



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Estudio del gen YKT6 y miRNAs asociados en la liberación de exosomas en pacientes quirúrgicos de cáncer de pulmón

Marc Ruiz Martinez

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT<sup>DE</sup>  
BARCELONA

TESIS DOCTORAL

PROGRAMA DOCTORADO MEDICINA

**Estudio del gen YKT6 y miRNAs asociados en la liberación de  
exosomas en pacientes quirúrgicos de cáncer de pulmón**

Tesis presentada por Marc Ruiz Martinez

Para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona

Codirectores: Dr. Mariano Monzo Planella y Dr. Alfons Navarro Ponz

FACULTAD DE MEDICINA

Barcelona 2016



A mi madre,

A mi hermana



## Agradecimientos

Me gustaría agradecer a todos los que me han acompañado durante estos cuatro años de realización de tesis, sin vuestro soporte no habría sido posible.

En primer lugar me gustaría agradecer al Dr. Marià Monzó, mi director de tesis, la oportunidad que me dió en su momento durante la realización del master de entrar en su laboratorio. Me abrió las puertas en el mundo de la investigación y por eso siempre le voy a estar inmensamente agradecido. Además, desde el primer momento ha confiado en mí, ayudándome a conseguir una beca para la realización de la tesis, a conseguir mis objetivos y a no desanimarme durante los momentos en los que durante la puesta a punto de los experimentos nada parece salir bien. El Dr. Monzó posee unos valores admirables, es culto, inteligente, profesional pero a la vez cercano. Me encantan todas las historias que nos cuenta, tiene mucho recorrido y una gran carrera investigadora, pero siempre tiene tiempo para dedicar a sus estudiantes. También querría agradecer a mi codirector, el Dr. Alfons Navarro, su apoyo durante la realización de la tesis, ya que sin su ayuda esto tampoco habría sido posible. Le agradezco todo lo que me ha enseñado y lo que me ha ayudado a esforzarme en conseguir mis metas.

A mi madre y mi hermana y, a toda mi familia, en especial a mi abuela, porque son una parte importantísima de mi vida, por su apoyo incondicional, por su amor y porque las quiero muchísimo. A mi madre y mi hermana por ser las mujeres más fuertes que conozco, porque hemos superado todos los obstáculos que nos hemos encontrado en la vida y seguiremos luchando.

A todos mis compañeros de trabajo del laboratorio de oncología y embriología molecular humana, los presentes y pasados:

A Tania, por enseñarme en su momento y ayudarme con el trabajo final de master. A Rosa, por todas las horas preparando prácticas y todo lo que me enseñó de embriología. A Rut, la mejor compañera que me he podido encontrar, enseñándome desde el momento cero de mi llegada al laboratorio hasta el momento en que se fue, y escuchándome, dándome consejos y por todos los buenos momentos que pasamos. También a las secretarias del departamento, Gloria, Cristina y Trini, que siempre han hecho mucho más fácil todos los papeleos del laboratorio. A Gerardo, también gracias por resolverme las dudas en mis inicios. A Carme, por haberme ayudado en los inicios con las Real Time, por ser un gran ejemplo de constancia y ser una gran trabajadora. A Marina, por bajarme al mundo de nuevo cuando me pierdo en las nubes, y por entrar siempre con esa alegría al laboratorio. A Anna, empezamos juntos en el laboratorio, por todos los momentos que hemos compartido. A Oriol, por proponerse sus objetivos y conseguirlos, estudia mucho. Al Dr. Jorge Moisés, por ser un grande de la pneumología, por ser un currante nato, y hacernos tan cercana la clínica en el laboratorio. A Joan, por ser un gran compañero, por toda la ayuda que me ha podido dar en los momentos de estrés en el trabajo, y los momentos divertidos. Y como no a Sandra, que sabes que te quiero un montón, y te agradezco que seas una gran amiga, por nuestros desayunitos, nuestros momentos de trabajo juntos, y nuestras conversaciones sobre los dramas de la vida.

También querría agradecer al equipo de la Dra. Cristina Malagelada y al grupo de Dr. Hernando del Portillo su apoyo en las dudas sobre las técnicas para aislar exosomas, ya que sin ellos todo el trabajo habría sido más complicado.

A los pacientes y sus familias por la ayuda a la investigación al permitir realizar estudios que de otra forma sería imposible. A los equipos de neumología, anatomía patológica, y cirugía torácica del Hospital Clínic de Barcelona, por su aportación de muestras, y clasificación de estas ya que sin ello tampoco podríamos realizar nuestras investigaciones.

Gracias a todos mis amigos, por el apoyo en los momentos en los que los he necesitado, siempre han estado allí, por los ánimos para escribir la tesis. Podría empezar y no acabar de nombraros, Carlos, Javi, Viky, Miguel, Meri, Jose, pero en especial me gustaría agradecerle a Nuria su ayuda. Nada de esto habría sido posible sin ti. Por haberme aguantado todo este tiempo, por nuestras charlas, meriendas, discusiones, comidas, experimentos... gracias y mil gracias. Eres una crack y vas a llegar muy lejos, lo sé!

Por último me gustaría agradecerle a la universidad de Barcelona, en la que he estudiado y me he formado durante los últimos 7 años, el haber recibido una beca APIF (Ajuda Professor Investigador en Formació) para la realización de esta tesis.

*“You are today where your thoughts have brought you;  
you will be tomorrow where your thoughts take you”*

*- James Allen-*

1.	Introducción .....	15
1.1	Cáncer de pulmón .....	17
1.1.1	Epidemiología y etiología .....	17
1.1.2	Histopatología del cáncer de pulmón .....	22
1.1.3	Origen celular del cáncer de pulmón .....	26
1.1.4	Biología molecular del cáncer de pulmón de célula no pequeña .....	28
1.1.5	Diagnóstico, estadiaje, pronóstico y tratamiento del cáncer de pulmón de célula no pequeña .....	31
1.2	microRNAs.....	38
1.2.1	Descubrimiento y características .....	38
1.2.2	Biogénesis y mecanismos de acción.....	39
1.2.3	Identificación de dianas de microRNAs.....	43
1.2.4	microRNAs en cáncer .....	44
1.2.5	microRNAs en cáncer de pulmón.....	45
1.3	Vesículas extracelulares .....	47
1.3.1	Exosomas.....	48
1.3.2	Biogénesis de los exosomas. ....	49
1.3.3	Secreción de los exosomas.....	50
1.3.4	Contenido de los exosomas .....	51
1.3.5	Implicaciones de los exosomas en cáncer.....	54
1.3.6	Exosomas en cáncer de pulmón.....	56
1.4	YKT6.....	59
1.4.1	Principales características de YKT6 .....	59
1.4.2	Mecanismos de regulación de YKT6.....	61
1.4.3	Estudio de YKT6 en cáncer .....	62
2.	Hipótesis y objetivos .....	63
2.1	Hipótesis.....	65
2.2	Objetivos .....	66

