

VESÍCULAS EXTRACELULARES COMO BIOMARCADORES Y DIANAS TERAPÉUTICAS EN CÁNCER: FUNCIONES Y POTENCIALES APLICACIONES DENTRO DEL CÁNCER DE PÁNCREAS

Grado en Medicina

Presentado por:
D^ª EVA CASTILLO CASTILLO

Tutorizado por:
D^ª MARÍA JOSÉ CARMENA SIERRA

Alcalá de Henares, a 29 de mayo de 2023

FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

**VESÍCULAS EXTRACELULARES COMO BIOMARCADORES Y
DIANAS TERAPÉUTICAS EN CÁNCER: FUNCIONES Y
POTENCIALES APLICACIONES DENTRO DEL CÁNCER DE
PÁNCREAS**

**EXTRACELLULAR VESICLES AS CANCER BIOMARKERS AND
THERAPEUTIC TARGETS: FUNCTIONS AND POTENTIAL
APPLICATIONS IN PANCREATIC CANCER**

Eva Castillo Castillo

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

Universidad de Alcalá de Henares

Palabras clave: Vesículas extracelulares, exosomas, cáncer pancreático, adenocarcinoma ductal de páncreas, microambiente tumoral, RNA no codificante, biomarcadores, dianas terapéuticas, vehículos farmacológicos, inmunoterapia.

Keywords: Extracellular vesicles, exosomes, pancreatic cancer, pancreatic ductal adenocarcinoma, tumor microenvironment, non-coding RNA, biomarkers, therapeutic targets, drug delivery system, immunotherapy.

Índice de contenidos

1. Resumen	4
2. Abstract.....	5
3. Glosario	6
4. Introducción.....	7
4.1 El auge de las vesículas extracelulares	7
4.2 Funciones de las vesículas extracelulares en el cáncer	9
4.3 Situación actual del cáncer de páncreas.....	11
5. Metodología.....	14
5.1 Materiales.....	14
5.2 Métodos	14
6. Resultados y discusión	20
6.1 Vesículas extracelulares en la patogenia del cáncer pancreático.....	20
6.2 Aplicaciones de las vesículas extracelulares en el cáncer de pancreas.....	25
6.2.1 Biomarcadores.....	25
6.2.2 Dianas terapéuticas.....	28
6.2.3 Vehículos terapéuticos	29
6.2.4 Inmunoterapia.....	33
7. Conclusiones.....	36
8. Bibliografía.....	38
9. Agradecimientos.....	44

1. Resumen

Las vesículas extracelulares son estructuras envueltas en bicapa lipídica implicadas en la comunicación intercelular, destacando dentro de estas los exosomas, vesículas de dimensiones nanométricas con mecanismo de formación selectivo que les confiere una huella molecular específica reflejo de su célula originaria. Las vesículas extracelulares de pequeño tamaño desempeñan numerosas funciones en situaciones fisiológicas y patológicas, entre las que el cáncer ocupa un puesto destacado, a través del transporte de biomoléculas como proteínas o ácidos nucleicos reguladores de la expresión génica hasta células diana, lo que las plantea como novedosas estrategias terapéuticas y diagnósticas. Las vesículas extracelulares desempeñan un importante papel en el remodelado del microambiente tumoral, favoreciendo la progresión neoplásica. El cáncer de páncreas presenta un microambiente tumoral especialmente complejo, íntimamente ligado a la proliferación de células tumorales, desarrollo de quimiorresistencia y metástasis, que, junto con un frecuente diagnóstico tardío, explican su ominoso pronóstico pese a los múltiples esfuerzos por optimizar el manejo actual.

En este trabajo se expone una revisión bibliográfica de los hallazgos más recientes respecto a las funciones de las vesículas extracelulares como mediadoras de la interacción entre células tumorales pancreáticas y su estroma, con el objetivo de esclarecer la intrincada patogenia de este cáncer, detallar sus posibles aplicaciones como biomarcadores en fluidos biológicos y estrategias terapéuticas como dianas, vehículos e inmunomoduladores con actividad *in vivo*.

Sus resultados son prometedores, sin embargo, son múltiples las limitaciones que distancian su traslado a la práctica clínica, precisando mayor investigación al respecto y estudios de diseño prospectivo en humanos.

2. Abstract

Extracellular vesicles are lipid bilayer membrane-based structures involved in intercellular communication. A notable subset are exosomes, which are nanometer-sized vesicles with a selective formation mechanism that provides them with a specific molecular signature that reflects their original cell nature. Small extracellular vesicles perform numerous functions in physiological and pathological situations, among which cancer occupies a prominent position, carrying biomolecules such as proteins or nucleic acids that regulate gene expression in target cells, which makes them relevant to novel therapeutic and diagnostic strategies. Extracellular vesicles play an important role in remodeling the tumor microenvironment, promoting neoplastic progression. Pancreatic cancer possesses a particularly complex tumor microenvironment, closely linked to tumor growth, development of chemoresistance, and metastasis, which, taken together with its late diagnosis, explain its ominous prognosis in spite of multiple efforts to optimize current management.

This paper presents a bibliographic review of the most recent findings regarding the functions of extracellular vesicles as mediators of the interaction between pancreatic tumor cells and their stroma, with the aim of clarifying its intricate pathogenesis and describing possible applications of extracellular vesicles as biomarkers in biological fluids and therapeutic strategies as targets, drug delivery systems and immunomodulators with *in vivo* activity.

Its results are promising, however, there are multiple limitations that need to be addressed in order to transfer their application to clinical practice, requiring further research in this regard and prospectively designed studies in humans.

3. Glosario

ACDP: Adenocarcinoma ductal de páncreas

CA19-9: Antígeno carbohidrato 19-9 o antígeno sializado de Lewis

CMC: Células madre cancerosas

CRISPR/Cas: Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas/enzima con actividad endonucleasa asociada a CRISPR

DNA: Ácido desoxirribonucleico

FAC: Fibroblastos asociados a cáncer

MAT: Microambiente tumoral

NPMI: Neoplasia papilar mucinosa intraductal

RNA: Ácido ribonucleico

circRNA: RNA circular

lncRNA: RNA no codificador largo

miRNA/miR: micro-RNA

RNA_m: RNA mensajero

siRNA: RNA corto de interferencia o de silenciamiento

hnRNP: ribonucleoproteína heterogénea nuclear

TC: Tomografía axial computarizada

VE: Vesículas extracelulares

pVE: Vesícula extracelular de pequeño tamaño (< 200nm)

VE_t: Vesículas extracelulares derivadas de células tumorales

4. Introducción

4.1 El auge de las vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares (VE) son estructuras esféricas envueltas en bicapa lipídica formadas por todo tipo de células de forma fisiológica y durante procesos patológicos, constituidas por múltiples componentes celulares como ácidos nucleicos, lípidos y proteínas ¹. **Las VE pueden subdividirse en tres grupos según su ruta biogénica:** cuerpos apoptóticos, vesículas de mayor tamaño con un diámetro de 1-5µm generadas por células en proceso de muerte programada; microvesículas o ectosomas, derivados de forma directa de la membrana plasmática por gemación, con un diámetro de 50-1000 nm; y los **exosomas**, de origen endosomal, que abarcan vesículas de 30-200 nm de diámetro ¹⁻³.

Originalmente se hipotetizó que los exosomas, descritos por primera vez en 1983 como una vía fisiológica de reciclaje del receptor de transferrina en reticulocitos, representaban un mecanismo de homeostasis celular para eliminar contenido innecesario^{4,5}; sin embargo, estudios posteriores sugieren su implicación en la **comunicación intercelular**, demostrándose la capacidad de transferir su contenido a células distantes de la original, regulando múltiples rutas de señalización y desencadenando respuestas biológicas ^{1,5}, cuyas posibles aplicaciones han propulsado el crecimiento de este campo de investigación de forma exponencial en las últimas dos décadas ⁵.

Existe cierta confusión en la literatura respecto a la nomenclatura, empleándose en muchas ocasiones el término exosoma para aludir a VE obtenidas por técnicas de aislamiento basadas en propiedades físicas como el diámetro o la densidad, que no discernen su ruta biogénica e implica este término, por lo que la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares estableció en 2018 la necesidad de estandarizar la denominación de las VE según su tamaño, marcadores específicos o su célula originaria⁶. De acuerdo con estas directrices los exosomas integran la categoría de **pequeñas vesículas extracelulares (pVE)** con un diámetro menor de 200 nm, junto con algunas microvesículas ^{3,6}.

Son numerosas las **patologías en las que se ha estudiado la implicación de las pVE**, como enfermedades neurodegenerativas, inflamatorias, cardiovasculares y procesos neoplásicos; destacándose como potenciales nuevas herramientas diagnósticas, al ser

fácilmente accesibles en fluidos corporales y reflejar el estado celular a través de alteraciones en su composición ¹, así como terapéuticas, fijándose como dianas o vehículos farmacológicos ^{1,3}.

Estimulados por estos objetivos, se han desarrollado múltiples estudios enfocados en dilucidar las rutas intracelulares implicadas en la formación de pVE, especialmente de los exosomas, y la **caracterización de sus componentes (Figura 1)** ^{2,7}. Estos pueden dividirse en comunes, entre los que destacan los miembros de la familia de las tetraspaninas **CD63**, CD81 y CD9, y proteínas relacionadas con el complejo ESCRT como **TSG101**, ALIX y Vps4; y específicos, determinadas por el tipo y estado de la célula de origen, como proteínas presentes en el citosol, núcleo, superficie o ambiente extracelular y ácidos nucleicos como DNA, mRNA y **RNA no codificante**, involucrados en la expresión génica de la célula diana ^{1,7}.

La biogénesis de los exosomas (Figura 1) se basa en la invaginación secuencial de la membrana plasmática. La primera da lugar a los endosomas tempranos, que al madurar forman endosomas tardíos, cuya membrana se invagina de nuevo formando vesículas intraluminales dentro del llamado cuerpo multivesicular, que a su vez puede ser degradado o fusionarse con la membrana plasmática liberando estas vesículas al medio extracelular, donde se denominan exosomas ^{1,2}. El proceso de secuestro de proteínas exosómicas y formación del cuerpo multivesicular está mediado principalmente por el **complejo ESCRT** e involucra el marcaje con ubiquitina; aunque se han descrito vías alternativas como la mediada por tetraspaninas, la ruta syndecan-sintenina-ALIX o la mediada por **esfingomielinasa** ².

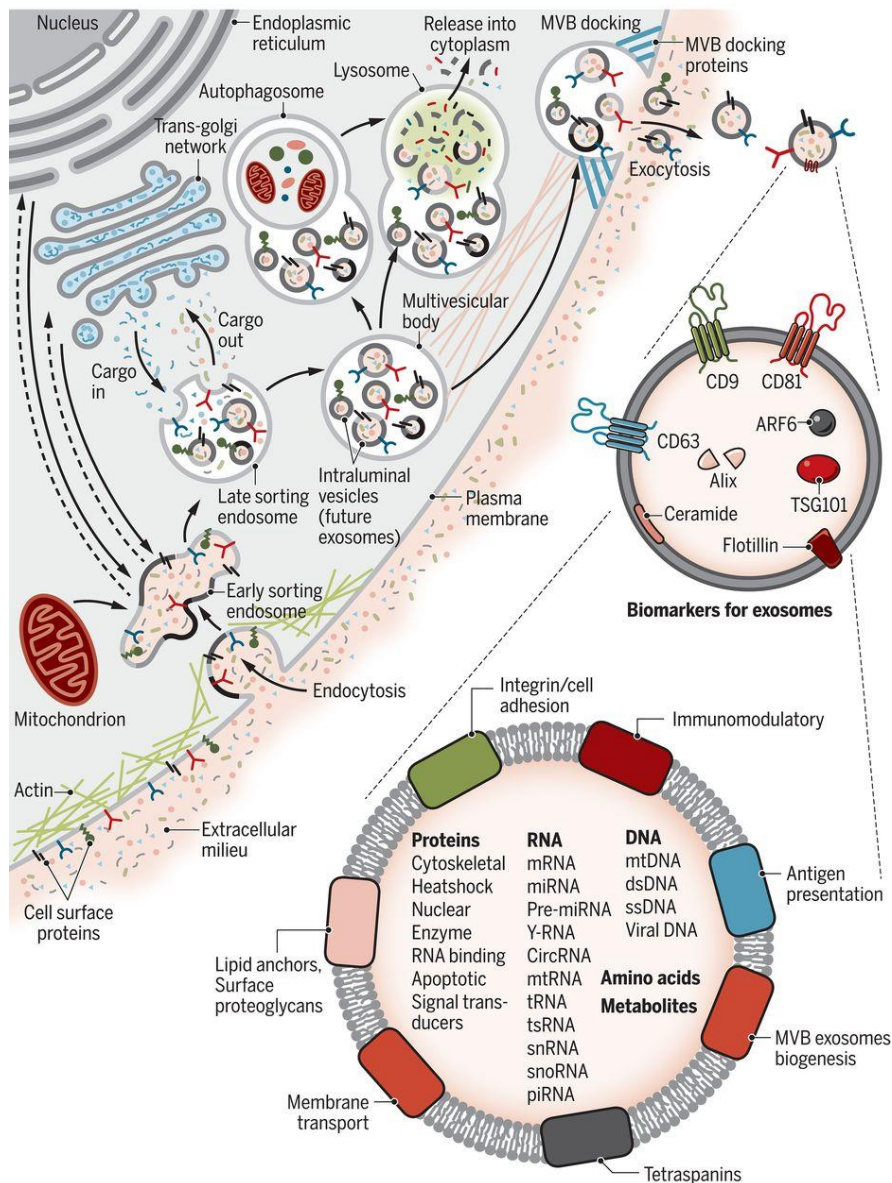


Figura 1. Biogénesis y composición de los exosomas. Tomada de Rädler et al. ²

4.2 Funciones de las vesículas extracelulares en el cáncer

Uno de los principales focos de investigación actual dentro del estudio de las VE es su papel como mediadoras de comunicación intercelular en procesos neoplásicos, participando en la carcinogénesis y progresión tumoral ^{8,9}; así como las potenciales promesas diagnósticas ¹⁰ y terapéuticas ^{3,11} que esto implica.

Las VE derivadas de células tumorales (VET) desempeñan importantes funciones dentro del microambiente tumoral (MAT), complejo y dinámico entorno íntimamente relacionado con la proliferación tumoral y metástasis; formado por matriz extracelular y diversos tipos de células estromales, entre las que destacan células del sistema inmune, endoteliales y fibroblastos asociados a cáncer (FAC) ^{8,9}. La comunicación entre tumor y

estroma ha sido clásicamente descrita a través de factores solubles; no obstante, en los últimos estudios están cobrando importancia las VEt, que presentan un comportamiento similar como mensajeras locales y a distancia (**Figura 2**)⁸.

