sedimento o *pellet*, para quedarnos con el sobrenadante. En este momento, se añadió el factor precipitante *ExoQuick-TC* y se incubaron las muestras durante toda la noche a 4°C.

Terminada la incubación, se realizó una centrifugación a 12000 rpm (10000 g) durante 75 minutos a 4°C y en esta ocasión se descartó el sobrenadante y nos quedamos con el sedimento, que a continuación resuspendimos en PBS. El PBS o tampón fosfato salino es una solución isotónica y no tóxica para las células que gracias a los grupos fosfato que contiene es capaz de mantener el pH estable, siendo de uso ubicuo en investigación biomédica. Tras ello, guardaremos los tubos de microcentrífuga a -20°C.

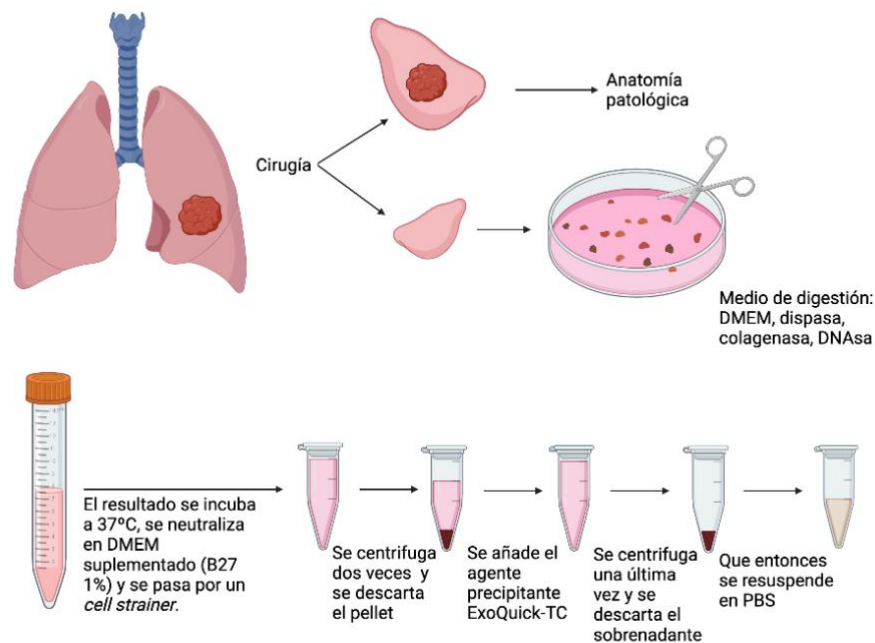


Figura 2: Proceso de obtención de exosomas en tejido sólido (realizado en BioRender.com)

3.3.2 Plasma periférico

La fracción seleccionada para el aislamiento de exosomas de sangre periférica es el plasma. Tras descongelar una alícuota de 600 µl, se comenzó realizando dos centrifugaciones, de forma análoga a la realizada con el tejido pulmonar. La primera a 6000 rpm (2000 g) durante 5 minutos a 20°C, y la segunda a 12000 rpm (10000 g) durante 20 minutos a 20 °C, descartándose en ambas ocasiones el sedimento o *pellet*.

A continuación, se añadieron 0.6 µL de trombina y se centrifugó de nuevo a 12000 rpm (10000 g) durante 5 minutos a 20°C y se descartó el sedimento. Tras ello se añadió la solución de precipitación y se incubó durante 1 hora a 4 °C. La figura 3 muestra de manera esquemática los distintos pasos del aislamiento.

De nuevo se realizó una última centrifugación y se descartó el sobrenadante, resuspendiendo el sedimento en PBS y se guardó en tubos de microcentrífuga a -20 °C.

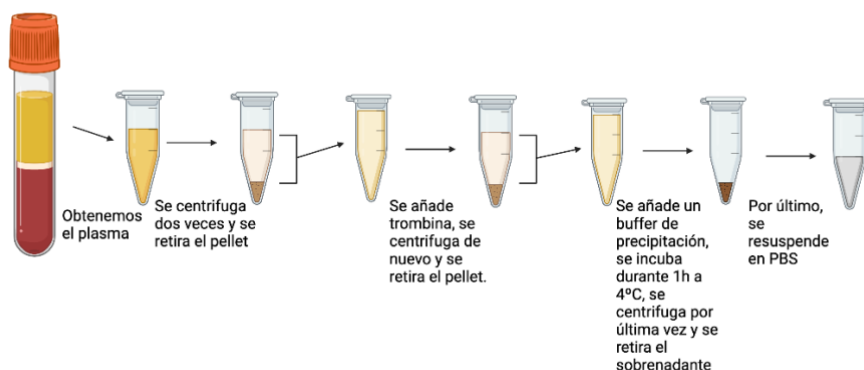


Figura 3: Proceso de obtención de exosomas en plasma sanguíneo (realizado en BioRender.com)

3.4 Caracterización de exosomas

Tras haber llevado a cabo el aislamiento de exosomas en nuestras muestras, y dado su carácter microscópico, se procedió a llevar a cabo diferentes técnicas de caracterización y cuantificación con el objetivo de confirmar su presencia, tanto mediante el análisis de marcadores proteicos como su morfología.

3.4.1 Caracterización proteica: ELISA

Para la caracterización proteica de los exosomas presentes en las muestras se utilizó un método de ELISA indirecto frente a CD63 como muestra la figura 4. En primer lugar, se midió la cantidad de proteína en las muestras para obtener una concentración de 100 µg y se prepararon las muestras para la curva estándar.

Se añadieron las muestras y se incubó la placa durante una hora a 37°C para facilitar la fijación de los exosomas en los pocillos. Tras ello, se lavaron los pocillos con *buffer* o tampón. Se añadió entonces el anticuerpo primario anti-CD63 y se incubó durante una hora a temperatura ambiente, tras lo que se lavaron de nuevo los pocillos con solución buffer. El CD63 es una tetraspanina, un tipo de proteína de membrana que se encuentra

en las células eucariotas. En concreto la proteína CD63 entre otras es propia de los exosomas y sirve en este caso para identificarlos como tal (31).

Tras la incubación se añadió el anticuerpo secundario HRP que se incubó de nuevo una hora a temperatura ambiente, y se realizó un nuevo lavado. HRP son las siglas de *Horseradish Peroxidase* o Peroxidasa del Rábano Picante. Es una enzima de uso habitual en bioquímica por su capacidad de amplificar una señal débil y aumentar los niveles de detección de la molécula objetivo. Por último, se añadió el sustrato TMB, que permite el análisis colorimétrico (azul) e incubamos durante 10 minutos. Se añadió el *buffer* que para la reacción enzimática y se leyó la placa con un espectrofotómetro a 450 nm. TMB (3,3',5,5' tetrametilbenzidina) es un cromógeno que produce un color azul cuando se oxida con peróxido de hidrógeno (catalizado por HRP). A continuación, el color cambió a amarillo (medido a 450 nm.) tras la adición de ácido sulfúrico o fosfórico para detener la reacción (32).

