



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster

Vesículas extracelulares en tejido sólido: nueva herramienta pronóstica

Autora

Yolanda Barrena López

Directores

David Sanz Rubio

José María Marín Trigo

Hospital Universitario Miguel Servet

Unidad de Investigación Traslacional - Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón

Máster en Salud Global: Integración de la Salud Ambiental, Humana y Animal

Curso 2020/2021

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1.1. CÁNCER DE PULMÓN	3
1.1.1. Factores de riesgo del cáncer de pulmón	3
1.1.1.1. Tabaco	3
1.1.1.2. Patologías previas.....	4
1.1.1.3. Factores genéticos.....	4
1.1.1.4. Contaminación atmosférica y exposición ocupacional	5
1.1.2. Tipos de cáncer de pulmón	5
1.1.2.1. Carcinoma no microcítico o de células no pequeñas.....	5
1.1.2.2. Carcinoma microcítico o de células pequeñas	6
1.1.3. Fisiopatología	7
1.1.3.1. Mutaciones genéticas.....	7
1.1.3.2. Microambiente tumoral	8
1.1.4. Manifestaciones clínicas y diagnóstico	8
1.1.5. Tratamiento.....	9
1.2. VESÍCULAS EXTRACELULARES: EXOSOMAS.....	10
1.2.1. Aspectos generales	10
1.2.2. Biogénesis.....	11
1.2.3. Composición de los exosomas	11
1.2.4. Aislamiento de exosomas	14
1.3. EXOSOMAS Y miRNAs EN EL CÁNCER DE PULMÓN	15
1.3.1. miRNAs oncogénicos	16
1.3.2. miRNAs supresores de tumores.....	17
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. SUJETOS DE ESTUDIO.....	19
3.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PRIMARIAS Y CRIOPRESERVACIÓN.....	19
3.2.1. Tejido pulmonar	19
3.2.2. Plasma	20
3.3. HOMOGENEIZADO DEL TEJIDO PULMONAR	20
3.4. AISLAMIENTO DE EXOSOMAS MEDIANTE KITS COMERCIALES	21

3.4.1. Aislamiento de exosomas de tejido pulmonar mediante el kit comercial <i>ExoQuick-TC® Exosome Precipitation Solution</i>	21
3.4.2. Aislamiento de exosomas de plasma mediante el kit comercial <i>miRCURY Exosome Serum/Plasma</i>	22
3.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS EXOSOMAS.....	23
3.5.1. Análisis de la morfología por microscopía electrónica de transmisión (TEM)	23
3.5.2. Caracterización proteica de exosomas mediante ELISA	23
3.5.3. Cuantificación y análisis del tamaño de los exosomas mediante análisis de rastreo de nanopartículas (NTA)	24
3.6. EXTRACCIÓN DE RNA	25
3.7. ANÁLISIS DEL RNA	25
3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1. SUJETOS DE ESTUDIO	27
4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS EXOSOMAS.....	27
4.2.1. Análisis de la morfología por microscopía electrónica de transmisión (TEM)	27
4.2.2. Caracterización proteica de exosomas mediante ELISA	28
4.2.3. Cuantificación y análisis del tamaño de los exosomas mediante análisis de rastreo de nanopartículas (NTA)	29
4.2.3.1. Tamaño de los exosomas	29
4.2.3.2. Concentración de los exosomas	30
4.3. ANÁLISIS DEL RNA	32
4.3.1. Cantidad total de RNA.....	32
4.3.2. Tipos de RNA	32
4.3.2.1. RNA de transferencia (tRNA).....	34
4.3.2.2. RNA largo intergénico no codificante (lincRNA).....	35
4.4. FUTURAS DIRECCIONES	37
5. CONCLUSIONES.....	38
CONCLUSIONS	38
BIBLIOGRAFÍA	39
ANEXOS.....	46

ABREVIATURAS

ALK: quinasa del linfoma anaplásico

BCP: buenas prácticas clínicas

BMI: índice de masa corporal

BPL: buenas prácticas de laboratorio

cDNA: DNA complementario

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

FEV1: volumen espiratorio forzado en el primer segundo

FVC: capacidad vital forzada

GWAS: *Genome-wide association study*

HRP: *Horseradish Peroxidase*

HUMS: Hospital Universitario Miguel Servet

ILV: vesículas intraluminales

KRAS: *Kirsten sarcoma rat virus*

lincRNA: RNA largo intergénico no codificante

lncRNA: RNA largo no codificante

MHC I: complejo mayor de histocompatibilidad de clase I

MHC II: complejo mayor de histocompatibilidad de clase II

miRNA: microRNA

mRNA: RNA mensajero

MVB: cuerpos multivesiculares

NCCN: *National Comprehensive Cancer Network*

NGS: *Next Generation Sequencing*

NSCLC: carcinoma pulmonar no microcítico o de células no pequeñas

NTA: análisis de rastreo de nanopartículas

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: *Phosphate Buffered Saline*, tampón fosfato salino

RNA-seq: RNA sequencing

rRNA: RNA ribosómico

SBI: System Bioscience

SCLC: carcinoma pulmonar microcítico o de células pequeñas

SD: desviación estándar

SE: error estándar

SEC: cromatografía de exclusión por tamaño

TA: temperatura ambiente

TEM: microscopía electrónica de transmisión

TMB: *Tetramethylbenzidine*

tRNA: RNA de transferencia

tRNA-like: estructuras similares al tRNA

TTF-1: Factor de transcripción tiroideo

VE: vesículas extracelulares

RESUMEN

El cáncer de pulmón es la primera causa de muerte por cáncer a nivel mundial y el segundo en incidencia, debido principalmente a la baja tasa de supervivencia y a la poca eficacia de los tratamientos actuales. Por ello, se han comenzado a estudiar nuevos biomarcadores que proporcionen información sobre la evolución del cáncer y la respuesta a las distintas terapias. Los exosomas son vesículas extracelulares, de entre 40 y 150 nm, cuyas funciones principales son la comunicación célula-célula y el intercambio de material. Estas vesículas están relacionadas con el cáncer de pulmón por su participación en funciones como la transición epitelial-mesenquimal o la metástasis. En este estudio se ha investigado el aislamiento de exosomas de tejido pulmonar por primera vez y de plasma, y su correspondiente carga, utilizando dos kits comerciales de precipitación. En la primera parte del estudio, se caracterizaron los exosomas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), ELISA y análisis de rastreo de nanopartículas (NTA). Las técnicas TEM y ELISA permitieron confirmar que se aislaron exosomas de ambas muestras mediante el análisis de la morfología y el contenido proteico, respectivamente, mientras que el NTA proporcionó datos precisos sobre la concentración. El contenido en exosomas fue mayor en el tejido pulmonar en pacientes con cáncer de pulmón, confirmando que las células tumorales liberan un mayor número de vesículas. En la segunda parte, se realizó un análisis del RNA mediante RNA-seq, lo que permitió conocer los tipos de RNAs, observándose una expresión alterada principalmente en pacientes con cáncer, con un mayor contenido en tRNAs en el tejido pulmonar. Todo esto ha permitido demostrar el aislamiento con éxito por primera vez de exosomas de tejido sólido y sugerir que los exosomas de pulmón y plasma pueden tener un papel importante en el cáncer de pulmón y ser potenciales fuentes de biomarcadores.

ABSTRACT

Worldwide, lung cancer is the leading cause of cancer death and the second most common cancer, mainly due to the low survival rate and the low efficacy of current treatments. For this reason, new biomarkers have been studied to provide information on the evolution of the cancer and the response to different therapies. Exosomes are 40-150 nm extracellular vesicles, whose main functions are cell-cell communication and material exchange. These vesicles are related to lung cancer because of their participation in functions such as epithelial-mesenchymal transition or metastasis. In this study, we investigated the isolation of exosomes from lung tissue for the first time and from plasma, and their corresponding cargo, using two commercial precipitation kits. In the first part of the study, exosomes were characterized by transmission electron microscopy (TEM), ELISA and nanoparticle tracking analysis (NTA). Exosome isolation was confirmed by TEM and ELISA, by analyzing morphology and protein content, respectively, while NTA provided accurate concentration data. The exosome content was higher in lung tissue from lung cancer patients, confirming that tumor cells release a higher number of vesicles. In the second part, RNA analysis was performed by RNA-seq, observing an altered expression mainly in patients with cancer, with a higher expression of tRNAs in lung tissue. We have demonstrated the isolation of exosomes from lung tissue for the first time and suggested that lung and plasma exosomes may play a crucial role in lung cancer and be potential biomarkers.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CÁNCER DE PULMÓN

El cáncer de pulmón es uno de los cánceres más diagnosticados a nivel mundial, siendo la primera causa de muerte por cáncer, con aproximadamente 1,8 millones de fallecidos en 2020 (18% del total de cánceres detectados). Su incidencia es la segunda más alta tras el cáncer de mama, con alrededor de 2,2 millones de nuevos casos en el año 2020 (1,2). En España el cáncer de pulmón es el cuarto cáncer más diagnosticado y también el primero como causa de mortalidad por cáncer, reportándose en el año 2020 casi 30000 casos nuevos y 23000 defunciones (3).

Esta alta mortalidad se debe a varios motivos, entre los que se encuentran una tasa de supervivencia a 5 años de entre un 10 y 20%, pacientes inicialmente asintomáticos y posteriormente diagnosticados en estadios avanzados y que los tratamientos actuales, a pesar de haber mejorado, no han supuesto un gran incremento en la supervivencia. Por ello, es necesario un mayor estudio a nivel molecular que abra las puertas a una posible medicina personalizada, desarrollando nuevos marcadores de diagnóstico temprano y terapias específicas para cada sujeto (4–6).

1.1.1. Factores de riesgo del cáncer de pulmón

A continuación, se describen los factores de riesgo más importantes del cáncer de pulmón, como son el tabaco, las patologías previas, los factores genéticos y la contaminación. Comprender cómo afectan los distintos factores podría ayudar a desarrollar estrategias de prevención para este tipo de cáncer (7).

1.1.1.1. Tabaco

El tabaco es el principal factor de riesgo del cáncer de pulmón, es decir, la primera causa de la prevalencia mundial (8). El tabaco contiene numerosos carcinógenos asociados con el desarrollo de distintos tipos de cáncer, por ello los fumadores tienen un riesgo 20 veces mayor de padecer cáncer de pulmón. Alrededor del 80% de los diagnósticos de cáncer pulmón tienen antecedentes de tabaquismo, aunque solo el 15% de los fumadores desarrollará uno (9).

La asociación entre cáncer de pulmón y tabaquismo se ha observado de manera preferente en hombres, con una mayor incidencia y mortalidad en este sexo a lo largo de los años (2). Esto se debe a que el tabaquismo era una actividad propia de hombres hasta la mitad del siglo XX, tendencia que ha comenzado a cambiar ya que el tabaco se ha establecido por igual en ambos sexos. Por ello, esta tendencia se está revirtiendo y se espera que, conforme pasen los años, la incidencia y la mortalidad en mujeres aumenten e incluso superen las del hombre (3,10).

Los fumadores pasivos también presentan mayor riesgo de padecer cáncer de pulmón, ya que se ven expuestos a los mismos componentes carcinógenos, pero en menor medida que un fumador activo. El metaanálisis realizado por Kim *et al.* asoció el tabaquismo pasivo con un 25% más de probabilidades de desarrollar cáncer de pulmón (11).

1.1.1.2. Patologías previas

Las enfermedades respiratorias representan un mayor riesgo de padecer cáncer de pulmón ya que aumentan el número de mutaciones, inhiben la apoptosis e incrementan la angiogénesis (12). La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una de las enfermedades respiratorias que más impacto tienen en el cáncer de pulmón. La inflamación en los bronquios, seguida de una continua destrucción y regeneración, y el enfisema juegan un papel importante en la carcinogénesis (9). Puesto que la EPOC guarda relación con el tabaco, es difícil determinar si son factores de riesgo independientes (13).

Otras patologías como el asma y las enfermedades infecciosas (la tuberculosis, la neumonía o el virus de la inmunodeficiencia humana) también aumentan la aparición del cáncer de pulmón (9).

1.1.1.3. Factores genéticos

El hecho de que solo el 15% de los fumadores desarrollen cáncer de pulmón puede indicar que hay susceptibilidad genética (8). Mediante el estudio de asociación del genoma completo (*Genome-wide association study*, GWAS) se han identificado múltiples polimorfismos relacionados con el cáncer de pulmón, sobre todo aquellos que codifican proteínas involucradas en el metabolismo de los carcinógenos del tabaco,

genes relacionados con la reparación y replicación del DNA, con la apoptosis o con los receptores nicotínicos (12).

1.1.1.4. Contaminación atmosférica y exposición ocupacional

La contaminación atmosférica ha aumentado a consecuencia del cambio climático y algunas de las partículas en suspensión se asocian con un incremento del cáncer de pulmón (14). El 50% de los cánceres de pulmón ocurren en áreas urbanas, debido principalmente a una mayor exposición a la contaminación producida por los vehículos, por los sistemas de calefacción y por los gases producidos por las industrias (8).

La exposición a determinados carcinógenos, como asbesto, cadmio, berilio, cromo o níquel, en los puestos de trabajo también aumenta las posibilidades de padecer cáncer de pulmón. Se calcula que del 5 al 10% de las muertes de cáncer de pulmón producidas cada año se deben a la exposición ocupacional (8,10).

1.1.2. Tipos de cáncer de pulmón

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció en 2015 una clasificación del cáncer de pulmón, dividiéndolo en carcinoma pulmonar no microcítico o de células no pequeñas (NSCLC) y en carcinoma pulmonar microcítico o de células pequeñas (SCLC) (15). El NSCLC representa el 85% de los diagnósticos de cáncer de pulmón (16).

1.1.2.1. Carcinoma no microcítico o de células no pequeñas

El NSCLC se clasifica principalmente en tres tipos: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células grandes (16).

El adenocarcinoma representa el 40% de los cánceres de pulmón y el 60% de los NSCLC (15). Es una neoplasia epitelial maligna con diferenciación glandular y producción de moco, y se sitúa en las zonas periféricas del pulmón, por lo que frecuentemente afecta a la pleura y la pared torácica. Se caracteriza por la expresión del Factor de transcripción tiroideo (TTF-1) y la Napsina, que aparecen en el 85% de los adenocarcinomas (15,17). El adenocarcinoma se clasifica según el grado de invasión y tamaño (Figura 1) (5,16) y según su perfil histológico, pudiendo ser lepidico, acinar, papilar, micropapilar o sólido, siendo el lepidico el que se asocia con una mejor prognosis (17).

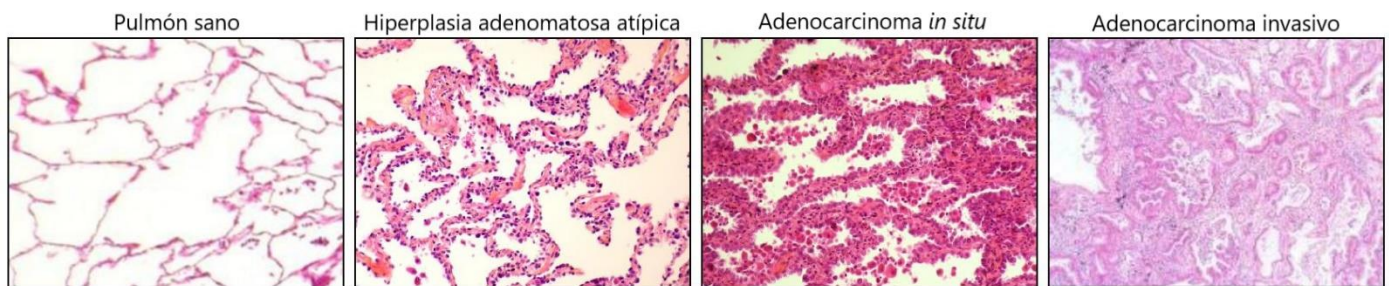


Figura 1. Comparación histológica entre un pulmón sano y las distintas evoluciones del adenocarcinoma. Adaptado de Duruisseaux *et al.*, 2018 (5).

El carcinoma de células escamosas representa el 25% de los cánceres de pulmón y se localiza en la zona central del pulmón y en el epitelio de la vía aérea (16). Este tipo muestra queratinización y uniones intercelulares, y se detecta con marcadores propios de la diferenciación de células escamosas, como el p40, el p63 o citoqueratinas. La supervivencia de este tipo de carcinoma es superior a la del adenocarcinoma (15).

El carcinoma de células grandes es menos común y se manifiesta solo en el 5-10% de los casos de cáncer de pulmón (16). Se localiza en la periferia pulmonar, presenta aspecto necrótico y consta de células alargadas que forman redes sólidas. Se diagnostica por exclusión de los otros dos tipos y por su apariencia macro y microscópica (15).

1.1.2.2. Carcinoma microcítico o de células pequeñas

El SCLC es la forma más agresiva y metastásica del cáncer de pulmón, con una supervivencia reducida y menor que en el caso del NSCLC. Su diagnóstico es complicado ya que no muestra síntomas inicialmente y crece rápidamente hasta alcanzar un grado de metástasis alto y difícil de tratar (18).

Este tipo de carcinoma pulmonar es propio de pacientes que han fumado excesivamente a lo largo de los años, siendo esta la causa en el 95% de los casos (19). Esto se combina con mutaciones en el gen TP53, que producen una alteración en la proteína p53, modificando su función como supresor de tumores y generando un carcinoma muy agresivo (20).

El origen de este tumor son las células neuroendocrinas presentes en el epitelio pulmonar y su proliferación descontrolada. Este tumor inicialmente limitado a la zona

pulmonar acaba extendiéndose y produciendo metástasis en sitios como el hígado, las glándulas adrenales, el hueso, la médula ósea y el cerebro (21).

1.1.3. Fisiopatología

La fisiopatología del cáncer de pulmón es compleja y todavía sigue estudiándose, pero se considera que la exposición a carcinógenos, especialmente los del tabaco, y la susceptibilidad genética llevan a displasia del tejido pulmonar, mutaciones genéticas y alteración de la síntesis de proteínas, produciendo finalmente carcinogénesis. Las alteraciones de los ciclos celulares y el aumento de células cancerígenas llevan a la invasión de varias estructuras del pulmón (22).

1.1.3.1. Mutaciones genéticas

Algunas de las mutaciones más frecuentes en el NSCLC son el *Kirsten sarcoma rat virus* (KRAS), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la quinasa del linfoma anaplásico (ALK), mientras que en el SCLC son los factores de transcripción MYC y p53 (21).

KRAS es una proteína GTPasa que regula la división celular, la reorganización del citoesqueleto y la autofagia (23), EGFR es una proteína transmembrana que participa en las vías de señalización intracelular que regulan la multiplicación de las células (17) y ALK es un receptor de tirosina quinasa que participa en la multiplicación celular y se relaciona con la formación de moco (23,24). Las mutaciones en los genes que regulan estas proteínas aumentan la producción y la actividad de estas, lo que hace que las células se multipliquen más y con mayor rapidez, produciendo metástasis e inhibición de la apoptosis.

Las mutaciones en el oncogén KRAS son las más comunes, en un 25-35% de los NSCLC, sobre todo en adenocarcinomas (17). Seguidas de estas son las producidas en el gen EGFR, presentes en un 10-20% de los pacientes diagnosticados con NSCLC, sobre todo en mujeres sin historial de tabaquismo (25). Por último, las mutaciones génicas de ALK son las menos frecuentes, entre un 2-7% de los NSCLC, sobre todo en pacientes jóvenes y poco fumadores (26).

La proteína p53 y la proteína MYC son factores de transcripción, con la misma función de supresión de tumores, ampliamente estudiada en la primera y menos en la segunda.

Regulan la expresión de genes involucrados en el ciclo celular, el metabolismo, la apoptosis y la reparación del DNA (27,28). Las mutaciones en ambas proteínas propician la activación de genes oncogénicos y la inhibición de la apoptosis, además de las alteraciones en el ciclo celular (29).

1.1.3.2. Microambiente tumoral

El microambiente que rodea al tumor suprime la respuesta inmune y altera la actividad de las células inmunitarias, en concreto la de macrófagos, células dendríticas, linfocitos T, células *natural killer* y células mieloides supresoras. La función supresora de tumores de estas células se ve modificada y comienzan a inactivar al resto de células inmunitarias y a producir especies reactivas de oxígeno (30). Además, se empiezan a secretar factores de crecimiento, se crea una inflamación crónica y pueden aparecer zonas hipóxicas (31).