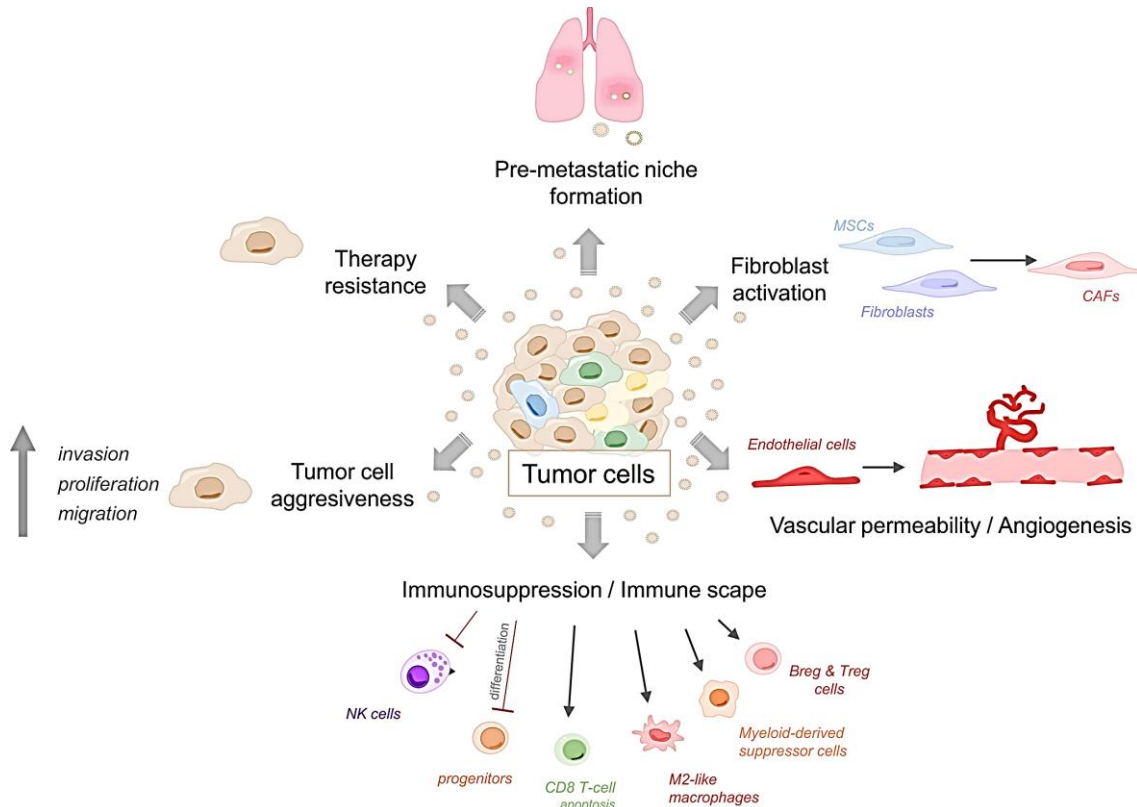


Figura 2. Funciones de las VEt en la progresión y metástasis tumoral: remodelado del MAT y desarrollo de nichos premetastáticos. Tomada de Robado-de-Lope et al.⁸

Se ha demostrado que la **interacción entre células tumorales mediante VEt** inhibe la apoptosis, aumenta la replicación celular, potencia su capacidad migratoria e incluso puede conferir quimiorresistencia; mientras que su **captación por células del estroma**, se ha relacionado con la activación de fibroblastos y células madre estromales dando lugar a los FACs, inmunomodulación, angiogénesis y alteración de la matriz extracelular^{8,9}, estableciéndose así un diálogo bidireccional entre tumor y estroma que en su conjunto promueve un **ambiente inmunosupresor, inflamación e hipoxia** tumoral, características clave del MAT a favor de la progresión neoplásica⁹. Las VEt tienen también la capacidad de realizar esta labor de remodelado en órganos distantes al tumor primario gracias a su estabilidad en fluidos biológicos, adecuando sus propiedades para hospedar a futuras células neoplásicas en los llamados nichos premetastáticos⁹.

Al igual que el resto de pVE, **las VEt poseen una huella molecular única que refleja el tipo y estado de la célula originaria**, de modo que junto a otras ventajas como su

mayor producción por parte de células tumorales frente a situaciones fisiológicas, su estabilidad y fácil acceso en fluidos corporales, las plantea como prometedoras **biomarcadoras** diagnósticas de cáncer, a través de la **biopsia líquida**, el análisis proteómico y detección de ácidos nucleicos específicos ¹⁰. En cuanto a las posibles aplicaciones terapéuticas de las pVE destaca su uso como **vector farmacológico**, especialmente quimioterapéuticos o reguladores de la expresión génica, gracias a su envuelta lipídica que permite la fusión directa con células diana, la posibilidad de ser derivadas de células del propio paciente disminuyendo la reacción inmune, su tamaño nanométrico que facilita su acceso hasta el tumor o su tropismo celular modificable por ingeniería molecular ¹¹. Otra posible estrategia basada en la **capacidad inmunorreguladora** de las VE es la elaboración de vacunas, especialmente las VEt y derivadas de células dendríticas, con el objetivo de estimular una respuesta inmune específica ³. Adicionalmente, pueden ser fijadas como **diana terapéutica**, bloqueando su efecto en alguna de las múltiples fases de proliferación y metástasis tumoral en las que se han visto implicadas ³.

La mayoría de ensayos clínicos publicados centran su punto de mira en la aplicación de las pVE o exosomas como biomarcadores de diferentes tipos de cáncer, aplicación que por ahora parece el principal objetivo, puesto que la modificación por ingeniería molecular para emplearse como agentes terapéuticos o transportadores farmacológicos es mucho más compleja y todavía se encuentra en fases tempranas de desarrollo, con escasos ensayos clínicos en humanos que hayan publicado sus resultados, aunque los estudios en animales e *in vitro* muestren resultados prometedores ¹¹.

4.3 Situación actual del cáncer de páncreas

El cáncer pancreático supone un **problema de salud a nivel mundial** pues, pese a tener una baja incidencia, representando sólo un 2,6 % de todos los nuevos casos de cáncer diagnosticados en 2020 ¹², es la **neoplasia con peor pronóstico** ¹³, con una supervivencia neta a 5 años del 7-10% ¹⁴, simbolizando la 7ª causa de muerte por cáncer global ¹² y la tercera en España, por detrás del de pulmón y colon ¹⁴. Su incidencia es mayor en países desarrollados y en varones, en aumento durante los últimos años, probablemente reflejando una mayor prevalencia de obesidad, diabetes y consumo alcohólico ¹², principales factores de riesgo junto con el tabaquismo, factores dietéticos, pancreatitis crónica, antecedentes familiares, raza negra y edad, con una mediana de diagnóstico a los

70 años ^{13,15}. Su pobre pronóstico se relaciona con la **detección tardía**, con metástasis sistémicas en más del 50% de los casos en el momento diagnóstico, debido al escaso reflejo sintomático en estadios incipientes, con un bajo porcentaje de pacientes candidatos a cirugía y altas tasas de **resistencia farmacológica** ¹⁵.

Dentro de las neoplasias pancreáticas destaca el **adenocarcinoma ductal (ACDP)** por ser el más frecuente y letal ¹³, en el que se centrará esta revisión. Su patogenia se entiende como un proceso evolutivo a partir de **lesiones precancerosas** no invasivas como la neoplasia intraepitelial microscópica pancreática, forma más frecuente difícilmente detectable por pruebas de imagen; y la **neoplasia papilar mucinosa intraductal (NPMI)**, lesiones de mayor tamaño con menor índice de malignización ¹⁵. Dentro de las alteraciones moleculares relacionadas destacan las mutaciones somáticas del **oncogen KRAS**, los genes supresores CDKN2A, TP53 y SMAD4 y las mutaciones hereditarias asociadas a cáncer de páncreas familiar, responsables de hasta un 10-15% del total de casos; aunque se ha estudiado su asociación con muchos otros genes e incluso grandes alteraciones cromosómicas, con frecuente heterogeneidad genética en lesiones precancerosas y multifocalidad, sugiriendo un origen policlonal ¹⁵. Otro factor de gran importancia en la carcinogénesis del ACDP es su **íntima relación con el MAT**, formando un santuario inmunitario protegido por una fuerte reacción desmoplásica que actúa como barrera física frente a los fármacos ¹³.

El cribado actual de ACDP se centra en pacientes de alto riesgo genéticamente predispuestos, destacando el síndrome de Peutz-Jeghers, la pancreatitis hereditaria o el melanoma familiar con nevus atípicos múltiples; y se realiza mediante pruebas de imagen, especialmente TC, y la medición anual de glucosa o HbA1C, puesto que la diabetes mellitus de inicio reciente es considerado un factor de alto riesgo en estos pacientes ¹⁵. Otro biomarcador ampliamente extendido en la práctica clínica es el **antígeno CA 19-9**, de gran utilidad pronóstica y en la monitorización de la respuesta al tratamiento; aunque con ciertas limitaciones ^{13,15}. Con el objetivo de incrementar el diagnóstico precoz de esta enfermedad, se han estudiado múltiples marcadores en sangre, destacando células y ADN tumorales circulantes y **marcadores exosomales**; y en jugo pancreático, con la detección de ADN con mutaciones en TP53/SMAD4 ¹⁵.

En cuanto al tratamiento, la mejor opción es la **resección quirúrgica** seguida de tratamiento adyuvante; sin embargo, menos del 20% de pacientes se encuentran en estadio

resecable en el momento diagnóstico. En los pacientes con enfermedad localmente avanzada, cobran importancia los tratamientos neoadyuvantes quimioterapéuticos y la radioterapia con el objetivo de reducir el tamaño tumoral y posibilitar el abordaje quirúrgico; reduciéndose las opciones terapéuticas a la quimioterapia en la enfermedad metastásica.^{13,15} El tratamiento quimioterapéutico actual se basa en el esquema **FOLFIRINOX** (5-fluorouracilo, ácido folínico, irinotecán y **oxaliplatino**) o **gemcitabina** más **paclitaxel**; aunque han surgido nuevas estrategias terapéuticas basadas en el perfil mutacional del tumor¹⁵.

Pese a todos los esfuerzos y avances realizados en los últimos años, el cáncer de páncreas sigue siendo una enfermedad de pronóstico umbrío, con la necesidad urgente de diseñar métodos eficientes de diagnóstico precoz y tratamientos con mayor impacto en la supervivencia, por lo que una mejor comprensión de su patogenia para determinar nuevas dianas terapéuticas y biomarcadores es de vital importancia. **Con este objetivo se plantea la revisión de las posibles funciones de las VE en la patogenia del ACDP y consecuentes aplicaciones diagnósticas y terapéuticas.**

5. Metodología

5.1 Materiales

Se ha empleado el sistema de búsqueda **PubMed** para navegar a través de las bases de datos asociadas a la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos (NLM), destacando Medline y PubMed Central, con el objetivo de realizar una revisión bibliográfica de la literatura disponible actualmente sobre las implicaciones de VE en la patogenia del cáncer de páncreas y sus posibles aplicaciones en la práctica clínica. También se ha consultado el catálogo de recursos electrónicos ofrecidos por la **Biblioteca de la Universidad de Alcalá**.

Adicionalmente se han utilizado las bases de datos de **ClinicalTrials.gov** y la Plataforma de Registro Internacional de Ensayos Clínicos (**ICTRP**) de la Organización Mundial de la Salud, con el fin de extraer información referente a los ensayos clínicos desarrollados hasta ahora en relación con las VE como biomarcadores y tratamiento dirigido de cáncer pancreático. Para completar la visión general sobre la situación actual de esta enfermedad se recurrió a informes publicados por la Sociedad Española de Oncología Médica (**SEOM**) basados en los datos obtenidos del Instituto Nacional de Estadística y la Red Española de Registros de Cáncer; empleándose las Estadísticas Globales del Cáncer (**GLOBOCAN**) para consultar su impacto a nivel mundial.

5.2 Métodos

Con el propósito de refinar la **búsqueda en PubMed**, se emplearon los descriptores MeSH, recogidos en el tesoro producido por la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos; así como los operadores booleanos “AND”, “OR” y “NOT”; y los filtros de búsqueda avanzada, como la fecha de publicación y el tipo de artículo deseado. De este modo, se siguieron las siguientes rutas para la selección de artículos:

- **Relación entre las VE y el cáncer:**

```
((("Extracellular Vesicles"[MeSH Terms]) OR ("Cell-Derived Microparticles"[MeSH Terms]) OR ("Exosomes"[MeSH Terms])) AND ("Neoplasms"[Mesh]) OR ("Early Detection of Cancer"[Mesh]) OR ("Cancer Vaccines"[Mesh]) OR ("Antineoplastic Agents"[Mesh]) OR ("Biomarkers,
```

Tumor"[Mesh])) NOT ("Cardiovascular Diseases"[Mesh]) NOT ("Neurodegenerative Diseases"[Mesh]) NOT ("Communicable Diseases"[Mesh]).

Dado que los artículos seleccionados de esta búsqueda sustentarían un apartado de la introducción y servirían para cohesionar los conceptos desarrollados en el cuerpo del trabajo, se decidió priorizar artículos de revisión bibliográfica que aportaran una visión panorámica sobre el tema a tratar, lo más actualizada posible, por lo que se aplicaron los filtros “review” y año de publicación 2023, delimitándose los resultados obtenidos a 80 artículos. Posteriormente se eliminaron aquellos que se centraban en un tipo de cáncer específico o a los que no se pudo conseguir acceso, reduciéndose a 34, de los cuales se seleccionaron 5 tras la lectura de sus abstracts.

- **Relación entre las VE y el cáncer de páncreas:**

("Carcinoma, Pancreatic Ductal"[Mesh]) OR ("Pancreatic Neoplasms"[Mesh]) AND ("Extracellular Vesicles"[Mesh]) OR ("Cell-Derived Microparticles"[Mesh]) OR ("Exosomes"[Mesh]))

Al ser este el tema central del trabajo, se amplió la selección a todo tipo de artículos científicos publicados entre 2020-2023, obteniéndose 176 resultados. Tras un primer cribado se eliminaron 82 por no facilitarse el acceso sin suscripción, presentar exclusivamente resultados *in vitro*, tratar el tema central de la revisión de forma tangencial o encontrarse artículos similares más recientes y completos. Tras leer el abstract de los 94 artículos restantes y clasificarlos según correspondieran a las funciones de las VE en la patogenia del ACDP, sus posibles aplicaciones en el diagnóstico o en el tratamiento, se seleccionaron 25 artículos priorizando artículos originales, sin conflictos de intereses, estudios en los que participaran pacientes con ACDP y aquellos cuyo contenido fuera de interés en más de un apartado de la revisión, que aparecen reflejados en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Artículos científicos originales incluidos en la revisión bibliográfica y sus aportaciones referentes al papel de las pVE en la patogenia del ACDP, aplicaciones diagnósticas o terapéuticas con actividad *in vivo*.