2.2.1	Objetivo general.....	66
2.2.2	Objetivos específicos.....	66
3.	Material y métodos.....	67
3.1	Estudio <i>in vitro</i> con línea celular A549.....	69
3.2	Inhibición de YKT6 con DsiRNA para evaluar la liberación de exosomas.....	69
3.3	Extracción de proteína y cuantificación de proteína total.....	70
3.4	Western Blot.....	71
3.5	Estudio de la regulación de YKT6 por miRNAs.....	72
3.6	Inhibición de YKT6 con miRNAs para evaluar la liberación de exosomas.....	77
3.7	Ensayo de proliferación celular.....	78
3.8	Aislamiento de Exosomas.....	79
3.9	Caracterización y cuantificación de los exosomas.....	81
3.10	Pacientes.....	82
3.11	Extracción ARN de muestras de tejido.....	82
3.12	Cuantificación de ARNm y miRNAs.....	84
3.13	Extracción ADN.....	85
3.14	Análisis de estado mutacional de TP53 y KRAS.....	86
3.15	Análisis estadístico.....	87
4.	Resultados.....	89
5.	Discusión.....	103
6.	Conclusiones.....	107
7.	Bibliografía.....	109
8.	Anexos.....	125
8.1	Publicación a la que ha dado lugar la tesis.....	125
8.2	Revisiones del artículo publicado.....	137
8.3	Conferencia oral a la que ha dado lugar la tesis.....	143
8.4	Carta de aceptación comunicación oral.....	149
8.5	Otras publicaciones en las que he participado y abstracts enviados a congresos ...	153

## Abreviaturas

ADN	Ácido desoxiribonucleico
Ago2	Argonauta
AKT	<i>Protein kinase B</i>
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ARN	Ácido ribonucleicos
ARNm	ARN mensajero
A-T	Adenina-Timina
BACs	<i>Bronchioalveolar stem cells</i>
BAL	Lavado broncoalveolar
BCL2	B-Cell CLL/Lymphoma 2
CDK	Kinasa dependiente de ciclina
CE	Carcinoma escamoso
CEA	Antígeno carcinoembriónico
CK-7	Citoqueratina 7
CLB	Buffer de lisis de células
CLL	Leucemia linfática crónica
CP	Cáncer de pulmón
CPCNP	Cáncer de pulmón de célula no pequeña
CPCP	Cáncer de pulmón de célula pequeña
CpG	Isla de citosina y guanina
Cryo-TEM	Crio microscopia electrónica de transmisión
DC	Células dendríticas

DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region Gene 8</i>
DsiRNA	<i>Dicer-substrate short interfering RNA</i>
ECOG	<i>Eastern cooperative oncology group</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
eIF4F	<i>Eukaryotic initiation factor 4F</i>
EML4-ALK	<i>Proteína de fusión de echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (EML4) y anaplastic lymphoma kinase (ALK)</i>
ENCODE	<i>Encyclopaedia of DNA elements</i>
ERBB1	<i>Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2</i>
ERBB2	<i>Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2</i>
ESCRT	<i>Endosomal sorting complex required for transport</i>
ESMO	<i>European society for medical education</i>
EV	<i>Extracellular vesicles</i>
FBS	Suero fetal bovino
FGFR	<i>Fibroblast growth factor receptor</i>
G-C	Guanina-Citosina
HER2/Neu	<i>Formerly human epidermal growth factor receptor</i>
hTERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>
IARC	<i>International agency for research on cancer</i>
IASCL	<i>International association for the study of lung cancer</i>
ILV	Vesículas intraluminales
Kb	Kilo bases

KLF4	<i>Factor 4 Kruppel-Like</i>
KRAS	<i>V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LKB1	<i>Liver kinase B1</i>
LncRNAs	<i>Long-non-coding RNAs</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MHC II	Complejo mayor de histocompatibilidad II
miRNAs	microRNA
mTOR	<i>Mamalian target of rapamicin</i>
MTS	Sales de tetrazolio:3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium)
MVB	Cuerpos multivesiculares
NANOG	Homeoproteina Nanog
NK	Linfocitos " <i>natural killers</i> "
NNK	4-(methylnitrosamino)-1-(3-iridil)-1-butanone
nSMase	<i>Neutral sphingomielinase</i>
NTA	<i>Nanoparticle trafficking analisis</i>
OCT3/4	<i>Octamer binding transcription factor 3/4</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
Onco-miRs	miRNA oncogénico
P16INK4A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
PABPC	<i>Cytoplasmic poly(a)-binding protein</i>
PAH	Hidrocarburos policiclicos aromáticos
PCR	Reacción de la polimerasa en cadena

PD-1	<i>Programed death receptor 1</i>
PET	Tomografías por emisión de positrones
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
pre-miRNA	Precursor de miRNA
pri-miRNA	miRNA primario
PS	<i>Performance status</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RB	<i>Retinoblastoma</i>
RE	Retículo endoplasmático
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
S-5A	Supervivencia a 5 años
SG	Supervivencia global
siRNA	Small interfering RNA
SLE	Supervivencia libre de enfermedad
SNARE	<i>N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor</i>
SNP	<i>Single nucleotide polimorfism</i>
SOX2	<i>SRY (sex determining region Y)-box 2</i>
TEM	Transición de epitelio a mesénquima
TMS	Tiempo medio de supervivencia
TNM	Tumor, nódulo y metástasis
TP53	<i>Tumor Protein P53</i>
TRBP	<i>Tar RNA-binding protein</i>
TTF1	<i>Thyroid transcription factor 1</i>

UTR	<i>Untranslated region</i>
WB	Western blot
Wnt	<i>Wingless-type MMTV integration site family</i>
XPO5	Exportina 5
XRN1	Exoribonucleasa 1



## **1. Introducción**



## 1.1 Cáncer de pulmón

### 1.1.1 Epidemiología y etiología

#### Epidemiología

La importancia de la investigación hoy en día del cáncer de pulmón (CP) en nuestra sociedad tiene sus fundamentos en su elevada incidencia y mortalidad. Si consideramos ambos sexos, el CP es el tipo de tumor sólido con más incidencia y mortalidad a nivel mundial(1).

En Estados Unidos, para el 2016, se espera que se produzcan unas 160.000 muertes debidas al CP, que representarían 1 de cada 4 muertes por cáncer (2). Los últimos datos de los que disponemos en España sobre estadísticas de CP, estiman que en el año 2014 se diagnosticaron unos 28.000 nuevos casos de CP y, 20.000 muertes anuales son debidas a este tipo de cáncer(3).