El tumor inicialmente localizado en la periferia o en la parte central del pulmón puede acabar extendiéndose por toda la zona pulmonar e invadir distintas localizaciones. Las células cancerosas pueden migrar de la zona tumoral a los alveolos del parénquima pulmonar, comenzando poco a poco a sustituir los espacios aéreos por masas de células tumorales. También se puede producir invasión de la pleura visceral y parietal, esta última sobre todo si el tumor está en una zona cercana al músculo esquelético. Por último, los bronquios también pueden verse afectados y en menor medida los vasos sanguíneos o linfáticos (32).

1.1.4. Manifestaciones clínicas y diagnóstico

A pesar de las pautas descritas por la organización *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) sobre el screening de cáncer de pulmón, los posibles costes derivados de esto han dificultado su implantación (33), por lo que países como España no han desarrollado todavía un programa de screening (3). La mayoría de los pacientes son detectados de manera accidental en pruebas complementarias que se les efectúan tras evaluar el historial clínico y encontrar diversos indicios, realizándose posteriormente un diagnóstico más completo para confirmar el cáncer de pulmón. Por lo tanto, se suele diagnosticar mayormente en estadios avanzados ya que no hay una sintomatología clara (33,34).

El síntoma más común, y que se presenta aproximadamente en la mitad de los afectados, es la tos (34), seguido de hemoptisis, dolores en el pecho y disnea. Estos dos últimos están causados por la obstrucción de las vías aéreas debido a la localización central del tumor en el pulmón. Los pacientes también tienen neumonías frecuentes o exacerbaciones de la EPOC, y un mayor riesgo de tener embolia pulmonar, neumotórax y derrames pleurales (34,35). Hay otros síntomas que están relacionados con la metástasis del cáncer, y pueden ser pérdida de peso o apetito, fatiga, dolor en los huesos o secuelas neurológicas (4,36).

Actualmente el diagnóstico del cáncer de pulmón se basa principalmente en varias pruebas de imagen distintas: radiografía de tórax, tomografía computarizada, imagen por resonancia magnética y tomografía por emisión de positrones, siendo la tomografía computarizada la que más efectividad tiene y la que más información proporciona sobre el tamaño y localización del tumor (37).

Para determinar la anatomía patológica del cáncer y en que estadio está, se necesitan pruebas citológicas para el análisis molecular. Se utilizan pruebas invasivas como la broncoscopia o la biopsia por aspiración con aguja fina, y otras menos invasivas como el esputo inducido, el lavado o cepillado bronquial y el lavado broncoalveolar (38).

1.1.5. Tratamiento

El tratamiento indicado para cada paciente es complejo y depende del estadio de cáncer diagnosticado, pudiendo ser cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia o cuidados paliativos (39).

Para los estadios tempranos del cáncer, I y II, el tratamiento de elección es la cirugía, en concreto resección tumoral, en la que la extracción dependerá del tamaño del tumor y la localización. Acompañado a esta cirugía se recomienda quimioterapia, sobre todo para el estadio II (4). En el estadio III del cáncer los tratamientos se basan en quimioterapia y radioterapia (40), aunque en gran parte de los casos la quimioterapia no resulta efectiva (31). El estadio IV se trata en algunos casos con quimioterapia, pero mayormente se usan cuidados paliativos ya que la supervivencia es muy baja (4,40).

En los últimos años se han intentado desarrollar otra clase de terapias como la inmunoterapia, que se basa en ayudar al sistema inmunitario a combatir el cáncer,

activando o inhibiendo ligandos o receptores para evitar que el tumor suprima la acción de las células inmunitarias (16,25).

A pesar de estos tratamientos, la supervivencia del cáncer del pulmón a 5 años se ha mantenido bastante baja. Debieuvre *et al.* comparó la supervivencia a 5 años en los años 2000 y 2010, y aunque se apreció una ligera subida, la supervivencia solo mejoró del 10 al 12%, y era más alta en pacientes con NSCLC (41). Wao *et al.* indicó que la supervivencia a 5 años sin tratamiento era del 2 al 4%, por lo que los tratamientos actuales no suponen un gran descenso de la mortalidad del cáncer de pulmón (42). Por ello, es importante que se sigan investigando biomarcadores que sean predictivos de las respuestas del paciente ante las distintas terapias y que puedan dar información sobre la evolución de la enfermedad, además de poder personalizar los planes de tratamiento minimizando efectos adversos y mejorando la calidad de vida (9).

1.2. VESÍCULAS EXTRACELULARES: EXOSOMAS

1.2.1. Aspectos generales

Las vesículas extracelulares (VE) son un conjunto heterogéneo de estructuras membranosas secretadas por las células, diferentes en tamaño, biogénesis, moléculas de carga y función (43). Entre ellas encontramos los exosomas, estructuras compuestas de una bicapa lipídica, de un diámetro de entre 40 y 150 nm (44) y que pueden contener numerosos constituyentes celulares como proteínas (receptores, factores de transcripción, enzimas), lípidos y ácidos nucleicos (RNA y DNA) (45).

Aunque al principio se consideraba que el papel de los exosomas era la eliminación de los desperdicios celulares, se descubrió que su función más importante es la comunicación célula-célula y el intercambio de material. Con los años se han ido describiendo otras funciones como la estimulación de la respuesta inmunitaria, promover la reparación de los tejidos (43), o intervenir en la muerte celular, la angiogénesis o la inflamación (46).

1.2.2. Biogénesis

Los exosomas se generan a partir de dos invaginaciones de la membrana plasmática de la célula y de la formación de los cuerpos multivesiculares (MVB) que contienen vesículas intraluminales (ILV) (Figura 2) (47).

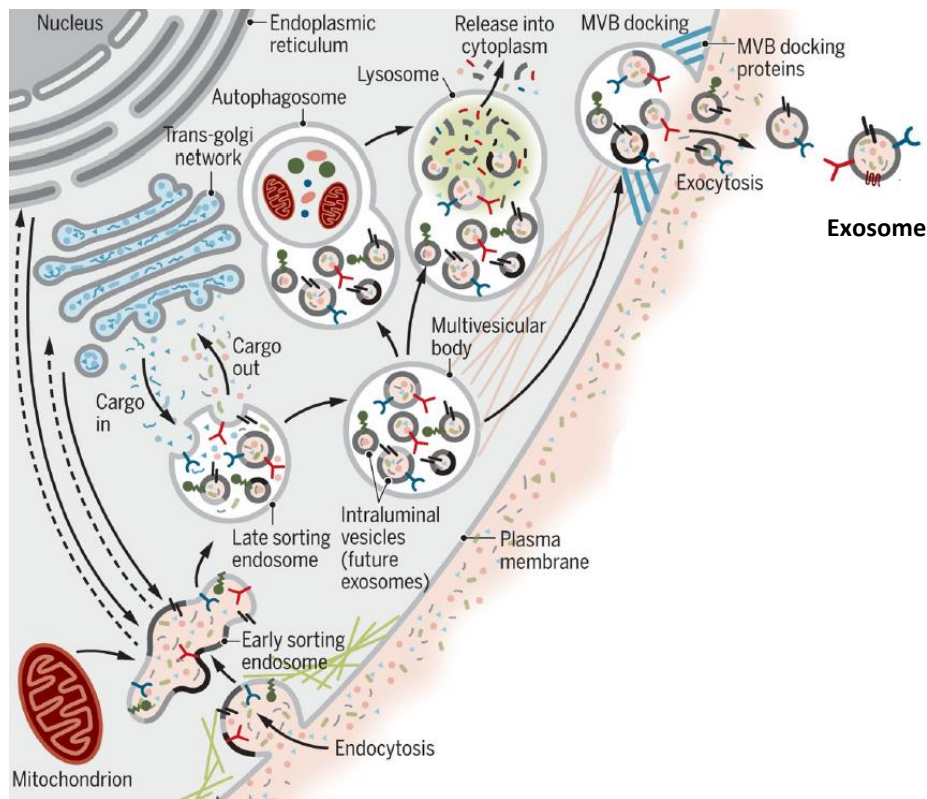


Figura 2. Biogénesis de los exosomas. Adaptado de Kalluri *et al.*, 2020 (47).

Primero se forman por endocitosis los endosomas tempranos, que se fusionan con vesículas endocíticas, adquiriendo su contenido y formando ILV en su interior. Posteriormente los endosomas son marcados o bien para ser reciclados por medio de vesículas de reciclaje o bien para transformarse en endosomas tardíos. Estos endosomas tardíos acumulan proteínas citosólicas, ácidos nucleicos y lípidos, transformándose en MVB. Finalmente los MVB son o marcados para ser degradados por los lisosomas o se fusionan con la membrana plasmática liberando su contenido, es decir, liberando esas ILV que son llamados exosomas cuando abandonan la célula (45,47,48).

1.2.3. Composición de los exosomas

Una vez liberados al espacio extracelular, los exosomas tienen especificidad para unirse a sus células diana gracias a los receptores que tienen en su membrana y al contenido

que poseen. Pueden unirse a células dendríticas, al epitelio del intestino, a neuronas y también a células presentes en el hígado, en los nodos linfáticos o en el pulmón, entre otras (49).

La composición de los exosomas es variada e incluye proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y distintos metabolitos (Figura 3) (47,50).

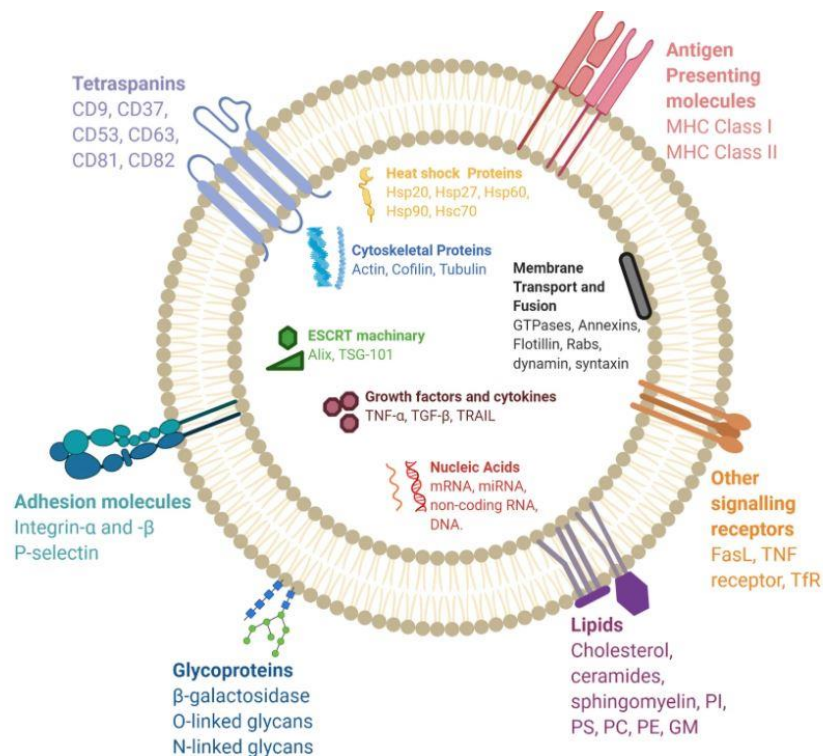


Figura 3. Composición de los exosomas. Gurung *et al.*, 2021 (50).

La mayoría de las proteínas se encuentran en la membrana y pueden ser tetraspaninas, el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I) y clase II (MHC II) (48), lectinas e integrinas que participan mayormente en los mecanismos de adhesión de los exosomas a las células diana (49). Los lípidos presentes son de membrana y pueden ser el colesterol, las esfingomielinas o las ceramidas, y se relacionan con la excreción de los exosomas al medio extracelular, la estructura y la señalización (50).

En cuanto a los ácidos nucleicos podemos encontrar DNA de cadena sencilla o de cadena doble (44) y distintos tipos de RNA, como el RNA mensajero (mRNA), el RNA ribosómico (rRNA), el RNA de transferencia (tRNA), el microRNA (miRNA) y otros RNA no codificantes (50,51). Sin embargo, el que más importancia está ganando es el miRNA por su funcionalidad y participación en distintos procesos (51). El miRNA es un tipo de RNA no

codificante de aproximadamente 22 nucleótidos que actúa como regulador post-transcripcional de la expresión génica (52). Los exosomas incorporan los miRNAs a través de proteínas como la hnRNPA2B1 y la hnRNPA1, que reconocen ciertos dominios de los miRNAs y los dirigen a los exosomas, de esta forma pueden ser liberados al medio extracelular y ser llevados a la célula diana para llevar a cabo su función (52). En los últimos años se han utilizado los miRNAs como marcadores de distintas enfermedades por su papel dentro de la diferenciación y proliferación celular en los tejidos, sobre todo en el cáncer, y por su relación con la metástasis, la carcinogénesis y la resistencia a los fármacos (53).

Además de estos miRNAs, el contenido de los exosomas ha sido ampliamente estudiado por las múltiples funciones con las que están relacionados en las células diana: procesos fisiológicos (homeostasis, estrés, envejecimiento, etc), inmunosupresión, enfermedades no infecciosas (cáncer, procesos neurodegenerativos, EPOC, etc) e infecciosas, entre otras (54). También se está investigando el uso terapéutico de los exosomas como vehículos de biomoléculas dirigidos a células dianas para tratar distintas enfermedades (55) o su posible uso en vacunas (Figura 4) (56).

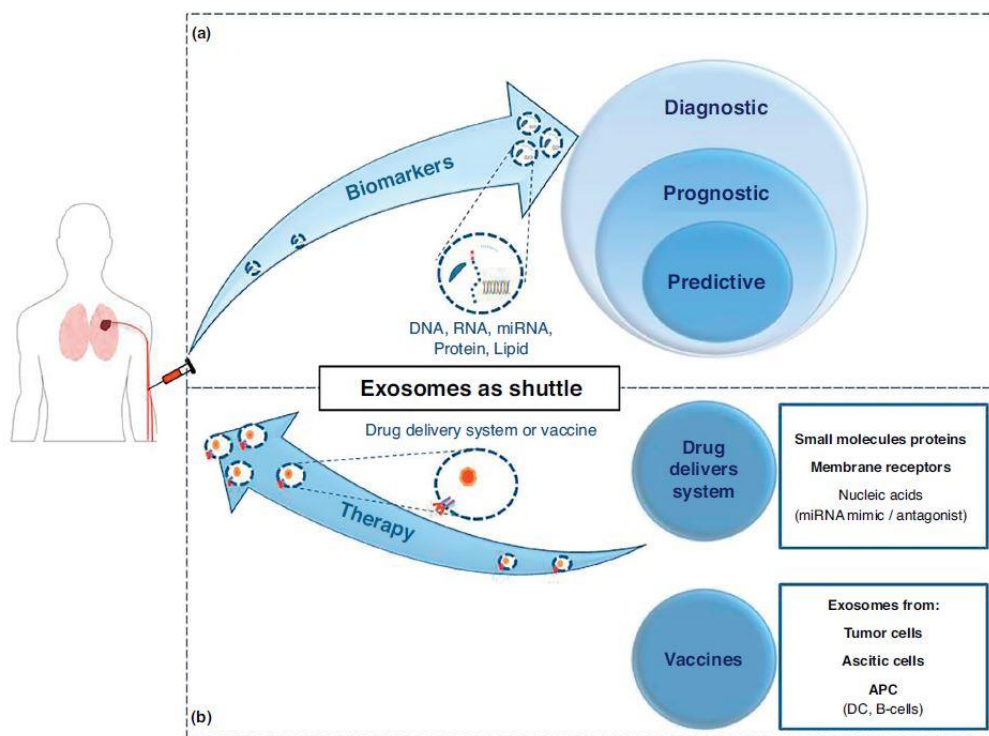


Figura 4. Aplicaciones potenciales de los exosomas en el cáncer de pulmón. Vanni *et al.*, 2017 (56).

1.2.4. Aislamiento de exosomas

Los exosomas se han encontrado en varios fluidos corporales como el plasma, la orina, el semen, la saliva, el fluido bronquial, el líquido cefalorraquídeo (LCR), la leche materna, el suero sanguíneo, el fluido amniótico, la bilis o el ácido gástrico (43). Puesto que en estos biofluidos hay una gran cantidad de moléculas que interfieren con el aislamiento de los exosomas, es importante encontrar una técnica que permita aislarlo de cualquier fluido, por lo que se han desarrollado algunas basadas en el tamaño, la densidad o las proteínas de superficie de los exosomas (57).

Las técnicas más conocidas son la ultracentrifugación, las técnicas basadas en el tamaño, la precipitación y la inmunoafinidad (58). La más ampliamente utilizada ha sido la ultracentrifugación (59), que consiste en la separación de los exosomas del resto de moléculas a través de fuerzas centrífugas de alta velocidad (alrededor de los 100000 g) y en el uso de tampón fosfato salino (PBS) para su conservación (57). Esta técnica también puede combinarse con una centrifugación en un gradiente de densidad de sacarosa, lo que permite una mejor purificación de los exosomas (60), pero que produce problemas de aislamiento en muestras procedentes de plasma (59). La ultracentrifugación es una técnica costosa en cuanto a tiempo y manejo y requiere de material caro, por ello han ido ganando fuerza otras técnicas (61). El aislamiento por tamaño, como la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), es una técnica rápida y fácil, pudiendo alcanzar purificaciones mayores, ya que está sometida a fuerzas mucho más débiles que la ultracentrifugación, aunque en ocasiones se forman agregados entre los exosomas y las distintas moléculas (57–59), y la tasa de aislamiento no es muy elevada, por lo que complica su uso en técnicas de análisis posteriores (43).

Otra de las técnicas prometedoras es la precipitación seguida de centrifugación a baja velocidad, que usa polímeros para facilitar la precipitación de los exosomas y después una centrifugación para eliminar cualquier otra molécula no deseada. Es una técnica rápida y simple, que dispone de varios kits comerciales como *Total Exosome Isolation Kit* (43), *Exo-Spin* (57) o *ExoQuick*, siendo este último kit tan bueno como la ultracentrifugación y prometedor en el contexto del análisis de RNA en los exosomas (61). Sin embargo, este método causa la precipitación de otras VE y proteínas, por lo que dificulta su uso en otras técnicas como la proteómica (43).

Para comprobar que la muestra aislada contiene exosomas, se requiere una combinación de varios métodos que lo confirmen, como la microscopía electrónica de transmisión (TEM) (62) o el análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) (63). También se pueden caracterizar los exosomas cuantificando la presencia de proteínas exosomales, como las tetraspaninas, mediante Western Blot (62). Por último, se cuantifican los exosomas presentes en una muestra por NTA, citometría de flujo u otras técnicas que basen la cuantificación en la relación entre el antígeno CD63 y su anticuerpo (64).

1.3. EXOSOMAS Y miRNAs EN EL CÁNCER DE PULMÓN

Los exosomas son liberados por todo tipo de células, pero se secretan en alta abundancia por las células tumorales, por lo que los exosomas aislados de los fluidos corporales pueden ser un potente biomarcador en el cáncer de pulmón (65) y su obtención representa una técnica menos invasiva que las actuales (66). Como muestra la Figura 5, los exosomas están relacionados con varias funciones del cáncer de pulmón, como la formación de células cancerosas, el crecimiento del tumor, la metástasis, la angiogénesis y la transición epitelial-mesenquimal (67).