	PATOGENIA	BIOMARCADORES	TRATAMIENTO
(16)	Incremento de circRNA PDK1 por hipoxia. Eje miR-628-3p/BPTF, degradación BIN1, regulación c-myc, proliferación tumoral y capacidad invasiva.	circPDK1 en pVE circulantes como biomarcador sérico diagnóstico y pronóstico	
(17)	Incremento lncRNA UCA1 en células tumorales hipóxicas. Eje miR-96-5p/AMOTL2 y angiogénesis.	UCA1 en pVE circulantes como biomarcador sérico diagnóstico y pronóstico	
(18)	LncRNA SNHG11 en VEt. Eje miR-324-3p/VEGFA y angiogénesis.	lncRNA SNHG11 en pVE circulantes como biomarcador diagnóstico	Bloqueo del eje SNHG11/miR-324-3p/VEGFA
(19)	miR-30b-5p inducido por hipoxia disminuye expresión de GJ1 provocando angiogénesis	miR-30b-5p en pVE y total en sangre como biomarcador diagnóstico	Inhibición de miR-30b-5p
(20)	SUMOilación de hnRNPA1 mediada por KRAS ^{G12D} y linfangiogénesis vía PROX-1.	hnRNPA1 en pVE como biomarcador sérico diagnóstico y detección de metástasis linfática.	Bloqueo de SAE1, hnRNPA1 o PROX-1.
(21)	Red de comunicación entre subpoblaciones tumorales mediada por pVE. Eje Agrina/LRP4/ YAP.	pVE con elevado contenido en agrina como marcador pronóstico.	Bloqueo de biogénesis exosómica (Rab 27) y tratamiento antiagrina.
(22)	miR-10 ^a y eje WWC2/LATS1/2/YAP. Células madre cancerosas y transición epitelio-mesenquimal.		Inhibición miR-10 ^a
(23)	miR-338-5p como regulador del eje WIF1/Wnt8/ β catenina y células madre tumorales		circRNA-0030167 vehiculizado por pVE derivadas de células madre de médula ósea inhibe miR-338-5

(24)	miR-4465 y miR-616-3p inducidos por hipoxia en células estrelladas. Inhibición PTEN, proliferación tumoral y capacidad invasiva.	miR-4465 y miR-616-3p en pVE séricas como biomarcador diagnóstico
(25)	miR-92a-3p, miR-221-3p, miR-181a-5p, miR-222-3p y miR-21-5p en pVE derivadas de FAC expuestos a gemcitabina. Inhibición PTEN y quimiorresistencia.	Inhibición de secreción exosómica mediante bloqueo de esfingomielinasa neutra
(26)	miR-331-3p en pVE derivadas de FAC Eje SCARA-5/FAK, proliferación celular y capacidad invasiva.	
(27)	ANXA-1 en VEt induce polarización M2 de macrófagos estromales.	
(28)	miR-21-5p en pVE derivadas de macrófagos M2. Aumento de diferenciación y actividad de células madre cancerosas.	Inhibición miR-21a-5p
(29)		pVE CD 63+ y pVE derivadas de plaquetas (CD 61+ y CD41+). Uso combinado de pVE CD 63+ y CA 19.9 en diagnóstico precoz.
(30)		Combinación miRNA exosomales y miRNA libre en plasma. Diagnóstico precoz y uso combinado con CA 19-9.
(31)		miRNA en pVE de jugo pancreático y plasma combinados con detección de CA19-9

(32)	GPRC5 y EPS8 en pVE plasmáticas. Diagnóstico precoz, distinción de pancreatitis y recurrencias postoperatorias.	
(33)	MUC5AC asociado a pVE en pacientes con NPMI de alto grado o ACDP invasivo	
(34)	Exosomas con DNA mitocondrial y cardiolipina como posible mecanismo de evasión apoptótica e inmune	Aumento de mtDNA/DNA nuclear en pVE circulantes y mutaciones específicas.
(35)	miR-485-3p en pVE derivados de células epiteliales ductales pancreáticas no tumorales. Inhibición PAK1 frena invasión y metástasis tumoral	miR-485-3p suprime invasión tumoral <i>in vitro</i> y metástasis pulmonar <i>in vivo</i> .
(36)		siRNA anti KRAS ^{G12D} en pVE derivadas de células mesenquimales
(37)		CRISPR/Cas 9 vehiculizado por pVE derivadas de células mesenquimales como supresor de KRAS ^{G12D} .
(38)		pVE derivadas de células tumorales autólogas modificadas con ligando de integrina $\alpha\beta3$ como vehículo de paclitaxel.
(39)		Sistema de transporte dual basado en pVE derivadas de células mesenquimales con siRNA anti galectina-9 y oxaliplatino como inmunoterapia
(40)		Vacuna antitumoral basada en pVE derivadas de células tumorales expuestas a mitoxantrona modificadas con siRNA anti CCL22.

La **búsqueda en ClinicalTrials.gov y en la Plataforma de Registro Internacional de Ensayos Clínicos** se realizó bajo los términos “extracelular vesicles” o “exosomes” y “pancreatic cancer” que ofrecieron un total de 11 y 7 ensayos clínicos respectivamente, 4 de ellos duplicados, ninguno con resultados publicados en el momento actual, por lo que se seleccionaron únicamente tres de ellos (NCT03711890 ⁴¹, NCT05625529 ⁴² y NCT03608631 ⁴³) y tres artículos relacionados para suplir la falta de datos concluyentes, dos incluidos dentro de los artículos originales recogidos en la **Tabla 1**.

Para elaborar la introducción del trabajo e integrar los conceptos básicos en los que se edifica el resto del documento se añadieron **otras referencias bibliográficas**, incluyendo 12 artículos de revisión obtenidos a través de Pubmed, dos libros electrónicos ^{13,44} , el informe sobre las cifras de cáncer en España en 2023 publicado por la Sociedad Española de Oncología Médica ¹⁴ y los datos de las Estadísticas Globales del Cáncer en 2020 recogidos por Sung et al. ¹².

6. Resultados y discusión

6.1 Vesículas extracelulares en la patogenia del cáncer pancreático

La **heterogeneidad** es una característica inherente del cáncer de páncreas, de manifiesto tanto en las células y componentes del estroma como en sus distintas subpoblaciones tumorales; principal causa de su marcada resiliencia, resistencia a tratamiento farmacológico y nefasto pronóstico, fruto de una dinámica y compleja interacción entre las células cancerosas y su entorno ⁴⁵. El ACDP posee un prominente y desarrollado **MAT de carácter fibroinflamatorio**, con un compartimento mesenquimal mayor que el de otros tumores sólidos, pudiendo llegar a representar la mayoría del volumen tumoral, compuesto principalmente por FAC, células endoteliales, leucocitos y componentes de la matriz extracelular, cuyas funciones e interrelaciones han sido ampliamente estudiadas con el objetivo de alcanzar un mayor entendimiento de esta patología y una mejor respuesta farmacológica ⁴⁵. De acuerdo con el importante papel que desempeña en esta entidad el MAT y la cantidad creciente de evidencia acumulada respecto a las implicaciones de las **VE como mediadoras de su remodelado y de la comunicación intercelular**, estas suponen un enfoque novedoso que podría ayudar a comprender la patogenia del ACDP y desarrollar nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas ^{9, 11}.

Uno de los principales mecanismos observados en la comunicación entre células tumorales pancreáticas y su entorno a través de pVE, es la transmisión de **RNA no codificante**, cuyas implicaciones en el cáncer han sido extensamente estudiadas en los últimos años ^{44,46,47}. Las funciones de estos RNA están estrechamente ligadas con la modulación de la expresión génica a distintos niveles, destacando el papel inhibitorio de los RNA no codificantes de menor tamaño como el **micro RNA (miRNA)** y el **RNA corto de interferencia o silenciamiento (siRNA)** ⁴⁴. Estas moléculas de RNA bicatenario lineal de 19-25 nucleótidos de longitud, que difieren en su origen endógeno o exógeno respectivamente, aportan el RNA guía al complejo silenciador inducido por RNA (RISC) al transformarse en su forma activa de cadena simple, que se aparea con secuencias complementarias de RNAm específicos impidiendo su traducción, lo cual puede tener un efecto oncogénico o supresor en distintos tipos de cáncer ⁴⁴. Otros miembros de esta familia son los **RNA largos no codificantes (lncRNA)**, caracterizados por poseer más de 200 nucleótidos, que suponen un componente emergente en la patogenia de procesos malignos, con diversas funciones como la señalización intracelular,

soporte del ensamblaje de complejos ribonucleoproteicos, secuestro de factores de transcripción o inhibición de miRNA al actuar como competidores de su mRNA diana ⁴⁶. También hay creciente evidencia sobre los papeles fisiopatológicos del **RNA circular (circRNA)**, molécula cíclica con funciones similares al lncRNA pero que a diferencia de las anteriores presenta ensamblaje covalente de sus extremos, lo que le confiere resistencia a exonucleasas y mayor estabilidad ⁴⁷.

Son diversos los estímulos que pueden influenciar la cantidad y composición de las pVE secretadas en el MAT, dentro de los cuales cabe resaltar el **estrés hipóxico**, característica común a todo tipo de neoplasias sólidas ⁹, especialmente en tumores marcadamente hipovascularizados como el ACDP, reflejo de la intensa reacción fibrosante del estroma implicada también en su resistencia farmacológica ⁴⁵. La hipoxia se asocia con un aumento de producción de **factor inducible por hipoxia (HIF)** que regula la expresión de genes desencadenantes de respuestas adaptativas tumorales ⁹; en concreto, se ha asociado HIF-1 α con el aumento de producción exosómica por parte de células tumorales de ACDP con elevado contenido en circRNA-PDK1 ¹⁶ y lncRNA-UCA1 ¹⁷. El circPDK1 exosomal se ha relacionado con aumento de glicolisis, crecimiento tumoral y metástasis mediante la potenciación de c-myc en otras células tumorales a través de dos vías: la inhibición competitiva de miR-628-3p que aumenta la traducción del RNAm de la subunidad BPTF requerida para la actividad transcripcional de c-myc; y favoreciendo la ubiquitinación y degradación de BIN-1, de naturaleza supresora, como se observa en la **Figura 3** ¹⁶. El factor de transcripción c-myc es clave en la regulación de diversos genes implicados en la glicolisis tumoral, cuyo incremento es necesario para cubrir la elevada demanda energética asociada a la proliferación celular y metástasis ¹⁶.

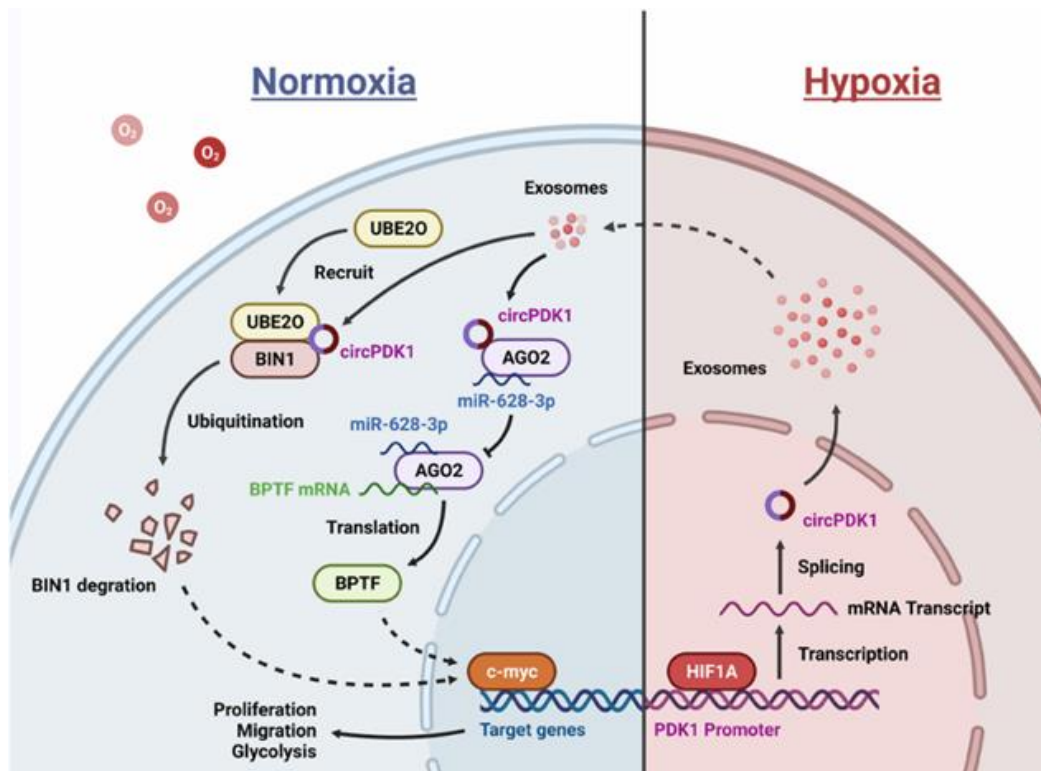


Figura 3: Representación esquemática del efecto de circPDK1 inducido por hipoxia en la progresión tumoral. Tomada de Jin et al. ¹⁶

Análogamente, se ha observado un aumento de producción de VEt y de su contenido en lncRNA-UCA1 inducido por hipoxia que al ser captado por células endoteliales secuestra miR-96-5p produciéndose **angiogénesis** y crecimiento tumoral por aumento de expresión de AMOTL-2, proteína de membrana señalizadora de angiomotilina, que regula migración y formación tubular a través de la vía de señalización de proteínas cinasas activadas por mitógenos MAPK/ERK1/2 ¹⁷. Otro lncRNA detectado en VEt con actividad angiogénica es el lncRNA-SNHG11, que compite con el RNAm del factor de crecimiento endotelial vascular VEGFA por su unión a miR-324-3p, aumentando su expresión ¹⁸. Chen et al. ¹⁹ realizaron un estudio transcriptómico de células endoteliales obtenidas de muestras de ACDP comparando su secuenciación con células endoteliales de tejido pancreático sano, detectándose menor expresión del gen codificador de conexina 43 (GJA1), a su vez silenciado por miR-30b-5p contenido en VEt secretadas en contexto de hipoxia, provocando migración y proliferación vascular.

Al igual que la angiogénesis es un factor predisponente para la metástasis tumoral por vía hemática, la **linfangiogénesis** promueve la diseminación linfática y es característica del MAT del ACDP ⁴⁵, donde también están cobrando importancia rutas de señalización

alternativas a VEGF, como la mediada por PROX-1²⁰. En el estudio de Luo et al.²⁰ se determinó que la mutación KRAS^{G12D}, oncogen conductor más frecuente en ACDP¹⁵, afectaba al mecanismo de clasificación del contenido exosomal mediado por TSG101, a través de la modificación de ribonucleoproteína heterogénea nuclear A1 (hnRNPA1) provocando su transporte a células endoteliales linfáticas donde impide la degradación del RNAm de PROX-1, cuya expresión se ha visto asociada al mantenimiento y proliferación del endotelio linfático, representado en **Figura 4**. Esta modificación consiste en una SUMOilación, proceso postraduccionl común implicado en la regulación de la estabilidad, localización en compartimentos celulares y activación de diversas proteínas, mediada en este caso por la enzima SAE-1 cuya expresión se ve inducida de forma directa por la mutación KRAS^{G12D}.²⁰

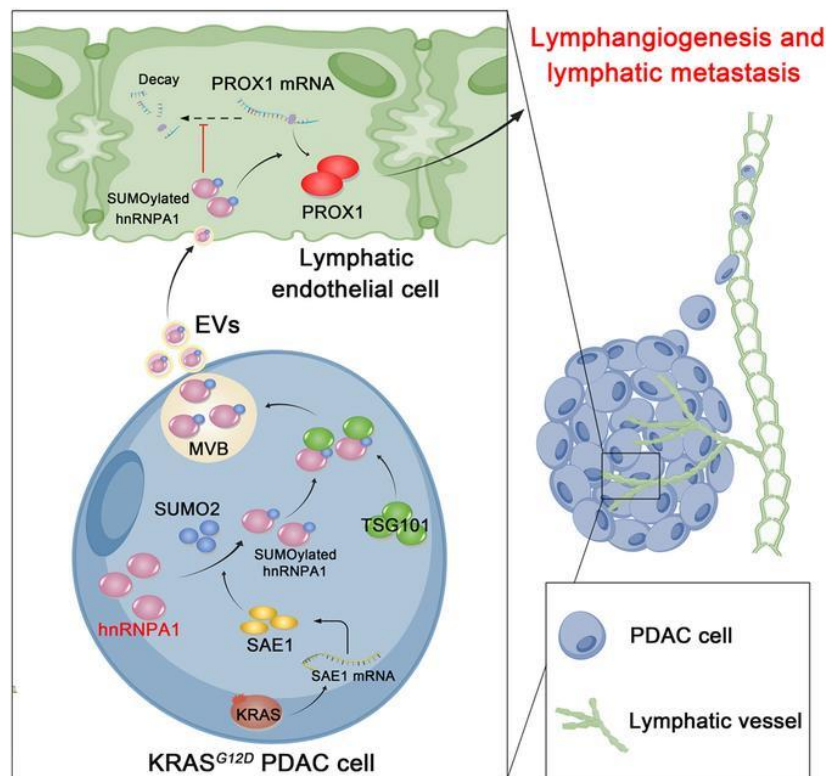


Figura 4: Linfangiogenesis por vía PROX-1 inducida por SUMOilación de hnRNPA1 dependiente de KRAS^{G12D}. Tomada de Luo et al.²⁰

Otro factor implicado en la progresión neoplásica y remodelado del MAT son las **células madre cancerosas (CMC)**, subpoblación celular con alta capacidad replicativa y potencial de diferenciación multidireccional, que favorecen la supervivencia y resistencia quimioterapéutica y están íntimamente ligadas al proceso de transición epitelio-

mesenquimal y metástasis⁴⁸. Recientemente se ha descubierto una red de comunicación organizada entre subpoblaciones tumorales mediada por pVE con marcadores exosómicos, mostrando mayor afluencia procedente de CMC en las que se observó un elevado contenido en agrina, que unida a su receptor LRP-4 favorece la forma activa del regulador transcripcional asociado a Yes1 (YAP) en las células tumorales receptoras²¹. También se ha visto asociación entre activación de YAP y miR-10a sobreexpresado en CMC²² y de miR-338-5p que promueve la ruta Wnt/ β catenina inhibiendo la traducción de su supresor WIF1²³. YAP actúa como un conductor oncogénico en ACDP²¹, jugando un papel central en la ruta de señalización Hippo, asociada a proliferación celular, promoción y mantenimiento de las CMC, transición epitelio-mesenquimal, resistencia quimioterapéutica y capacidad autorreplicativa²². La forma activa de YAP, no fosforilada, se trasloca al núcleo donde provoca la transcripción de diversos genes implicados en la supervivencia celular; mientras que su forma fosforilada es retenida en el citosol, por lo que la inhibición por distintas vías de la quinasa LATS1/2, responsable de esta fosforilación, provoca mayor activación de la vía Hippo^{21,22}. De una forma similar, el bloqueo de la traducción de su principal inhibidor resulta en la potenciación de la ruta de señalización Wnt/ β catenina que se ha visto asociado con las características propias de las CMC²³.