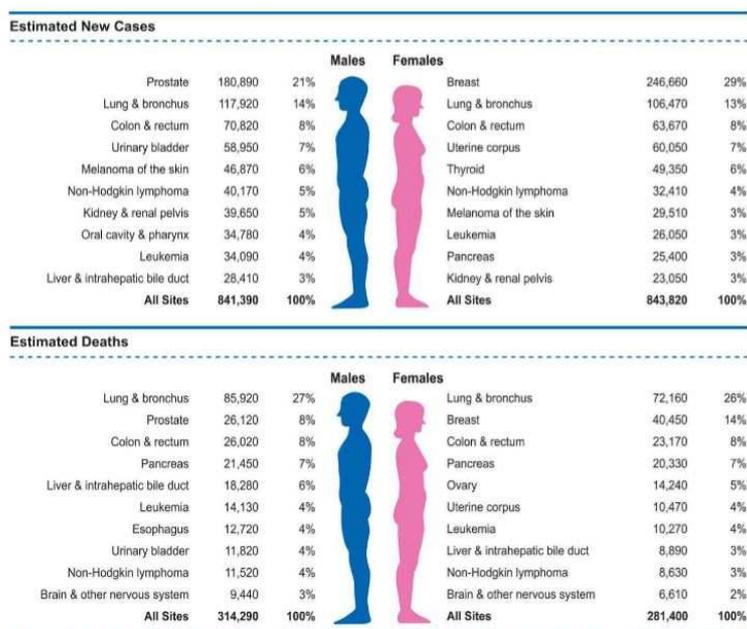


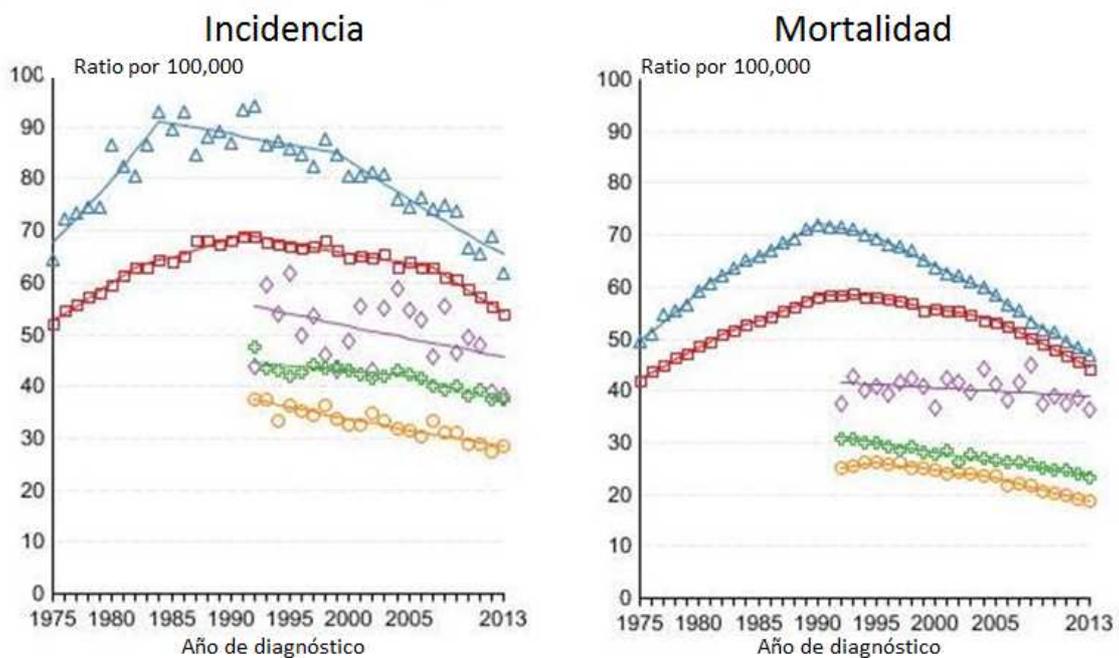
FIGURE 1. Ten Leading Cancer Types for the Estimated New Cancer Cases and Deaths by Sex, United States, 2016. Estimates are rounded to the nearest 10 and cases exclude basal cell and squamous cell skin cancers and in situ carcinoma except urinary bladder.

**Figura 1:** Incidencia estimada de nuevos casos y muertes para el año 2016 de enfermedades neoplásicas(4).

Globalmente el CP es más frecuente en hombres que en mujeres. En los países desarrollados su incidencia se encuentra en segundo lugar por detrás del cáncer de próstata y de mama, en hombres y mujeres respectivamente(2).

Alrededor del 90% de las personas con CP son diagnosticadas con una edad promedio de 70 años, y solo menos del 2% de los casos se presentan en menores de 45 años(4). La probabilidad de desarrollar un CP aumenta con el avance de la edad(5). Según la *American Cancer Society*, la probabilidad de que una persona desarrolle CP es de 1 de cada 14 para hombres, y 1 de cada 17 para mujeres.

Parece que la incidencia en hombres está disminuyendo o, como mínimo, estabilizándose, posiblemente debido a iniciativas para parar el consumo de tabaco. En contraste, la incidencia en mujeres parece estar aumentando(1). En las mujeres la incidencia de este tipo de cáncer empezó a aumentar en 1973, teniendo su máxima en el año 1990(6). Además del factor del sexo, la incidencia del CP también se ve afectada por la etnia. En los Estados Unidos, los afroamericanos fueron la raza que tuvo una mayor incidencia y mortalidad durante el periodo de 1975-2013(7).



**Figura 2:** Diferencias en las tasas de incidencia y mortalidad por razas en CP. En diferentes colores observamos diferentes razas y sus tasas de incidencia y mortalidad: Roja: Blanca; Azul: Afroamericana; Verde: Isleños asiáticos del pacífico; Lila: Nativos americanos; Naranja: Hispánicos. Adaptado de(7).

La tasa de supervivencia de los pacientes con CP depende entre otros factores de la evolución de la enfermedad en el momento del diagnóstico. La supervivencia al año y a los cinco años desde el diagnóstico en el CP es del 44% y del 17% respectivamente, y sólo el 16% de los casos

se diagnostican de forma localizada, es decir, confinado solamente al pulmón sin invadir otros órganos o nódulos linfáticos, teniendo estos una supervivencia del 55%(2).

Las tasas de supervivencia en pacientes de CP no han variado mucho en los últimos años, a pesar de los avances en el tratamiento y en su detección en estados primarios (8).

## **Etiología**

### **Tabaco**

A partir de la década de los 60 se llegó a la conclusión de que el consumo del tabaco era la mayor causa de CP por parte del *Royal College of Physicians of United Kingdom* y la *Surgeon General of United States*. Se basaron para concluir esta relación en una serie de estudios sin precedentes en el ámbito(9)(10)(11)(12). El primero de ellos fue realizado en el año 1939 por Mueller *et al*, y fue el primero en añadir un grupo de pacientes control y observar que la mayoría de pacientes que habían desarrollado CP eran fumadores(10). Después, llegaron dos estudios más en los años 50, que también contenían casos y controles, con unas poblaciones grandes y muy bien caracterizadas para la época, que llegaron a resultados similares (11)(12).

El tabaco es entre todos los factores de riesgo el más importante, ya que su consumo causa entorno al 80-90% de los casos, haciendo que el riesgo de las personas fumadoras sea 9 veces superior a las no fumadoras(13). Aunque hoy en día la relación entre CP y tabaco sigue viéndose en parte estigmatizada, poco a poco va cambiando y se entiende como un problema de adicción, y además, muchos de los pacientes habrían dejado de fumar años antes de ser diagnosticados.