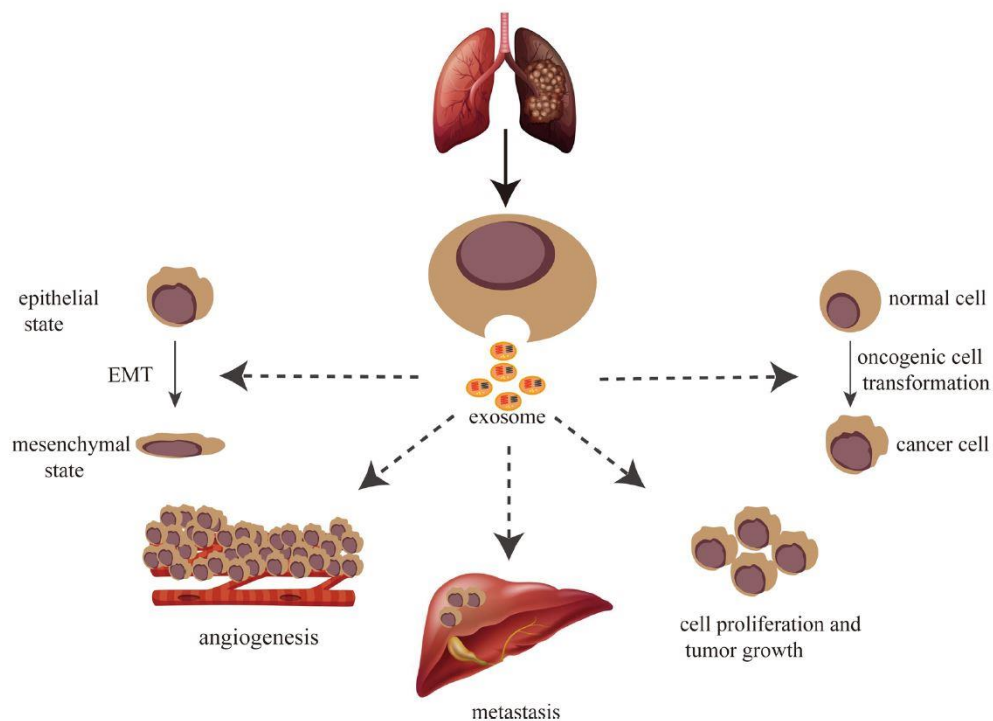


Figura 5. Funciones de los exosomas en el cáncer de pulmón. Xu *et al.*, 2021 (67).

De todas las moléculas que contienen los exosomas, las que más se han estudiado en el cáncer de pulmón son los miRNAs, ya que estos ácidos nucleicos se han relacionado con el inicio y la progresión del cáncer de pulmón (68,69), tanto de forma positiva como negativa, es decir, suprimiendo los tumores o favoreciendo la oncogénesis (70,71). Aunque aún se encuentra en estudio, según el biofluido utilizado para aislar los exosomas, se puede encontrar distinto perfil de miRNAs, como demostró el estudio de Rodríguez *et al.* (72).

1.3.1. miRNAs oncogénicos

Uno de los miRNAs más estudiados, respecto a su papel como miRNA oncogénico, es el *miR-21*, siendo uno de los primeros descritos en relación con distintos tipos de cáncer. Este miRNA está sobreexpresado en el cáncer de pulmón e implicado en la transición epitelial-mesenquimal, por lo tanto su aparición se relaciona con un mal pronóstico de la enfermedad (73), incluso se ha descubierto como biomarcador de la metástasis en el cerebro de este tipo de cáncer (74). En otro estudio realizado por Liu *et al.*, se analizaron un total de 84 miRNAs procedentes de exosomas, y se comprobaron que tres de ellos, *miR-23b-3p*, *miR-10b-5p* y *miR-21-5p*, podrían ser biomarcadores de la mala progresión del cáncer (75). Otro de los miRNAs asociados a un mal pronóstico es el *miR-4257*, cuya detección da, además, información sobre la histología del tumor y su estadio (65).

Otro de los miRNAs en estudio es el *miR-125b*, que tiene la función de favorecer la metástasis, inhibiendo la proteína p53 y beneficiando entonces el crecimiento del tumor al detener la actividad de ese tipo de proteínas supresoras de tumores (76). El estudio de Hsu *et al.* indicó que algunas zonas hipóxicas del cáncer de pulmón secretaban mediante exosomas el *miR-23a*, que aumentaba la angiogénesis y la permeabilidad vascular, permitiendo la migración del cáncer (77).

Hay algunos miRNAs que están relacionados con una larga exposición al tabaco como el *miR-124*, *miR-125*, *miR-140* o el *miR-146*, que provocan la activación de oncogenes y la inhibición de los genes supresores de tumores (78). Otros están implicados en la resistencia a los fármacos usados en la quimioterapia, como el *miR-96* (68).

1.3.2. miRNAs supresores de tumores

La familia *let-7* es un conjunto de miRNAs cuya función es la supresión de tumores y que a menudo se encuentra inhibida en el cáncer de pulmón (70). En un estudio llevado a cabo por Hong *et al.*, se comprobó que la expresión del *let-7* en el NSCLC se encontraba disminuida y que los pacientes que mostraban unos altos niveles de este tipo de miRNA tenían mejor pronóstico (79).

Otra familia importante es la de los *miR-34*, que participa en el ciclo celular y la apoptosis, y cuya inhibición causa la sobreexpresión de oncogenes. Son prometedores biomarcadores de la prognosis en varios tipos de cánceres además del cáncer de pulmón (80).

Finalmente, otros miRNAs también eran indicadores de un buen pronóstico, como el *miR-146a-5p* que facilitaba el tratamiento con fármacos, o el *miR-512* y el *miR-373* que retrasaban el crecimiento del tumor en pacientes que estaban siendo tratados con diferentes terapias (81).

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es optimizar el aislamiento de exosomas, tanto de tejido pulmonar como de muestras de sangre de pacientes con cáncer de pulmón y evaluar su potencial uso para la determinación de nuevos biomarcadores en el cáncer de pulmón. Para llevar a cabo este objetivo general, el planteamiento de trabajo y los objetivos específicos que se proponen para ambos tipos de muestra son los siguientes:

1. Optimizar la obtención, el procesamiento y la homogeneización de las muestras para su criopreservación.
2. Aislar exosomas a partir del homogeneizado pulmonar y el plasma mediante kits comerciales.
3. Caracterizar los exosomas aislados mediante tres métodos:
 - 3.1. Análisis de la morfología mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).
 - 3.2. Caracterización proteica de exosomas mediante ELISA.
 - 3.3. Cuantificación y estudio del tamaño mediante análisis de rastreo de nanopartículas (NTA).
4. Evaluar el contenido de RNA en las muestras de exosomas aislados mediante RNA-seq.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. SUJETOS DE ESTUDIO

Las muestras de este subestudio fueron seleccionadas a partir del estudio ExVeLP (*Extracellular vesicles from lung parenchyma*). Se analizaron un total de 10 muestras, 6 pertenecientes a pacientes con adenocarcinoma y 4 pertenecientes a pacientes intervenidos por otras patologías pulmonares y sin lesiones cancerosas. La elección de pacientes con adenocarcinoma se basó en que es el subtipo de cáncer de pulmón más común, con la frecuencia más alta y en aumento a lo largo de los años (82).

Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (CEICA 10/2020). De acuerdo con las recomendaciones de la Declaración de los Derechos Humanos, la Conferencia de Helsinki, la regulación institucional local, las buenas prácticas clínicas (BPC) y las buenas prácticas de laboratorio (BPL), todos los participantes en el estudio cumplieron el correspondiente consentimiento informado antes de comenzar.

3.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PRIMARIAS Y CRIOPRESERVACIÓN

Las muestras de tejido pulmonar fueron obtenidas a partir del Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS), con un tamaño de 2 cm² y extraídas a partir de la zona pulmonar más alejada de la zona cancerosa. Estas muestras fueron llevadas inmediatamente al laboratorio para comenzar su procesamiento.

Las muestras de sangre fueron recogidas en tubos BD Vacutainer K2E (EDTA; 367525) y BD Vacutainer SST™ II Advance (367953).

3.2.1. Tejido pulmonar

El fragmento de tejido pulmonar de cada sujeto se dispuso sobre una placa Petri y se cortó en pequeños trozos con la ayuda de unas tijeras y pinzas, previamente esterilizadas. Los pequeños segmentos se dividieron e introdujeron en dos eppendorf de 5 ml y fueron criopreservados a -80 °C.

3.2.2. Plasma

Las muestras de sangre recogidas de cada sujeto se centrifugaron a 3000 g durante 15 minutos y posteriormente se tomaron alícuotas de las tres fases separadas: 4 alícuotas de 600 µl de plasma, 2 alícuotas de 600 µl de la capa de células roja y 1 alícuota de volumen similar de la capa leucocitaria. Las muestras fueron criopreservadas a -80 °C.

3.3. HOMOGENEIZADO DEL TEJIDO PULMONAR

Para poder obtener un medio líquido a partir del tejido sólido fue necesario realizar el homogeneizado mediante enzimas digestivas.

Para cada sujeto, se descongeló la muestra de tejido pulmonar y posteriormente se pesó en una báscula para obtener el peso en gramos y así calcular el volumen de digestión, compuesto por el medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose*, Gibco® Thermo Scientific™) y tres enzimas digestivas: colagenasa, dispasa y DNAsa.

Una vez preparado, se comenzó a manipular la muestra de tejido sólido, empezando por un lavado con PBS (*Phosphate Buffered Saline* pH 7.4 (1x), Gibco® Thermo Scientific™) para eliminar la sangre adherida a la superficie del tejido. Posteriormente, en una placa Petri, se sumergió la muestra de tejido pulmonar en medio DMEM junto con la mitad del volumen de digestión preparado y se cortó con unas tijeras esterilizadas hasta conseguir fragmentos muy pequeños que faciliten la digestión. El volumen resultante se recogió con una pipeta y se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml. Sobre la placa Petri se añadió el resto de volumen de digestión restante para recoger todos los posibles restos de tejido sólido y finalmente se recogió con la pipeta y se trasvasó al tubo Falcon llenado anteriormente. El volumen final se homogeneizó con la pipeta dos o tres veces, se mezcló por inversión y se llevó a incubar en agitación a 37 °C durante 1 hora para dejar que las enzimas lleven a cabo su función.

Tras la primera incubación, se volvió a mezclar por inversión el contenido del Falcon y se dejó de nuevo incubar durante 1 hora a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se neutralizó la reacción enzimática con medio DMEM suplementado con B27 (1%) (*DMEM high glucose*, Gibco® Thermo Scientific™; B-27 Supplement (50X), Gibco® Thermo Scientific™), con el mismo volumen utilizado en la mezcla de digestión. Se pasó el

volumen resultante por un tamiz celular (Tamiz celular 100 µm, Labbox Labware) para eliminar cualquier resto sólido no digerido (normalmente partes fibrosas del fragmento pulmonar) y se centrifugó a 210 g durante 5 minutos a 4 °C, tras lo cual se descartó el pellet y el sobrenadante se alicuotó en volúmenes de 1.5 ml para su criopreservación a -80 °C.

3.4. AISLAMIENTO DE EXOSOMAS MEDIANTE KITS COMERCIALES

Se seleccionaron dos kits comerciales para el aislamiento de exosomas, *ExoQuick-TC® Exosome Precipitation Solution* (System Biosciences) para el aislamiento en tejido pulmonar y *miRCURY Exosome Serum/Plasma* (QIAGEN) para el aislamiento en plasma. Para cada sujeto se prepararon varios viales de aislamiento de exosomas para tenerlos disponibles para usos como los descritos en el apartado 3.5.

3.4.1. Aislamiento de exosomas de tejido pulmonar mediante el kit comercial *ExoQuick-TC® Exosome Precipitation Solution*

Se descongelaron las muestras criopreservadas del apartado 3.3 y se centrifugó a 2000 g durante 20 minutos y a 20 °C. Se descartó el pellet y se trasvasó el sobrenadante a un nuevo eppendorf de 1.5 ml, el cual se centrifugó a 10000 g durante 20 minutos y a 20 °C. El pellet se descartó de nuevo y 1 ml del sobrenadante se trasvasó a un nuevo eppendorf de 1.5 ml.

Las sucesivas centrifugaciones permitieron descartar otras células y quedarnos con las vesículas extracelulares y otros contenidos celulares. Para hacer precipitar los exosomas se usó el kit *ExoQuick-TC® Exosome Precipitation Solution* que contiene un reactivo de precipitación. Se añadieron 200 µl del reactivo a 1 ml de sobrenadante recogido anteriormente, y, como el reactivo es denso, se agregó lentamente para que ambos se mezclasen correctamente, además de vortearlo durante 5 segundos. La mezcla se introdujo inmediatamente en hielo y fue llevada a refrigeración a 4 °C durante toda la noche, ya que el reactivo necesita una incubación de al menos 12 horas.

Pasado el periodo de incubación, se centrifugó a 10000 g durante 75 minutos a 4 °C. El reactivo permite que los exosomas precipiten y queden en el pellet, por lo que se retiró el sobrenadante con cuidado de no remover el pellet depositado sobre el fondo del eppendorf. En caso de que quedasen gotas adheridas en la pared o cercanas al pellet,

se centrifugó a 1000 g durante 5 minutos y se eliminaron después. Para resuspender el pellet se usaron 200 µl de PBS 1x previamente filtrado través de unidades de filtración Millex®-GV de 0,22 µm PVDF (Merck Millipore) para eliminar fragmentos cristalizados de las sales y evitar la aparición de precipitados finales. La mezcla final se congeló a -20 °C.

3.4.2. Aislamiento de exosomas de plasma mediante el kit comercial *miRCURY Exosome Serum/Plasma*

De acuerdo con los pasos indicados en el kit *miRCURY Exosome Serum/Plasma*, se preparó primero la trombina que se usó en este mismo. Para preparar 500 U/ml de la solución de trombina, se añadieron 400 µl del buffer para trombina a la trombina liofilizada. Tras su incubación a temperatura ambiente (TA) durante 1 minuto, se mezcló por inversión suavemente y se alicuotó y congeló a -20 °C para evitar procesos de congelación y descongelación. Estos viales se pueden mantener durante aproximadamente 6 meses.

Para cada sujeto, se descongeló una de las muestras de plasma preparadas según se ha indicado en el *apartado 3.2.2*. Se centrifugó a 2000 g durante 5 minutos a TA, se descartó el pellet y el sobrenadante se pasó a un nuevo eppendorf. Se volvió a centrifugar a 10000 g durante 20 minutos a TA, tras lo cual se trasvasó el sobrenadante a un nuevo eppendorf. Con esto se eliminaron restos celulares no deseados y se mantuvieron los exosomas entre otros contenidos celulares.

Posteriormente, se adicionó 6 µl de la solución de trombina a los 600 µl de plasma resultantes tras las centrifugaciones, se mezcló e incubó durante 5 minutos a TA. Después de la incubación, se centrifugó a 10000 g durante 5 minutos a TA, tras lo cual se descartó el pellet y 500 µl de sobrenadante se transfirieron a un nuevo eppendorf de 1.5 ml. A este nuevo vial se le añadieron 200 µl de buffer de precipitación A (almacenado en nevera a 4 °C), se mezcló el contenido y se vorteoó durante 5 segundos, para guardarlo inmediatamente en hielo y mantenerlo en refrigeración a 4 °C durante 1 hora, manteniendo de esta forma la temperatura a la que inicialmente estaba el buffer usado.

Tras la incubación, se centrifugó a 500 g durante 5 minutos a TA y se descartó el sobrenadante, y, si fuera necesario, se repitió la centrifugación para eliminar cualquier

gota restante de sobrenadante, dejando el pellet completamente libre de líquido. Por último, se añadieron 270 µl de PBS 1x previamente filtrado para eliminar sales cristalizadas, se vorteo la solución y se congeló a -20 °C.

3.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS EXOSOMAS

La caracterización de exosomas de tejido pulmonar o plasma se realizó mediante técnicas para analizar su morfología, tamaño, y concentración. Las muestras utilizadas fueron las preparadas según los *apartados 3.4.1 y 3.4.2*.

3.5.1. Análisis de la morfología por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La morfología de los exosomas aislados de ambos tipos de muestra fue analizada mediante TEM, según la metodología descrita por Lässer *et al.* (62). Los exosomas fueron fijados sobre una capa de Parafilm con glutaraldehído al 2.5% y lavados con agua desionizada, se tiñeron con acetato de uranilo al 2% y fueron adsorbidos en metilcelulosa al 0.13% y acetato de uranilo al 0.4%. Para la visualización de los exosomas se utilizó el microscopio electrónico de transmisión con un filamento de LaB₆ *Tecnai T20* (FEI Company) del Instituto Universitario de Nanociencia de Aragón (INA). El voltaje de trabajo fue de 200 KV y se utilizó una cámara CCD 2K x 2K Veleta (Olympus).

3.5.2. Caracterización proteica de exosomas mediante ELISA

Se realizó un ensayo ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) para cuantificar los exosomas presentes en las muestras procesadas de tejido pulmonar y plasma. Esto se llevó a cabo mediante el kit comercial *ExoELISA-ULTRA CD63* (System Biosciences).

Para comenzar el ensayo, se realizó la curva estándar del experimento, para lo cual fue necesario hacer diluciones seriadas de la proteína *ExoELISA-ULTRA protein standard*. Primero se preparó una dilución 1:1000 de la proteína *ExoELISA-ULTRA protein standard* (1 µl en 1 ml de *Coating Buffer*) y a partir de ella las seis diluciones siguientes como se indica en la Tabla A.1 del Anexo I. Se escogió el blanco y tres diluciones de las sugeridas en el protocolo (2, 4 y 6) (Tabla A.1 del Anexo I) para obtener la recta de calibrado (Figura A.1 del Anexo I).

Previamente a la carga de las muestras de aislamiento de exosomas de tejido pulmonar o plasma, se midió la cantidad de proteína presente mediante el espectrofotómetro de

microvolúmenes *NANODROP 2000c* (Thermo Fisher Scientific) para preparar 100 µg de proteína total. El volumen de muestra total preparada fue de 60 µl, para lo cual se calcularon los µl necesarios de las muestras del aislamiento y se completó el volumen con *Coating Buffer*. Sobre cada pocillo de la placa microtituladora se cargaron 50 µl de las muestras preparadas y de las diluciones indicadas anteriormente, se cubrió la placa y se mantuvo en incubación durante 1 hora a 37 °C para que los exosomas quedasen fijados en el fondo de los pocillos. Posteriormente se vaciaron los pocillos por inversión, se lavó la placa con *Wash Buffer* 3 veces durante 5 minutos cada una, y se añadió a cada pocillo 50 µl del *Anti-CD63 Primary Antibody* (previamente diluido 1:100). La placa se incubó durante 1 hora con agitación a TA y se lavó de nuevo con *Wash Buffer* 3 veces durante 5 minutos cada una, tras lo cual se añadieron 50 µl a cada pocillo del anticuerpo secundario *Horseradish Peroxidase (HRP)-conjugated Secondary Antibody*, repitiendo el lavado con *Wash Buffer*. Finalmente se añadieron 50 µl del sustrato colorimétrico *Super-sensitive Tetramethylbenzidine (TMB) ELISA* y tras una incubación de 10 minutos, se añadieron 50 µl del tampón de parada de la reacción o *Stop buffer*. La placa se leyó inmediatamente en el lector de placas *Synergy™ HT* (Biotek) a 450 nm.

3.5.3. Cuantificación y análisis del tamaño de los exosomas mediante análisis de rastreo de nanopartículas (NTA)

Para una cuantificación específica de los exosomas aislados y una determinación del tamaño, se utilizó el análisis de rastreo de nanopartículas (NTA). Se basa en las propiedades de la dispersión de la luz mediante la incidencia de un rayo láser (405 nm) y en el movimiento browniano. El instrumento utilizado fue *NanoSight NS300* (Malvern Panalytical).

Las muestras de plasma o tejido pulmonar fueron diluidas 1:1000 en una solución de PBS y EDTA para evitar la agregación de las partículas y garantizar una mejor visualización. Con una jeringa se inyectaron 1000 µl de la disolución en la placa del analizador. Por cada muestra, se tomaron cinco vídeos de 1 minuto, en los que se realizó el seguimiento de muchas partículas individualmente. Esto permitió obtener varias mediciones del tamaño, el movimiento de las partículas y su concentración, generando gráficos representativos y cálculos matemáticos (media, moda, desviación y error estándar). Las mediciones se realizaron a 25 °C y con una velocidad de flujo de 50 µl/s,

fueron captadas por la cámara sCMOS y analizadas por el software *NanoSight NTA 3.4 Build 3.4.003*, con un umbral de detección de 3 que permitió diferenciar entre el ruido de fondo y los exosomas.

3.6. EXTRACCIÓN DE RNA

Se realizó una extracción del RNA presente en las muestras de exosomas aislados de tejido pulmonar y plasma mediante el kit comercial *miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit* (QIAGEN). Antes de llevar a cabo el protocolo, se limpió la superficie de trabajo y los materiales con etanol para evitar la degradación de los ácidos nucleicos de las muestras.