Las **células del estroma tumoral** también producen pVE con diverso impacto en células tumorales y otras células del MAT⁹. La inhibición del gen supresor PTEN en células tumorales es la diana de varios miRNA encapsulados en pVE, como los derivados de células estrelladas pancreáticas hipóxicas²⁴ o FAC²⁵. Los FAC son una población heterogénea muy abundante en el estroma, responsables del depósito de la matriz extracelular característicamente densa del ACDP y en íntima relación con las células cancerosas⁴⁵. La producción de exosomas derivados de FAC puede verse incrementada por la exposición a gemcitabina, agente quimioterapéutico ampliamente empleado en esta patología¹⁵, derivando en la inhibición del RNAm de PTEN mediada por miRNA y desarrollo de quimiorresistencia²⁵. Otro mecanismo mediado por miRNA transportado por pVE derivadas de estas células es la inhibición de la expresión del receptor “scavenger” SCARA-5 que se ha relacionado con mayor potencial proliferativo, a través de la pérdida de supresión de la quinasa de adhesión focal (FAK); e invasivo, con elevación de producción de metaloproteasas²⁶. Los receptores “scavenger” son una familia de receptores de membrana ampliamente expresados en monocitos y macrófagos;

SCARA-5, en concreto, se ha visto asociado a células epiteliales, con efecto supresor tumoral al inhibir la expresión de FAK implicada en la migración celular y angiogénesis ²⁶.

Los **macrófagos asociados al tumor** son otra población con gran relevancia dentro del MAT, cuya polarización M2 o antiinflamatoria se conoce como fenotipo protumoral favoreciendo ambiente inmunosupresor, angiogénesis, crecimiento y metástasis ⁹; y es promovida en el ACDP por VEt con elevado contenido en anexina-1, entre otros mecanismos ²⁷. Los macrófagos M2 a su vez se han visto relacionados con la progresión neoplásica a través de la producción de pVE, fomentando por ejemplo la proliferación y mantenimiento de CMC mediada por miR-21-5p, que se ve sobreexpresado en esta subpoblación tumoral y se asocia con mayor actividad autorreplicativa, migratoria y resistencia quimioterapéutica ²⁸.

6.2 Aplicaciones de las vesículas extracelulares en el cáncer de páncreas

6.2.1 Biomarcadores

Una de las principales causas de la baja supervivencia del ACDP es el retraso diagnóstico, que limita gravemente el porcentaje de pacientes candidatos a cirugía, único tratamiento potencialmente curativo ^{13,15}. El **antígeno carbohidrato 19-9 (CA19-9)**, o antígeno sializado de Lewis, constituye el principal biomarcador empleado en la práctica clínica tanto en el cribado, como en el diagnóstico, manejo y predicción pronóstica de esta patología; sin embargo, presenta notables limitaciones que resaltan la necesidad de elaborar nuevas estrategias para abordar el ACDP ⁴⁹. Dentro de las principales limitaciones a su potencial como biomarcador sérico destacan: ausencia de expresión en un 6-22% de la población caucásica con genotipo negativo para la expresión del gen de Lewis; sobreexpresión en otras patologías gastrointestinales y extraintestinales tanto benignas como malignas; bajo valor predictivo positivo que lo descalifica como herramienta de cribado; sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo subóptimos para el diagnóstico, quedando relegado al uso adyuvante de pruebas de imagen, con negligente eficacia para la distinción entre lesiones benignas y premalignas; y un rango de valores no estandarizado para su uso en el manejo y predicción de recurrencias ⁴⁹. Se han diseñado numerosos estudios para mejorar su rendimiento, muchos de ellos centrados en detectar nuevos biomarcadores dentro del concepto revolucionario de la **biopsia líquida**, que permite la determinación del perfil molecular

de todo tipo de fluidos corporales, con el fin de detectar sustancias específicas derivadas del tumor, como células tumorales o DNA circulantes y pVE ^{10,15}.

Las pVE presentan ciertas ventajas sobre el resto de sustratos de la biopsia líquida, como su mayor estabilidad en muestras biológicas, composición específica reflejo de su célula originaria y **mayor producción en procesos neoplásicos** frente a estado basal fisiológico ¹⁰. Basándose en este último precepto, Odaoka et al. ²⁹ observaron una mayor producción de VE circulantes en pacientes con ACDP reflejada en una elevación de marcadores exosómicos (tetraspanina CD63) y plaquetarios (CD41 y CD61) frente a sujetos sanos; demostrando independencia entre marcadores vesiculares y CA19-9, con mejoría del rendimiento diagnóstico en fases precoces al combinar VE CD63+ con CA19-9 frente a ambos por separado; y fluctuación de niveles de marcadores de VE de forma similar a CA19-9 antes y después de cirugía; sin embargo, la aparente elevación de marcadores plaquetarios preoperatoria en pacientes que sufrieron recaídas no fue estadísticamente significativa y se especula que CD63 podría elevarse también en otras patologías especialmente de naturaleza inflamatoria. Buscando mayor especificidad y rendimiento diagnóstico, otros autores centraron su estudio en componentes concretos de las VEt como miRNA ^{30,31}, proteínas ^{32,33} e incluso DNA mitocondrial ³⁴.

Nakamura et al. ³⁰ llevaron a cabo un estudio de cohortes retrospectivo multicéntrico a partir de muestras séricas procedentes de Korea, Estados Unidos y Japón, determinando en una primera cohorte potenciales **miRNA contenidos en VE circulantes** y libres en plasma sobreexpresados en pacientes con ACDP frente a individuos sanos, y posteriormente validando su rendimiento diagnóstico en una segunda cohorte en comparación y combinación con CA19-9. La combinación de 5 miRNA libres y 8 exosómicos presentó un elevado rendimiento diagnóstico en etapas tempranas de ACDP, siendo capaces de identificar hasta el 91% de falsos negativos con detección aislada de CA19-9. Otro estudio analizó el uso conjunto de miRNA exosomal en sangre y jugo pancreático obtenido de pacientes sometidos a ecoendoscopia y estimulación con secretina, mostrando sólo una modesta mejoría frente a CA19-9 ³¹.

El **estudio proteómico de pVE** aisladas por ultracentrifugación del suero de pacientes reveló elevación de GPRC5, de la familia de receptores asociados a proteína G, y EPS8, sustrato de la ruta del factor de crecimiento epitelial, cuyo uso combinado mostraba buena precisión diagnóstica en fases iniciales, con independencia y mejoría del rendimiento de CA19-9, así como potencial discriminatorio frente a pacientes con pancreatitis y

predictivo de recurrencias postoperatorias; sin embargo, el tamaño muestral fue pequeño, especialmente para el estudio de las recurrencias, no se determinó el origen celular de las pVE y el análisis proteómico fue complejo y requería técnicas de laboratorio no presentes en la práctica clínica habitual ³². Con el objetivo de salvar esta dificultad técnica, Yang et al. ³³ emplearon un dispositivo de lectura digital de ELISA en un estudio basado en la detección de proteínas contenidas en VE como biomarcador que permita **diferenciar lesiones preneoplásicas de alto grado o ACDP invasor dentro de pacientes con NPMI** detectadas por imagen, destacando la sobreexpresión en vesículas circulantes de la glicoproteína secretora de mucina MUC5AC, con elevada precisión y resultados marcadamente superiores al seguimiento por imagen aislado. Este hallazgo podría ofrecer un abordaje no invasivo, evitando el seguimiento por imagen a largo plazo y cirugías innecesarias en lesiones de bajo grado, gran dilema afrontado en el manejo de esta patología debido al creciente diagnóstico de este tipo de lesión con bajo índice de malignización, detectando de forma precoz aquellas con displasia de alto grado o que entrañen un ACDP incipiente, por lo que sería de gran interés desarrollar estudios prospectivos que permitan su incorporación a la práctica clínica ³³. Un ejemplo de esto es el ensayo clínico **NCT03711890**, que pretende determinar la eficacia de la tomografía de coherencia óptica con ultrarresolución en el seguimiento de pacientes diagnosticados con NPMI; y, adicionalmente, se les está extrayendo muestras sanguíneas para analizar la presencia de marcadores exosómicos y comparar la eficacia de ambos métodos en la detección de ACDP microinvasor en pacientes con esta lesión premaligna ⁴¹.

Otro descubrimiento reciente es el aumento de la proporción entre **DNA mitocondrial** y DNA genómico en pVE circulantes de pacientes con ACDP frente a controles sanos, lo que podría tener un significado diagnóstico al detectar su elevación o mutaciones específicas; además, el alto contenido en DNA mitocondrial junto con la presencia de cardiolipina en VEt podrían explicar un mecanismo de escape apoptótico de células tumorales, evitando también desencadenar una respuesta inmune, al evacuar estos contenidos mitocondriales a través de exosomas ³⁴.

Otras moléculas contenidas en VE implicadas en la patogenia que han presentado potencial como biomarcadores séricos *in vivo* y/o se han relacionado con mal pronóstico aparecen reflejadas en la **Tabla 1**.

Como resaltan Yoshioka et al. ³² las **pVE circulantes podrían optimizar la sensibilidad de CA19-9 en fases precoces**, puesto que, a diferencia de este último, su concentración

no depende únicamente del tamaño tumoral; sino que, al estar implicadas en la progresión del ACDP, se encuentran elevadas en fases incipientes en las que el remodelado del MAT es vital para la supervivencia de las células cancerosas, lo que explicaría la mejoría del rendimiento diagnóstico precoz observada en los estudios con marcadores exosomales recogidos en esta sección.

Pese al gran esfuerzo de investigación y cantidad de información emergente respecto al uso de VE en el diagnóstico de ACDP, los estudios expuestos son de carácter retrospectivo, la mayoría de ellos con tamaños muestrales limitados y los métodos de aislamiento y detección de componentes de VE diversos, factores que limitan su reproducibilidad, por lo que es necesaria la realización de estudios prospectivos que validen estos resultados y estandaricen los métodos de obtención de este potencial biomarcador tan prometedor.

Con este fin se ha diseñado el ensayo clínico ExoLuminate (**NCT05625529**)⁴², con un gran tamaño muestral (1000 adultos), que busca probar la eficacia diagnóstica en ACDP de un panel basado en marcadores exosómicos comparado con las técnicas de cribado actuales, a través del método de detección exoverita®⁵⁰, sistema desarrollado para el estudio proteómico de pVE circulantes en el diagnóstico precoz de cáncer pancreático, ovárico y vesical, que se basa en el aislamiento de VE plasmáticas mediante un campo de corriente eléctrica alterna. Esta plataforma tiene además capacidad de detección multiómica, por lo que puede incorporarse la detección de otros biomarcadores como ácidos nucleicos⁵⁰. ExoLuminate es un estudio de cohortes prospectivo multicéntrico que planea incluir a pacientes de alto riesgo para desarrollar ACDP en una primera cohorte y pacientes con alta sospecha de cáncer de páncreas o ACDP ya diagnosticado en una segunda⁴².

6.2.2 Dianas terapéuticas

El conocimiento de los mecanismos intrínsecos que rigen la carcinogénesis y desarrollo tumoral es fundamental para la elaboración de terapias dirigidas, cuyas indicaciones actuales en el ACDP se restringen ciertos perfiles mutacionales y no han mostrado gran impacto en la supervivencia global¹⁵; sin embargo, las numerosas aportaciones científicas sobre las implicaciones de las VE en la patogenia del cáncer, las sitúan en el punto de mira como potenciales dianas terapéuticas³.

Como se ha descrito previamente, las VE están integradas dentro del MAT del cáncer de páncreas, regulando múltiples vías que favorecen la progresión tumoral, por lo que varios trabajos de investigación han experimentado con la **supresión de la maquinaria de biogénesis exosómica** en ratones con xenoinjertos de ACDP, como el bloqueo de la esfingomielinasa neutra ²⁵ o de Rab27a ²¹ con los que se observó disminución del crecimiento tumoral; no obstante, estas rutas son comunes para la producción de exosomas en el resto de células del organismo, por lo que sería importante descartar otras repercusiones sistémicas.

Otros estudios emplearon abordajes más específicos, bloqueando rutas concretas asociadas a la comunicación extracelular mediada por VE, como la inhibición de la **angiogénesis** tumoral mediante el bloqueo *in vivo* de lncRNA-SNHG11 ¹⁸ o de miR-30b-5p ¹⁹ e *in vitro* del eje lnc-UCA1/AMOTL-2 ¹⁷, planteando nuevas estrategias para disminuir la proliferación de vasculatura aberrante y metástasis. Análogamente, Luo et al. ²⁰ observaron una marcada disminución en la **linfangiogénesis** e invasión ganglionar *in vivo* al bloquear SAE-1, responsable de la SUMOilación y empaquetado exosómico de la ribonucleoproteína nuclear heterogénea A1 (hnRNPA1), reduciendo así la expresión de PROX-1 en células endoteliales.

Se ha analizado también la capacidad de reducir la subpoblación de **células madre cancerosas**, determinada mediante la disminución de expresión de marcadores celulares asociados, potencial replicativo y metastásico, a través de la supresión de diversas moléculas como agrina ²¹, miR-21-5p ²⁸ y miR-10a ²².

Todas las rutas celulares asociadas a VE descritas en el apartado enfocado en la patogenia tumoral ofrecen una perspectiva terapéutica, aunque sólo algunos hayan comprobado su eficacia *in vivo*, por lo que se requiere mayor investigación al respecto antes de poder llegar a aplicarse en humanos.

6.2.3 Vehículos terapéuticos

Las VE poseen ciertas características que han propulsado la investigación en torno a su uso como vectores terapéuticos, especialmente dentro del cáncer, como su bicapa lipídica, origen endógeno, función intrínseca como mensajeras intercelulares, dimensiones nanométricas y tropismo celular que podría permitir dirigir agentes terapéuticos a células específicas reduciendo la toxicidad sistémica ¹¹; sin embargo, hay ciertos obstáculos que deben ser salvados para que su aplicación se convierta en una realidad, en general

relacionadas con la optimización de su producción y control farmacocinético ³. Las principales estrategias estudiadas en relación con el cáncer se basan en la transfección de RNA no codificante y agentes quimioterapéuticos ¹¹.