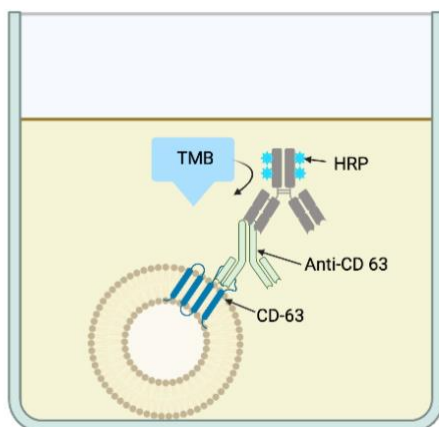


Figura 4: ELISA indirecto para detección de exosomas (Realizado en BioRender.com).

3.4.2 Caracterización morfológica: Microscopía electrónica de transmisión

Este procedimiento se llevó a cabo en colaboración con el Servicio de Microscopia de Muestras Biológicas de la Universidad de Zaragoza que se encuentra en la Facultad de Medicina. Tres muestras de cada grupo fueron preparadas para su análisis.

En primer lugar, las muestras se diluyeron 1:50 en PBS basándonos en la experiencia previa del grupo. Tras ello se llevaron al servicio descrito, donde se procedió a su fijación y tinción negativa con acetato de uranilo sobre una capa de carbono activado. La

visualización de las muestras las llevó a cabo un técnico especializado del Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA).

3.4.3 Cuantificación de exosomas: NTA

Como última técnica de caracterización, y con el objetivo de cuantificar los exosomas de nuestras muestras, se realizó el análisis de seguimiento de partículas o NTA (Nanoparticle Tracking Analysis). Se trata de un análisis que calcula la distribución de las partículas por sus propiedades de dispersión de la luz y por el movimiento browniano para calcular su concentración y analizar su trayectoria. El estudio se realizó en un equipo Nanosight NS300 de *Malvern Panalytical*.

Las muestras se diluyeron 1:1000 en una solución con PBS y EDTA para evitar su agregación. Tras ello, se introdujeron en la cámara de lectura mediante un aparato de microfluídica. Un láser incide en la cámara donde se inyecta la muestra, de forma que las partículas pueden observarse fácilmente con un microscopio de 20 aumentos por la dispersión de la luz que generan. La imagen se graba por el software de análisis de seguimiento y analiza y calcula su diámetro hidrodinámico mediante la ecuación de Stokes-Einstein (33,34).

3.5 Análisis de secuenciación del RNA

Tras finalizar el proceso de caracterización, se procedió al análisis del RNA de su interior, que se realizó mediante la técnica de RNA-Seq o secuenciación de RNA (35). Ésta permite conocer la cantidad, presencia y tipo de RNA contenido en una muestra biológica determinada. La técnica utiliza RNA para obtener DNA de doble cadena mediante PCR inversa. Una vez obtenida dicha cadena, se amplifica para crear una biblioteca de ADN que entonces se divide en fragmentos de entre 30 y 400 pares de bases y que después se lee para comparar los resultados con un modelo de referencia genómico o transcriptómico para caracterizar la muestra (35,36). Esta técnica permite diferenciar los diferentes tipos de RNA, así como los cambios cuantitativos específicos de cada sujeto.

Dada la complejidad metodológica y el elevado coste de las infraestructuras, el proceso de secuenciación masiva no se pudo llevar a cabo en nuestras instalaciones ni en los servicios adheridos a la Universidad. El procedimiento de RNA-Seq se realizó de manera externa, en las instalaciones de Palo Alto (California, USA), de la empresa especializada *System Bioscience* (SBI).

3.6 Análisis estadístico

En la tabla de caracterización clínica de la población, se expresó la edad, y la escala de Charlson a través de la mediana de sus datos. En el caso de la tabla que expresa las características de la muestra, se añadió además la mediana del Índice de Masa Corporal y la mediana de los datos espirométricos. El resto de variables, el sexo, el hábito tabáquico, la presencia de hipertensión arterial, dislipemia, EPOC o bronquiectasias aparecen representadas en números absolutos.

Para comparar cuantificación de exosomas entre las muestras con cáncer y los controles, se usó la prueba de Mann Whitney, usando como umbral de significación 0.05.

En el caso del estudio RNA-Seq se aplica un *False Discovery Rate* (FDR) del 5%

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Características de la muestra del estudio ExVeLP

En el momento del estudio, la cohorte contaba con 99 pacientes intervenidos por el servicio de Cirugía Torácica. La edad de los pacientes esta comprendida entre 19 y 84 años, con una mediana de 68 años. Son 31 mujeres y 68 hombres y 96 de ellos son de raza caucásica.

En cuanto al hábito tabáquico, 29 personas eran fumadoras en el momento del estudio, 45 eran exfumadores y 19 referían nunca haber estado expuestos directamente. En cuanto a comorbilidades destacables, 19 de ellos presentaba diagnóstico de EPOC. La media de la escala de Charlson fue de 5.47, con una mediana de 5.

Hablando de las lesiones estudiadas 7 pacientes no presentaban lesiones malignas, 43 presentaban histología compatible con adenocarcinoma, 26 con carcinoma epidermoide, 7 eran tumores carcinoide, 3 carcinomas microcíticos, 2 tumores fibrosos y 10 tumores metastásicos de otras localizaciones primarias.

Tabla 1. Características clínicas de la población a estudio

		No cáncer	Adenocarcinoma	Carcinoma Escamoso	Tumor carcinoide	Tumor microcítico	Metástasis
Número de casos		8	43	26	7	3	10
Sexo	Hombre	4	28	23	4	1	7
	Mujer	4	15	3	3	2	3
Mediana de edad		65,5	69	69	72	61	65,5
Hábito Tabáquico	Fumador	2	11	10	1	2	1
	Exfumador	3	25	12	4	1	1
HTA		4	24	15	5	3	3
DLP		5	21	18	2	1	2
EPOC		0	11	7	0	1	0
Bronquiectasias		1	5	0	2	0	0
Mediana de la escala de Charlson		3,5	5	5	4	6	6,5

Existen otros estudios de caracterización exosomal en pacientes con cáncer. *Rodríguez et al.* realizaron un estudio (29) en el Hospital Infanta Leonor de Madrid en el que seleccionaron 30 muestras de lavado broncoalveolar de pacientes con cáncer y 75 controles, para su estudio. De los 30 citados, 16 de ellos (un 54%) se trataba de carcinomas escamosos y 14 (un 46%) eran adenocarcinomas. La mediana de edad era 69 años, 23 eran hombres y 7 eran mujeres. Dentro del grupo control, la enfermedad más común era la patología intersticial, en 24 de ellos (un 32%). Se trata de una muestra muy pequeña, si bien es cierto que se estudiaron los tumores más frecuentes, falta representación de otros tipos principales y una cantidad de pacientes mayor. Utilizar como grupo control un grupo en el que predomina una enfermedad con tal componente inflamatorio puede llevar a conclusiones erróneas o difíciles de interpretar.

Tabla 2. Localización de las lesiones intervenidas.