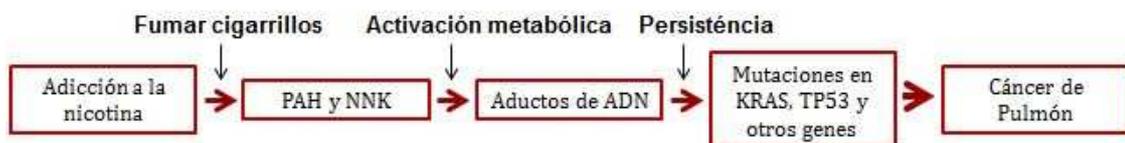
En el humo del tabaco se han detectado alrededor de 4.000 compuestos, de los cuales 60 son carcinógenos reconocidos por la *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, y de estos muchos se ha probado que pueden dar lugar al proceso tumorogénico(14) del pulmón.

Entre otros, de los componentes más perjudiciales en el tabaco encontramos los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH), o las N-nitrosaminas, que aunque su contenido es bajo en los cigarrillos (5-200ng/unidad), tienen el efecto más potente(15). Un ejemplo de PAH sería el benzo(a)pireno, mientras que un ejemplo de N-nitrosamina sería el 4-(methylnitrosamino)-1-(3-yridil)-1-butanone (NNK) que proviene de la nitrosación de la nicotina. Estos dos compuestos necesitarán su activación metabólica para producir su efecto carcinogénico, y este tendrá lugar cuando el compuesto sea metabolizado como cualquier otro compuesto o droga

por el organismo. El proceso de metabolización envuelve entre otras moléculas a la enzima citocromo P450, que cataliza la oxidación del carcinógeno, haciéndolo más hidrosoluble y por lo tanto más fácilmente excretable. El metabolito oxigenado será entonces metabolizado por enzimas de fase II para acabar de hacerlo aún más fácilmente excretable(14). Aun así, algunos de los metabolitos resultantes de la reacción del citocromo P450 con los carcinógenos tienen un centro electrofílico reactivo y pueden interactuar con el ácido desoxiribonucleico (ADN) u otras macromoléculas formando uniones covalentes dando lugar a lo que recibe el nombre de aductos de ADN. El proceso de la activación metabólica es por lo tanto el paso del carcinógeno no reactivo a la obtención de la forma que se puede unir al ADN, y la formación de estos aductos de ADN tienen un papel clave en el proceso de carcinogénesis(16). La formación de estos aductos de ADN provocará un error que no siempre puede ser reparado por los sistemas de reconocimiento y reparación de errores de ADN, provocando mutaciones que activarán oncogenes como *KRAS* o inactivarán genes supresores tumorales como *TP53*.

La relación del benzo-a-pireno con el proceso del desarrollo del CP se explica con el desarrollo de su metabolito diol epoxide. El diol epoxide, puede producir mutaciones de forma en el gen supresor TP53(17).

NNK se trata de una nitrosamina específica del tabaco que también tiene un papel importante en la causa del CP. En este caso concreto se explica, entre otras razones, ya que el aducto resultante de la metabolización del NNK, el O6-methylguanina, produce un error de lectura de la ADN polimerasa que produce una conversión de los pares de bases G-C (Guanina-Citosina) a A-T (Adenina-Timina). Esta mutación dará como lugar una activación del oncogén *KRAS*(18).



**Figura 3.** Esquema del proceso del desarrollo del cáncer de pulmón a través del hábito tabáquico. Adaptado de(19).

Además el tabaco también contiene otros carcinógenos que no necesitan su metabolización para producir daños en las células pulmonares, entre ellos encontramos el benceno y el radón. También el humo del tabaco generado por un fumador puede afectar a una persona no fumadora, con lo que se conoce con el nombre de tabaquismo pasivo, y resulta un factor de riesgo para desarrollar CP(20).

Hoy en día se conoce que la forma más efectiva de disminuir la mortalidad por cáncer de pulmón es la prevención, en concreto la del inicio del hábito tabáquico(15).

### **Exposición a otros productos**

Algunos tóxicos ambientales o productos de la industria también pueden tener un alto impacto en el desarrollo de cáncer de pulmón. Alrededor del 10% de los CP están relacionados a exposición a productos tóxicos durante el trabajo(21). Muchos elementos o materiales de industria se han identificado como carcinógenos, y entre otros encontramos el arsénico, asbesto, radón y cromo. El radón liberado por materiales o derivado de actividades industriales produce una emisión de partículas alfa que pueden dañar las células pulmonares. También la exposición a radiación ionizante se ha descrito como factor que aumenta el riesgo de desarrollar CP.

### **Factores genéticos**

Aunque la mayoría de casos de cáncer de pulmón se dan en personas fumadoras, una pequeña proporción de pacientes no son fumadores, y además, no todos los fumadores crónicos desarrollaran CP. Estas diferencias podrían ser debidas a variaciones en genes que provocarían una susceptibilidad a padecer CP o, por el contrario, a su protección. De todas formas, estos factores no están claros.

Aun así se ha demostrado que tanto factores genéticos heredados como adquiridos tienen un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Se conoce que las personas que tienen un familiar con CP, tienen mayor riesgo que las personas control, y éste aumenta si se tienen dos familiares o más(22).

Algunos polimorfismos se han descrito como factores genéticos que predisponen a padecer CP. En concreto algunos genes presentando estos polimorfismos serían genes que codifican proteínas involucradas en el procesamiento de metabolitos carcinogénicos y de mecanismos de reparación del ADN entre otros (23)(24)(25).

También se han encontrado en diferentes estudios asociación de inestabilidad genómica en ciertas regiones del genoma con una mayor predisposición a CP. Estas son las regiones 15q25, 5p15 y 6p21(26)(27).

En la región de 15p21, encontramos polimorfismos en una zona donde encontramos los receptores nicotínicos colinérgicos, que producirán cambios en el ámbito tabáquico de los pacientes y provocarán así un mayor riesgo a padecer CP(28)(29).

## **Patología pulmonar previa**

El haber padecido una enfermedad pulmonar es un factor que cada vez se está reconociendo más como posible impacto en el desarrollo de CP. Patologías pulmonares como el asma, la neumonía o la fibrosis pulmonar, que pueden producir lesiones cicatrizales son factores potenciales para desarrollar un adenocarcinoma. Además, los pacientes de fibrosis idiopática pulmonar tienen más riesgo de padecer CP que personas control(30).

### **1.1.2 Histopatología del cáncer de pulmón**

El CP hasta se clasifica histológicamente según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en dos grandes grupos, cáncer de pulmón de célula pequeña (CPCP) y cáncer de pulmón de célula no pequeña (CPCNP). La clasificación más reciente ha tenido lugar durante el año 2015, con la publicación de la cuarta edición de la clasificación de tumores de pulmón de la OMS, aunque la utilizada para esta tesis ha sido la clasificación del 2004.

### **Cáncer de pulmón de célula pequeña**

Representan el 10-15% del total de casos de CP (31). Este tipo de tumores tienen una alta incidencia en personas fumadoras, solo entre el 2-3% de personas que lo sufren son no fumadoras(32).