Primero, 200 μ l de las muestras de exosomas aislados se mezclaron con 60 μ l de *buffer RPL*, se vorteoó el tubo y se incubó durante 3 minutos a TA. Después, se añadieron 20 μ l de *buffer RPP*, se vorteoó durante 30 segundos y se incubó durante 3 minutos a TA. Inmediatamente, se centrifugó a 12000 g durante 3 minutos a TA y se descartó el pellet, transfiriendo el sobrenadante a un nuevo tubo y añadiéndole 250 μ l de isopropanol. Tras mezclarlo vigorosamente, el contenido de este se pasó a una columna *RNeasy UCP MinElute*, previamente colocada sobre un tubo colector. Se centrifugó a 8000 g durante 15 segundos y se descartó el eluido, para posteriormente adicionar 700 μ l de *buffer RWT*, volver a centrifugar y descartar el eluido, y finalizar añadiendo 700 μ l de *buffer RPE* y repitiendo los pasos de centrifugado y descarte del eluido. A continuación, se adicionaron 500 μ l de etanol al 80%, se centrifugó a 8000 g durante 2 minutos y se descartó el eluido y el tubo colector. La columna se colocó en un nuevo tubo colector y se realizó una centrifugación a 10000 g durante 5 minutos, tras lo cual se descartó el eluido y se transfirió la columna a otro nuevo tubo colector para evitar la mezcla del eluido final con eluidos anteriores. Finalmente se añadieron 20 μ l de agua libre de RNAsas sobre la columna, se incubó durante 1 minuto y se centrifugó a 10000 g durante 1 minuto. El RNA aislado quedó finalmente en el tubo colector y este se almacenó a -80 °C.

3.7. ANÁLISIS DEL RNA

El RNA aislado en el *apartado 3.6* fue mandado al Servicio de Secuenciación de RNA exosomal de System Bioscience (SBI), en Palo Alto, EEUU, para realizar el análisis de secuenciación RNA sequencing (RNA-seq). El RNA-seq es una técnica de secuenciación

de segunda generación (*Next Generation Sequencing, NGS*) que permitió detectar y cuantificar los distintos tipos de RNA presentes en las muestras de tejido pulmonar y plasma, pudiendo observar las diferencias entre pacientes con cáncer y sin cáncer, y entre el tejido sólido y el biofluido.

La técnica de RNA-seq para RNA exosomal llevada a cabo en SBI consta de varios pasos. Primero se preparó una librería, en la que los diferentes RNAs aislados fueron convertidos a DNAs complementario (cDNAs) mediante una transcriptasa reversa usando cebadores o *primers* al azar. Después, se añadieron adaptadores a los cDNAs, que contienen regiones conocidas para permitir la amplificación mediante PCR y la secuenciación masiva. El análisis de los datos permitió alinear las secuencias obtenidas a transcriptomas de referencia, identificando y cuantificando los distintos tipos de RNA. La técnica empleada por SBI introduce unas modificaciones para minimizar los posibles artefactos, es decir, aquellas secuencias, como los adaptadores introducidos, que puedan alterar el análisis e identificación de RNA de muestras que contienen pequeñas cantidades de RNA.

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El tamaño de los exosomas se representó como moda, media y sus correspondientes errores estándar, aunque la moda fue el parámetro elegido para explicar los resultados por las pocas variables de estudio (cinco). Para la comparación de las concentraciones de exosomas en pacientes con y sin cáncer se utilizaron las pruebas *t de Student* (paramétrica, *t Student*; no paramétrica, *Mann-Whitney test*) para estudiar la existencia de diferencias significativas en ambos grupos. El valor de probabilidad o *p-valor* inferior a 0.05 se consideró estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

Para los cálculos estadísticos y la generación de gráficos se utilizó el programa *GraphPad Prism 8.4.3*, y para el análisis y la comprensión de datos genómicos de alto rendimiento se utilizó el programa *Bioconductor de R statistical analysis software*.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. SUJETOS DE ESTUDIO

Se seleccionaron 6 pacientes con adenocarcinoma y 4 pacientes control con otras patologías pulmonares no cancerosas. En cada paciente, se analizaron 2 muestras, una perteneciente al plasma y otra al tejido pulmonar, haciendo un total de 20 muestras. En la Tabla A.2 del Anexo II se recogen algunas de las variables clínicas de interés de los sujetos participantes en este subestudio. Todos los sujetos tenían valores del índice de masa corporal (BMI) dentro de los fisiológicos (peso normal y sobrepeso) (83) y tenían una función pulmonar normal, con valores en la espirometría de $\geq 80\%$ en la capacidad vital forzada (FVC) y el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1), y $\geq 70\%$ en el ratio FEV1/FVC en casi todos los casos (84).

4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS EXOSOMAS

Los exosomas fueron caracterizados mediante tres métodos distintos para comprobar que de las muestras de tejido pulmonar y plasma se estaban aislando estas vesículas extracelulares.

4.2.1. Análisis de la morfología por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se visualizaron exosomas en las muestras analizadas, y puesto que, en las muestras se observaron morfologías y tamaño similares, se escogieron dos imágenes representativas de la TEM (Figura 6).

Se encontraron exosomas de diferentes tamaños en todas las muestras, desde 40 nm a 150 nm aproximadamente. La morfología que adoptaron los exosomas fue cóncava, ya que su forma esférica característica desapareció por la deshidratación intensa a la que se vieron sometidos durante la tinción negativa. Para evitar la modificación de la morfología se podría recurrir a la criomicroscopía electrónica (46). Tanto el rango de tamaños como la morfología descritos son similares a los encontrados en otros estudios de aislamiento de exosomas en plasma (85) o en líneas celulares (86).

En todas las imágenes se observaron restos en el fondo o *background*, probablemente por los residuos de los reactivos precipitantes de los kits comerciales *ExoQuick-TC*[®]

Exosome Precipitation Solution y *miRCURY Exosome Serum/Plasma*, quedando estos en la muestra final.

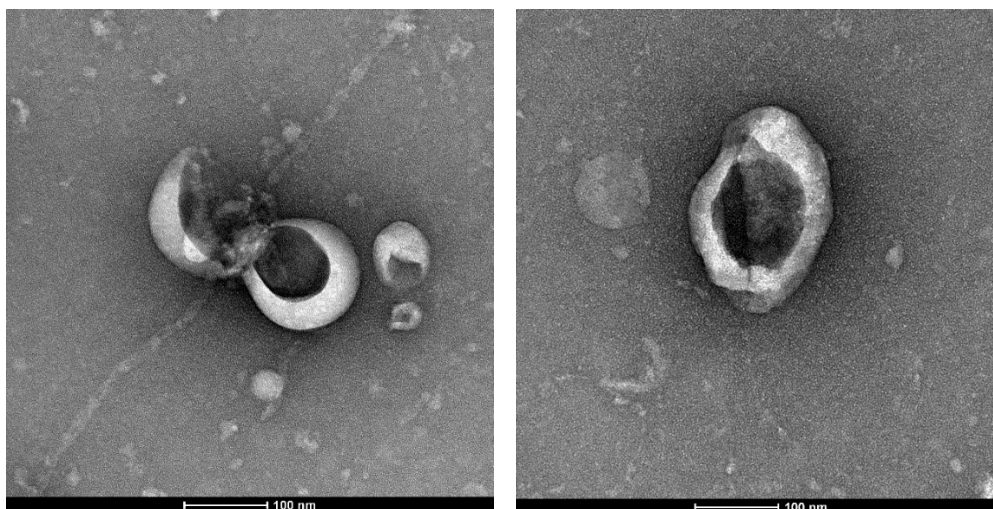


Figura 6. Morfología y tamaño de los exosomas visualizados mediante TEM. La escala aparece en el margen inferior de cada imagen.

4.2.2. Caracterización proteica de exosomas mediante ELISA

Para determinar la presencia de exosomas, se analizó mediante ELISA la presencia de la tetraspanina CD63, una proteína localizada en la superficie de los exosomas que es considerada uno de los marcadores exosomales más usados (61). Por ello, se asume que la cuantificación de la proteína CD63 se correlaciona con la abundancia de exosomas presentes en las muestras de tejido pulmonar o plasma. Se analizaron 8 muestras de pacientes con cáncer, 4 muestras de exosomas aislados de tejido pulmonar y 4 muestras de exosomas aislados de plasma.

Las absorbancias de las muestras medidas a 450 nm se interpolaron en la recta de calibrado del ensayo (Figura A.1 del Anexo I) para conocer la abundancia de exosomas en estas (Tabla 1).

Tabla 1. Cuantificación de exosomas en las muestras de tejido pulmonar y plasma analizadas mediante ELISA. Se muestra la absorbancia y la abundancia de exosomas de cada muestra.

	Tejido pulmonar				Plasma			
Absorbancia a 450 nm	0.144	0.140	0.127	0.105	0.142	0.143	0.182	0.162
Abundancia de exosomas	$1.79 \cdot 10^9$	$1.74 \cdot 10^9$	$1.57 \cdot 10^9$	$1.28 \cdot 10^9$	$1.77 \cdot 10^9$	$1.78 \cdot 10^9$	$2.29 \cdot 10^9$	$2.03 \cdot 10^9$

En todas las muestras analizadas se pudo detectar una abundancia de exosomas cuantificable, entre $1.57 \cdot 10^9$ y $2.29 \cdot 10^9$. Las concentraciones de las muestras procedentes de tejido pulmonar y plasma no fueron muy diferentes entre sí.

Sin embargo, aunque esta técnica es cuantitativa, en este estudio se ha utilizado como técnica cualitativa para comprobar si las muestras de aislamiento presentan exosomas o no, ya que la técnica de análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) es una técnica más sensible para medir la concentración en muestras biológicas complejas (87), como el plasma o el tejido pulmonar usados en este estudio. Por lo tanto, con la técnica ELISA se ha demostrado la presencia de exosomas a partir de los protocolos de aislamiento de exosomas.

4.2.3. Cuantificación y análisis del tamaño de los exosomas mediante análisis de rastreo de nanopartículas (NTA)

Mediante NTA se analizó el tamaño y la cuantificación de los exosomas aislados. Esta técnica se seleccionó porque es de los métodos más usados para obtener ambos análisis, ya que otras metodologías como la dispersión dinámica de luz (*Dynamic light scattering*) utiliza también el movimiento browniano para calcular los datos pero presenta la limitación de generar solo un análisis del tamaño de los exosomas y no de su concentración (88). Además, el NTA es capaz de medir partículas de hasta 30 nm, evitando las limitaciones de otras técnicas como la citometría de flujo, que no mide partículas de menos de 300 nm (89). Se analizaron 10 muestras procedentes de tejido pulmonar.

En la Figura A.2 del Anexo III se muestra una imagen de los vídeos capturados por el software *NanoSight NTA 3.4 Build 3.4.003*, a partir de los cuales el programa calculó el tamaño de las distintas partículas que visualizó y la concentración de la muestra introducida.

4.2.3.1. Tamaño de los exosomas

Respecto al tamaño, todas las muestras tenían resultados parecidos, por lo que se escogió una de las muestras como representativa de las demás. En la Tabla 2, se especifican la media, la moda, la desviación estándar (SD) y los percentiles D10, D50 y D90, con sus correspondientes errores estándar (SE).

Tabla 2. Parámetros matemáticos del cálculo del tamaño de las partículas de las muestras. Realizado mediante el software *NanoSight NTA 3.4 Build 3.4.003*. Se representa cada parámetro y los correspondientes errores estándar (SE).

Media	164.9 ± 1.2 nm
Moda	119.3 ± 9.3 nm
Desviación estándar (SD)	82.0 ± 1.4 nm
D10	99.0 ± 0.7 nm
D50	140.3 ± 2.2 nm
D90	262.8 ± 1.8 nm

Como se pudo ver en la Figura A.2 del Anexo III, las muestras presentan vesículas extracelulares de diversos tamaños, visible también en las Figuras A.3, A.4 y A.5 del Anexo III. Dado que se realizaban solo cinco mediciones por cada muestra, se escogió la moda y no la media como medida representativa del conjunto de datos. La moda de 119.3 nm está dentro del rango de medida de los exosomas descrito en la bibliografía (90), y además coincidió con las mediciones obtenidas en la técnica TEM, descritas en el *apartado 4.2.1*. Según la Figura A.4 y A.5 del Anexo III, se vieron picos y puntos correspondientes a varias medidas, respectivamente, predominando el rango entre 90 y 120 nm. Los puntos o picos observados fuera de este rango y superiores a 200 nm se debieron seguramente a otras vesículas extracelulares de mayor tamaño o a restos de reactivos de los kits comerciales utilizados en el aislamiento de los exosomas. Los percentiles de la Tabla 2 también indicaron un rango de medidas similar a las representadas en las Figuras A.4 y A.5 del Anexo III.

4.2.3.2. Concentración de los exosomas

En relación con la concentración de exosomas, por cada muestra se obtuvo un valor expresado en VE/ml (Tabla A.3 del Anexo III), a partir del cual se generó la Figura 7 para observar la diferencia entre las muestras de tejido pulmonar en pacientes con cáncer y pacientes control.

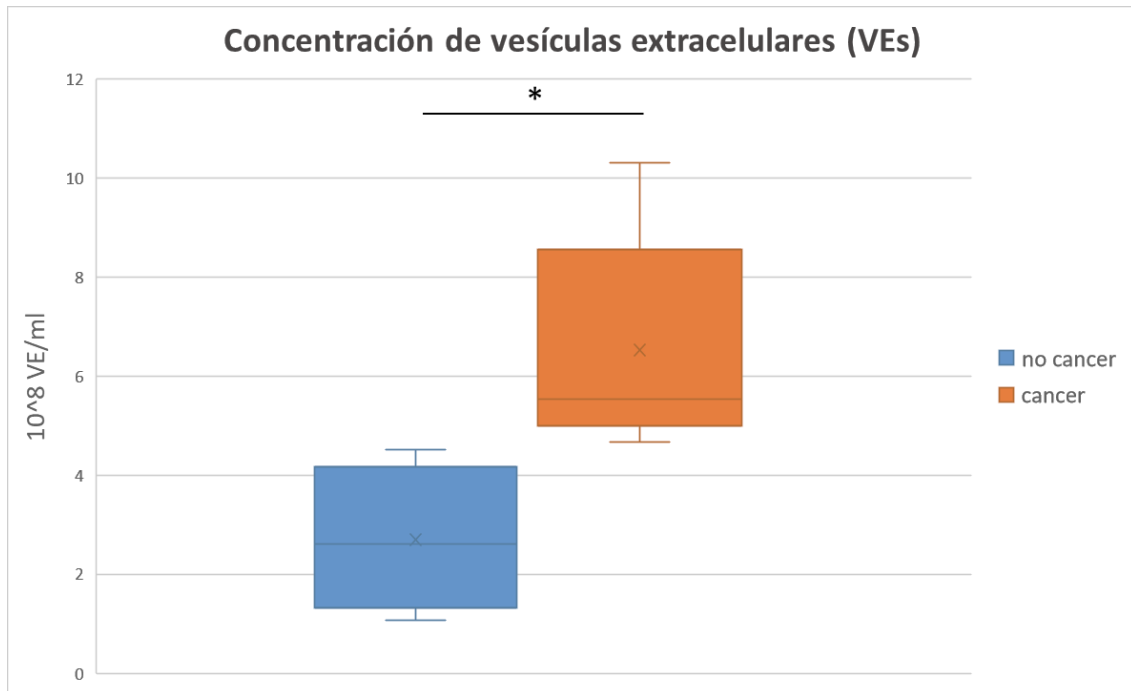


Figura 7. Concentración de las vesículas extracelulares en pacientes con cáncer de pulmón y pacientes control sin cáncer. Las concentraciones fueron generadas a partir del software *NanoSight NTA 3.4 Build 3.4.003* de *NanoSight NS300*. * $p < 0.05$

Las concentraciones de exosomas en pacientes control se situaron entre $1.07 \cdot 10^8$ y $4.51 \cdot 10^8$ VE/ml, mientras que en pacientes con cáncer de pulmón fueron de entre $4.67 \cdot 10^8$ y $10.3 \cdot 10^8$ VE/ml. Las concentraciones medidas estaban prácticamente dentro del rango sugerido como óptimo para las mediciones mediante NTA, que va desde $2 \cdot 10^8$ a $20 \cdot 10^8$ partículas/ml, ya que concentraciones mayores pueden indicar que sea necesario diluir más la muestra (91). Dragovic *et al.* demostró que la técnica NTA era más precisa en las mediciones de concentración por ser capaz de detectar vesículas más pequeñas (30-50 nm) que otros métodos (87).

Se pudo observar que en los pacientes con cáncer de pulmón la cantidad de exosomas que había en el tejido pulmonar era mayor, con cifras superiores a las encontradas en los pacientes sin cáncer (Figura 7). Se ha visto que los exosomas son liberados en mayor número por las células tumorales (92,93), por la necesidad que tienen este tipo de células de cambiar el microambiente que les rodea y hacerlo más apto para la progresión tumoral (94). Se espera que la cantidad de exosomas aislados en los pacientes con cáncer sea el doble (44) o incluso diez veces más que en pacientes sanos (95), algo que en este estudio se comprobó, ya que las concentraciones de exosomas alcanzadas por

los pacientes con cáncer de pulmón fueron mayores, e incluso esas 10 veces más ($1.07 \cdot 10^8$ VE/ml en un paciente sin cáncer frente a $10.3 \cdot 10^8$ VE/ml en otro paciente con cáncer de pulmón). Por ello, los exosomas representan un potencial biomarcador en el cáncer de pulmón, ya que su mayor concentración implica su posible uso como herramienta para detectar la progresión del cáncer (96) e incluso han comenzado a estudiarse terapias para reducir la liberación excesiva de exosomas y de esta forma limitar el avance del cáncer (97).

4.3. ANÁLISIS DEL RNA

El RNA aislado de las muestras de exosomas de tejido pulmonar y plasma, y analizado mediante RNA-seq, permitió conocer la concentración y los perfiles de los distintos tipos de RNAs de cada muestra. Se utilizaron 20 muestras para el análisis, 10 muestras de tejido pulmonar y 10 muestras de plasma, de pacientes con y sin cáncer. Todas las muestras pasaron los controles de calidad del RNA llevados a cabo mediante *Bioanalyzer*.

4.3.1. Cantidad total de RNA

En la Tabla A.4 del Anexo IV se indican las concentraciones obtenidas de cada paciente y tipo de muestra. El RNA aislado de las muestras de tejido pulmonar fue muy superior al aislado en las muestras de plasma (3.1-7.9 ng de RNA en plasma frente a 5.4-37.7 ng de RNA en tejido pulmonar). En las muestras de plasma, los pacientes con cáncer tenían concentraciones ligeramente superiores de RNA respecto a los pacientes control, sin embargo, la mayor diferencia se observó en las muestras de tejido pulmonar, donde las concentraciones de RNA en pacientes con cáncer eran notablemente mayores. Esto podría implicar que en el tejido pulmonar haya mayor cantidad de unos determinados tipos de RNAs que estén sobreexpresados y puedan servir de biomarcadores de la enfermedad.

4.3.2. Tipos de RNA

Del análisis del RNA-seq se obtuvieron los distintos tipos de RNAs por cada muestra de tejido pulmonar y plasma (Figura A.6 y A.7 del Anexo IV). Los porcentajes de lecturas con éxito de todas las muestras rondaron el 60-85%, por lo que el porcentaje de lecturas

fallidas fue bajo y se comprobó la apta calidad de las muestras (Figuras A.8 y A.9 del Anexo IV).

Las principales diferencias se encontraron en los tipos de RNAs y secuencias no codificantes entre el tejido pulmonar y el plasma (Figura A.6 y A.7 del Anexo IV). En las muestras de tejido pulmonar se vio una clara predominancia, de aproximadamente el 50-70%, del RNA de transferencia (tRNA) o estructuras similares a este (tRNA-like), mientras que en las muestras de plasma predominó el microRNA (miRNA) con un 25-50%. En otros estudios también se observó que en el aislamiento de RNA exosomal de plasma el contenido de miRNAs era uno de los mayoritarios en pacientes sanos y con distintos tipos de cáncer. El análisis llevado a cabo por Huang *et al.* indicó que el contenido de miRNAs en pacientes sanos era del 76% (98), Zhu *et al.* mostró que el contenido en miRNAs de células procedentes de cáncer de hígado era del 22% (99), mientras que Yuan *et al.* observó un 40% de miRNAs en distintos tipos de cáncer y pacientes sanos (100).