Dentro de la utilización de **RNA endógenos** como moduladores de la expresión génica en ACDP se pueden explotar tanto su capacidad inhibidora bloqueando rutas oncogénicas en las que se ven sobreexpresados ²³, como sus propiedades supresoras tumorales, reponiendo sus niveles disminuidos en el proceso neoplásico ³⁵. Yao et al. ²³ demostraron que el circRNA_0030167 presente en pVE derivadas de células madre mesenquimales de médula ósea era capaz de secuestrar el miR-338-5p sobreexpresado en CMC y responsable del bloqueo de la traducción del factor supresor WIF1, disminuyendo su capacidad replicativa en ratones. Por otro lado, apoyándose en el efecto restrictivo tumoral de pVE derivadas de células ductales pancreáticas sanas ricas en miR-485-3p, con baja expresión en muestras de pacientes con ACDP relacionada con mal pronóstico e invasión linfática y perineural, Li et al. ³⁵ demostraron que la restauración de niveles de este miRNA con funciones defensivas suprimía la invasión tumoral *in vitro* y la metástasis pulmonar *in vivo*.

Otro abordaje explorado es la transmisión de **inhibidores exógenos de la expresión del gen conductor KRAS^{G12D}** a través de distintos mecanismos como VE portadoras de siRNA ³⁶ o CRISPR/Cas9 ³⁷.

Los **siRNA** presentan un funcionamiento similar a los miRNA, inhibiendo la expresión de RNAm diana a través del complejo silenciador inducido por RNA (RISC), aunque presentan algunas diferencias como su origen a partir de material genético exógeno, considerado un mecanismo de defensa frente a infecciones virales en células eucariotas; y la mayor complementariedad entre su secuenciación y la del RNAm, provocando su escisión y degradación frente al secuestro característico asociado a miRNA ⁴⁴. Kamerkar et al. ³⁶ demostraron el efecto terapéutico de exosomas derivados de células mesenquimales modificados con siRNA dirigido frente al RNAm de KRAS^{G12D} en ratones, con superioridad frente a su vehiculización en liposomas atribuible a la expresión exosómica de CD47, proteína transmembrana asociada a integrinas que inhibe fagocitosis por monocitos y macrófagos al unirse a su receptor CD172a prolongando la vida media circulatoria; y a la alta capacidad macropinocítica por parte de células cancerosas en ACDP, mejorando su captación y afinidad por el tejido tumoral. Basándose en estos resultados se ha diseñado el ensayo clínico **NCT03608631**, que busca determinar la

seguridad y eficacia de este tratamiento en pacientes con ACDP avanzado con mutación KRAS^{G12D} ⁴³. El ensayo está en fase 1, centrado en probar la seguridad de la administración intravenosa de exosomas derivados de células madre mesenquimales cargados con siRNA y detectar posibles efectos adversos graves, definiendo sus objetivos primarios como la identificación de la máxima dosis tolerada y determinación de la toxicidad limitante de dosis. De forma secundaria pretende establecer el perfil farmacocinético del fármaco y su impacto en el control de la progresión de la enfermedad y supervivencia ⁴³.

Un sistema de defensa similar encontrado en células procariotas frente a ácidos nucleicos exógenos es el **complejo CRISPR/Cas**, en el que una secuencia transcriptómica actúa como guía para la escisión de segmentos diana invasores en el genoma, por lo que representa una potente herramienta en ingeniería genética ⁴⁴. El estudio de McAndrews et al. ³⁷ puso a prueba la transfección de CRISPR/Cas9 dirigido contra KRAS^{G12D} a través de exosomas derivados de células madre mesenquimales, de modo que el fragmento de RNA guía fuera complementario de esta mutación y dirigiera a la endonucleasa Cas9 contra ella, demostrando la reducción de la transcripción del gen KRAS mutado y proliferación tumoral *in vitro* e *in vivo* en modelos murinos de ACDP, lo cual podría suponer una ventaja frente a inhibidores postranscripcionales como siRNA al erradicar el gen mutado y no requerir administración continua; sin embargo, al no ser este el único conductor oncogénico, su eficacia podría verse limitada y deben considerarse también posibles alteraciones del genoma indeseadas.

Son múltiples las barreras defensivas del ACDP frente a **agentes quimioterapéuticos** habituales, aparte de la heterogeneidad entre subpoblaciones tumorales, capacidad autorreplicativa de CMC y complejas interacciones entre células tumorales y estroma que ya se han explicado; el cáncer de páncreas se caracteriza por una baja densidad vascular e intensa reacción desmoplásica que dificultan la penetración y difusión de fármacos en el tejido tumoral ⁴⁵. Con el objetivo de solventar este impedimento, el estudio de Al Faruque et al. ³⁸ ofrece una novedosa perspectiva sobre la modificación molecular y tropismo de VEt autólogas como vector de **paclitaxel** hasta células pancreáticas neoplásicas. Las VEt extraídas de cultivo celular de ACDP fueron modificadas con un péptido de superficie con elevada afinidad por integrina $\alpha\beta3$, con marcada expresión en células tumorales pancreáticas, y nanopartículas magnéticas, ambos a través de la unión a lípidos pegilados, alteración que aumenta la vida media en sangre, y sometidas a

sonicación suave para introducir el paclitaxel, resultando en VEt modificadas como aparece representado en la **Figura 5A** ³⁸.

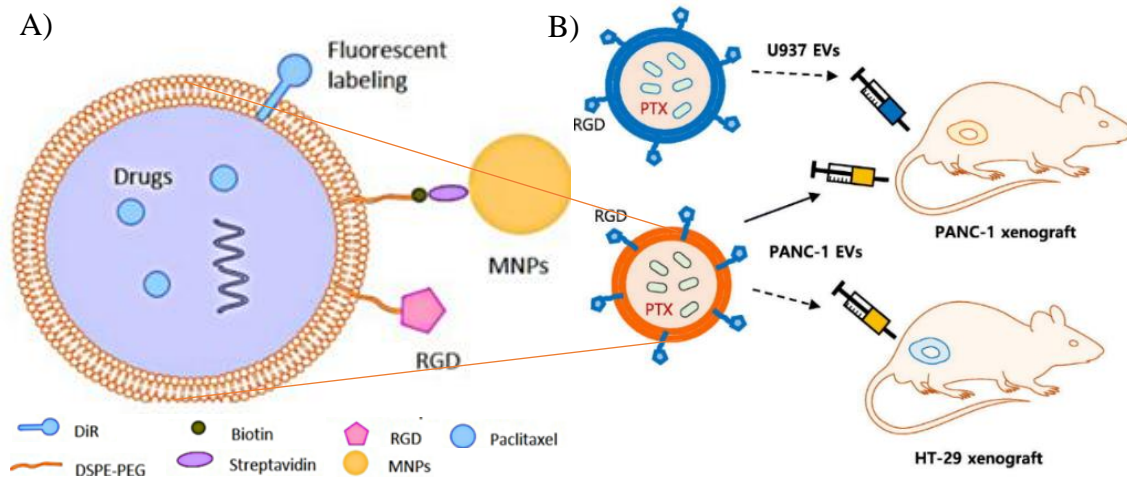


Figura 5: VEt modificadas como vehículo de paclitaxel. A) Composición de VEt modificadas. RGD: péptido con afinidad por integrina $\alpha\beta_3$. MNPs: nanopartículas magnéticas. DSPE-PEG: lípido pegilado. B) Representación esquemática de las VE modificadas y ambos modelos murinos con xenoinjerto tumoral. PANC-1: línea celular de ACDP humano. U937: línea celular monocítica humana. HT-29: línea celular de cáncer colorrectal humano. Adaptada de Al Faruque et al. ³⁸

Los objetivos principales eran comprobar los cambios que estas partículas inducían en la distribución y captación tumoral de paclitaxel atribuible al péptido de superficie y/o a la exposición a un imán permanente sobre la región tumoral, así como sus repercusiones farmacocinéticas y retención circulatoria. Adicionalmente, se usaron estas mismas VEt modificadas en otro modelo murino con xenoinjerto de cáncer colorrectal y VE derivadas de otra línea celular no tumoral con la misma modificación peptídica de membrana en el modelo original como se observa en la **Figura 5B** con el objetivo de cuantificar el tropismo atribuible a la homología entre tumor y VEt frente a la alteración la superficie de las vesículas ³⁸. Sus resultados demostraron eficacia de la modificación peptídica mejorando la afinidad de las VEt con paclitaxel por el tumor, con mayor tropismo de VEt autólogas que alostéricas y transfección efectiva del agente quimioterapéutico suprimiendo la progresión tumoral en el modelo con xenoinjerto de ACDP; sin embargo, las nanopartículas magnéticas no contribuyeron a una mayor eficacia ³⁸. Estos resultados muestran que una mayor afinidad por integrina con elevada expresión tumoral incrementa la llegada de VEt modificadas al páncreas, beneficio que no se obtuvo al aplicarse estas

mismas VEt en el modelo con xenoinjerto de cáncer de colon que no presenta altos niveles de integrina $\alpha\beta3$; sin embargo, de ser únicamente debido a esta modificación, las pVE derivadas de otra línea celular con la misma modificación serían igual de efectivas, por lo que también se demostró que parte de la afinidad por el tumor se debe a su naturaleza autóloga, posiblemente asociada a componentes de membrana análogos a la célula originaria ³⁸.

6.2.4 Inmunoterapia

El ACDP se caracteriza por presentar un ambiente marcadamente inmunosupresor, con escasez de antígenos tumorales, disminución de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase 1 (MHC1) en la superficie de células cancerosas, deficiencia de mecanismos presentadores y exclusión de poblaciones activas linfocitarias a favor de células supresoras, lo que restringe de forma acusada la efectividad de la inmunoterapia en este tipo de cáncer ⁴⁵, limitándose a la utilización de inhibidores PD1/PDL1 en pacientes con inestabilidad microsatelital, típica del síndrome de Lynch que aparte de cáncer colorrectal asocia cierta elevación de riesgo de cáncer de páncreas ¹⁵. Aprovechando las propiedades que la célula de origen les confiere a las pVE, así como todas aquellas ventajas que las convertían en un buen vehículo terapéutico, se ha estudiado su posible aplicación en la inmunomodulación del MAT, especialmente pVE derivadas de células madre mesenquimales, células dendríticas y células tumorales, pudiendo usarse estas dos últimas como vacunas antitumorales ³.

Los dos estudios recogidos en esta revisión que abordan la aplicación de VE como inmunoterapia en ACDP se basan en la potenciación del mecanismo de **muerte celular inmunogénica**, desencadenado por ciertos agentes quimioterapéuticos como la mitoxantrona o el oxaliplatino, por el que las células tumorales cambian la composición de su membrana exponiendo calreticulina y liberan factores solubles como proteínas de alta movilidad del grupo 1 (HMGB1) y ATP, procesos implicados en la activación del sistema inmune letárgico a través de la maduración de células dendríticas, exposición cruzada de antígenos tumorales y activación de linfocitos T citotóxicos (TCD8+) ^{39,40}.

El primero empleó VE derivadas de células madre mesenquimales como **vehículo dual de oxaliplatino en superficie y siRNA dirigido contra galectina-9** en su interior ³⁹. El objetivo de estas modificaciones era lograr un efecto sinérgico entre la muerte inmunogénica inducida por oxaliplatino con activación de células dendríticas y

reclutamiento de linfocitos, y la inhibición de la expresión de galectina-9 en células tumorales, cuya interacción con macrófagos promueve la polarización M2 y escape inmune. Se demostró eficacia en xenoinjerto de ACDP en ratones con disminución de subpoblación M2 de macrófagos e infiltración de linfocitos T citotóxicos con actividad antitumoral ³⁹.

Por otro lado, Zhou et al. ⁴⁰ indujeron **muerte inmunogénica en células tumorales *in vitro* mediante la exposición a mitoxantrona** y extrajeron las VE resultantes del sobrenadante, bajo la acertada teoría de que estas presentarían un contenido elevado en materiales inmunogénicos relacionados con la muerte celular y antígenos tumorales que permitieran su uso como **vacuna**. También buscaron potenciar este efecto con otras modificaciones, cuyos mecanismos de acción aparecen representados en la **Figura 6**, como la adición de un **péptido de superficie** asociado a actividad de linfocitos T citotóxicos y **siRNA dirigido contra CCL22**, ligando de quimiocina con motivo CC producido por células dendríticas que al interactuar con su receptor CCR4 promueve reclutamiento de linfocitos T reguladores e inmunosupresión ⁴⁰.

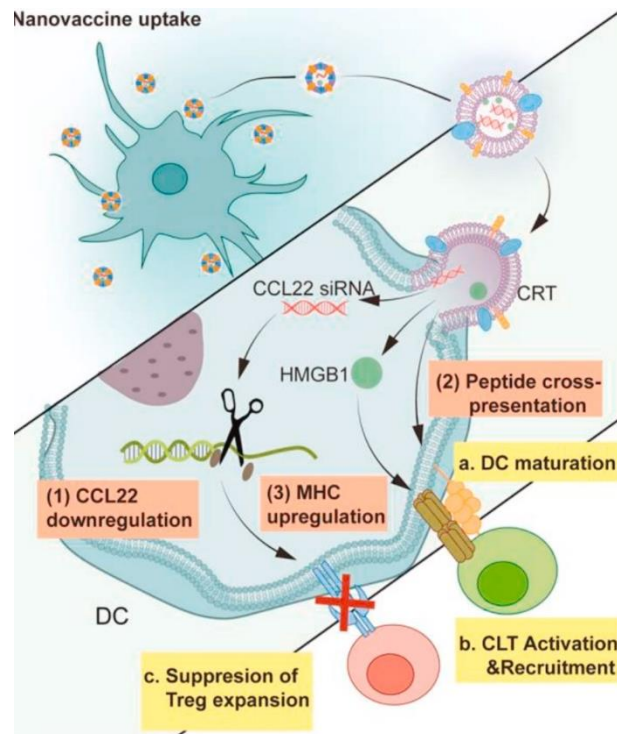


Figura 6: Representación del mecanismo de acción de VE derivadas de células tumorales expuestas a mitoxantrona modificadas con péptido de superficie y siRNA en la maduración de células dendríticas y sus interacciones con linfocitos. CRT: Calreticulina. CLT: linfocitos T citotóxicos. DC: células dendríticas. Treg: Linfocitos T reguladores. Tomada de Zhou et al. ⁴⁰

Tras mostrar efectividad *in vitro*, se administraron a ratones con xenoinjerto de ACDP de la misma línea celular por vía intramuscular, con el objetivo de salvar la barrera física impuesta por el fibroso estroma del tumor y baja densidad vascular a través de su distribución por vía linfática, que probó conseguir una rápida captación pancreática reduciendo retención hepática. Los resultados *in vivo* demostraron disminución de linfocitos T reguladores, reclutamiento de células dendríticas maduras y linfocitos TCD8+ activos, ralentización del crecimiento tumoral y potenciación de efectos terapéuticos al combinarse con gemcitabina y paclitaxel ⁴⁰.