	LSI	Língua	LII	LSD	LM	LID	OTRAS	Total
No cáncer	1	-	1	1	1	1	3	8
Adenocarcinoma	7	1	6	17	3	8	LSI+Língua: 1	43
Carcinoma escamoso	4	-	7	9	1	4	LM + LID: 1	26
Tumor carcinoide	2	-	0	1	1	2	1	7
Microcítico	2	-	-	1	-	-	-	3
Tumor fibroso	-	-	-	-	-	2	-	2
Metástasis	-	-	1	1	1	3	LID + LSD: 1 LM + LID: 1	10

Sandfeld-Paulsen et al. (37), por su parte, aislaron plasma de 581 pacientes, 431 de ellos con cáncer de pulmón y 150 controles. Finalmente, en la cohorte final, de los 336 pacientes con cáncer, 199 eran pacientes con adenocarcinoma (un 59.2%), 71 con carcinoma escamoso (un 21.13%), 57 de ellos presentaron carcinoma de células pequeñas o microcítico (un 16.96%) y otros tipos en 9 casos, (un 2.67%). Este estudio en su distribución se parece más a nuestra muestra y a la distribución que se produce en la población de forma natural. Bien es cierto que en caso del carcinoma microcítico hay una muestra mucho mayor, esto es debido a que en nuestro caso se añadieron pacientes

sugestivos de tratamiento quirúrgico radical. Este tipo de cáncer, como se ha explicado, presenta una agresividad tal, que las opciones quirúrgicas a su diagnóstico suelen ser escasas.

4.2 Subpoblación de estudio RNA-Seq.

De la cohorte descrita, se tomaron para el estudio que se presenta 10 pacientes, 6 de ellos con cáncer y 4 controles sin enfermedad. Sus características concretas se desarrollan en la Tabla 3. Se seleccionaron los pacientes con adenocarcinoma de entre los pacientes con cáncer por ser el tumor de mayor frecuencia de aparición en la población general (4,9).

Tabla 3. Características clínicas de la muestra

		No cáncer	Adenocarcinoma
Número de casos		4	6
Sexo	Hombre	1	4
	Mujer	3	2
Mediana de edad		71	63.5
Mediana de BMI		26	25.965
Hábito Tabáquico	Fumador	1	1
	Exfumador	1	5
HTA		1	1
DLP		3	2
EPOC		0	0
Bronquiectasias		0	1
Mediana de la escala de Charlson		5	4
Mediana de FVC en %		106.5%	103.6%
Mediana de FEV1 en %		99.5%	96.2%
Mediana de relación FEV1/FVC		80.77	72
Mediana de DLCO en %		88%	92%

4.3 Caracterización de exosomas de parénquima pulmonar

4.3.1 Caracterización Proteica

A continuación, se presenta una tabla de señal de absorbancia en la que se compara la muestra en blanco (sin exosomas) respecto a la muestra con vesículas, en la que se demuestra la presencia de la proteína típica que identifica los exosomas como tales, como se ha expresado en líneas previas, la conocida como CD63, ampliamente descrita en la bibliografía (31).

Tabla 4. Tabla de señal de absorbancia

	Blanco (negativo)	Exosomas de pulmón (n=4)
Absorbancia 450 nm.	0.09	0.16 +/- 0.01

4.3.2 Caracterización Morfológica

Mediante la microscopía electrónica de transmisión se observan los exosomas con su forma típica de copa tal y como se observa en la figura 5. Esta forma se debe a la deshidratación extrema que sufren durante el proceso de preparación de la muestra. Su tamaño se encuentra entre 60 y 100 nm, como es esperable y como se ha descrito en la bibliografía (2,25).

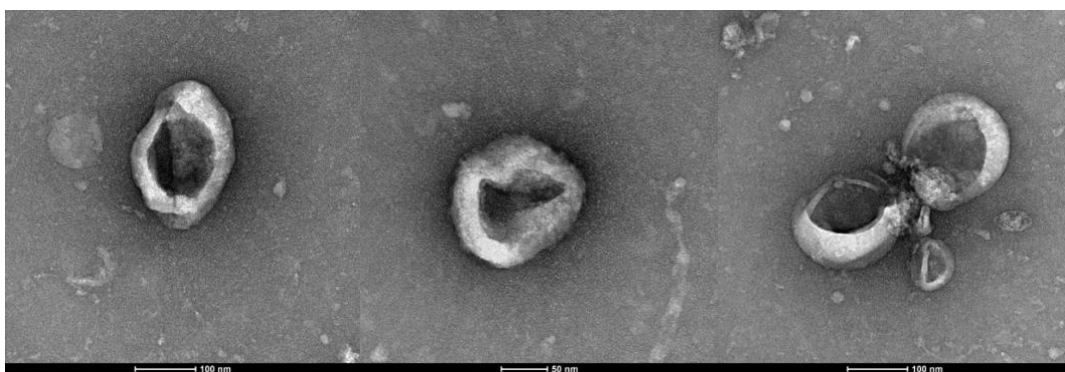


Figura 5. Exosomas observados por microscopía electrónica de transmisión.

4.3.3 Cuantificación de exosomas

Finalmente, se cuantificaron las muestras procedentes del aislamiento de exosomas en parénquima pulmonar de pacientes sin cáncer y pacientes con adenocarcinoma. Se realizó la comparación con la prueba estadística de Mann Whitney y se obtuvieron diferencias significativas entre las dos muestras con una p de 0.0095. En los pacientes

sin cáncer, se encuentra un rango de 3.44×10^8 part/ml con una desviación estándar de 1.472, mientras que en los pacientes con adenocarcinoma presentan un rango de 5.63×10^8 part/ml con una desviación estándar de 2.180.

A continuación, se adjunta la gráfica de la comparativa, en la figura 6.

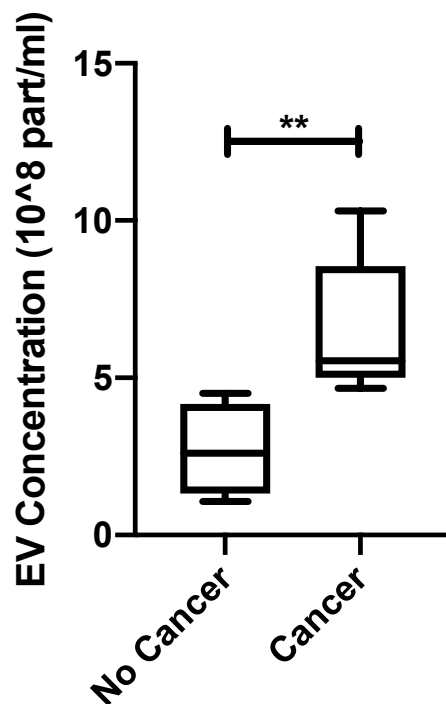


Figura 6: Representación gráfica de las diferencias cuantitativas de exosomas en tejido pulmonar

Existen otros estudios en esta dirección. Ya en 2009 *Rabinowits et al.*(28) analizaron el microRNA presente en exosomas circulantes en sangre en pacientes con y sin adenocarcinoma de pulmón. Se tomaron 27 pacientes con cáncer y 9 controles, hallando diferencias estadísticamente significativas tanto en concentración global de exosomas como en concentración de microRNA, ambas determinaciones en mayor cuantía en paciente afecto de cáncer.

4.4 Análisis de RNA-Seq

Además de estudiar los exosomas en tejido pulmonar se han estudiado los exosomas en plasma sanguíneo de los mismos pacientes, con el fin de comparar tanto su cantidad

como su contenido, con la intención de conocer si es posible obtener una información análoga por medios no cruentos.

4.4.1 Diferencias en la composición de RNA exosomal

El primer dato que se evaluó fue la composición de cada tipo de RNA que se localizaba en el interior de los exosomas de parénquima pulmonar y de plasma. En las figuras 7 y 8 se muestran la representación porcentual de cada subtipo de RNA estudiado. De manera visual, es evidente la diferencia que existe entre el tejido pulmonar y el plasma sanguíneo estudiado.