Se diagnostica fácilmente en biopsias broncoscópicas directamente con microscopia normal. Se visualizan focos de células pequeñas con un alto índice mitótico, con cromatina granular y en ocasiones sin nucleolo, de ahí viene su nombre.

La mayoría de pacientes presentan metástasis en el momento del diagnóstico, y este tipo de cáncer se caracteriza por su agresividad y rápido progreso(33) . Su tratamiento inicial consiste en quimioterapia con cisplatino más etoposide que puede estar combinada con radioterapia, siempre teniendo en cuenta el *Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status* (ECOG PS) de los pacientes(34).

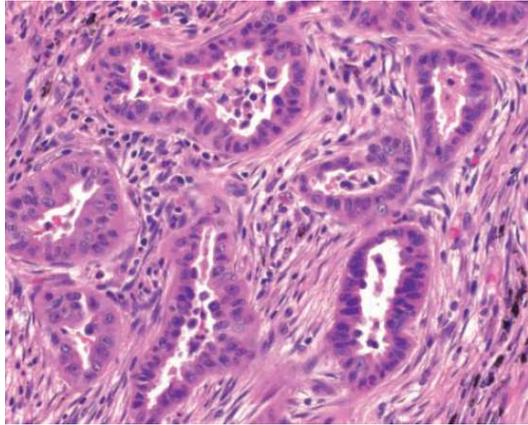
## **Cáncer de pulmón de célula no pequeña**

Representa el 85% de los casos de CP(35). Se divide principalmente en escamoso y en no escamoso, agrupando éste a adenocarcinoma y carcinoma de célula grande(36). Actualmente el subtipo más frecuente es el adenocarcinoma(37), que ha relegado al carcinoma escamoso (CE) a segundo lugar. Esta tesis se ha realizado con una serie de pacientes de CPCNP. En la Tabla 1 podemos ver la clasificación de la OMS para CPCNP.

### **Adenocarcinoma**

Se trata de un tumor epitelial maligno con diferenciación glandular o producción de mucina, que puede presentarse con patrones de crecimiento acinar, papilar, bronquioloalveolar, sólido mucinoso o en combinación de estos patrones. La combinación de estos patrones de crecimiento da lugar al adenocarcinoma mixto, que es el subtipo más frecuente. La clasificación de la OMS del 2004 tuvo una pequeña propuesta de modificación en 2011 por la *International Association for the study of lung cancer* (IASCL) para definir los adenocarcinomas según su invasividad(37). Representa alrededor del 30-35% de todos los CP y, aunque la mayoría de casos se dan en fumadores, en no fumadores representa el subtipo más frecuente, y en concreto en mujeres que nunca han fumado(38). Se suele localizar en la periferia pulmonar formando nódulos de unos 4cm en las vías aéreas pequeñas, y los márgenes del tumor muchas veces forman patrones lobulados o con bordes estrellados.

Las características principales de estas células pueden variar según su subtipo, pero la mayoría presentan una vacuola grande y llena de mucina que puede comprimir el núcleo hacia la periferia. Las características inmunohistoquímicas pueden variar también con el subtipo y el grado de diferenciación. Algunos marcadores epiteliales como el CAM5.2, y el antígeno carcinoembrionario (CEA) son típicos. También algunas citoqueratinas como la 7 (CK-7) que se expresa más que la 20. Normalmente se encuentra presencia de *thyroid transcription factor 1* (TTF1), especialmente en los tumores más diferenciados.

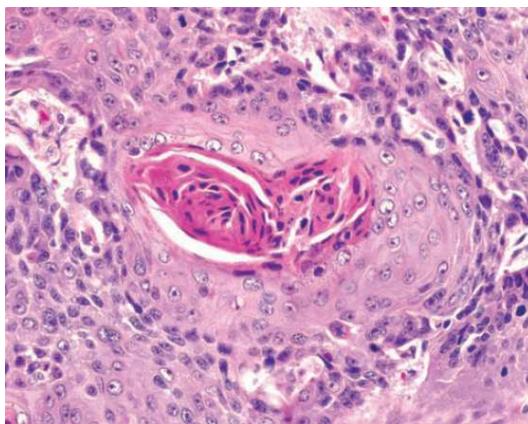


**Figura 4.** Corte histológico de un adenocarcinoma donde se puede apreciar formas irregulares semejantes a glándulas con núcleos hiper cromáticos(39).

### **Carcinoma escamoso**

El CE es un tumor epitelial maligno que presenta queratinización y que puede presentar puentes intercelulares. La mayoría de casos se dan en pacientes fumadores y su desarrollo está muy relacionado con la exposición al arsénico(40). Estos tumores suelen ser blancos o grises con depósitos de carbón. La mayoría se encuentran en posición central en el bronquio lobar o segmentario y en ocasiones en forma de tumor Pancoast.

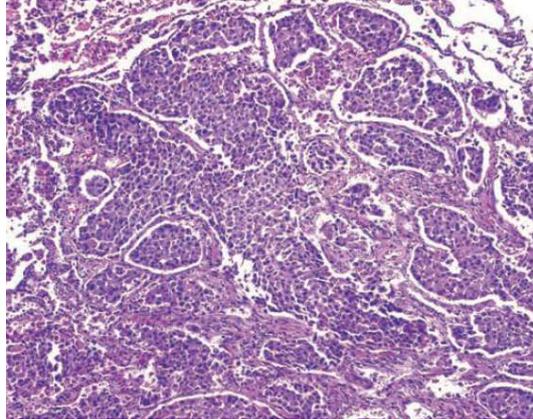
Con un proceso de necrosis y de restos celulares en el tumor, las células grandes de carcinoma escamoso suelen presentar un núcleo central irregular y un abundante citoplasma. La mayoría de CE presentan queratinas de alto peso molecular (citoqueratina 34BE12) y proteína p63, y muy pocos expresan TTF1 o la CK-7. Otro marcador como es la Keratina-81, se encuentra en un 95% de los carcinomas escamosos, mientras que solamente en un 19% de adenocarcinomas (41).



**Figura 5.** Corte histológico de un carcinoma escamoso donde podemos observar la keratinización prominente(39).

## Carcinoma de célula grande

Se trata de un carcinoma indiferenciado al que le faltan las características citológicas y arquitectónicas típicas del carcinoma de célula pequeña, y que no presenta diferenciación glandular o escamosa. Representa alrededor del 9% de todos los CP. La mayoría de casos se diagnostican por exclusión al no tener características específicas discriminatorias.



**Figura 6.** Corte histológico de un carcinoma de célula grande donde podemos apreciar que el tumor puede llenar los espacios alveolares(39).

La última clasificación del 2015 difiere de la del 2004 en las principales modificaciones o diferencias sobre la utilización de la inmunohistoquímica durante la clasificación, nuevo énfasis en los estudios genéticos e integración de las pruebas moleculares para el manejo de los pacientes en estadios avanzados y en su tratamiento. Entre otros, el CE, se clasifica según si es queratinizante o no. También una nueva clasificación para biopsias pequeñas y citología similar a la que se propuso en 2011, y reclasificación de los adenocarcinomas.