7. Conclusiones

De acuerdo con la información expuesta en apartados anteriores, se concluye que:

1. La **comunicación intercelular** mediante pVE desempeña un importante papel en el remodelado del MAT del ACDP a través del transporte de biomoléculas hasta células diana, como RNAs no codificantes reguladores de la expresión génica y diversas proteínas implicadas en rutas de señalización intracelular.
2. Tanto las VEt como pVE derivadas de células estromales circundantes han demostrado estar implicadas en la patogenia y **progresión neoplásica** a distintos niveles, como la reprogramación metabólica y proliferación de células tumorales, aumento y mantenimiento de la subpoblación de CMC, desarrollo de resistencia farmacológica, escape inmune, angiogénesis, linfangiogénesis, invasión tumoral y metástasis.
3. Las pVE presentes en fluidos corporales contienen marcadores que podrían ser utilizados en el **diagnóstico precoz, seguimiento y valoración pronóstica** de pacientes con ACDP, optimizando el rendimiento de CA19-9 en fases incipientes debido al incremento de su producción por células tumorales pancreáticas.
4. Las pVE pueden ser empleadas como **diana terapéutica** en ACDP en ratones, bloqueando la biogénesis exosómica o vías de señalización a las que se han visto asociadas.
5. Las pVE pueden utilizarse como **vehículos farmacológicos** de reguladores de la expresión génica específicos, incluyendo RNA no codificantes y el complejo CRISPR/Cas, o agentes quimioterapéuticos como el paclitaxel, con buenos resultados en modelos murinos.
6. Las pVE modificadas son capaces de desencadenar una **respuesta inmune adaptativa antitumoral** en ratones con xenoinjerto de ACDP a través de la potenciación de la muerte celular inmunogénica de células tumorales.

Valorando en conjunto las conclusiones de esta revisión, se puede afirmar que un estudio más detallado de las pVE podría ayudar a esclarecer la compleja patogenia del ACDP, planteando novedosas estrategias diagnósticas y terapéuticas, que, lejos de ser la panacea de esta letal enfermedad, han mostrado resultados esperanzadores *in vitro* e *in vivo*, pero

requieren mayor estudio para su validación y escalada a estudios en humanos, con escasos aunque existentes ensayos clínicos desarrollados actualmente.

Su uso como biomarcadores es especialmente prometedor, considerando la sencillez y escasa invasividad del análisis de grandes tamaños muestrales sanguíneos de pacientes, en comparación con el estudio de sus efectos terapéuticos, por lo que podría llegar a consolidarse la aplicación de un panel de marcadores contenidos en pVE circulantes en un futuro no muy lejano.

Es, en definitiva, esperable que este campo de investigación en auge continúe su trayectoria de crecimiento exponencial y ofrezca alguna de las perseguidas respuestas a las incógnitas que nublan el abordaje del cáncer de páncreas.

8. Bibliografía

- (1) Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* [Internet]. 2020 [citado 14 Abr 2023];367(6478):[15 p.]. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>
- (2) Rädler J, Gupta D, Zickler A, Andaloussi SE. Exploiting the biogenesis of extracellular vesicles for bioengineering and therapeutic cargo loading. *Mol Ther* [Internet]. 2023 [citado 14 Abr 2023];31(5):[20 p.]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2023.02.013>
- (3) Takahashi Y, Takakura Y. Extracellular vesicle-based therapeutics: Extracellular vesicles as therapeutic targets and agents. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2023 [citado 14 Abr 2023];242:[10 p.]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2023.108352>
- (4) Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* [Internet]. 1983 [citado 14 Abr 2023];97(2):329-339. Disponible en: <https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.329>
- (5) Couch Y, Buzàs EI, Di Vizio D, Gho YS, Harrison P, Hill AF, et al. A brief history of nearly EV-erything - The rise and rise of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2021 [citado 14 Abr 2023];10(14):[12 p.]. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jev2.12144>
- (6) Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles* [Internet]. 2018 [citado 14 Abr 2023];7(1):[43 p.]. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- (7) Li X, Yang L, Wang C, Li H, Shi D, Wang J. The roles of exosomal proteins: classification, function, and applications. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 [citado 14 Abr 2023];24(4):[18 p.]. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms24043061>
- (8) Robado-de-Lope L, Sánchez-Herrero E, Serna-Blasco R, Provencio M, Romero A. Cancer as an infective disease: the role of EVs in tumorigenesis. *Mol Oncol* [Internet]. 2023 [citado 14 Abr 2023];17(3):390-406. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13316>

- (9) Luo X, Li Y, Hua Z, Xue X, Wang X, Pang M, et al. Exosomes-mediated tumor metastasis through reshaping tumor microenvironment and distant niche. *J Control Release* [Internet]. 2023 [citado 14 Abr 2023];353:327-336. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.11.050>
- (10) Bamankar S, Londhe VY. The rise of extracellular vesicles as new age biomarkers in cancer diagnosis: promises and pitfalls. *Technol Cancer Res Treat* [Internet]. 2023 [citado 14 Abr 2023];22:[10 p.]. Disponible en: <https://doi.org/10.1177/15330338221149266>
- (11) Stefańska K, Józkiwiak M, Angelova Volponi A, Shibli JA, Golkar-Narenji A, Antosik P, et al. The role of exosomes in human carcinogenesis and cancer therapy-recent findings from molecular and clinical research. *Cells* [Internet]. 2023 [citado 14 Abr 2023];12(3):[22 p.]. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/cells12030356>
- (12) 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* [Internet]. 2021 [citado 14 Abr 2023];71(3):209-249. Disponible en: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- (13) von Hoff DD. Cáncer de páncreas. En: Jameson JL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Loscalzo J, editors. *Harrison. Principios de medicina interna* [Internet]. 20 ed. New York (NY): McGraw-Hill Education; 2018 [citado 14 Abr 2023]. [13 p.]. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2461§ionid=203644969>
- (14) Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras del cáncer en España. [Internet]. 2023 [citado 14 Abr 2023]. Disponible en: https://seom.org/images/Las_cifras_del_Cancer_en_Espana_2023.pdf
- (15) Wood LD, Canto MI, Jaffee EM, Simeone DM. Pancreatic cancer: pathogenesis, screening, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology* [Internet]. 2022 [citado 14 Abr 2023];163(2):386-402. Disponible en: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2022.03.056>
- (16) Lin J, Wang X, Zhai S, Shi M, Peng C, Deng X, et al. Hypoxia-induced exosomal circPDK1 promotes pancreatic cancer glycolysis via c-myc activation by modulating miR-628-3p/BPTF axis and degrading BIN1. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2022 [citado 14 Abr 2023];15(1):[22 p.]. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01348-7>
- (17) Guo Z, Wang X, Yang Y, Chen W, Zhang K, Teng B, et al. Hypoxic tumor-derived exosomal long noncoding RNA UCA1 promotes angiogenesis via miR-96-5p/AMOTL2 in pancreatic cancer. *Mol Ther Nucleic Acids* [Internet]. 2020 [citado 14 Abr 2023];22:179-195. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.08.021>

- (18) Fang X, Cai Y, Xu Y, Zhang H. Exosome-mediated lncRNA SNHG11 regulates angiogenesis in pancreatic carcinoma through miR-324-3p/VEGFA axis. *Cell Biol Int* [Internet]. 2022 [citado 14 Abr 2023];46(1):106-117. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/cbin.11703>
- (19) Chen K, Wang Q, Liu X, Wang F, Yang Y, Tian X. Hypoxic pancreatic cancer derived exosomal miR-30b-5p promotes tumor angiogenesis by inhibiting GJA1 expression. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2022 [citado 14 Abr 2023];18(3):1220-1237. Disponible en: <https://doi.org/10.7150/ijbs.67675>
- (20) Luo Y, Li Z, Kong Y, He W, Zheng H, An M, et al. KRAS mutant-driven SUMOylation controls extracellular vesicle transmission to trigger lymphangiogenesis in pancreatic cancer. *J Clin Invest* [Internet]. 2022 [citado 14 Abr 2023];132(14):[19 p.]. Disponible en: <https://doi.org/10.1172/JCI157644>
- (21) Ruivo CF, Bastos N, Adem B, Batista I, Duraes C, Melo CA, et al. Extracellular vesicles from pancreatic cancer stem cells lead an intratumor communication network (EVNet) to fuel tumour progression. *Gut* [Internet]. 2022 Jan 10 [citado 14 Abr 2023];71(10):2043-2068. Disponible en: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-324994>
- (22) Wang C, Yin W, Liu H. MicroRNA-10a promotes epithelial-to-mesenchymal transition and stemness maintenance of pancreatic cancer stem cells via upregulating the Hippo signaling pathway through WWC2 inhibition. *J Cell Biochem* [Internet]. 2020 [citado 14 Abr 2023];121(11):4505-4521. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jcb.29716>
- (23) Yao X, Mao Y, Wu D, Zhu Y, Lu J, Huang Y, et al. Exosomal circ_0030167 derived from BM-MSCs inhibits the invasion, migration, proliferation and stemness of pancreatic cancer cells by sponging miR-338-5p and targeting the Wif1/Wnt8/ β -catenin axis. *Cancer Lett* [Internet]. 2021 [citado 14 Abr 2023];512:38-50. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.04.030>
- (24) Cao W, Zeng Z, He Z, Lei S. Hypoxic pancreatic stellate cell-derived exosomal mirnas promote proliferation and invasion of pancreatic cancer through the PTEN/AKT pathway. *Aging* [Internet]. 2021 [citado 14 Abr 2023];13(5):7120-7132. Disponible en: <https://doi.org/10.18632/aging.202569>
- (25) Richards KE, Xiao W, Hill R. Cancer-associated fibroblasts confer gemcitabine resistance to pancreatic cancer cells through PTEN-targeting miRNAs in exosomes. *Cancers* [Internet]. 2022 [citado 14 Abr 2023];14(11):[13 p.]. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/cancers14112812>

- (26) Han Y, Qian X, Xu T, Shi Y. Carcinoma-associated fibroblasts release microRNA-331-3p containing extracellular vesicles to exacerbate the development of pancreatic cancer via the SCARA5-FAK axis. *Cancer Biol Ther* [Internet]. 2022 [citado 14 Abr 2023];23(1):378-392. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/15384047.2022.2041961>
- (27) Novizio N, Belvedere R, Pessolano E, Morello S, Tosco A, Campiglia P, et al. ANXA1 contained in EVs regulates macrophage polarization in tumor microenvironment and promotes pancreatic cancer progression and metastasis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 [citado 14 Abr 2023];22(20):[17 p.]. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms222011018>
- (28) Chang J, Li H, Zhu Z, Mei P, Hu W, Xiong X, et al. microRNA-21-5p from M2 macrophage-derived extracellular vesicles promotes the differentiation and activity of pancreatic cancer stem cells by mediating KLF3. *Cell Biol Toxicol* [Internet]. 2022 [citado 14 Abr 2023];38(4):577-590. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10565-021-09597-x>
- (29) Odaka H, Hiemori K, Shimoda A, Akiyoshi K, Tateno H. CD63-positive extracellular vesicles are potential diagnostic biomarkers of pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Gastroenterol* [Internet]. 2022 [citado 14 Abr 2023];22(1):[10 p.]. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12876-022-02228-7>
- (30) Nakamura K, Zhu Z, Roy S, Jun E, Han H, Munoz RM, et al. An exosome-based transcriptomic signature for noninvasive, early detection of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma: a multicenter cohort study. *Gastroenterology* [Internet]. 2022 [citado 14 Abr 2023];163(5):1252-1266. Disponible en: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2022.06.090>
- (31) Nesteruk K, Levink IJM, de Vries E, Visser IJ, Peppelenbosch MP, Cahen DL, et al. Extracellular vesicle-derived microRNAs in pancreatic juice as biomarkers for detection of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreatol* [Internet]. 2022 [citado 14 Abr 2023];22(5):626-635. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.pan.2022.04.010>
- (32) Yoshioka Y, Shimomura M, Saito K, Ishii H, Doki Y, Eguchi H, et al. Circulating cancer-associated extracellular vesicles as early detection and recurrence biomarkers for pancreatic cancer. *Cancer Sci* [Internet]. 2022 [citado 14 Abr 2023];113(10):3498-3509. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/cas.15500>
- (33) Yang KS, Ciprani D, O'Shea A, Liss AS, Yang R, Fletcher-Mercaldo S, et al. Extracellular vesicle analysis allows for identification of invasive IPMN. *Gastroenterology* [Internet]. 2021 [citado 14 Abr 2023];160(4):1345-1358. Disponible en: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.11.046>

- (34) Vikramdeo KS, Anand S, Khan MA, Khushman M, Heslin MJ, Singh S, et al. Detection of mitochondrial DNA mutations in circulating mitochondria-originated extracellular vesicles for potential diagnostic applications in pancreatic adenocarcinoma. *Sci Rep* [Internet]. 2022 [citado 14 Abr 2023];12(1):[12 p.]. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22006-5>
- (36) Kamerkar S, LeBleu VS, Sugimoto H, Yang S, Ruivo CF, Melo SA, et al. Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature* [Internet]. 2017 [citado 14 Abr 2023];546(7659):498-503. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nature22341>
- (37) McAndrews KM, Xiao F, Chronopoulos A, LeBleu VS, Kugeratski FG, Kalluri R. Exosome-mediated delivery of CRISPR/Cas9 for targeting of oncogenic Kras(G12D) in pancreatic cancer. *Life Sci Alliance* [Internet]. 2021 [citado 14 Abr 2023];4(9):[12 p.]. Disponible en: <https://doi.org/10.26508/lsa.202000875>
- (38) Al Faruque H, Choi E, Kim J, Kim E. Enhanced effect of autologous EVs delivering paclitaxel in pancreatic cancer. *J Control Release* [Internet]. 2022 [citado 14 Abr 2023];347:330-346. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.05.012>
- (39) Zhou W, Zhou Y, Chen X, Ning T, Chen H, Guo Q, et al. Pancreatic cancer-targeting exosomes for enhancing immunotherapy and reprogramming tumor microenvironment. *Biomaterials* [Internet]. 2021 [citado 14 Abr 2023];268:[12 p.]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120546>
- (40) Zhou W, Chen X, Zhou Y, Shi S, Liang C, Yu X, et al. Exosomes derived from immunogenically dying tumor cells as a versatile tool for vaccination against pancreatic cancer. *Biomaterials* [Internet]. 2022 [citado 14 Abr 2023];280:[12 p.]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121306>
- (41) ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000 Feb 29 - . Identifier NCT03711890, Ultra-high resolution optical coherence tomography in detecting micrometer sized early stage pancreatic cancer in participants with pancreatic cancer; 2018 Oct 19 [citado 14 Abr 2023]; [8 p.]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03711890>
- (42) ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000 Feb 29 - . Identifier NCT05625529, ExoLuminate study for early detection of pancreatic cancer; 2022 [citado 14 Abr 2023]; [9 p.]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05625529>

(43) ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000 Feb 29 - . Identifier NCT03608631, IExosomes in treating participants with metastatic pancreas cancer with KrasG12D mutation; 2018 [citado 14 Abr 2023]; [9 p.]. Disponible en:

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03608631?cond=NCT03608631&draw=2&rank=1>

(44) Watson JD. *Biología Molecular del Gen* [Internet]. 7 ed. México (DF): Editorial Médica Panamericana; 2016. Capítulo 20, RNA reguladores; [citado 14 Abr 2023]; p. 701-732. Disponible en:

<https://www.medicapanamericana.com/VisorEbookV2/Ebook/9786079356903#{%22Pagina%22:%22701%22,%22Vista%22:%22Indice%22,%22Busqueda%22:%22%22}>

(45) Sherman MH, Beatty GL. Tumor microenvironment in pancreatic cancer pathogenesis and therapeutic resistance. *Annu Rev Pathol* [Internet]. 2023 Jan 24 [citado 14 Abr 2023];18:123-148. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-031621-024600>

(46) Del Vecchio F, Lee GH, Hawezi J, Bhome R, Pugh S, Sayan E, et al. Long non-coding RNAs within the tumour microenvironment and their role in tumour-stroma cross-talk. *Cancer Lett* [Internet]. 2018 [citado 14 Abr 2023];421:94-102. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.02.022>

(47) Chen B, Huang S. Circular RNA: An emerging non-coding RNA as a regulator and biomarker in cancer. *Cancer Lett* [Internet]. 2018 [citado 14 Abr 2023];418:41-50. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.01.011>

(48) Babaei G, Aziz SG, Jaghi NZZ. EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2021 [citado 14 Abr 2023];133:[11 p.]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110909>

(49) Lee T, Teng TZJ, Shelat VG. Carbohydrate antigen 19-9 - tumor marker: Past, present, and future. *World J Gastrointest Surg* [Internet]. 2020 Dec 27 [citado 14 Abr 2023];12(12):468-490. Disponible en: <https://doi.org/10.4240/wjgs.v12.i12.468>

(50) Hineostroza JP, Kurzrock R, Lewis JM, Schork NJ, Schroeder G, Kamat AM, et al. Early-stage multi-cancer detection using an extracellular vesicle protein-based blood test. *Commun Med* [Internet]. 2022 Mar 17 [citado 14 Abr 2023];2:[9 p.]. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s43856-022-00088-6>

9. Agradecimientos

Me gustaría agradecer en primer lugar a mi tutora María José Carmena Sierra por introducirme al apasionante mundo de la investigación biosanitaria a través del estudio de las vesículas extracelulares, así como sus consejos y correcciones que han permitido el desarrollo de este TFG.