En un análisis más detallado de los tipos de RNAs obtenidos y sus copias, se comprobaron las diferencias entre el pulmón y plasma en pacientes con y sin cáncer (Tabla 3).

Tabla 3. Subtipos diferenciales de RNA pequeños (miRNA, tRNA y lincRNA) en pulmón y plasma en pacientes con cáncer pulmonar y en pacientes control sin cáncer. *p < 0.05

Subtipo diferencial de RNA pequeño *		
Subtipo de RNA pequeño	Pulmón Cáncer vs control	Plasma Cáncer vs control
miRNA	0	0
tRNA	34	0
lincRNA	1	16

Se esperaba que hubiera diferencias significativas en la expresión de los miRNAs tanto de plasma como pulmón, ya que se han estudiado gran cantidad de estos en el cáncer de pulmón por su relación con la progresión y el diagnóstico, como el *miR-21* o *miR-34* (80), pero el número reducido de muestras analizadas podría haber complicado la obtención de estas diferencias significativas. Lo que se observó fueron diferencias entre los tRNAs y los RNAs largos intergénicos no codificantes (lincRNA), ampliamente descrito

el primero y menos el segundo. Los lincRNAs son RNAs no codificantes de 200 nucleótidos o más que están relacionados con el plegamiento de proteínas o regulación de genes, entre otros, y que se han relacionado con el cáncer de pulmón (101). Mientras que el tRNA estaba sobreexpresado en pulmón en los pacientes con cáncer, el lincRNA lo estaba en plasma también en los pacientes con cáncer.

4.3.2.1. RNA de transferencia (tRNA)

El estudio más detallado de cada tipo de tRNA mediante un diagrama de Venn permitió conocer que tRNAs eran exclusivos de cada tipo de muestra y paciente y cuales eran comunes (Figura 8). Casi el 87% de los tRNAs eran comunes a todos los tipos, aunque en las muestras de pulmón había más tRNAs que en las de plasma. Esto podría significar que solo algunos tRNAs sirvan como marcadores de la enfermedad y den información sobre el progreso del cáncer.

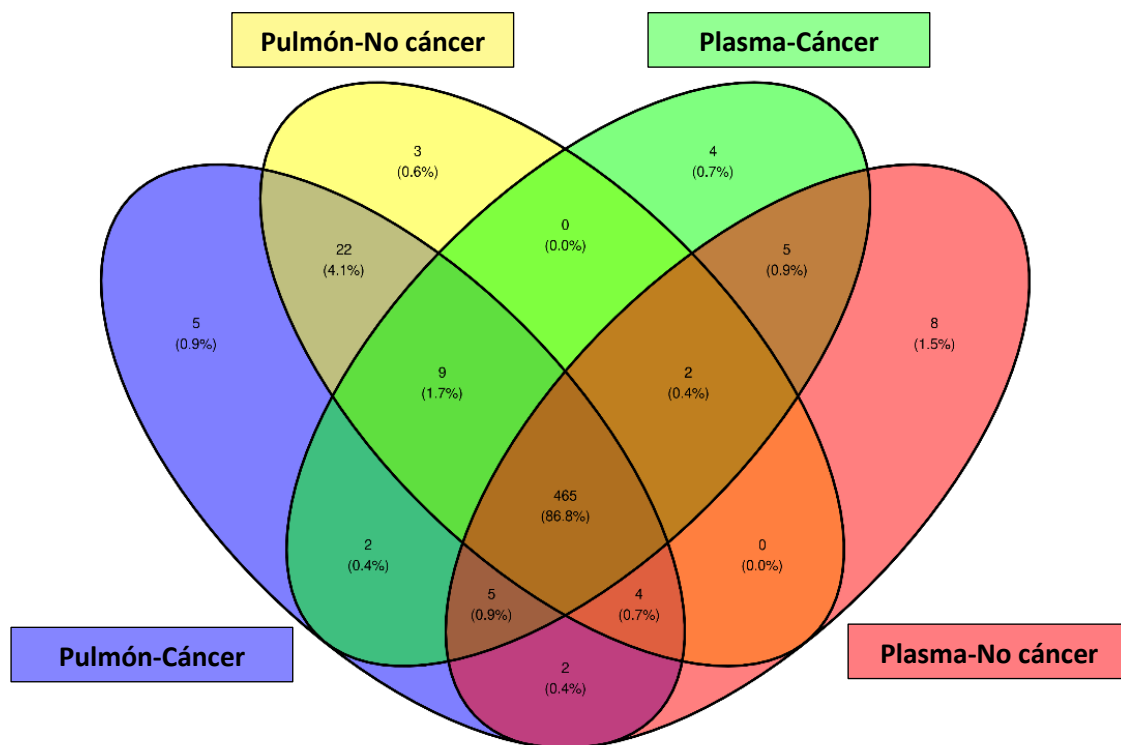


Figura 8. Diagrama de Venn de los tipos de tRNA comunes y exclusivos de cada muestra, expresados en número y porcentaje. Cada conjunto representa el tipo de muestra de la que proceden (tejido pulmonar o plasma) y el tipo de sujeto (paciente con cáncer pulmonar o paciente sin cáncer).

Mediante un agrupamiento jerárquico (*hierarchical clustering*) se observó además que en tejido pulmonar los tRNAs estaban más expresados que en plasma tanto en pacientes con cáncer como en pacientes control (Figura A.10 del Anexo IV).

Como los tRNAs eran mayoritarios en tejido pulmonar, se vieron con más detalle mediante otro agrupamiento jerárquico, en el que se observó que en los sujetos con cáncer pulmonar estaban más expresados que en los sujetos control (Figura A.11 del Anexo IV), lo que coincide con lo descrito en la Tabla 3, en la que solo algunos tRNAs estaban sobreexpresados en cáncer. Aunque no hay estudios sobre tRNAs procedentes de tejido pulmonar, no se encontraron los tRNAs detallados en la Figura A.11 del Anexo IV en plasma en otros estudios, ya que Zhu *et al.* indicó que los tRNA-Gln y tRNA-Asp representaban el 3% de los aislados de muestras de RNA exosomal en cáncer (99), por lo que todavía no existen artículos detallados sobre estos ni se encuentran en la ExoCarta, una base de datos sobre la carga exosomal (<http://www.exocarta.org/>).

4.3.2.2. RNA largo intergénico no codificante (lincRNA)

Los lincRNAs exclusivos y comunes para los cuatro tipos de muestras distintas (tejido pulmonar o plasma en sujetos control o con cáncer) se representaron mediante un diagrama de Venn (Figura 9).

En este caso el 57% de lincRNAs eran comunes, y se encontraron más en plasma que en tejido pulmonar, a diferencia de lo visto en el tRNA del apartado 4.3.2.1, donde predominaba la presencia en tejido pulmonar. Además, los distintos tipos de lincRNAs eran mayores en pacientes con cáncer que en pacientes control.

En el agrupamiento jerárquico se observaron que solo en algunos tipos de lincRNAs había más expresión en plasma tanto en pacientes con cáncer y sin cáncer (Figura A.12 del Anexo IV). La mayoría de los lincRNAs tuvieron menos expresión que los tRNA vistos en la Figura A.10 del Anexo IV, sin embargo, se observó que algunos lincRNA tienen actividad funcional incluso con un bajo número de copias (102).

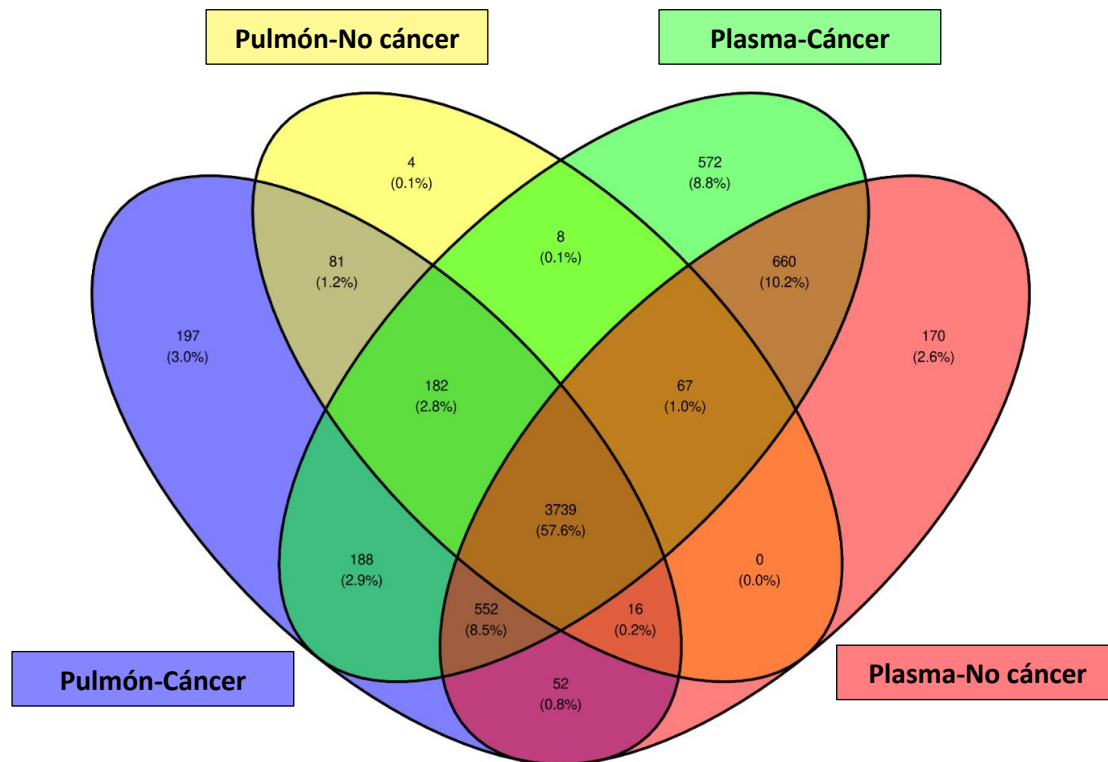


Figura 9. Diagrama de Venn de los tipos de lincRNA comunes y exclusivos de cada muestra, expresados en número y porcentaje. Cada conjunto representa el tipo de muestra de la que proceden (tejido pulmonar o plasma) y el tipo de sujeto (paciente con cáncer pulmonar o paciente sin cáncer).

Respecto a algunos tipos de lincRNAs estudiados en plasma, se observó que la expresión era mayor en pacientes control (Figura A.13 del Anexo IV), tendencia que también se vio en el único lincRNA estudiado en tejido pulmonar (Figura A.14 del Anexo IV). Esto se deba probablemente a que los tipos de lincRNAs analizados en este estudio estén relacionados con funciones beneficiosas y su sobreexpresión indique una buena regulación génica o proteica en relación con el cáncer.

Los lincRNAs estudiados en las Figuras A.13 y A.14 del Anexo IV suelen estar relacionados con la regulación de genes, de ahí el nombre que se les da. Sin embargo, el estudio de los lincRNAs es un tema reciente y la nomenclatura de estos varía según cada estudio, lo que dificulta la búsqueda bibliográfica de los encontrados en este estudio. Por ello se ha desarrollado LNCipedia, una base de datos humana de RNAs largos no codificantes (lncRNA), entre los que se encuentran distintos tipos de lincRNAs, y que pretende

solventar los problemas anteriores (103). Esto permitiría un futuro análisis más específico de los lincRNAs encontrados en los pacientes del presente estudio.

4.4. FUTURAS DIRECCIONES

Este subestudio sienta las bases para el estudio ExVeLP (*Extracellular vesicles from lung parenchyma*), donde se espera estudiar una población más extensa e incluir más tipos de cáncer de pulmón, como el carcinoma de células escamosas o el carcinoma de células grandes. Un estudio con una muestra más grande permitirá hacer mejores validaciones y conocer más datos sobre los exosomas y su carga, descubriendo nuevos biomarcadores que proporcionen información del diagnóstico y la progresión del cáncer de pulmón.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio y su correspondiente análisis permitieron extraer las siguientes conclusiones:

- Se han aislado con éxito exosomas de muestras procedentes de tejido pulmonar y plasma mediante kits comerciales de precipitación.
- La concentración de exosomas es mayor en tejido pulmonar en pacientes con cáncer de pulmón que en pacientes sin cáncer, lo que indica que pueden tener un papel en la fisiopatología del cáncer de pulmón.
- La composición de RNA entre el tejido pulmonar y el plasma es distinta, siendo predominante el tRNA en el primero y el miRNA en el segundo.
- La carga de RNA exosomal está alterada mayormente en pacientes con cáncer de pulmón, lo que supone un gran potencial como biomarcador futuro.

CONCLUSIONS

The results obtained from the study and their corresponding analysis allowed to draw the following conclusions:

- Exosomes have been successfully isolated from lung tissue and plasma samples using commercial precipitation kits.
- The concentration of exosomes is higher in lung tissue in patients with lung cancer than in patients without cancer, indicating that they may play a role in the pathophysiology of lung cancer.
- The RNA composition of lung tissue and plasma is different, with tRNA being predominant in the former and miRNA in the latter.
- Exosomal RNA load is mostly altered in lung cancer patients, which holds great potential as future biomarker.

BIBLIOGRAFÍA

1. GLOBOCAN 2020. Cancer today [Internet]. [citado 20 de julio de 2021]. Disponible en: <http://gco.iarc.fr/today/home>
2. 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*. mayo de 2021;71(3):209-49.
3. Remon J, Reguart N, García-Campelo R, Conde E, Lucena C-M, Persiva O, et al. Lung Cancer in Spain. *J Thorac Oncol*. 1 de febrero de 2021;16(2):197-204.
4. Nasim F, Sabath BF, Eapen GA. Lung Cancer. *Med Clin North Am*. 1 de mayo de 2019;103(3):463-73.
5. Duruisseaux M, Esteller M. Lung cancer epigenetics: From knowledge to applications. *Semin Cancer Biol*. 1 de agosto de 2018;51:116-28.
6. de Sousa VML, Carvalho L. Heterogeneity in Lung Cancer. *Pathobiol J Immunopathol Mol Cell Biol*. 2018;85(1-2):96-107.
7. Akhtar N, Bansal JG. Risk factors of Lung Cancer in nonsmoker. *Curr Probl Cancer*. 1 de septiembre de 2017;41(5):328-39.
8. Mao Y, Yang D, He J, Krasna MJ. Epidemiology of Lung Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. julio de 2016;25(3):439-45.
9. Schabath MB, Cote ML. Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. octubre de 2019;28(10):1563-79.
10. Bade BC, Dela Cruz CS. Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin Chest Med*. marzo de 2020;41(1):1-24.
11. Kim A-S, Ko H-J, Kwon J-H, Lee J-M. Exposure to Secondhand Smoke and Risk of Cancer in Never Smokers: A Meta-Analysis of Epidemiologic Studies. *Int J Environ Res Public Health*. septiembre de 2018;15(9):1981.
12. de Groot P, Munden RF. Lung cancer epidemiology, risk factors, and prevention. *Radiol Clin North Am*. septiembre de 2012;50(5):863-76.
13. Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, Vecchia CL, Boffetta P. Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur Respir J*. 1 de septiembre de 2016;48(3):889-902.
14. Li J, Li WX, Bai C, Song Y. Particulate matter-induced epigenetic changes and lung cancer. *Clin Respir J*. 2017;11(5):539-46.
15. Zheng M. Classification and Pathology of Lung Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. julio de 2016;25(3):447-68.
16. Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc*. agosto de 2019;94(8):1623-40.

17. Rodriguez-Canales J, Parra-Cuentas E, Wistuba II. Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer. *Cancer Treat Res.* 2016;170:25-46.
18. Yang S, Zhang Z, Wang Q. Emerging therapies for small cell lung cancer. *J Hematol Oncol* | *Hematol Oncol.* 2 de mayo de 2019;12(1):47.
19. Kalemkerian GP, Schneider BJ. Advances in Small Cell Lung Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1 de febrero de 2017;31(1):143-56.
20. Byers LA, Rudin CM. Small Cell Lung Cancer: Where Do We Go From Here? *Cancer.* 1 de marzo de 2015;121(5):664-72.
21. Wang S, Zimmermann S, Parikh K, Mansfield AS, Adjei AA. Current Diagnosis and Management of Small-Cell Lung Cancer. *Mayo Clin Proc.* agosto de 2019;94(8):1599-622.
22. Siddiqui F, Siddiqui AH. Lung Cancer. En: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [citado 27 de julio de 2021]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482357/>
23. Villalobos P, Wistuba II. Lung Cancer Biomarkers. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1 de febrero de 2017;31(1):13-29.
24. Suster DI, Mino-Kenudson M. Molecular Pathology of Primary Non-small Cell Lung Cancer. *Arch Med Res.* noviembre de 2020;51(8):784-98.
25. Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, Kwon R, Curran WJ, Wu Y-L, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet Lond Engl.* 21 de enero de 2017;389(10066):299-311.
26. Oberndorfer F, Müllauer L. Molecular pathology of lung cancer: current status and perspectives. *Curr Opin Oncol.* marzo de 2018;30(2):69-76.
27. Carvajal LA, Manfredi JJ. Another fork in the road--life or death decisions by the tumour suppressor p53. *EMBO Rep.* mayo de 2013;14(5):414-21.
28. Dang CV. MYC on the Path to Cancer. *Cell.* 30 de marzo de 2012;149(1):22-35.
29. Kim D-W, Kim K-C, Kim K-B, Dunn CT, Park K-S. Transcriptional deregulation underlying the pathogenesis of small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* febrero de 2018;7(1):4-20.
30. Sautès-Fridman C, Cherfils-Vicini J, Damotte D, Fisson S, Fridman WH, Cremer I, et al. Tumor microenvironment is multifaceted. *Cancer Metastasis Rev.* 1 de marzo de 2011;30(1):13-25.
31. Lemjabbar-Alaoui H, Hassan OU, Yang Y-W, Buchanan P. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer.* 1 de diciembre de 2015;1856(2):189-210.
32. Kutob L, Schneider F. Lung Cancer Staging. *Surg Pathol Clin.* 1 de marzo de 2020;13(1):57-71.

33. Wood DE, Kazerooni EA, Baum SL, Eapen GA, Ettinger DS, Hou L, et al. Lung Cancer Screening, Version 3.2018, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 1 de abril de 2018;16(4):412-41.
34. Ost DE, Jim Yeung S-C, 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*. 1 de mayo de 2013;143(5, Supplement):e121S-e141S.
35. Kocher F, Hilbe W, Seeber A, Pircher A, Schmid T, Greil R, et al. Longitudinal analysis of 2293 NSCLC patients: A comprehensive study from the TYROL registry. *Lung Cancer*. 1 de febrero de 2015;87(2):193-200.
36. Kanaji N, Watanabe N, Kita N, Bandoh S, Tadokoro A, Ishii T, et al. Paraneoplastic syndromes associated with lung cancer. *World J Clin Oncol*. 10 de agosto de 2014;5(3):197-223.
37. Thakur SK, Singh DP, Choudhary J. Lung cancer identification: a review on detection and classification. *Cancer Metastasis Rev*. 1 de septiembre de 2020;39(3):989-98.
38. Jain D, Roy-Chowdhuri S. Molecular Pathology of Lung Cancer Cytology Specimens: A Concise Review. *Arch Pathol Lab Med*. septiembre de 2018;142(9):1127-33.
39. Vinod SK, Hau E. Radiotherapy treatment for lung cancer: Current status and future directions. *Respirology*. 2020;25(S2):61-71.
40. Latimer K, Mott T. Lung Cancer: Diagnosis, Treatment Principles, and Screening. *Am Fam Physician*. 15 de febrero de 2015;91(4):250-6.
41. Debieuvre D, Locher C, Asselain B, Dayen C, Molinier O, Falchero L, et al. Evidence of slight improvement in five-year survival in non-small-cell lung cancer over the last 10 years: Results of the French KBP-CPHG real-world studies. *Bull Cancer (Paris)*. 1 de abril de 2019;106(4):283-92.
42. Wao H, Mhaskar R, Kumar A, Miladinovic B, Djulbegovic B. Survival of patients with non-small cell lung cancer without treatment: a systematic review and meta-analysis. *Syst Rev*. 4 de febrero de 2013;2(1):10.
43. Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*. julio de 2019;8(7):727.
44. Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest*. 1 de abril de 2016;126(4):1208-15.
45. Mashouri L, Yousefi H, Aref AR, Ahadi A mohammad, Molaei F, Alahari SK. Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Mol Cancer*. 2 de abril de 2019;18(1):75.
46. Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj*. 1 de julio de 2012;1820(7):940-8.

47. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 7 de febrero de 2020;367(6478):eaau6977.
48. Abels ER, Breakefield XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol*. 1 de abril de 2016;36(3):301-12.
49. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. abril de 2018;19(4):213-28.
50. Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, Baruteau J. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal*. 23 de abril de 2021;19(1):47.
51. Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, et al. Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 1 de febrero de 2015;13(1):17-24.
52. Yu X, Odenthal M, Fries JW. Exosomes as miRNA Carriers: Formation–Function–Future. *Int J Mol Sci*. diciembre de 2016;17(12):2028.
53. Yang F, Ning Z, Ma L, Liu W, Shao C, Shu Y, et al. Exosomal miRNAs and miRNA dysregulation in cancer-associated fibroblasts. *Mol Cancer*. 29 de agosto de 2017;16(1):148.
54. Pegtel DM, Gould SJ. Exosomes. *Annu Rev Biochem*. 20 de junio de 2019;88(1):487-514.
55. Carretero-González A, Otero I, Carril-Ajuria L, de Velasco G, Manso L. Exosomes: Definition, Role in Tumor Development and Clinical Implications. *Cancer Microenviron*. 1 de junio de 2018;11(1):13-21.
56. Vanni I, Alama A, Grossi F, Dal Bello MG, Coco S. Exosomes: a new horizon in lung cancer. *Drug Discov Today*. 1 de junio de 2017;22(6):927-36.
57. Bu H, He D, He X, Wang K. Exosomes: Isolation, Analysis, and Applications in Cancer Detection and Therapy. *ChemBioChem*. 2019;20(4):451-61.
58. Zhang Y, Bi J, Huang J, Tang Y, Du S, Li P. Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications. *Int J Nanomedicine*. 22 de septiembre de 2020;15:6917-34.
59. Logozzi M, Mizzone D, Di Raimo R, Fais S. Exosomes: A Source for New and Old Biomarkers in Cancer. *Cancers*. septiembre de 2020;12(9):2566.
60. Chen B-Y, Sung CW-H, Chen C, Cheng C-M, Lin DP-C, Huang C-T, et al. Advances in exosomes technology. *Clin Chim Acta*. 1 de junio de 2019;493:14-9.
61. Lin J, Li J, Huang B, Liu J, Chen X, Chen X-M, et al. Exosomes: Novel Biomarkers for Clinical Diagnosis. *Sci World J*. 27 de enero de 2015;2015:e657086.
62. Lässer C, Eldh M, Lötvall J. Isolation and Characterization of RNA-Containing Exosomes. *JoVE J Vis Exp*. 9 de enero de 2012;(59):e3037.

63. Tang Y-T, Huang Y-Y, Zheng L, Qin S-H, Xu X-P, An T-X, et al. Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum. *Int J Mol Med*. 1 de septiembre de 2017;40(3):834-44.
64. Koritzinsky EH, Street JM, Star RA, Yuen PST. Quantification of Exosomes. *J Cell Physiol*. 2017;232(7):1587-90.
65. Cui S, Cheng Z, Qin W, Jiang L. Exosomes as a liquid biopsy for lung cancer. *Lung Cancer*. 1 de febrero de 2018;116:46-54.
66. Zhang L, Yu D. Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer*. 1 de abril de 2019;1871(2):455-68.
67. 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*. 1 de febrero de 2021;134:111111.
68. Hu C, Meiners S, Lukas C, Stathopoulos GT, Chen J. Role of exosomal microRNAs in lung cancer biology and clinical applications. *Cell Prolif*. junio de 2020;53(6):e12828.
69. Chen R, Xu X, Qian Z, Zhang C, Niu Y, Wang Z, et al. The biological functions and clinical applications of exosomes in lung cancer. *Cell Mol Life Sci*. 1 de diciembre de 2019;76(23):4613-33.
70. Miaowei W, Guosheng W, Wei T, Yongchuan D, Yibing X. MiRNA-based Therapeutics for Lung Cancer. *Curr Pharm Des*. 31 de octubre de 2017;23(39):5989-96.
71. Hashemi ZS, Khalili S, Forouzandeh Moghadam M, Sadroddiny E. Lung cancer and miRNAs: a possible remedy for anti-metastatic, therapeutic and diagnostic applications. *Expert Rev Respir Med*. 1 de febrero de 2017;11(2):147-57.
72. Rodríguez M, Silva J, López-Alfonso A, López-Muñoz MB, Peña C, Domínguez G, et al. Different exosome cargo from plasma/bronchoalveolar lavage in non-small-cell lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014;53(9):713-24.
73. Bica-Pop C, Cojocneanu-Petric R, Magdo L, Raduly L, Gulei D, Berindan-Neagoe I. Overview upon miR-21 in lung cancer: focus on NSCLC. *Cell Mol Life Sci*. 1 de octubre de 2018;75(19):3539-51.
74. Dong J, Zhang Z, Gu T, Xu S-F, Dong L-X, Li X, et al. The role of microRNA-21 in predicting brain metastases from non-small cell lung cancer. *OncoTargets Ther*. 29 de diciembre de 2016;10:185-94.
75. Liu Q, Yu Z, Yuan S, Xie W, Li C, Hu Z, et al. Circulating exosomal microRNAs as prognostic biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*. 30 de diciembre de 2016;8(8):13048-58.
76. Li Q, Han Y, Wang C, Shan S, Wang Y, Zhang J, et al. MicroRNA-125b promotes tumor metastasis through targeting tumor protein 53-induced nuclear protein 1 in patients with non-small-cell lung cancer. *Cancer Cell Int*. 17 de septiembre de 2015;15(1):84.
77. Hsu Y-L, Hung J-Y, Chang W-A, Lin Y-S, Pan Y-C, Tsai P-H, 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*. agosto de 2017;36(34):4929-42.
78. Guang L, Jing F, Ying W, Hu W, Cheng-Cao S. MiRNA-based Therapeutic Strategy in Lung Cancer. *Curr Pharm Des*. 31 de octubre de 2017;23(39):6011-8.
 79. Hong W, Xue M, Jiang J, Zhang Y, Gao X. Circular RNA circ-CPA4/ let-7 miRNA/PD-L1 axis regulates cell growth, stemness, drug resistance and immune evasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Exp Clin Cancer Res*. 3 de agosto de 2020;39(1):149.
 80. Xiaohong D, Jitai Z, Juping W, Xiaoming L, Feng D. Role of miRNA in Lung Cancer-Potential Biomarkers and Therapies. *Curr Pharm Des*. 31 de octubre de 2017;23(39):5997-6010.
 81. Liu S, Zhan Y, Luo J, Feng J, Lu J, Zheng H, et al. Roles of exosomes in the carcinogenesis and clinical therapy of non-small cell lung cancer. *Biomed Pharmacother*. 1 de marzo de 2019;111:338-46.
 82. Hutchinson BD, Shroff GS, Truong MT, Ko JP. Spectrum of Lung Adenocarcinoma. *Semin Ultrasound CT MRI*. 1 de junio de 2019;40(3):255-64.
 83. Weir CB, Jan A. BMI Classification Percentile And Cut Off Points [Internet]. *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing; 2021 [citado 8 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541070/>
 84. Rivero-Yeverino D. Espirometría: conceptos básicos. *Rev Alerg México*. 4 de abril de 2019;66(1):76-84.
 85. Cizmar P, Yuana Y. Detection and Characterization of Extracellular Vesicles by Transmission and Cryo-Transmission Electron Microscopy. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2017;1660:221-32.
 86. Jung MK, Mun JY. Sample Preparation and Imaging of Exosomes by Transmission Electron Microscopy. *J Vis Exp JoVE*. 4 de enero de 2018;(131):56482.
 87. Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJP, Hole P, et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. 1 de diciembre de 2011;7(6):780-8.
 88. Street JM, Koritzinsky EH, Glispie DM, Star RA, Yuen PST. Urine Exosomes: An Emerging Trove of Biomarkers. *Adv Clin Chem*. 2017;78:103-22.
 89. Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Zimoch J, Lekka M, Siedlar M, Baran J. The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *Int J Mol Sci*. junio de 2017;18(6):1153.
 90. Barile L, Vassalli G. Exosomes: Therapy delivery tools and biomarkers of diseases. *Pharmacol Ther*. 1 de junio de 2017;174:63-78.
 91. Soo CY, Song Y, Zheng Y, Campbell EC, Riches AC, Gunn-Moore F, et al. Nanoparticle tracking analysis monitors microvesicle and exosome secretion from immune cells. *Immunology*. 2012;136(2):192-7.

92. Rabinowits G, Gerçel-Taylor C, Day JM, Taylor DD, Kloecker GH. Exosomal MicroRNA: A Diagnostic Marker for Lung Cancer. *Clin Lung Cancer*. 1 de enero de 2009;10(1):42-6.
93. Frydrychowicz M, Kolecka-Bednarczyk A, Madejczyk M, Yasar S, Dworacki G. Exosomes – Structure, Biogenesis and Biological Role in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Scand J Immunol*. 2015;81(1):2-10.
94. Alipoor SD, Mortaz E, Varahram M, Movassaghi M, Kraneveld AD, Garssen J, et al. The Potential Biomarkers and Immunological Effects of Tumor-Derived Exosomes in Lung Cancer. *Front Immunol*. 2018;9:819.
95. Sun Z, Shi K, Yang S, Liu J, Zhou Q, Wang G, et al. Effect of exosomal miRNA on cancer biology and clinical applications. *Mol Cancer*. 11 de octubre de 2018;17(1):147.
96. Mathew M, Zade M, Mezghani N, Patel R, Wang Y, Momen-Heravi F. Extracellular Vesicles as Biomarkers in Cancer Immunotherapy. *Cancers*. octubre de 2020;12(10):2825.
97. Nam G-H, Choi Y, Kim GB, Kim S, Kim SA, Kim I-S. Emerging Prospects of Exosomes for Cancer Treatment: From Conventional Therapy to Immunotherapy. *Adv Mater*. 2020;32(51):2002440.
98. Huang X, Yuan T, Tschannen M, Sun Z, Jacob H, Du M, et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics*. 10 de mayo de 2013;14(1):319.
99. 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*. 2 de abril de 2019;18(1):74.
100. Yuan T, Huang X, Woodcock M, Du M, Dittmar R, Wang Y, et al. Plasma extracellular RNA profiles in healthy and cancer patients. *Sci Rep*. 20 de enero de 2016;6(1):19413.
101. Ransohoff JD, Wei Y, Khavari PA. The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA. *Nat Rev Mol Cell Biol*. marzo de 2018;19(3):143-57.
102. van Balkom BWM, Eisele AS, Pegtel DM, Bervoets S, Verhaar MC. Quantitative and qualitative analysis of small RNAs in human endothelial cells and exosomes provides insights into localized RNA processing, degradation and sorting. *J Extracell Vesicles*. 1 de enero de 2015;4(1):26760.
103. Volders P-J, Anckaert J, Verheggen K, Nuytens J, Martens L, Mestdagh P, et al. LNCipedia 5: towards a reference set of human long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res*. 8 de enero de 2019;47(D1):D135-9.

ANEXOS

ANEXO I

Tabla A.1. Preparación del blanco y las diluciones seriadas de la proteína *ExoELISA-ULTRA protein standard* según el kit *ExoELISA-ULTRA CD63* para la caracterización proteica de los exosomas. En negrita y marcados en gris aparecen los tubos utilizados para la recta de calibrado.

Tubo	Abundancia de exosomas	Factor de dilución	ExoELISA-ULTRA protein standard (μ l)	Coating buffer (μ l)
0 (Blanco)	0	-	-	60
1	4.56×10^{10}	1	1000	-
2	2.28×10^{10}	1:2	60	60
3	1.14×10^{10}	1:4	60	60
4	5.7×10^9	1:8	60	60
5	2.9×10^9	1:16	60	60
6	1.4×10^9	1:32	60	60
7	7×10^8	1:64	60	60

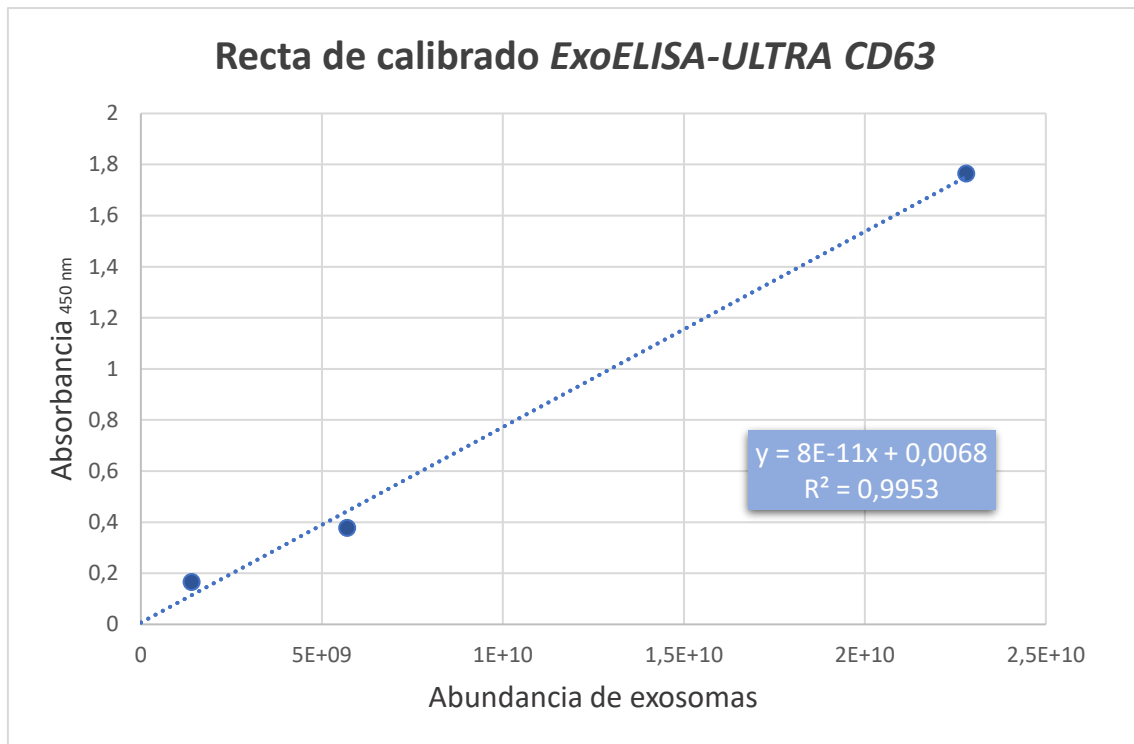


Figura A.1. Recta de calibrado del ensayo ELISA para la caracterización proteica de exosomas mediante el kit *ExoELISA-ULTRA CD63*. Para el cálculo de la recta de calibrado, se seleccionaron tres diluciones sugeridas del protocolo y el blanco. La absorbancia medida para cada una de las diluciones se correlaciona con un valor de abundancia de exosomas estandarizado e indicado por el fabricante.

ANEXO II

Tabla A.2. Características clínicas de los sujetos participantes en el estudio. Los sujetos con “A” en el Id representan los pacientes con adenocarcinoma, los sujetos con “C” en el Id representan los pacientes control sin patologías pulmonares cancerosas. BMI: Índice de masa corporal. FVC: Capacidad vital forzada en la espirometría. FEV₁: Volumen espiratorio forzado en el primer segundo en la espirometría. FEV₁/FVC: Fracción o porcentaje de la FVC que es espirada en el primer segundo en la espirometría.

Id. sujetos	Edad	Sexo	BMI	FVC (%)	FEV ₁ (%)	FEV ₁ /FVC
A42	60	Hombre	30,8	121	84	81,84
A44	66	Hombre	28,1	99,2	101	66,27
A46	67	Hombre	27,4	108	171	83
A47	61	Mujer	23,3	75	98	79,7
A53	72	Hombre	24,53	99	109	72,69
A67	61	Mujer	18,9	118,8	86,4	67,86
C45	55	Mujer	26	86	106	73,18
C49	68	Hombre	30,5	118	72	72
C56	74	Mujer	-	167	75	58,37
C64	76	Mujer	25,43	95	107	-

ANEXO III

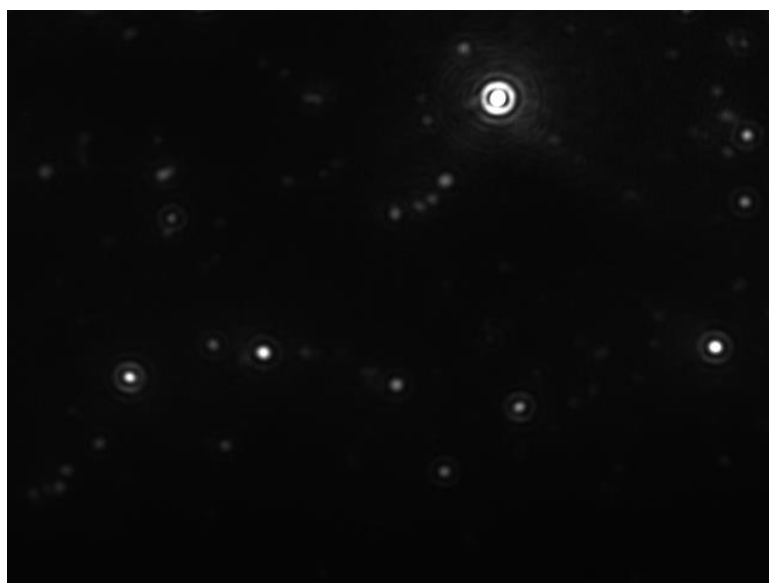


Figura A.2. Partículas visualizadas mediante *NanoSight NS300*. Imagen capturada a partir del vídeo generado por el software *NanoSight NTA 3.4 Build 3.4.003*.

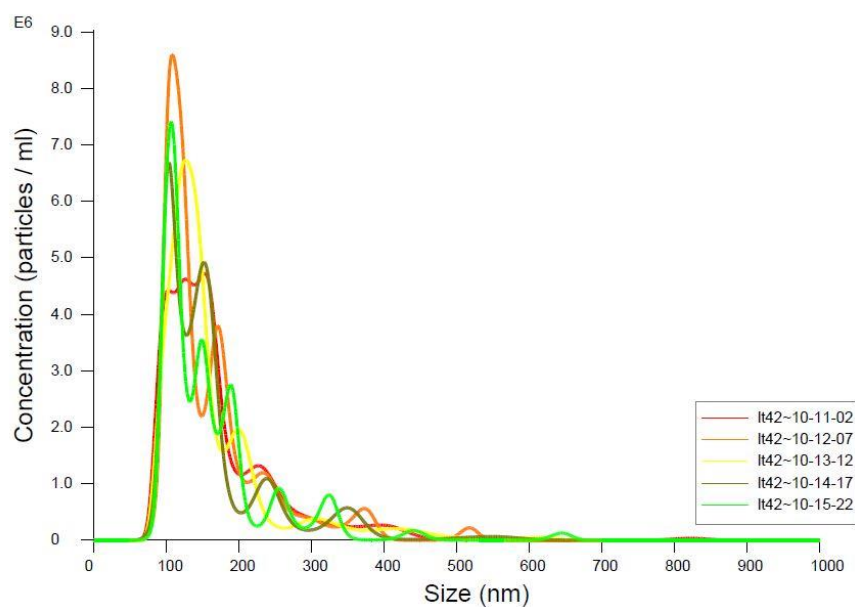


Figura A.3. Tamaño de las partículas (nm) y su concentración correspondiente (partículas/ml). Se representan 5 líneas por cada uno de los vídeos tomados por el software *NanoSight NTA 3.4 Build 3.4.003*.