En el tejido pulmonar predominó claramente el tRNA, mientras que en las muestras en plasma sanguíneo es bastante más abundante el miRNA. Estos hallazgos pueden explicar el amplio estudio que se ha realizado de los miRNA exosomales en plasma, ya que son mucho más accesibles por el tipo de muestra en el que se encuentran. Además, estos resultados ponen el foco sobre el papel de los tRNAs en la biología tumoral. Hay que tener en cuenta que se encuentran en mayor porcentaje, pero también que la cantidad de exosomas en tejido pulmonar de pacientes con cáncer era mayor, lo que puede suponer que se trate de una pieza clave en la comunicación celular patológica.

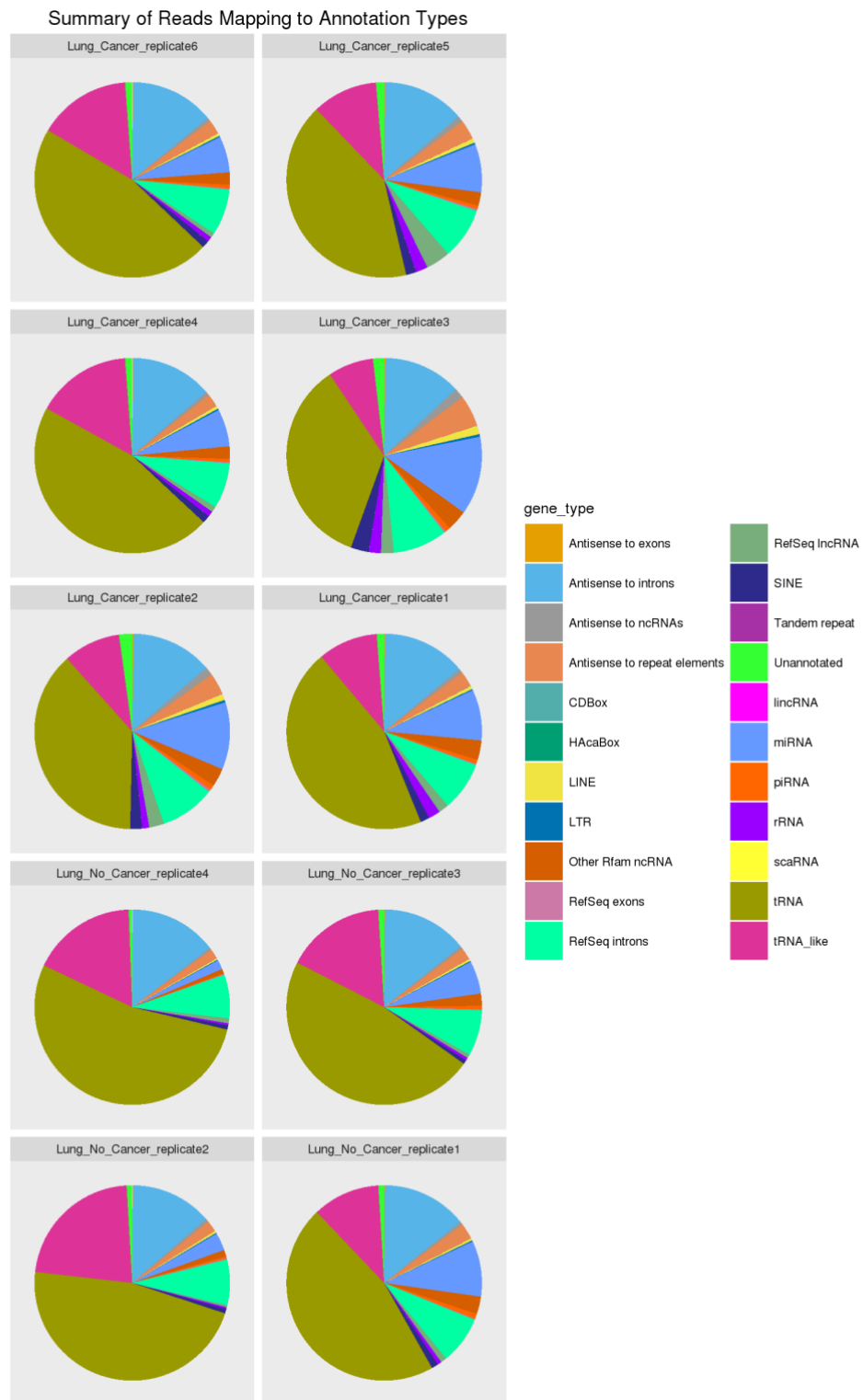


Figura 7. Representación gráfica porcentual de tipo de ácidos nucleicos contenidos en los exosomas aislados en tejido pulmonar.