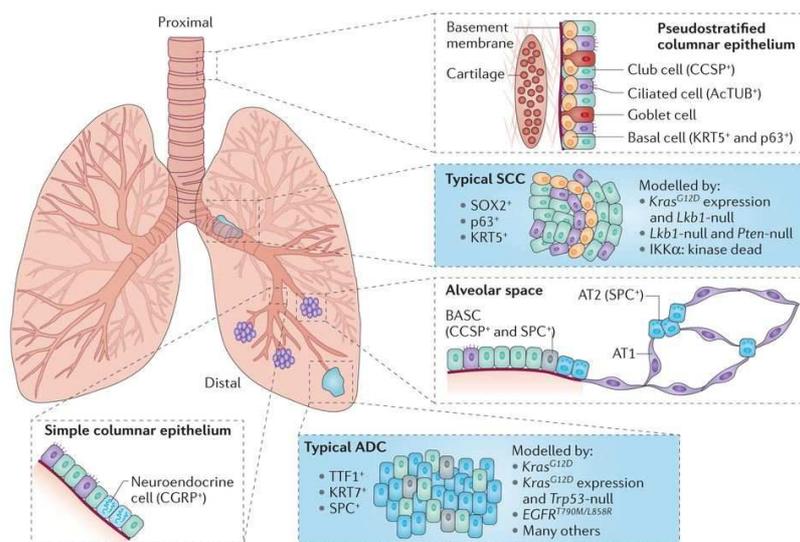
**Tabla 1.** Clasificación histológica del CPCNP, Adaptado de la clasificación de la OMS del 2004.

<b>Clasificación histológica de la OMS del CPCNP</b>
<b>Carcinoma de células escamosas</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Papilar</li><li>Célula clara</li><li>Célula pequeña</li><li>Basaloide</li></ul>
<b>Adenocarcinoma</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Adenocarcinoma con subtipos mixtos</li><li>Adenocarcinoma acinar</li><li>Adenocarcinoma Papilar</li><li>Carcinoma bronquioloalveolar<ul style="list-style-type: none"><li>No mucinoso</li><li>Mucinoso</li><li>Mucinoso y no mucinoso mixto o de tipo celular indeterminado</li></ul></li><li>Adenocarcinoma sólido<ul style="list-style-type: none"><li>Adenocarcinoma fetal bien diferenciado</li><li>Adenocarcinoma mucinoso (coloide)</li><li>Cistoadenocarcinoma mucinoso</li><li>Adenocarcinoma de células en anillo de sello</li><li>Adenocarcinoma de células claras</li></ul></li></ul>
<b>Carcinoma de células grandes</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Carcinoma neuroendocrino de células grandes</li><li>Carcinoma neuroendocrino de células grandes combinado</li><li>Carcinoma basaloide</li><li>Carcinoma tipo linfopitelioma</li><li>Carcinoma de células claras</li><li>Carcinoma de células grandes con fenotipo rabdoideo</li></ul>
<b>Carcinoma Adenoescamoso</b>
<b>Carcinoma Sarcomatoide</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Carcinoma pleomórfico</li><li>Carcinoma fusiforme</li><li>Carcinoma de células gigantes</li><li>Carcinosarcoma</li><li>Blastoma pulmonar</li></ul>
<b>Tumor carcinoide</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Carcinoide típico</li><li>Carcinoide atípico</li></ul>
<b>Carcinoma de tipo glándulas salivales</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Carcinoma mucoepidermoide</li><li>Carcinoma quístico adenoide</li><li>Carcinoma epitelial-mesenquimal</li></ul>

### **1.1.3 Origen celular del cáncer de pulmón**

El origen celular del que provienen las células tumorales de cáncer de pulmón sigue siendo desconocido, postulándose que las diferentes clases podrían provenir de diferentes tipos celulares(42). Se ha postulado que posiblemente las células epiteliales con características neuroendocrinas podrían dar lugar a CPCP y que las células epiteliales bronquiales o alveolares

darían lugar al CPCNP(43)(44). Esta teoría está reforzada por el patrón de distribución de los subtipos histológicos de CP, donde los adenocarcinomas suelen ser más frecuentes en las zonas más distales, mientras que los carcinomas escamosos se suelen encontrar más frecuentemente en las zonas proximales de las vías respiratorias(45). Respecto al CPCNP, se ha propuesto que los adenocarcinomas podrían venir de células de clara o de células pneumocitos tipo 2, debido a los marcadores que comparten(42), y los carcinomas escamosos en cambio se ha postulado que podrían provenir de las células basales(45), esquematizado en la Figura 7. De todas formas, esta teoría que defiende que células diferenciadas del pulmón darían lugar a las células iniciadoras del tumor supone que éstas, que normalmente tienen un tiempo de vida determinado, adquirieran propiedades de células madre. Esta opción es posible, ya que las alteraciones en las células diferenciadas pueden provocar un fenotipo y propiedades similares a las células madre como la autorenovación(46), pero también han dado lugar a la teoría de las células madre cancerosas, origen de las células tumorales a partir de células madre o progenitoras del tejido (47).



Nature Reviews | Cancer

**Figura 7.** Imagen que muestra el supuesto origen celular de los subtipos de CPCNP; carcinoma escamoso y de adenocarcinoma, junto con marcadores de expresión de estos(42).

La teoría de la célula madre cancerosa como origen del tumor tiene a su favor que éstas al tener un tiempo de vida más largo podrían tener tiempo suficiente para acumular las mutaciones que darían lugar al proceso tumoral(48). En el caso del pulmón, el primer estudio que determinó la presencia de células madre en el tejido adulto(49), observó que estas células tenían expresión de los marcadores típicos de pluripotencia de las células madre como NANOG, OCT3/4, SOX2 y KLF4. Gracias a estudios con animales de experimentación, se

identificaron las células que podrían dar lugar a los adenocarcinomas, las células madre bronquialveolares (BASCs del inglés *Bronchioalveolar stem cells*) que se encuentran en la zona de transición entre alveolos y bronquios terminales. Las células basales tienen capacidad de diferenciación multipotente, al igual que los pneumocitos tipo 2, que pueden dar lugar a pneumocitos de tipo 1 y a su autorenovación. Estas posibilidades hacen factible que el origen celular del cáncer de pulmón sea o bien una célula diferenciada o una célula con características de célula madre(42).

#### **1.1.4 Biología molecular del cáncer de pulmón de célula no pequeña**

La tumorigénesis del CP es un proceso de transformación del epitelio normal bronquial que requiere varios pasos(50). Por un lado, en el caso del CE estos pasos consecutivos son la hiperplasia, metaplasia, displasia y el carcinoma *in situ*. Por otro lado, el adenocarcinoma se origina a partir de una hiperplasia adenomatosa(51).