Por otra parte, quisiera incluir dentro de este apartado algunas reflexiones de carácter más emotivo, pues es inevitable asociar la finalización de este trabajo con el cierre de la etapa de formación y superación personal que ha supuesto para mí el paso por Medicina.

Definiría este largo camino como una carrera de resistencia, en la que he afrontado numerosos obstáculos y dudas que a veces parecían insuperables, forjando en el proceso la persona en la que me he convertido, que poco tiene que ver con la adolescente que decidió que esta era su vocación. A lo largo de los años me he peleado en repetidas ocasiones con este término, redefiniendo sus límites, tambaleándome en la línea que separa la determinación del sacrificio, hasta reescribir su significado y comprender que los sueños cuanto más grandes son, más hay que luchar por ellos. No me avergüenza reconocer que ha sido difícil, que en muchos momentos he estado cerca de rendirme; por el contrario, me llena de orgullo, y por ello querría empezar agradeciéndome a mí misma y a todas mis versiones pasadas el haberme traído hasta aquí. Si bien, este logro hubiera sido imposible sin contar con las personas que me rodean y su apoyo incondicional.

Gracias a mis padres por creer en mí más allá de lo humanamente posible, por alimentar mi curiosidad y afán de conocimiento desde pequeña, brindarme todo cuanto haya podido necesitar y no perder la paciencia tras mis interminables sesiones clínicas caseras, incluyendo la lectura de cada párrafo de este documento.

Me gustaría agradecer a Ismael, mi tercer e imprescindible pilar, compañero de vida y fuente inagotable de ella, por dedicarme su tiempo, cariño y comprensión infinita, motivándome día a día para dar lo mejor de mí.

Gracias también a Andrea y a Clara, compañeras que más allá de lo académico han supuesto un apoyo fundamental durante estos 6 largos años, y junto a las que espero poder seguir creciendo personal y profesionalmente allá donde nos lleve la vida a cada una.

Finalmente, quiero agradecer su tiempo y esfuerzo a los profesores que han participado en mi educación, especialmente al equipo docente del Hospital Universitario de Guadalajara.

VESÍCULAS EXTRACELULARES COMO BIOMARCADORES Y DIANAS TERAPÉUTICAS EN CÁNCER: FUNCIONES Y POTENCIALES APLICACIONES DENTRO DEL CÁNCER DE PÁNCREAS

Autora: Eva Castillo Castillo **Tutora:** M^a José Carmena Sierra
 Departamento de Biología de Sistemas, Universidad de Alcalá

Introducción y objetivos

Vesículas extracelulares

- Las **vesículas extracelulares (VE)** son estructuras esféricas envueltas en bicapa lipídica implicadas en la **comunicación intercelular**. Según su ruta biogénica pueden subdividirse en cuerpos apoptóticos, microvesículas y exosomas. Estos últimos, junto con algunas microvesículas, se pueden clasificar a su vez como **VE de pequeño tamaño (pVE) (<200nm)**.
- La formación de los **exosomas** está mediada por mecanismos altamente selectivos, lo que les confiere una huella molecular específica reflejo de su célula originaria, aliciente del mayor interés científico por este subgrupo de VE. Dentro de los componentes exosomales específicos destacan proteínas y ácidos nucleicos implicados en múltiples rutas de señalización intracelular y regulación de la expresión génica de la célula diana.
- Dentro de las patologías en las que se han visto implicadas las pVE destaca el cáncer. Las **VE derivadas de células tumorales (VET)** y de células del estroma circundante actúan como mediadoras del remodelado del **microambiente tumoral (MAT)**, favoreciendo la progresión y metástasis.
- Dada su implicación en la patogenia, especificidad, estabilidad y fácil acceso en fluidos corporales, las pVE suponen un prometedor **biomarcador** diagnóstico de cáncer a través de la biopsia líquida. Otro foco de la investigación actual es su **aplicación terapéutica** como dianas o aprovechando sus características como mensajeras endógenas para el diseño de vehículos farmacológicos e inmunoterapia.

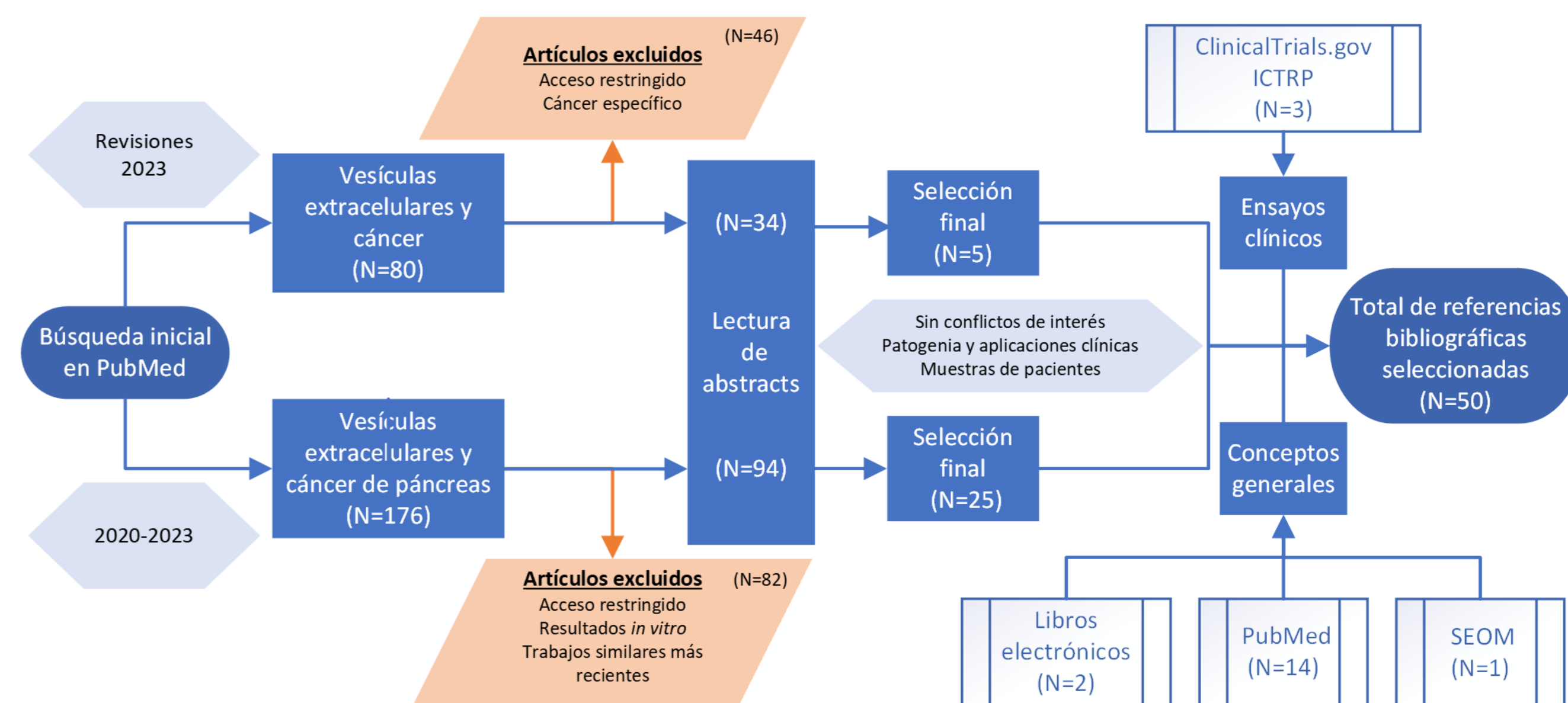
Cáncer de páncreas

- El cáncer de páncreas es la **neoplasia con peor pronóstico en países desarrollados**, en los que está ascendiendo dentro de las causas más frecuentes de muerte por cáncer pese a su baja incidencia, debido a su difícil detección y manejo, presentando tasas abrumadoras de diagnóstico en fase avanzada con metástasis sistémicas y frecuente resistencia a quimio e inmunoterapia.
- El **adenocarcinoma ductal de páncreas (ACDP)**, entidad más frecuente y letal en la que se centrará la revisión, se caracteriza por una marcada heterogeneidad entre subpoblaciones tumorales con múltiples conductores oncogénicos, destacando la mutación del **oncogen KRAS**. Presenta una íntima y dinámica relación con las abundantes células estromales que lo rodean, resultando en un complejo MAT que actúa como un **santuario inmunitario** protegido por una fuerte **reacción desmoplásica** que obstaculiza el paso de fármacos.

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica de las posibles funciones de las VE en la patogenia del ACDP y consecuentes aplicaciones diagnósticas y terapéuticas.

Material y métodos

Se ha realizado una **revisión bibliográfica** empleando principalmente el sistema de búsqueda **PubMed** de la Biblioteca Nacional de Estados Unidos (**NLM**). También se han empleado otras bases de datos como el catálogo de recursos electrónicos de la **Biblioteca de la Universidad de Alcalá**, **ClinicalTrials.gov**, la Plataforma de Registro Internacional de Ensayos Clínicos (**ICTRP**) y la página web de la Sociedad Española de Oncología Médica (**SEOM**), con el fin de obtener una muestra representativa de la literatura más actualizada disponible sobre las implicaciones de las vesículas extracelulares en el cáncer de páncreas, así como una perspectiva general del tema. La metodología empleada para la selección de referencias bibliográficas aparece representada en la **figura 1**.



Resultados y discusión

Figura 2: Representación esquemática del efecto de circPDK1 inducido por hipoxia en la progresión tumoral. Tomada de Jin et al. (16)

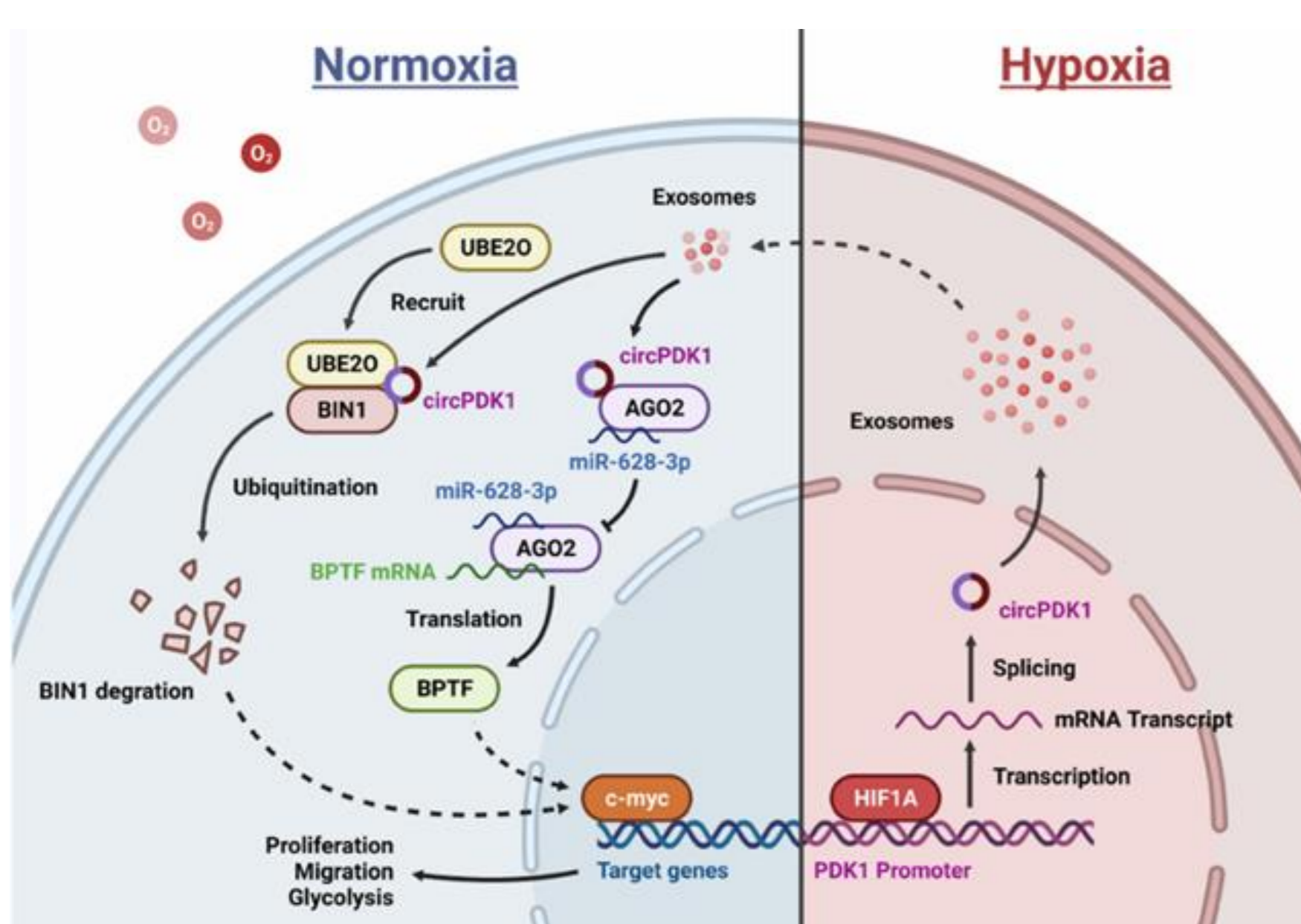
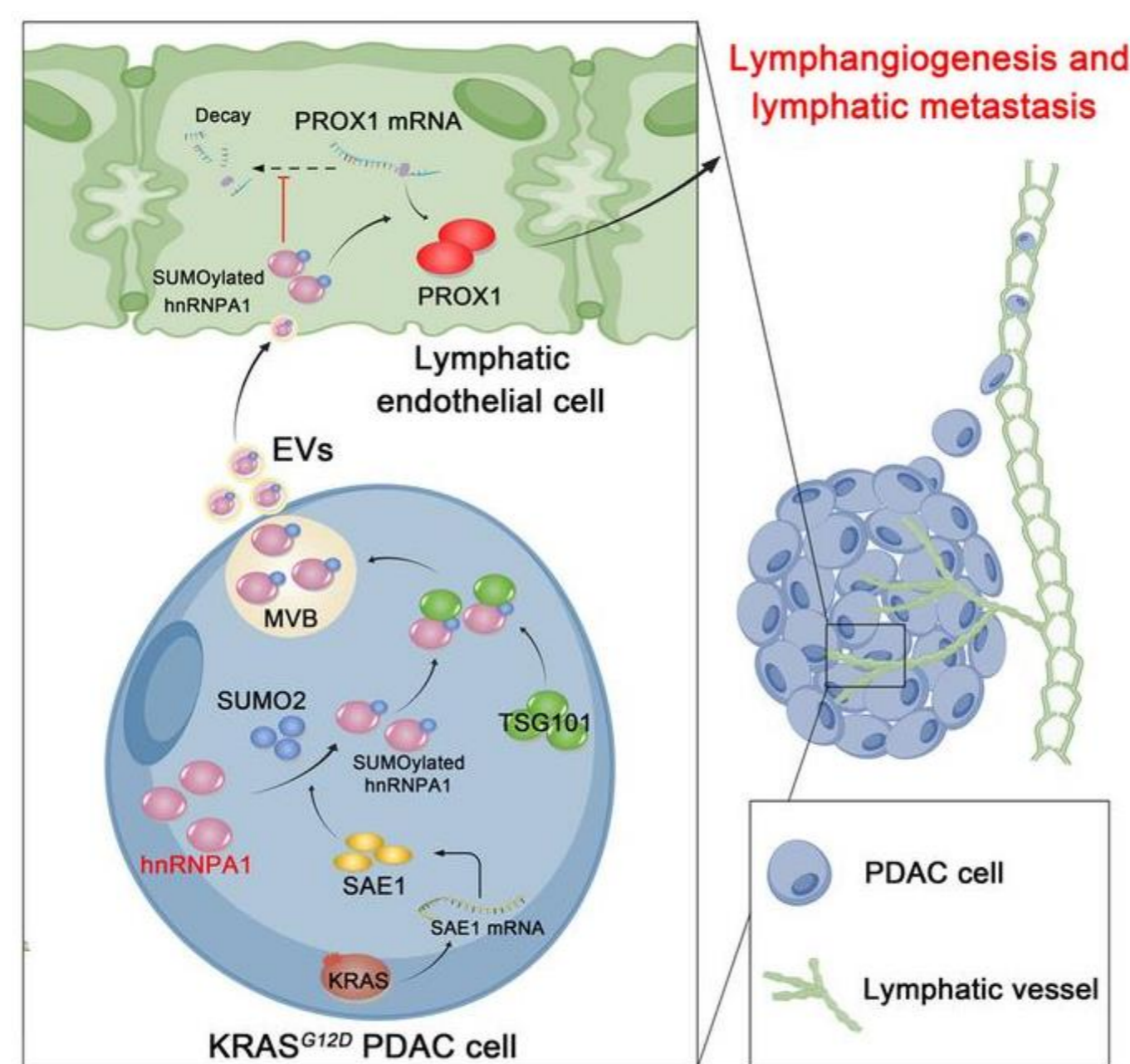