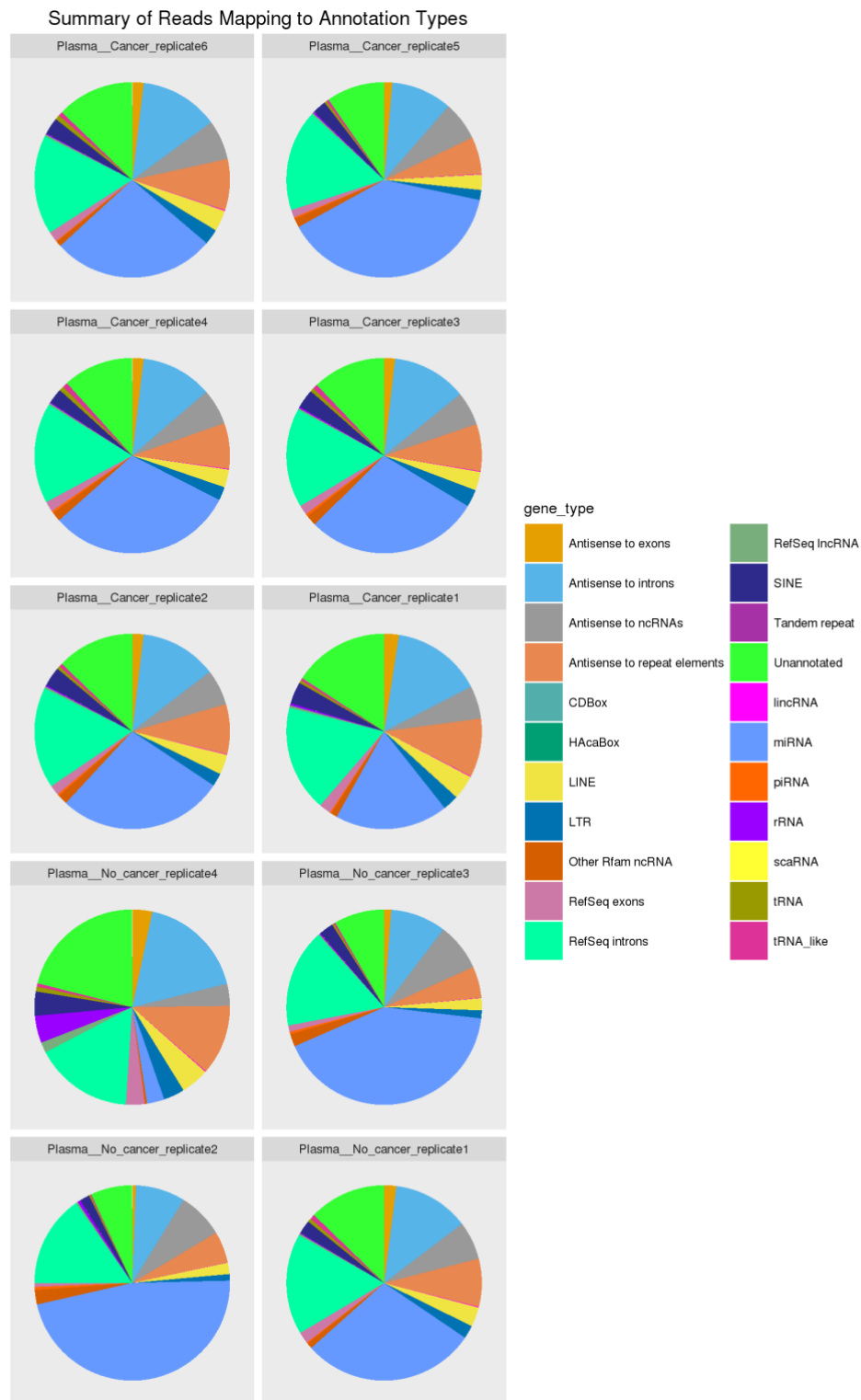


Figura 8. Representación gráfica porcentual de tipo de ácidos nucleicos contenidos en los exosomas aislados en plasma.

4.4.2 Evaluación de la presencia de miRNAs y tRNAs en plasma y parénquima pulmonar

El material genético estudiado se analizó exhaustivamente. A continuación, se adjuntan en las Figuras 7 y 8 dos diagramas de Venn en la que se representa la cantidad de miRNA y tRNA, respectivamente, que tienen en común entre sí los diferentes tipos de muestra obtenidos.

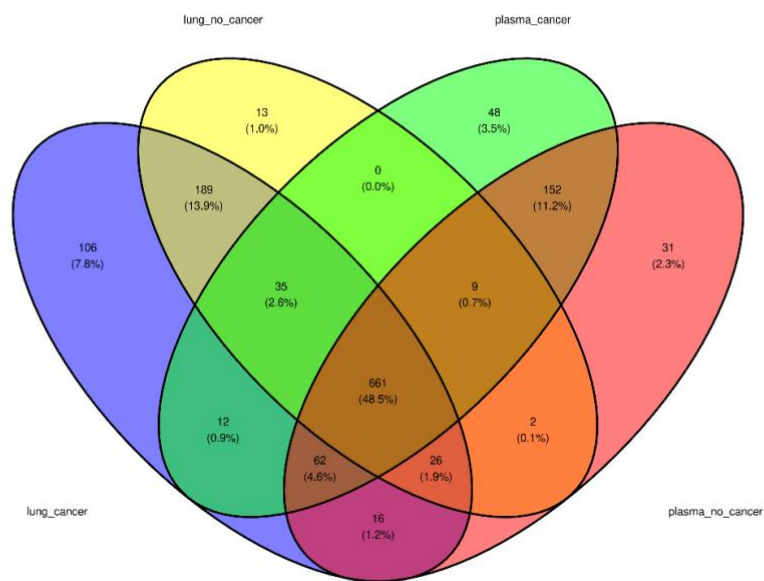


Figura 9. Diagrama de Venn de los diferentes miRNA observados en la muestra y sus coincidencias en los distintos tipos de muestra obtenida.

Sin evaluar la significación estadística, se puede observar en la figura 9 la gran cantidad de miRNA común a todos ellos, 661 (48.5% del total). Los puntos de corte entre el pulmón y el plasma afectados son mayores cuantitativamente respecto a las muestras de pulmón y plasma sanos. Aún así, existe un 48.5% de puntos en común en todas las muestras, un 13.9% entre las muestras de pulmón, ya sean sanos o no y un 11.2% entre las muestras de plasma, tanto sanas como afectas, lo que deja en realidad, la cuantía de posibles miRNA diagnósticos en un porcentaje bajo.

Sin embargo, son esta pequeña población la que posee un mayor interés como biomarcadores. En este sentido, se detectaron 48 miRNAs específicamente expresados

en plasma de pacientes con cáncer, lo que representa un 3.5% del total. Por otro lado, en el pulmón de los pacientes con cáncer se detectaron de manera específica 108 miRNAs (7.8%). Finalmente, se detectaron 12 miRNAs específicos de manera común a parénquima pulmonar y plasma de pacientes con cáncer.

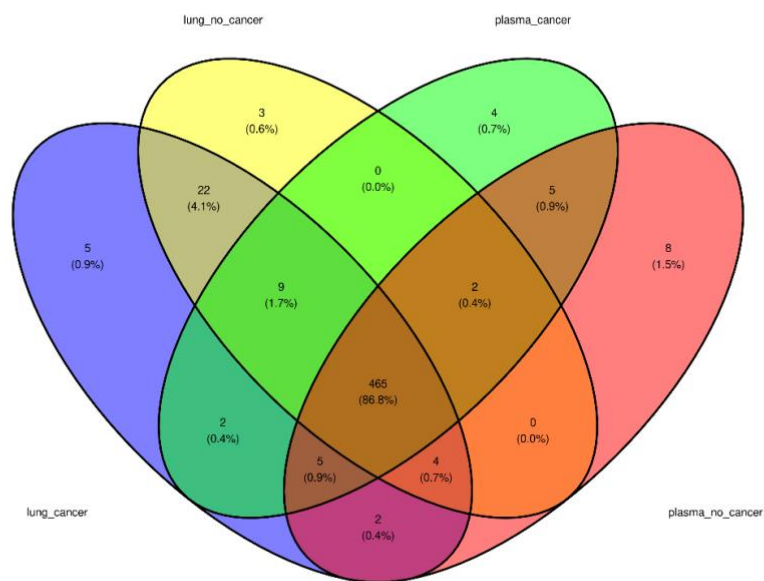


Figura 10. Diagrama de Venn de los diferentes tRNA observados en la muestra y sus coincidencias en los distintos tipos de muestra obtenida.

Si nos centramos en los tRNAs, como muestra la figura 10, centrándonos en la detección o no de tRNAs, se observa un 86.8% de determinaciones en común a todos los tejidos y grupos de pacientes. En este caso, se detectaron tan solo 4 tRNAs detectados específicamente en el plasma de pacientes con cáncer (0.7%), 5 tRNAs en el parénquima pulmonar de pacientes con cáncer (0.9%) y 2 comunes en plasma y pulmón de pacientes con cáncer (0.4%).

En ambos casos, miRNAs y tRNAs, estos resultados son realmente prometedores y exponen varios candidatos para su uso como biomarcador. Sin embargo, es necesario llevar a cabo estudios de validación para confirmar la reproducibilidad de su presencia

o ausencia en una muestra de pacientes más grande. Además, esta validación se debería llevar a cabo con técnicas más accesibles en la práctica rutinaria como pudiera ser la reacción en cadena de la polimerasa o PCR cuantitativa.

4.4.3 Cambios cuantitativos en el RNA exosomal de pacientes con cáncer

El siguiente paso en nuestro análisis fue evaluar de manera cuantitativa el número de copias detectadas para cada RNA. Los resultados más relevantes se muestran en la tabla 5. En esta tabla se muestran aquellas diferencias significativas tras aplicar un *False Discovery Rate* (FDR) del 5% al comparar en las dos primeras columnas entre pacientes con cáncer y sin cáncer en pulmón y plasma respectivamente. Las dos columnas restantes muestran la comparación entre orígenes de muestras en primer lugar en pacientes con cáncer y en segundo lugar en los pacientes sin cáncer.