Este proceso que recibe el nombre de carcinogénesis se debe a la adquisición de capacidades que confieren a las células tumorales unas ventajas para su desarrollo(52)(53). La adquisición de estas características tumorales y de la transformación hacia el fenotipo maligno se da por la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas de las células del epitelio pulmonar y bronquial. Estos cambios incluyen mutaciones en oncogenes y en genes supresores tumorales, así como inestabilidad cromosómica o silenciamiento de genes epigenéticamente mediante la hipermetilación de las islas CpG del promotor(54)(55). La producción de todas estas alteraciones genéticas en las células tumorales, vendrá dada por la combinación de diferentes factores, ambientales como la exposición a compuestos carcinógenos y los propios factores genéticos de cada persona que harán que tenga una mayor o menor susceptibilidad a desarrollarlos.

Los cambios en oncogenes, se suelen dar principalmente en aquellos genes que codifican por receptores o proteínas intracelulares cruciales para el crecimiento, proliferación y supervivencia. Algunos de los oncogenes que suelen estar activados en el CP son *ERBB1*, *KRAS*, *ERBB2*, *PIK3CA*, *FGFR*, *EML4-ALK*.

El gen *ERBB1* codifica para el *Epidermal Growth Factor receptor* (EGFR), que es un receptor de membrana que tiene una función tirosina kinasa que se encuentra sobreexpresado en alrededor del 70% de los pacientes de CPCNP. *EGFR* se encuentra en la parte superior de una cascada de señalización que regula a través de la vía de *KRAS-RAF-MAPK* el crecimiento

tumoral, diferenciación y apoptosis, pero también a través de la vía de la señalización de *PIK3CA* la supervivencia y motilidad celular(56). Se suelen encontrar tanto mutaciones puntuales activadoras como amplificaciones del gen, y la actuación en el bloqueo de la señalización de *EGFR* es una importante diana terapéutica(57).

*ERBB2* codifica para el receptor *formerly human epidermal growth factor receptor* (HER2/Neu), y su activación depende de la dimerización con otros receptores seguida de la unión de los ligandos de la familia del *epidermal growth factor* (EGF). Se han detectado tanto mutaciones como amplificaciones del gen, aunque en baja prevalencia(58).

EML4-ALK es una proteína de fusión que tiene función oncogénica resultante de la fusión de los genes *EML4* y *ALK* durante la inversión del brazo corto del cromosoma 2, y al igual que las mutaciones en *EGFR*, parece darse principalmente en adenocarcinomas(59).

Otro gen importante en la biología molecular del CPCNP es *KRAS*. Este gen, está regulando vías de transducción de señales y proliferación celular y se encuentra más frecuentemente mutado en adenocarcinomas(54). Se suele encontrar mutado en los codones 12 y 13 en el 30% de los CPCNP, principalmente en adenocarcinomas(60).

El gen *PIK3CA*, que codifica para la subunidad catalítica de PI3K se encuentra sobreexpresado en el 43% de los CPCNP sobretodo en el subtipo de carcinoma escamoso(61). PI3K está envuelto en la vía de *PI3K-PTEN-AKT*, su función es la de la fosforilación de AKT, regulando fuertemente la respuesta de supervivencia celular entre otros a través del mecanismo efector del EGFR(62).

Otro evento importante que se suele dar también en CPCNP es la pérdida de función de genes supresores tumorales. En este caso suele ser necesaria la inactivación bialélica para la pérdida de función. Algunos de los genes supresores de tumor que suelen estar alterados en CPCNP son *TP53*, y genes de la vía de p53, *P16INK4A*, *RB*, *LKB1*, *AMPK* y la vía de *MTOR*.

El gen que codifica para p53 es *TP53*. Esta proteína es clave para el mantenimiento de la integridad genética y se encuentra mutado en el 50% de CPCNP, con mayor frecuencia en carcinomas escamosos y carcinomas de célula grande que en adenocarcinomas(54). La mayoría de mutaciones en p53 se dan en la región de unión al ADN, sobretodo en residuos de arginina que se encargan en la interacción con él(63). Cuando p53 es funcional, se activa por fosforilación como resultado del estrés celular(64) e induce la expresión de otros genes supresores tumorales que tienen funciones en puntos de control o *checkpoints* del ciclo celular, apoptosis, y reparación del ADN entre otras(65).

El gen que codifica para p16, *CDKN2A*, también se ha encontrado mutado, metilado o deleciónado en CPCNP(66). p16 es una proteína inhibidora de kinasas dependiente de ciclina (CDK), y actúa inhibiendo la CDK4 y CDK6 para mantener el *checkpoint* de la fase del ciclo celular G1 a S. La pérdida de p16 permite que las CDKs fosforilen la proteína Retinoblastoma (pRb) y que esta no ejerza su función supresora del crecimiento(67). Cuando la pRb es activa, en su forma no fosforilada, pRb se une e inactiva otras proteínas como el factor de transcripción E2F-1, evitando el paso de fase G1 a S del ciclo celular(68). El gen *RB*, que codifica para pRb, se encuentra alterado en un 15% de CPCNP(69).

LKB1 (*Liver Kinase B1*) es una kinasa de serina/treonina que fosforila y activa la proteína AMPK (*AMP-activated protein kinase*)(70). La activación de AMPK a través de LKB1 tiene un papel clave en la supresión de la actividad metabólica y del crecimiento tumoral bajo condiciones de hipoxia y de falta de nutrientes(71). La inactivación de *LKB1* se encuentra en un 30% de los adenocarcinomas (72). La inactivación de LKB1 produce que AMPK sea inactiva y que al final mTOR (*mamalian target of rapamicin*) tenga una alta actividad favoreciéndose así el crecimiento tumoral.

Además, otras anomalías biológicas en el CPCNP serían el incremento de la actividad de la telomerasa y la desregulación de la apoptosis. En el 80-85% de los casos de CPCNP encontramos sobreexpresada la actividad de la telomerasa, que permite que no haya frenada de la replicación de las células por el acortamiento de los telómeros(73). Altos niveles de telomerasa y del gen *hTERT* se han relacionado con una peor supervivencia en pacientes de estadios iniciales de CPCNP(74). Algunos casos de CPCNP presentan una pérdida del gen antiapoptótico BCL2. Además BCL2 se asocia con un buen pronóstico de los pacientes(75).

La caracterización genética permite una mejor clasificación de los CPCNP. Solo el Carcinoma de célula grande es la excepción que puede contener alteraciones que se asocian a cualquier otro de los subtipos. En la Figura 8 pequeño resumen a modo de tabla de las alteraciones más frecuentes en CPCNP.