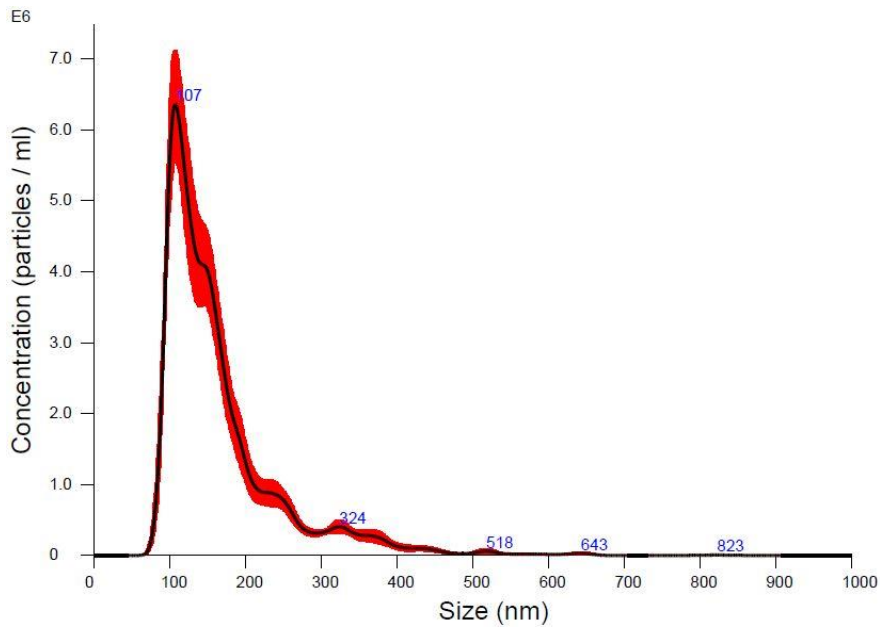


Figura A.4. Tamaño de las partículas y concentración media de las cinco mediciones tomadas por el software *NanoSight NTA 3.4 Build 3.4.003*.

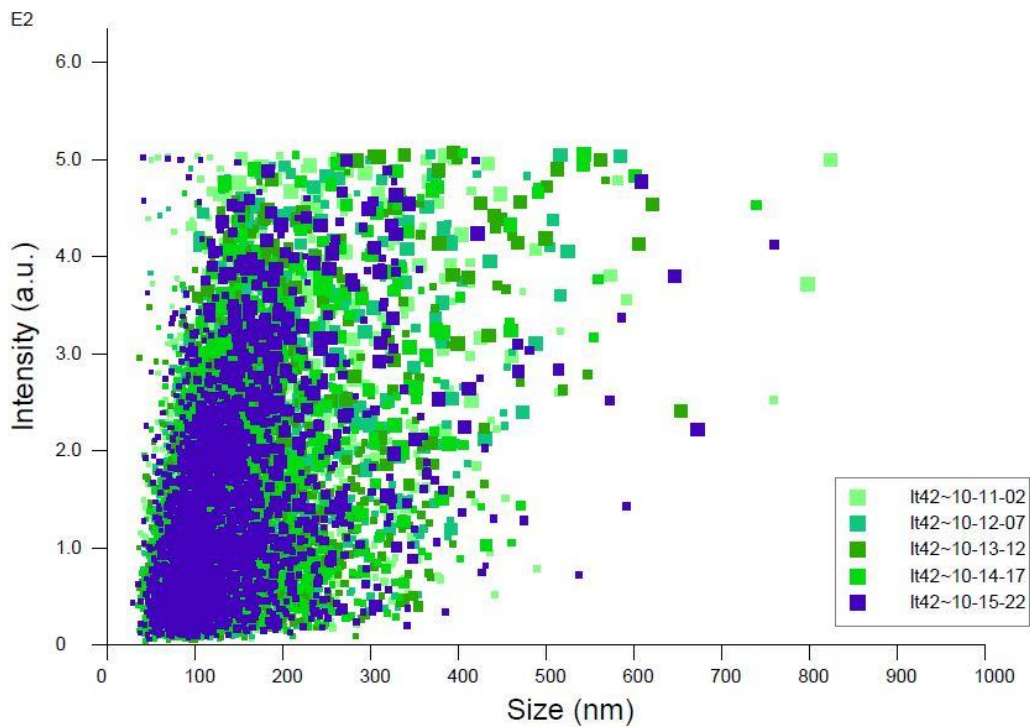


Figura A.5. Tamaño de las partículas y su intensidad correspondiente. Se representan 5 puntos distintos por cada uno de los vídeos tomados por el software *NanoSight NTA 3.4 Build 3.4.003*.

Tabla A.3. Concentraciones de las vesículas extracelulares en muestras de tejido pulmonar en pacientes con y sin cáncer de pulmón. Calculadas a partir del software *NanoSight NTA 3.4 Build 3.4.003*.

Concentración de vesículas extracelulares (10^8 VE/ml)									
Pacientes con adenocarcinoma						Pacientes control			
5.11	4.67	5.49	7.98	5.59	10.3	3.13	1.07	4.51	2.08

ANEXO IV

Tabla A.4. Concentraciones del RNA aislado por cada muestra (tejido pulmonar o plasma) y paciente (cáncer de pulmón o control). Los sujetos con “A” en el Id representan los pacientes con adenocarcinoma, los sujetos con “C” en el Id representan los pacientes control sin patologías pulmonares cancerosas.

Id. Sujeto	Tipo de muestra	Concentración (ng/μl)	Cantidad total (ng)
A42	Plasma	0.04	0.8
A44	Plasma	0.32	6.4
A46	Plasma	0.39	7.9
A47	Plasma	0.25	5.1
A53	Plasma	0.26	5.1
A67	Plasma	0.20	4.0
C45	Plasma	0.19	3.8
C49	Plasma	0.20	3.9
C56	Plasma	0.33	6.6
C64	Plasma	0.16	3.1
A42	Tejido pulmonar	1.88	37.7
A44	Tejido pulmonar	0.64	12.7
A46	Tejido pulmonar	1.30	26.0
A47	Tejido pulmonar	0.27	5.4
A53	Tejido pulmonar	0.95	19.0
A67	Tejido pulmonar	0.46	9.2
C45	Tejido pulmonar	0.83	16.6
C49	Tejido pulmonar	0.39	7.9
C56	Tejido pulmonar	0.29	5.8
C64	Tejido pulmonar	0.33	6.6

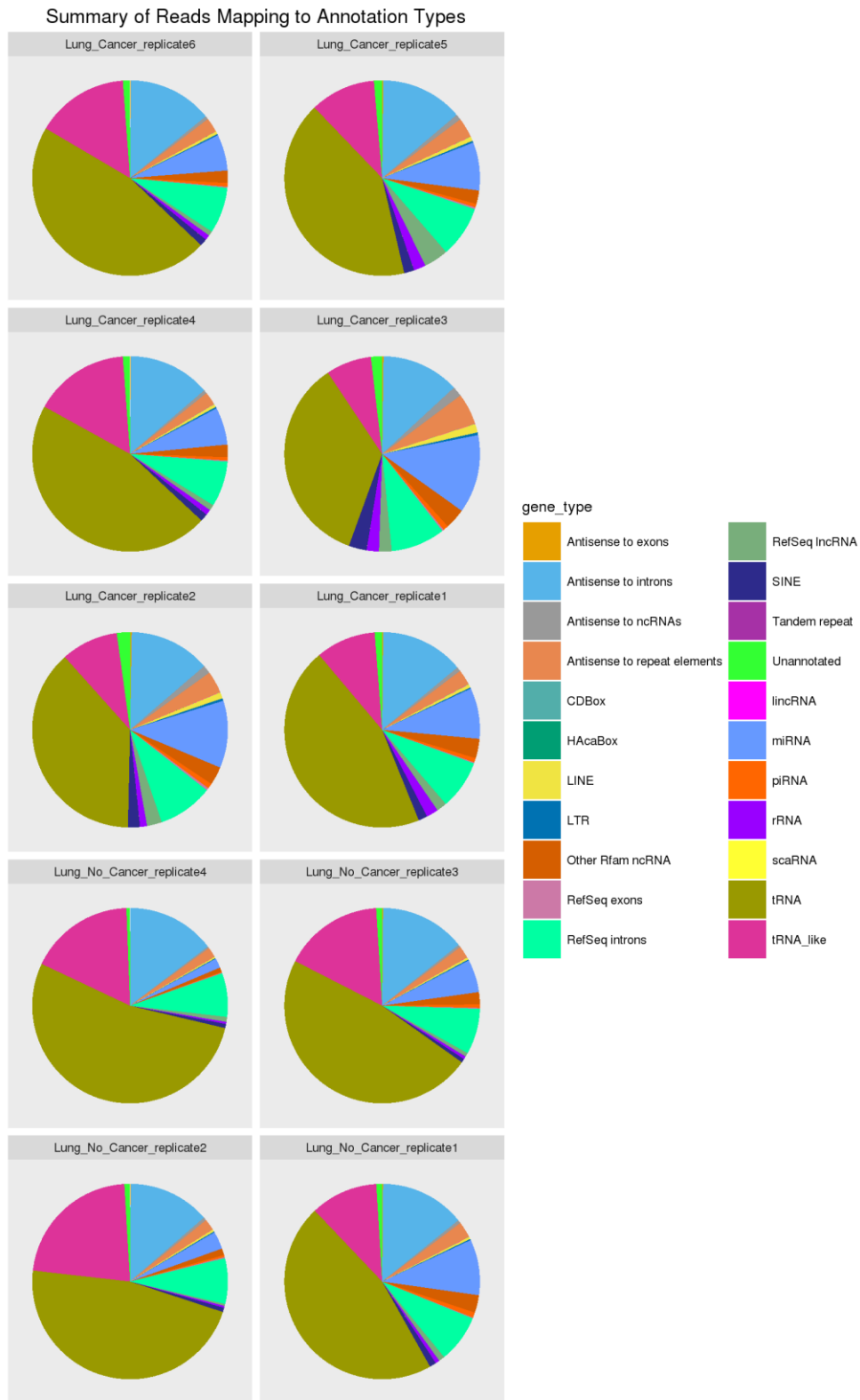


Figura A.6. Tipos de RNAs en muestras de tejido pulmonar en pacientes con cáncer de pulmón (*Lung_cancer*) y pacientes control (*Lung_No_Cancer*), obtenido a partir del análisis RNA-seq. A la derecha se muestra la leyenda de los distintos tipos de RNA y secuencias no codificantes.

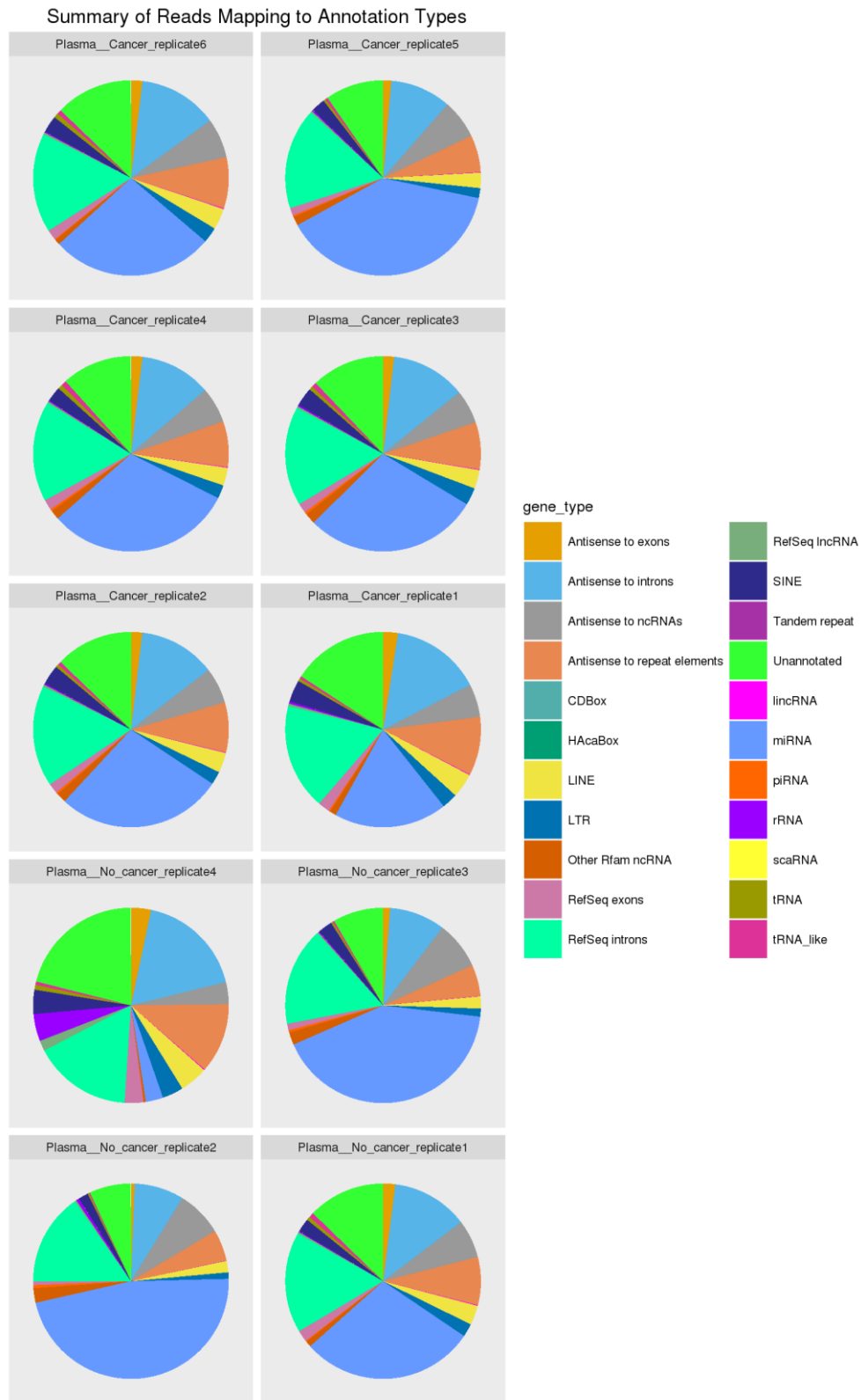


Figura A.7. Tipos de RNAs en muestras de plasma en pacientes con cáncer de pulmón (*Lung_cancer*) y pacientes control (*Lung_No_Cancer*), obtenido a partir del análisis RNA-seq. A la derecha se muestra la leyenda de los distintos tipos de RNA y secuencias no codificantes.

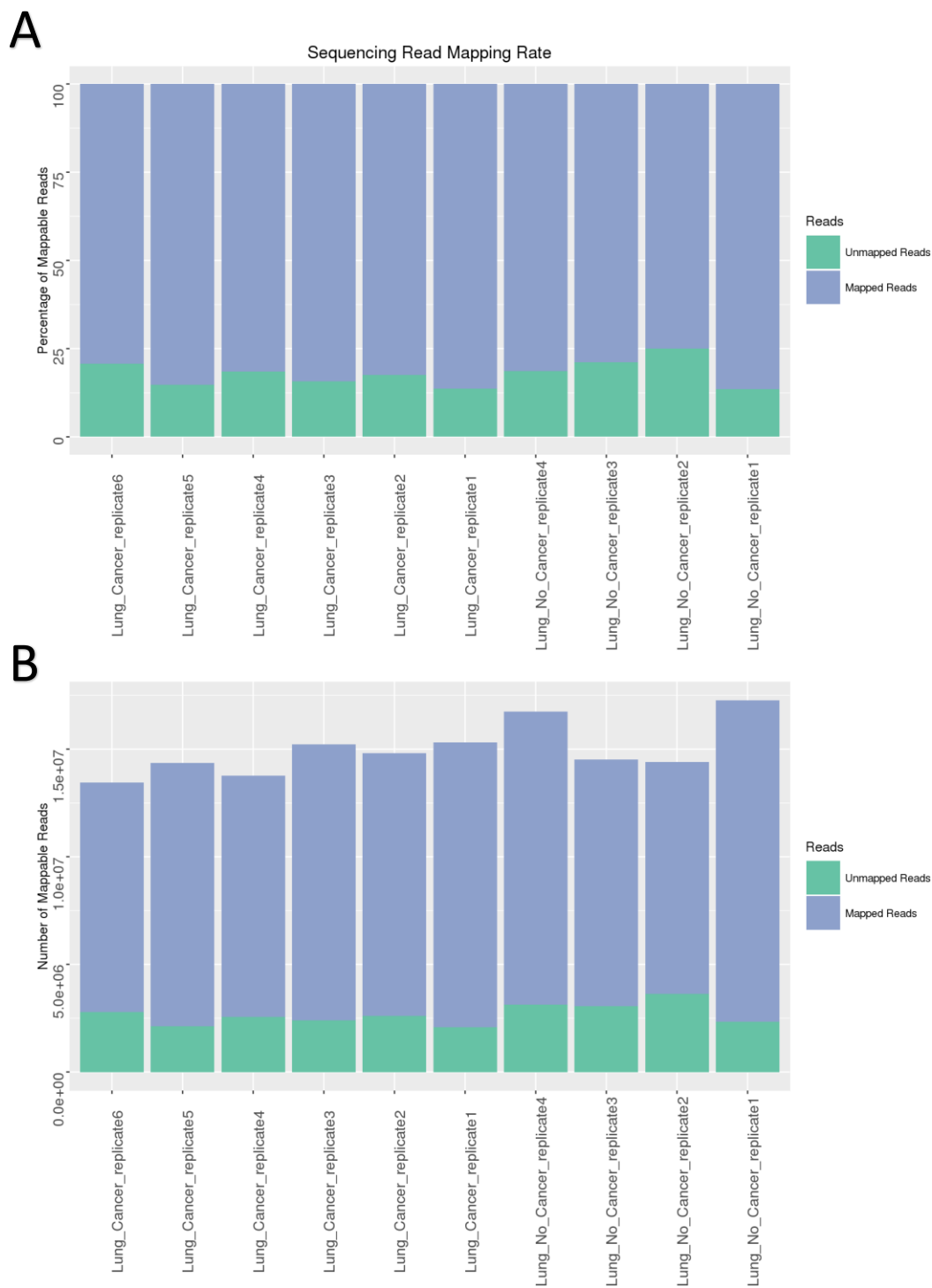


Figura A.8. Lecturas realizadas de las muestras de RNA de tejido pulmonar de pacientes con y sin cáncer de pulmón mediante la técnica RNA-seq. Porcentajes de las lecturas de cada muestra (A) y cantidad de lecturas por cada muestra (B). *Unmapped Reads*: lecturas fallidas. *Mapped Reads*: lecturas correctas.