Tabla 5 Resultados del análisis de RNA-Seq

Differential small RNA subtype at 5% level of significance				
small RNA subtype	Lung Cáncer vs normal	Plasma Cáncer vs normal	Lung vs Plasma Cancer	Lung vs Plasma Normal
miRNA	0	0	1017	704
tRNA	34	0	445	360
RefSeq	1	0	9401	1221
RefSeq_antisense	25	1	9667	1171

Se encontraron hallazgos diferenciales estadísticamente significativos relativos a los tRNAs encontrados en tejido pulmonar sano respecto a tejido pulmonar no afecto, en concreto, para 34 tRNAs. Asimismo, se puede inferir una diferencia entre pacientes con y sin cáncer al comparar las diferencias significativas que se encontraban entre plasma y pulmón en cada uno de ellos. En el caso de los miRNAs, 1017 se encontraban diferencialmente expresados entre plasma y parénquima en pacientes con cáncer mientras que solo 704 lo estaban en los pacientes sin cáncer. Esta diferencia se incrementaba en el caso de los RefSeq y RefSeq_Antisense que mostraron más de 9400 en pacientes con cáncer por tan solo 1170 en el caso de los pacientes sin cáncer.

En el dendograma mostrado en la figura 11 se observa la separación de los dos grupos de pacientes, diferenciados en la parte superior del gráfico, los pacientes con cáncer y los pacientes sin cáncer. Teniendo en cuenta que a mayor tendencia a los colores cálidos mayor presencia del tRNA de estudio, podemos observar que en la muestra de tejido pulmonar existen tRNAs concretos de mayor expresión en exosomas obtenidos de parénquima pulmonar afecto de cáncer, lo que orienta hacia cuáles pueden ser útiles como marcador diagnóstico y de screening o tener un papel relevante en la biología molecular del tumor.

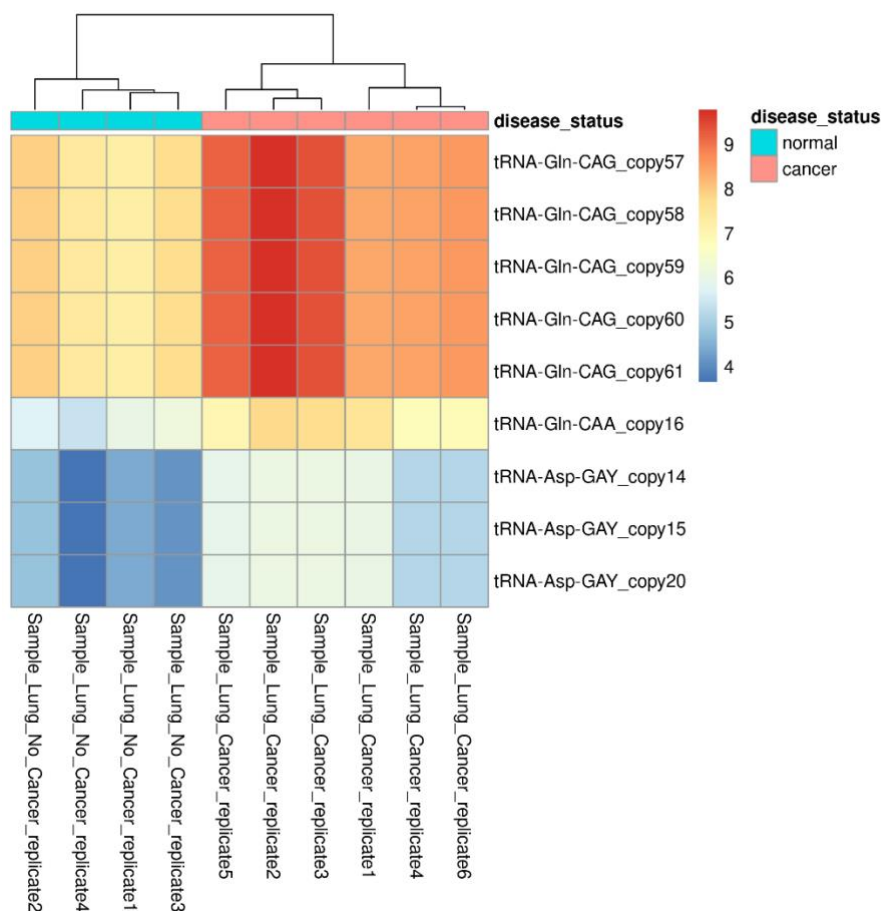


Figura 11. Hierarchical cluster heatmap o dendograma de tRNAs diferencialmente expresados en exosomas de parénquima pulmonar de pacientes con adenocarcinoma pulmonar.

Los ácidos nucleicos que contienen los exosomas son, en su mayor parte DNA, mRNA, miRNA, tRNAs, LncRNA y RNA viral. De entre todos ellos, los más estudiados en la bibliografía son los miRNAs. Los miRNAs son una familia de RNAs no codificantes de entre 21 y 25 nucleótidos, altamente conservados entre especies que se encargan de la

regulación de la expresión génica en la célula, así como de procesos de desarrollo y con una fuerte relación con procesos fisiopatológicos como el cáncer (38).

En concreto en el cáncer de pulmón, los miRNAs son responsables de muchos procesos que ayudan al avance de la enfermedad. Citando algunos ejemplos, el miR-660-5p se expresa en mayor cuantía en pacientes afectados de carcinoma de célula no pequeña, y se ha comprobado su papel en el crecimiento y la formación de metástasis (39). Las neoformaciones de rápido crecimiento a menudo presentan áreas de necrosis. En estas condiciones de hipoxia se han identificado exosomas con miR-23a, capaz de promover la neovascularización y la permeabilidad capilar, y en última instancia la angiogénesis (40), dotando al tejido tumoral de mayor capacidad de crecimiento y mejores condiciones. Existen numerosos estudios en este sentido y se han identificado diversas vías y receptores en las que participan los miRNAs (26).

Además de la descripción de sus funciones, se están perfilando algunos de ellos como biomarcadores. *Grimolizzi et al.* (41) por su parte, realizaron un estudio también en suero de paciente con carcinoma pulmonar de células no pequeñas en el que se estudió el microRNA-126 como biomarcador de progresión tumoral. Se tomaron 76 pacientes, 45 casos y 31 controles y se evaluaron los niveles de dicho miRNA según el estadio tumoral en suero total, en exosomas aislados y en suero sin exosomas. El miRNA-126 presente en exosomas fue capaz de diferenciar pacientes sanos respecto a pacientes con carcinoma de célula no pequeña, incluso en estadios precoces.

Mediante el estudio del plasma de paciente enfermo se han llegado a perfilar agrupaciones de microRNAs concretos dependiendo de la histología de las lesiones. El trabajo de *Xiance et al.* (42) validó con su estudio microRNAs concretos como herramienta diagnóstica de adenocarcinoma y de carcinoma escamoso de pulmón, lo que abre una puerta prometedora en la búsqueda de nuevos biomarcadores. Citando algunos de ellos podríamos destacar el miR-96 como marcador diagnóstico, miR-181-5p, miR-30a-3p, miR-30e-3p y miR-320b como marcadores específicos de adenocarcinoma y capaces de diferenciar entre éste y el carcinoma escamoso (26).