Figura 3: Linfangiogenesis por vía PROX-1 inducida por SUMOilación de hnRNP1 dependiente de KRASG12D. Tomada de Luo et al. (20)



Patogenia

- Las respuestas celulares desencadenadas por pVE en el ACDP observadas en los estudios recogidos están mediadas principalmente por RNA no codificante, encargado de la regulación postranscripcional de diversas rutas de señalización implicadas en el **crecimiento tumoral**, aumento y mantenimiento de la subpoblación de **células madre cancerosas (CMC)**, **quimiorresistencia**, **invasión tumoral** y **metástasis**.
- El **estrés hipóxico** juega un importante papel como inductor de la secreción de VET con elevado contenido en distintos tipos de RNA no codificantes relacionados con la reprogramación metabólica, proliferación tumoral y angiogénesis. Un ejemplo de esto aparece representado en la **Figura 2**.
- Las VET pueden inducir **angiogénesis y linfangiogenesis**, eventos cardinales para el crecimiento tumoral e invasión a distancia a través de la vía clásica ligada al factor de crecimiento endotelial y otras alternativas, como se observa en la **Figura 3**. Este hecho podría explicar la baja tasa de respuesta del ACDP a agentes antiangiogénicos convencionales y expone nuevas dianas terapéuticas.
- Las VET, especialmente aquellas procedentes de **CMC**, favorecen el crecimiento de esta subpoblación tumoral, transportando RNA no codificante o proteínas capaces de regular las vías Hippo/YAP y Wnt/ β catenina, cuya activación se ha visto relacionada con las características propias de las CMC, como elevada supervivencia, resistencia quimioterapéutica, transición epitelio-mesenquimal y metástasis.
- Los **componentes no tumorales del estroma** también suponen una fuente activa de pVE en el MAT del cáncer de páncreas, especialmente las células estrelladas pancreáticas, fibroblastos asociados a cáncer y macrófagos con polarización M2, cuyos efectos en células tumorales se han relacionado con quimiorresistencia, mayor potencial proliferativo e invasivo y potenciación de CMC.

Biomarcadores

- La detección de marcadores exosomales comunes como la tetraspanina CD63, proteínas y ácidos nucleicos específicos de VET circulantes, así como la combinación con biomarcadores de distinta naturaleza o determinación simultánea en jugo pancreático han demostrado optimizar el rendimiento de CA19-9, marcador ampliamente utilizado en la práctica clínica, en **fases precoces** de la enfermedad. Esto podría explicarse por la función de las VE en la patogenia del ACDP, requiriendo una producción elevada en estadios incipientes donde el remodelado del MAT es vital para la supervivencia de células cancerosas y por tanto su concentración no dependería únicamente del tamaño tumoral como el CA 19-9.
- Los marcadores contenidos en pVE circulantes han demostrado también potencial en el **seguimiento y manejo** de pacientes con neoplasias papilares mucinosas intraductales detectadas por imagen.
- Pese a sus resultados favorables, estos estudios no están exentos de **limitaciones**, como su reducido tamaño muestral, diseño retrospectivo y falta de estandarización del método de aislamiento y detección de componentes de pVE en fluidos biológicos, por lo que la futura publicación de resultados de **ensayos clínicos** como **NCT03711890** y **NCT05625529** puede aportar valiosa información necesaria para su traslado a la práctica clínica.

Estrategias terapéuticas

- Las pVE pueden emplearse como **diana terapéutica** bloqueando la biogénesis exosómica o las rutas específicas descritas en la patogenia del ACDP, demostrando eficacia *in vivo* las terapias dirigidas contra la angiogénesis, linfangiogenesis y la subpoblación de CMC.
- Las pVE han demostrado eficacia como **vehículos de reguladores de la expresión génica** tanto endógenos, como exógenos tras ser modificadas por ingeniería molecular. Dentro de estos últimos destacan los inhibidores específicos de la mutación KRASG12D introducidos en exosomas de origen mesenquimal. El ensayo **NCT03608631** busca comprobar su seguridad en humanos.
- El uso de VET autólogas modificadas para mejorar su tropismo tumoral como **vehículo de agentes quimioterapéuticos**, como el paclitaxel también ha demostrado efectividad (**Figura 4**).
- Las mismas facultades que permiten su uso como vehículos farmacológicos posibilitan la utilización de pVE como agentes **inmunomoduladores**, transportando inhibidores de rutas asociadas al ambiente inmunosupresor del MAT, especialmente en combinación con la inducción de muerte celular inmunogénica de células tumorales o presentando moléculas relacionadas y antígenos tumorales que permitan su uso como vacunas (**Figura 5**).
- Las principales **limitaciones** de estos estudios son la falta de experiencia en humanos, elevada complejidad de ingeniería molecular y variabilidad según células de origen empleadas, método de administración y farmacocinética.

Figura 4: VET modificadas como vehículo de paclitaxel. Tomada de Al Faruque et al. (38)

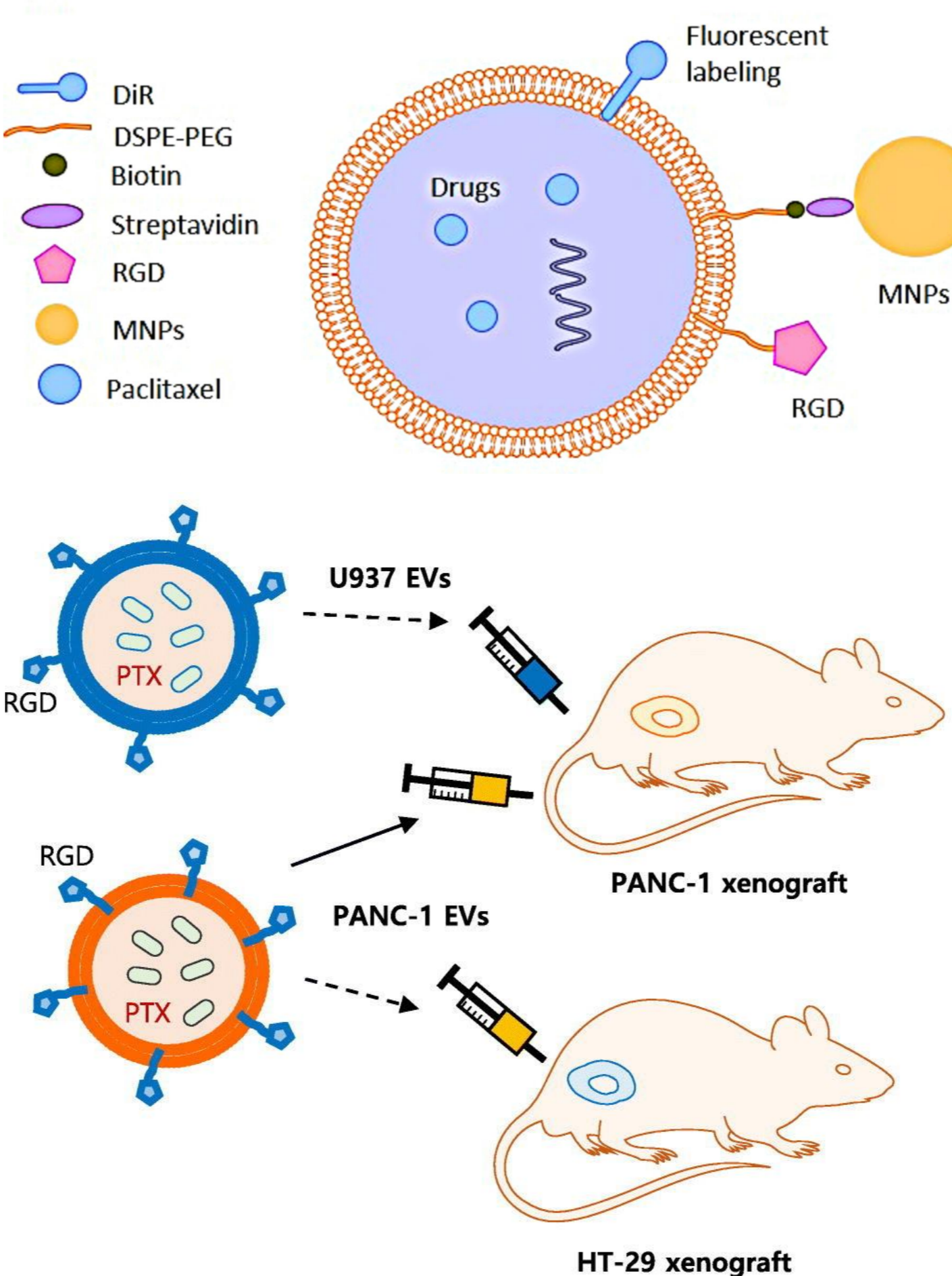
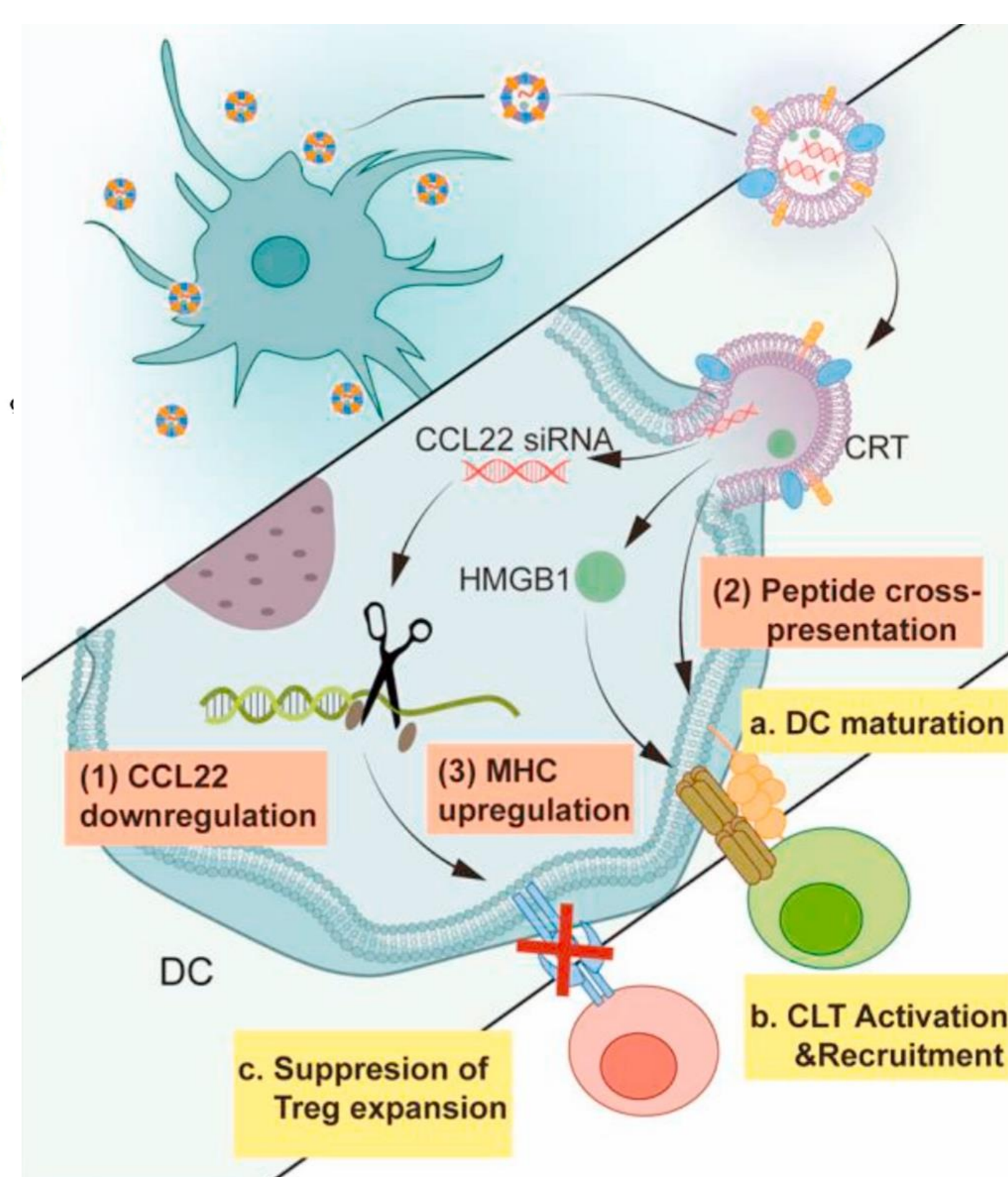


Figura 5: VET expuestas a mitoxantrona modificadas como vacuna anti-tumoral. Tomada de Zhou et al. (40)



Conclusiones

- La **comunicación intercelular** mediante pVE desempeña un importante papel en el **remodelado del MAT** del ACDP, viéndose implicadas en la **progresión** neoplásica a distintos niveles.
- Las pVE presentes en fluidos corporales contienen marcadores con potencial en el **diagnóstico precoz, seguimiento y valoración pronóstica** de pacientes con ACDP.
- Las pVE presentan actividad como **diana terapéutica** en ACDP en ratones.
- Las pVE pueden utilizarse como **vehículos farmacológicos** de reguladores de la expresión génica y quimioterapéuticos con buenos resultados en modelos murinos con xenoinjerto de ACDP.
- Las pVE modificadas son capaces de desencadenar **respuesta inmune antitumoral** en ratones con xenoinjerto de ACDP a través de la potenciación de la muerte celular inmunogénica de células tumorales.

Los resultados de las publicaciones recogidas en esta revisión ofrecen un entendimiento y abordaje novedosos del ACDP, con resultados prometedores *in vitro* e *in vivo*, aunque se requiere mayor estudio para su validación y escalada a la aplicación en humanos.

Bibliografía y agradecimientos