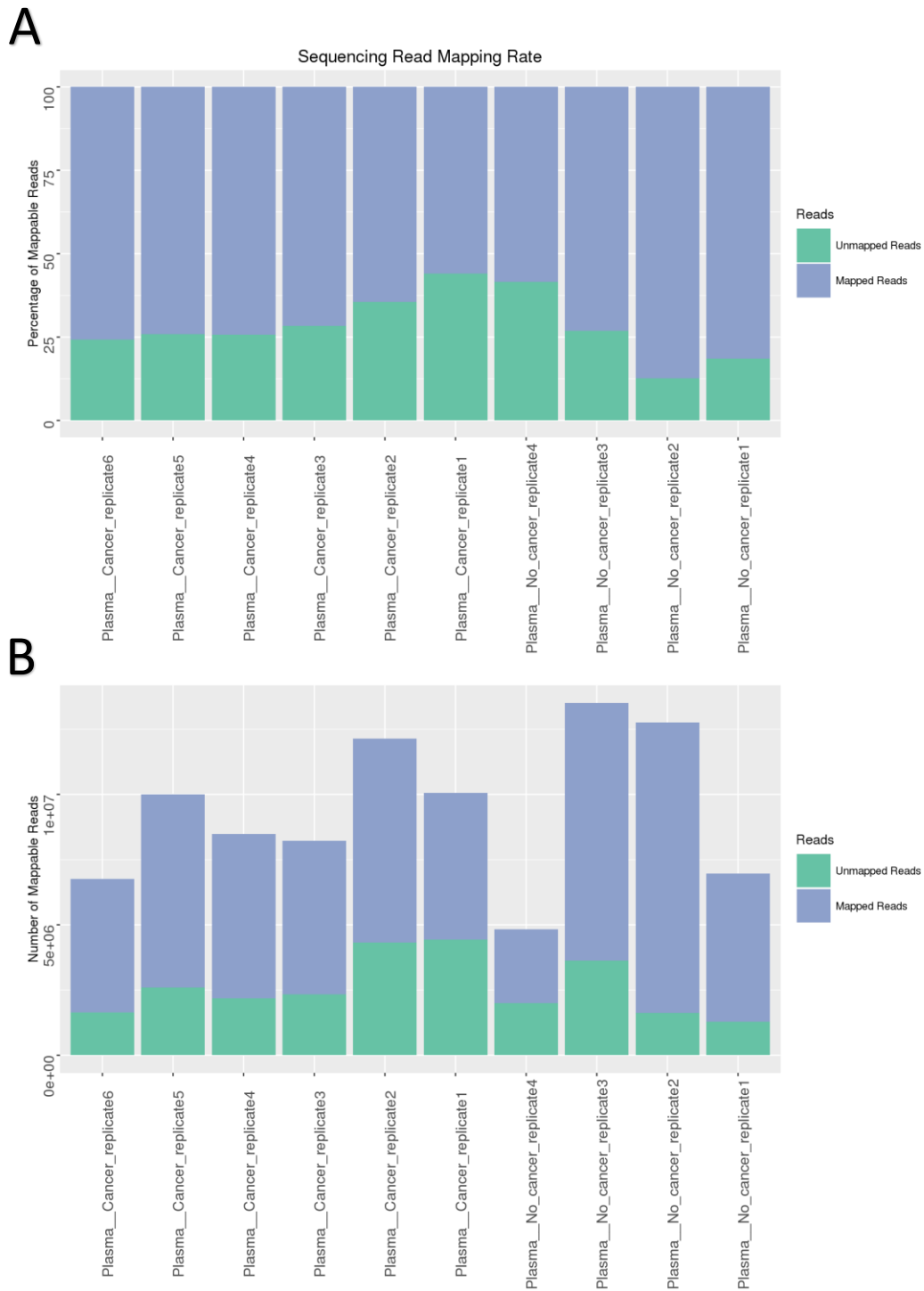


Figura A.9. Lecturas realizadas de las muestras de RNA de plasma de pacientes con y sin cáncer de pulmón mediante la técnica RNA-seq. Porcentajes de las lecturas de cada muestra (A) y cantidad de lecturas por cada muestra (B). *Unmapped Reads*: lecturas fallidas. *Mapped Reads*: lecturas correctas.

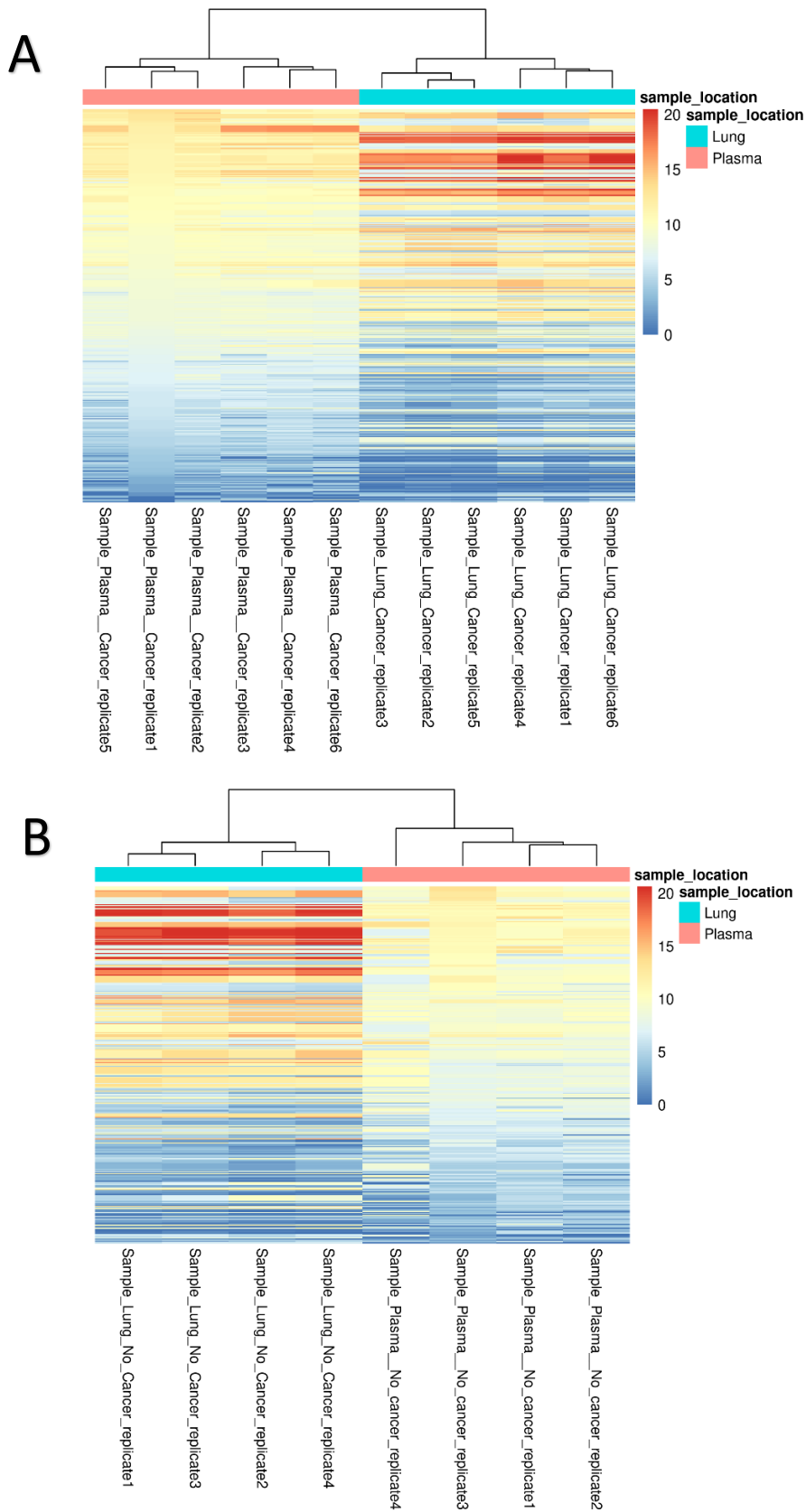


Figura A.10. Agrupamientos jerárquicos (*hierarchical clustering*) sobre la expresión de los tipos de tRNAs en tejido pulmonar y en plasma en sujetos con cáncer de pulmón (A) y sujetos control (B).

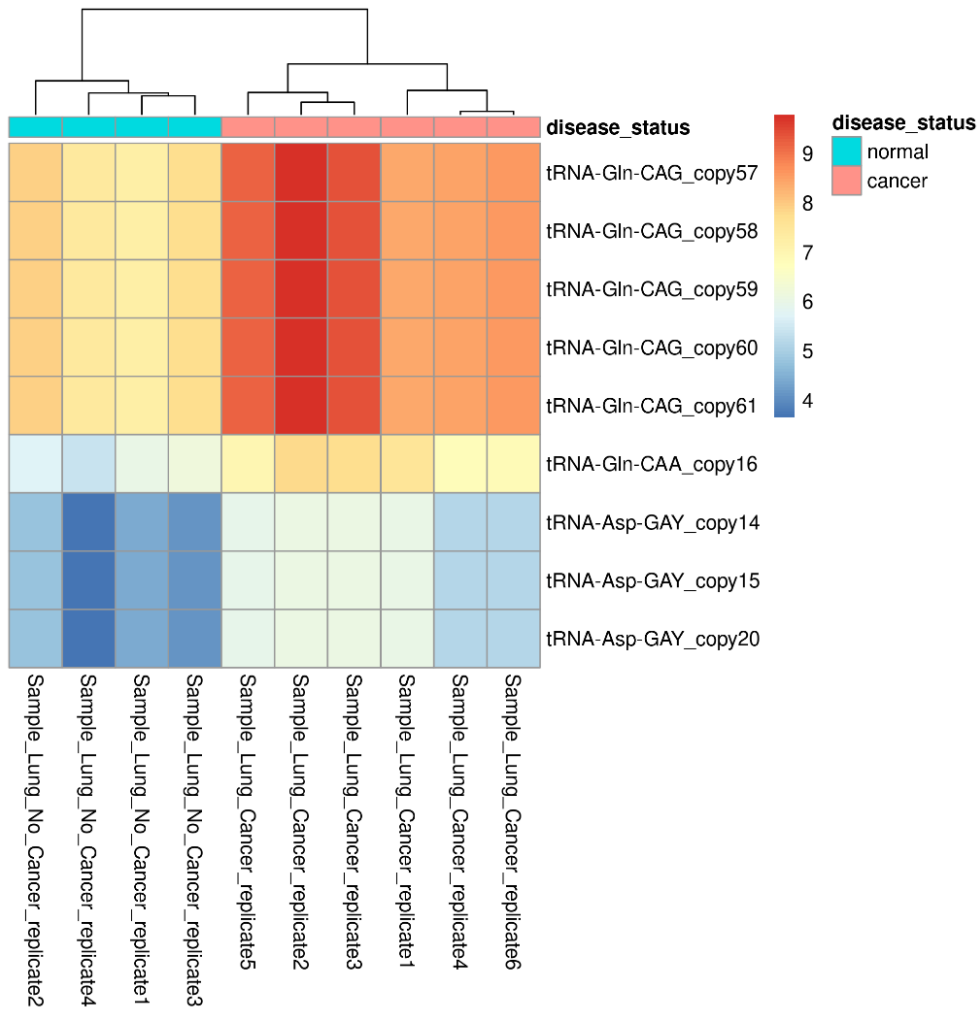


Figura A.11. Agrupamiento jerárquico (*hierarchical clustering*) sobre la expresión de tres tipos de tRNAs y sus copias, obtenidos a partir del RNA exosomal de tejido pulmonar de pacientes control y pacientes con cáncer de pulmón.

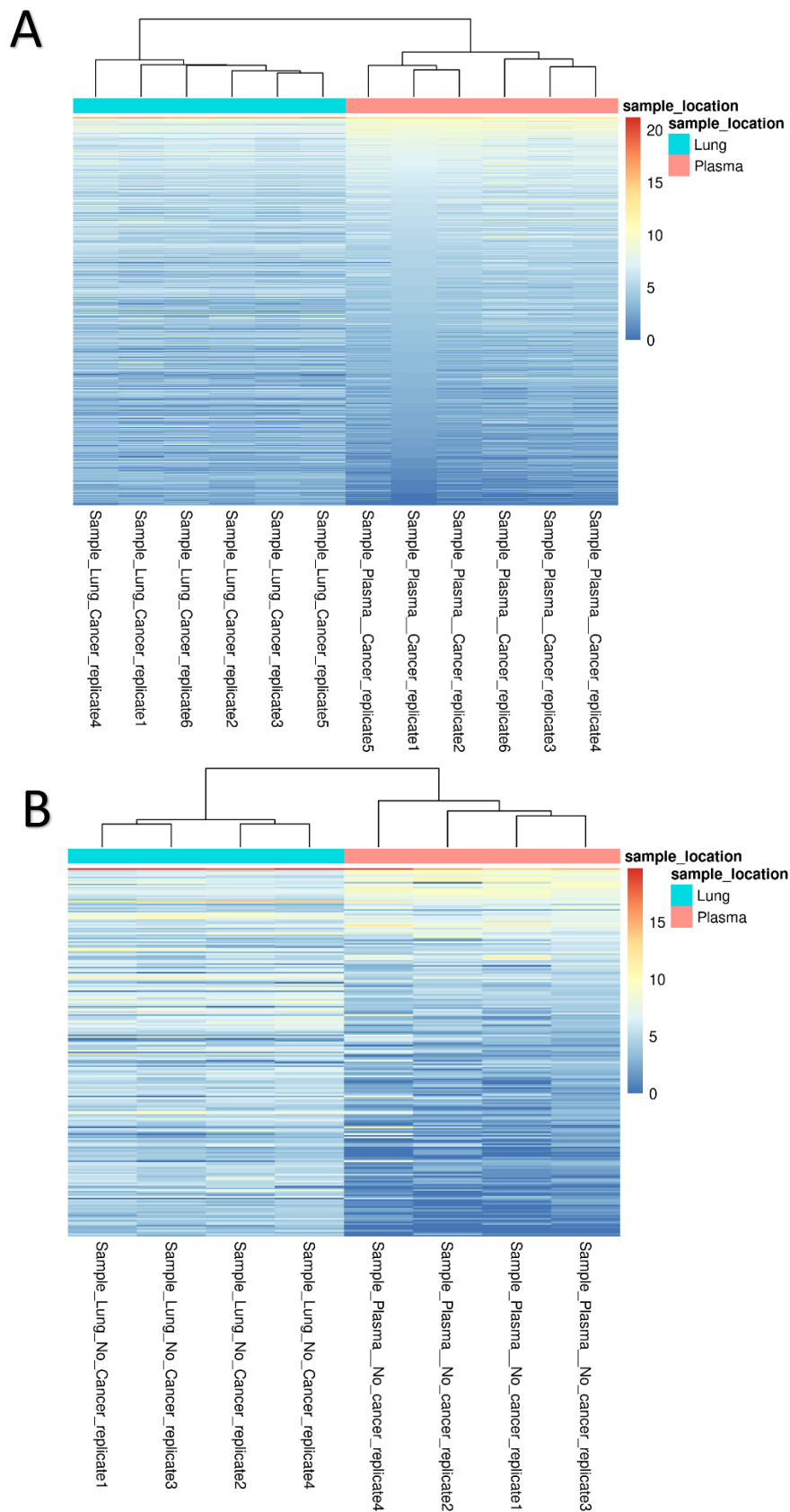


Figura A.12. Agrupamientos jerárquicos (*hierarchical clustering*) sobre la expresión de los tipos de lincRNAs en tejido pulmonar y en plasma en sujetos con cáncer de pulmón (A) y sujetos control (B).

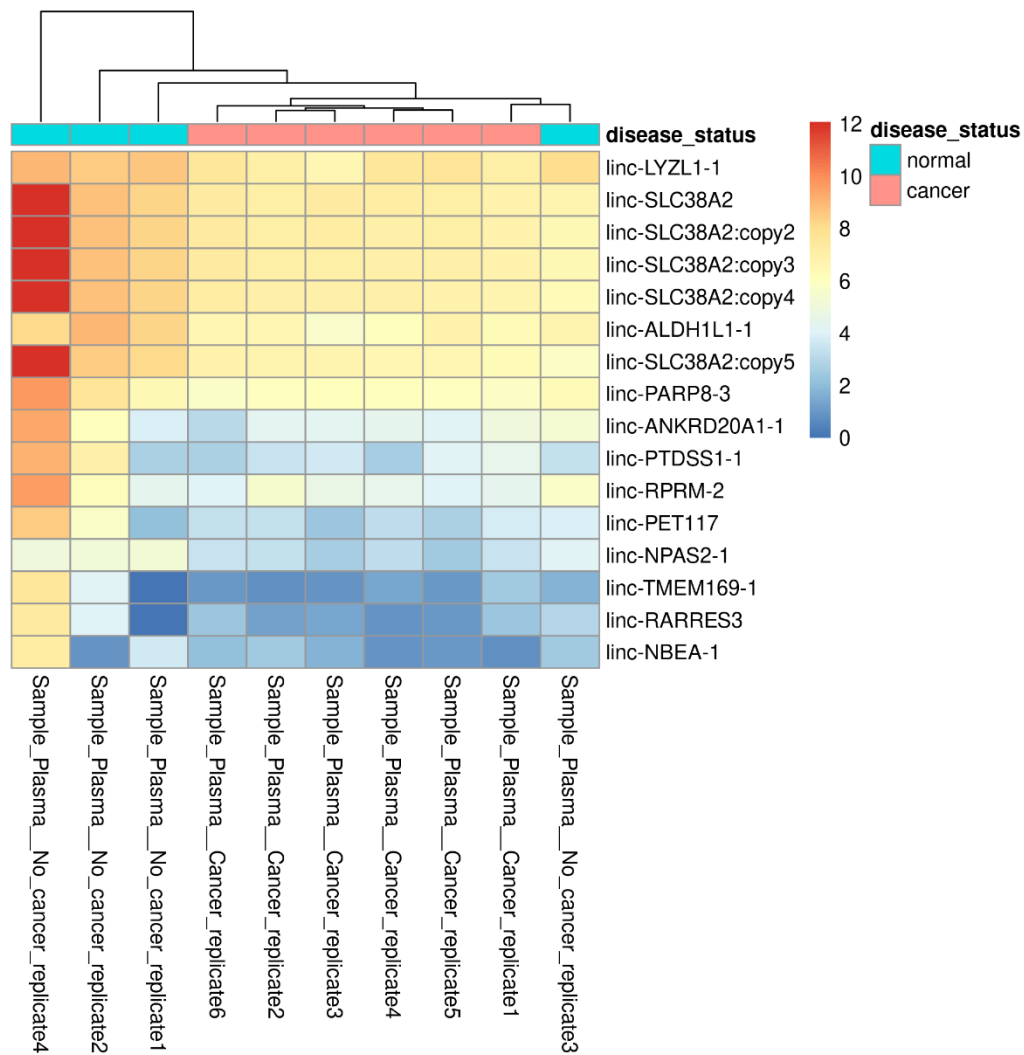


Figura A.13. Agrupamiento jerárquico (*hierarchical clustering*) sobre la expresión de doce tipos de lincRNAs y sus determinadas copias, obtenidos a partir del RNA exosomal de plasma en pacientes control y pacientes con cáncer de pulmón.

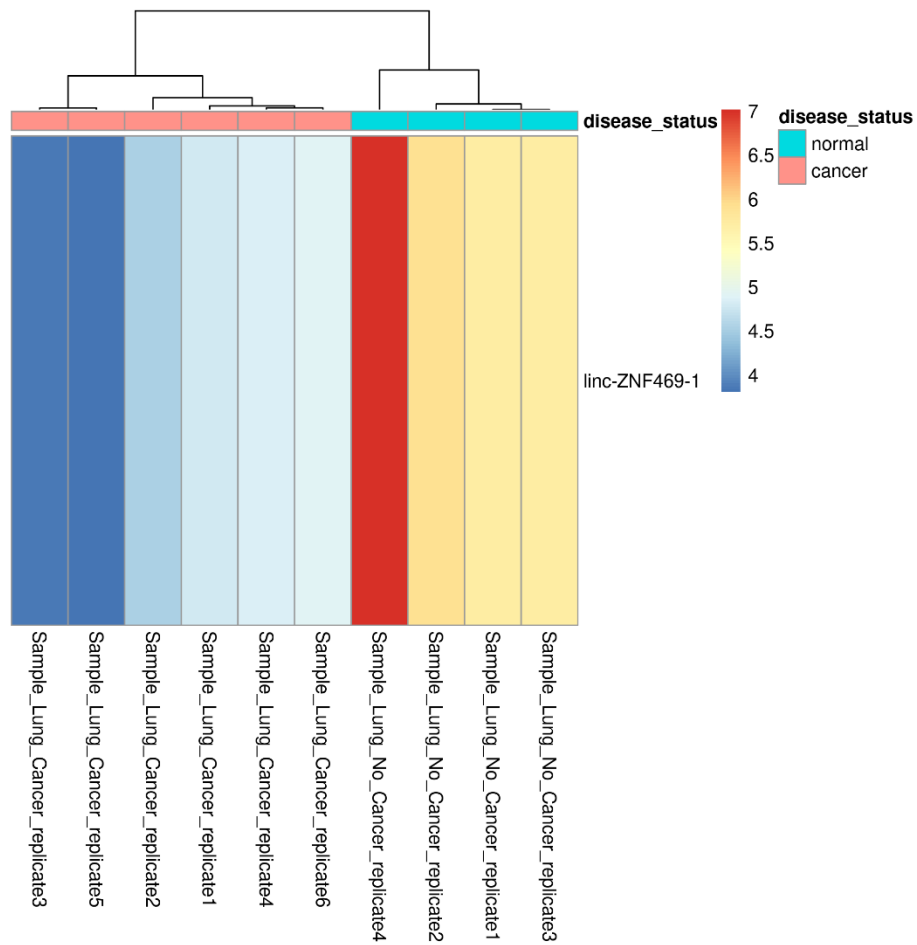


Figura A.14. Agrupamiento jerárquico (*hierarchical clustering*) sobre la expresión de un tipo de lincRNA, obtenido a partir del RNA exosomal de tejido pulmonar en pacientes control y pacientes con cáncer de pulmón.