Yendo aún más allá, también se han identificado miRNAs asociados al pronóstico del tumor, como el miR-155 (43) o capaces de dar información en relación con la potencial respuesta al tratamiento que se plantee.

Los tRNAs, aunque menos estudiados, también forman parte de la regulación de las funciones celulares. Recientemente se han descrito alteraciones en la expresión de diversos tipos de tRNA en leucemia linfocítica y cáncer de pulmón, que podrían tener que ver con la oncogénesis y el desarrollo de la enfermedad (44,45). En concreto se han descrito fragmentos de tRNA, los denominados tsRNA, de entre 18 y 40 nucleótidos y se ha estudiado su papel como biomarcadores diagnósticos. En el estudio de *Zhu et al.* (45), en el que se estudió el cáncer de hígado, se encontró en el interior de los exosomas una mayoría clara de miRNA, tratándose de tRNA en tan solo el 0.2-2% del total, encontrándose en mayor cuantía en pacientes enfermos, y 46 de ellos expresados de forma diferencial respecto a pacientes sanos, lo que abre una puerta a su potencial uso como biomarcador de forma análoga a los miRNA.

5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Este trabajo presenta un estudio observacional sin intervención y cuyo objetivo principal es la generación de hipótesis de investigación.

La limitación más evidente en el estudio de secuenciación del RNA es el reducido tamaño muestral (6 pacientes con adenocarcinoma y 4 pacientes sin cáncer). Los análisis expuestos en estas líneas son poco accesibles, de una complejidad extraordinaria tanto técnicamente como en su interpretación y económicamente muy costosos. Además, de manera intrínseca a esta limitación, se seleccionaron pacientes con un solo perfil de cáncer de pulmón, aquel más frecuente, por lo que debido a la heterogeneidad de esta patología se requieren más trabajos que incluyan también otros tipos de cáncer de pulmón.

En cuanto a los resultados obtenidos, la existencia de determinaciones genéticas diferenciales y características de situaciones clínicas y patológicas concretas no

garantiza su validez como biomarcadores. Su validación, y por supuesto su generalización y uso diario son aún objetivos a largo plazo que requieren un conocimiento del tema expuesto que aún hay que recorrer.

Actualmente se conoce el hecho de que las lesiones neoplásicas son capaces de cambiar radicalmente su conformación histológica a lo largo del tratamiento dirigido como parte de su avance. Si los cambios celulares son de tal peso que son capaces de observarse con un microscopio óptico, a nivel molecular es esperable que las dianas, la expresión génica y los marcadores cambien, por lo que, si como se espera esto sucede, los exosomas serán clave en la monitorización terapéutica y por ello los análisis deberían realizarse periódicamente con el objetivo de evaluar esta evolución.

6. CONCLUSIONES

La situación epidemiológica del cáncer de pulmón y los resultados obtenidos hacen clara la necesidad de nuevas herramientas diagnósticas. En esta dirección y con los resultados expuestos anteriormente podemos extraer las siguientes conclusiones:

El parénquima pulmonar, pese a su naturaleza de tejido sólido, posee en su estructura retenidas vesículas extracelulares que pueden ser aisladas mediante el protocolo establecido. Además, pese a converger en su estructura, su carga en cuanto a RNA es significativamente distinta entre un biofluido como el plasma y el tejido pulmonar, por lo que su origen, función y actividad difieren. Una de las características más notables del estudio es la extracción de exosomas directamente desde tejido pulmonar. Hasta el momento, sólo se habían extraído exosomas de tejido cerebral (46)

Contando con una muestra pequeña como la que se ha expuesto, hemos obtenido resultados significativos estadísticamente y demostrado la mayor cuantía de exosomas en tejido pulmonar patológico respecto a los controles con lesiones no cancerosas, mostrando la sensibilidad de este tipo de vesículas a la patología.

La extraordinaria complejidad de los contenidos de dichas vesículas es evidente y las variables a tener en cuenta para elegir las secuencias potencialmente válidas en este sentido han quedado sucintamente expuestas, destacando especialmente aquellas pertenecientes a miRNAs y tRNAs, aunque existiendo probablemente otras muchas que hoy en día se desconocen. Aún con todo, es un campo prometedor que puede suponer un cambio de paradigma en el cáncer de pulmón en concreto, pero también en otras entidades que merman en años y en calidad la vida a muchas personas hoy.

7. ANEXO



Informe Dictamen Favorable

C.P. - C.I. PI15/130
29 de abril de 2020

Dña. María González Hínjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

CERTIFICA

1º. Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 29/04/2020, Acta Nº 10/2020 ha evaluado la modificación relevante propuesta por el investigador referida al estudio:

Título: Recolección de tumores primarios pancreáticos y hepáticos, o de la vesícula, o conductos biliares intra- e extra-hepáticos, o del conducto biliar común para el aislamiento de células madre del árbol biliar humano.

Investigador Principal: Pedro Miguel Baptista, IIS Aragón

Versión protocolo: 18/03/2020

Versión documento de información y consentimiento: v6, 06/04/2020

2º. Considera que

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuada la utilización de los datos y son correctos los documentos elaborados para la obtención del consentimiento informado.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

3º. Por lo que este CEIC emite **DICTAMEN FAVORABLE a la recogida de muestra según la modificación en un plazo de un año tras el dictamen.**

Lo que firmo en Zaragoza

GONZALEZ
HINJOS MARIA
- DNI
03857456B

Firmado digitalmente
por GONZALEZ
HINJOS MARIA - DNI
03857456B
Fecha: 2020.04.30
09:50:16 +02'00'

María González Hínjos
Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Bade BC, dela Cruz CS. Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. Clin Chest Med [Internet]. 2020;41(1):1–24. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.10.001>
2. Cui S, Cheng Z, Qin W, Jiang L. Exosomes as a liquid biopsy for lung cancer. Lung Cancer [Internet]. 2018;116(25):46–54. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2017.12.012>
3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2021;0(0):1–41.
4. Remon J, Reguart N, García-Campelo R, Conde E, Lucena CM, Persiva O, et al. Lung Cancer in Spain. J Thorac Oncol [Internet]. 2021;16(2):197–204. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.09.026>
5. Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras del cáncer en España 2020 [Internet]. Sociedad Española de Oncología Médica. 2020 [cited 2021 Apr 19]. p. 36. Available from: https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Cifras_del_cancer_2020.pdf
6. Alberg AJ, Brock M v., Ford JG, Samet JM, Spivack SD. Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. Chest. 2013;143(5 SUPPL):1–29.
7. Bade BC, dela Cruz CS. Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. Clin Chest Med [Internet]. 2020;41(1):1–24. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.10.001>
8. Ministerio de Sanidad Consumo y Bienestar Social. Encuesta Nacional de Salud, España 2017 [Internet]. 2018. p. 1–12. Available from: https://www.mscbs.gob.es/estadEstudios/estadisticas/encuestaNacional/encuestaNac2017/ENSE2017_notatecnica.pdf
https://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/encuestaNacional/encuestaNac2017/ENSE2017_notatecnica.pdf
9. Nasim F, Sabath BF, Eapen GA. Lung Cancer. Med Clin North Am [Internet]. 2019;103(3):463–73. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.12.006>
10. Ost DE, Yeung SCJ, Tanoue LT, Gould MK. Clinical and organizational factors in the initial evaluation of patients with lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. Chest. 2013;143(5 SUPPL):121–41.
11. Bradley SH, Grice A, Neal RD, Abraham S, Rodriguez Lopez R, Shinkins B, et al. Sensitivity of chest X-ray for detecting lung cancer in people presenting with symptoms: A systematic review. Br J Gen Pract. 2019;69(689):E827–35.
12. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. N Engl J Med. 2012;366(10):883–92.
13. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WEE, et al. The IASLC lung cancer staging project: Proposals for revision of the TNM

- stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM Classification for lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2016;11(1):39–51.
14. Majem M, Juan O, Insa A, Reguart N, Trigo JM, Carcereny E, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (2018). *Clin Transl Oncol* [Internet]. 2019;21(1):3–17. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12094-018-1978-1>
 15. Travis WD. Lung Cancer Pathology: Current Concepts. *Clin Chest Med* [Internet]. 2020;41(1):67–85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.11.001>
 16. Matilla González JM, Andreo García F, Cabezas Pastor E, Calatayud Gastardi J, Cilleruelo Ramos Á, Congregado Loscertales M, et al. Cáncer de pulmón. [Internet]. SEPAR, editor. Barcelona: Respira; 2016. 218. Available from: https://issuu.com/separ/docs/monografia_4_c__ncer_de_pulm__n
 17. Dómine M, Moran T, Isla D, Martí JL, Sullivan I, Provencio M, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of small-cell lung cancer (SCLC) (2019). *Clin Transl Oncol* [Internet]. 2020;22(2):245–55. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12094-020-02295-w>
 18. Kauczor H, Baird A, Blum TG, Bonomo L, Bostantzoglou C. ESR / ERS statement paper on lung cancer screening. *Eur Radiol*. 2020;30:3277–94.
 19. Mejia R, Nutman TB. Screening, prevention and treatment for hyperinfection syndrome and disseminated infections caused by *Strongyloides stercoralis*. *Curr Opin Infect Dis*. 2012;25(4):458–63.
 20. Detterbeck FC, Mazzone PJ, Naidich DP, Bach PB. Screening for lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2013;143(5 SUPPL):e78s–92s.
 21. Hubbard MO, Fu P, Margevicius S, Dowlati A, Linden PA. Five-year survival does not equal cure in non-small cell lung cancer: A Surveillance, Epidemiology, and End Results-based analysis of variables affecting 10- to 18-year survival. *J Thorac Cardiovasc Surg* [Internet]. 2012;143(6):1307–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcvs.2012.01.078>
 22. Pastor L, Vera E, Marin JM, Sanz-Rubio D. Extracellular vesicles from airway secretions: New insights in lung diseases. *Int J Mol Sci*. 2021;22(2):1–21.
 23. Crossland RE, Norden J, Bibby LA, Davis J, Dickinson AM. Evaluation of optimal extracellular vesicle small RNA isolation and qRT-PCR normalisation for serum and urine. *J Immunol Methods* [Internet]. 2016;429:39–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2015.12.011>
 24. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020;367(eaau6977):1–15.
 25. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*. 1987;262(19):9412–20.
 26. Xu K, Zhang C, Du T, Gabriel ANA, Wang X, Li X, et al. Progress of exosomes in the diagnosis and treatment of lung cancer. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2021;134(November 2020):111111. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111111>

27. Vanni I, Alama A, Grossi F, Dal Bello MG, Coco S. Exosomes: a new horizon in lung cancer. *Drug Discov Today* [Internet]. 2017;22(6):927–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2017.03.004>
28. Rabinowits G, Gerçel-Taylor C, Day JM, Taylor DD, Kloecker GH. Exosomal microRNA: A diagnostic marker for lung cancer. *Clin Lung Cancer* [Internet]. 2009;10(1):42–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.3816/CLC.2009.n.006>
29. Rodríguez M, Silva J, López-Alfonso A, López-Muñiz MB, Peña C, Domínguez G, et al. Different exosome cargo from plasma/bronchoalveolar lavage in non-small-cell lung cancer. *Genes Chromosom Cancer*. 2014;53(9):713–24.
30. Lin J, Wang Y, Zou YQ, Chen X, Huang B, Liu J, et al. Differential miRNA expression in pleural effusions derived from extracellular vesicles of patients with lung cancer, pulmonary tuberculosis, or pneumonia. *Tumor Biol* [Internet]. 2016;37(12):15835–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-016-5410-6>
31. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018;7(1).
32. Fisher Scientific Inc. Thermo Scientific™ 1-Step™ Turbo TMB-ELISA Substrate Solution [Internet]. 2020 [cited 2021 Jun 9]. Available from: <https://www.fishersci.es/shop/products/pierce-tmb-substrates/p-4532141>
33. Filipe V, Hawe A, Jiskoot W. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharm Res*. 2010;27(5):796–810.
34. IESMAT. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) [Internet]. [cited 2021 Jun 9]. Available from: https://iesmat.com/catalogos/WC_TECNTA/nanoparticle-tracking-analysis-nta/
35. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*. 2010;10(1):57–63.
36. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*. 2008;5(7):621–8.
37. Sandfeld-Paulsen B, Jakobsen KR, Bæk R, Folkersen BH, Rasmussen TR, Meldgaard P, et al. Exosomal proteins as diagnostic biomarkers in lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2016;11(10):1701–10.
38. Alerting E. MicroRNA function : Multiple mechanisms for a tiny RNA ? *Rna*. 2005;11(Bartel 2004):1753–61.
39. Qi Y, Zha W, Zhang W. Exosomal miR-660-5p promotes tumor growth and metastasis in non-small cell lung cancer. *J BUON*. 2019;24(2):599–607.
40. Hsu YL, Hung JY, Chang WA, Lin YS, Pan YC, Tsai PH, et al. Hypoxic lung cancer-secreted exosomal MIR-23a increased angiogenesis and vascular permeability by targeting prolyl hydroxylase and tight junction protein ZO-1. *Oncogene*. 2017;36(34):4929–42.
41. Grimolizzi F, Monaco F, Leoni F, Bracci M, Staffolani S, Bersaglieri C, et al. Exosomal miR-126 as a circulating biomarker in non-small-cell lung cancer regulating cancer progression. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-15475-6>

42. Jin X, Chen Y, Chen H, Fei S, Chen D, Cai X, et al. Evaluation of tumor-derived exosomal miRNA as potential diagnostic biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer using next-generation sequencing. *Clin Cancer Res*. 2017;23(17):5311–9.
43. Xu TP, Zhu CH, Zhang J, Xia R, Wu FL, Han L, et al. MicroRNA-155 expression has prognostic value in patients with non-small cell lung cancer and digestive system carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(12):7085–90.
44. Zhu L, Liu X, Pu W, Peng Y. tRNA-derived small non-coding RNAs in human disease. *Cancer Lett* [Internet]. 2018;419:1–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.01.015>
45. Zhu L, Li J, Gong Y, Wu Q, Tan S, Sun D, et al. Exosomal tRNA-derived small RNA as a promising biomarker for cancer diagnosis. *Mol Cancer*. 2019;18(1):1–5.
46. Vella LJ, Scicluna BJ, Cheng L, Bawden EG, Masters CL, Ang CS, et al. A rigorous method to enrich for exosomes from brain tissue. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2017;6(1). Available from: <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1348885>