**Table 1. Recurrent Molecular Alterations in Lung Adenocarcinoma, Squamous-Cell Carcinoma, and Small-Cell Carcinoma.\***

Type of Alteration	Adenocarcinoma	Squamous-Cell Carcinoma	Small-Cell Carcinoma
Cell-cycle mutations	<i>TP53</i> (46%), <i>CDKN2A</i> (4%)	<i>TP53</i> (91%), <i>CDKN2A</i> (17%), <i>RBI</i> (7%)	<i>TP53</i> (92%), <i>RBI</i> (75%)
	<i>RTK/PI3K-MTOR</i> signaling: <i>KRAS</i> (33%), <i>EGFR</i> (14%), <i>BRAF</i> (10%), <i>STK11</i> (17%), <i>MET</i> (8%), <i>NF1</i> (11%), <i>PIK3CA</i> (7%), <i>RIT1</i> (2%)	<i>RTK/PI3K-MTOR</i> signaling: <i>PIK3CA</i> (16%), <i>PTEN</i> (8%), <i>HRAS</i> (3%)	<i>RTK/PI3K-MTOR</i> signaling: <i>PTEN</i> (5%)
Other mutations	Oxidative stress response: <i>KEAP1</i> (17%), <i>MYC</i> pathway; <i>MGA</i> (8%)	Oxidative stress response: <i>CUL3</i> (6%), <i>KEAP1</i> (12%), <i>NFE2L2</i> (15%)	Epigenetic deregulation: <i>EP300</i> (11%), <i>CREBBP</i> (10%)
	Aberrant splicing: <i>UZF1</i> (3%), <i>RBM10</i> (8%)	Squamous differentiation: <i>NOTCH1</i> (8%), <i>ASCL4</i> (3%), <i>NOTCH2</i> (5%)	Neuroendocrine differentiation: <i>NOTCH1</i> (15%), <i>NOTCH2</i> (5%), and <i>NOTCH3</i> (9%)
Rearrangements	<i>ALK</i> (3–8%), <i>ROS1</i> (2%), <i>RET</i> (1%), <i>NTRK1</i> (3%), <i>NRG1</i> (2%), <i>BRAF</i> (3% in those who never smoked), <i>ERBB4</i> (1%)	<i>FGFRs</i> (rare)	<i>RBI</i> (13%), <i>TP73</i> (7%), <i>CREBBP</i> (4%), <i>PTEN</i> (4%), <i>RBL1</i> (3%)
Amplifications	<i>TTF1</i> (14%), <i>TERT</i> (18%), <i>EGFR</i> (7%), <i>MET</i> (4%), <i>KRAS</i> (6%), <i>ERBB2</i> (3%), <i>MDM2</i> (8%)	Chr3q: <i>SOX2</i> (43%), <i>TP63</i> (29%), <i>PIK3CA</i> (38%), <i>HES1</i> (26%)†	<i>MYC</i> family members (16%): <i>MYC</i> , <i>MYCN</i> , <i>MYCL1</i> , <i>SOX2</i> (27%), <i>FGFR1</i> (8%), <i>IRS2</i> (2%)
Deletions	<i>CDKN2A</i> (20%)	<i>CDKN2A</i> (27%), <i>PTEN</i> (3%)	<i>TP53</i> , <i>RBI</i> , <i>CDKN2A</i> , Chr3p (e.g., <i>FHIT</i> , <i>ROBO1</i> )†
Commonly altered pathways	<i>MAPK</i> and <i>PI3K</i> signaling, oxidative stress response, cell-cycle progression, RNA splicing and processing, nucleosome remodeling	Squamous-cell differentiation, oxidative stress response, <i>MAPK</i> and <i>PI3K</i> signaling	Cell-cycle regulation, <i>PI3K</i> signaling, regulation of nucleosome transcriptional and remodeling, <i>NOTCH</i> signaling and neuroendocrine differentiation

\* Percentages represent the prevalence of mutation and were obtained from the cBioPortal for Cancer Genomics ([www.cbioportal.org](http://www.cbioportal.org)).<sup>18,11</sup>  
† Chromosomes 3q and 3p are cytogenetic bands.

**Figura 8.** En esta imagen podemos ver algunas alteraciones genómicas más frecuentes de CPCNP según los principales grupos histológicos(48).

### 1.1.5 Diagnóstico, estadiaje, pronóstico y tratamiento del cáncer de pulmón de célula no pequeña

#### Diagnóstico

La mitad de pacientes que se diagnostican de CPCNP lo hacen en un momento avanzado de la enfermedad. Sólo un cuarto de los pacientes se diagnostican en un estadiaje primario, normalmente asintomático y debido a una evaluación o proceso no relacionado.

El diagnóstico del CPCNP empieza con una historia clínica y exploración completas. La mayoría de pacientes presentan síntomas en el momento del diagnóstico, aunque muchos de estos síntomas no sean específicos de la enfermedad, como la tos, hemoptisis y disnea(76). Es por eso que hay que tener en cuenta entre otros los factores de riesgo para padecer CPCNP como el tabaco o enfermedades previas.

Además, necesitaremos varias exploraciones complementarias para estadiar la enfermedad y proceder al diagnóstico definitivo. Las principales son: analítica con hemograma completo, funciones hepáticas y renales, fosfatasa alcalina, albúmina, calcio y electrolitos. Algunos resultados analíticos como anemia, anormalidades de función hepática o hipercalcemia

pueden ser indicativos de dispersión de la enfermedad. Además, se necesitará una imagen por radiografía de tórax que es una técnica no invasiva, sencilla y accesible. Esta imagen permitirá en la mayoría de casos evaluar el tamaño y la localización del tumor, entre otras características. La realización de tomografías con emisión de positrones (PET) es útil para decidir si proceder con una biopsia u observación en aquellos pacientes en los que no está claro el tratamiento a seguir(77). Después de la biopsia, se puede confirmar el diagnóstico histológico definitivo.

Las metástasis del CPCNP más frecuentes suelen localizarse en cerebro, hueso, hígado, y pulmón. La mitad de pacientes presentan diseminación a distancia en el momento del diagnóstico, es por eso que se suele evaluar la existencia de diseminación y, para ello, las pruebas más frecuentes son la resonancia cerebral y la gammagrafía ósea(78).

### **Estadaje**

El estadaje del CPCNP sirve para estandarizar la clasificación de los pacientes con fines de determinar tratamiento y pronóstico. Para el estadaje se sigue el paradigma utilizado para la mayoría de tumores sólidos que recibe el nombre de Tumor, Nódulo y Metástasis (TNM), donde la T describe las características del tumor primario, la N la diseminación a ganglios linfáticos y la M a sitios metastáticos distantes. La combinación de la T, N y M dará como lugar el estadaje de la enfermedad.

Actualmente se utiliza la séptima edición del TNM establecida en 2007 por la IASCL(79) que podemos observar en la Tabla 2.

En primer lugar, se realiza un estadaje clínico basado en la historia clínica y en todas las pruebas de las que se disponga, ya sea solo exploración física, como estudios radiológicos o biopsias del tumor primario. El estadaje clínico recibe el nombre del propio estadaje precedido por una “c” y se realiza antes de cualquier posible tratamiento.

El estadaje patológico, se denomina con el nombre del propio estadaje precedido en este caso de una “p”. Sólo se realiza si se produce la resección quirúrgica con la finalidad de curar y es revisado histológicamente por un patólogo.

**Tabla 2.** Estadificación TNM para CPCNP. Adaptado de la OMS del 2007(79).

<b>T: Tumor</b>	
<b>TX</b>	El tumor primario no puede ser evaluado o existencia del tumor comprobada por la presencia de células malignas en esputo o lavados bronquiales, pero no visualizado por imagen o broncoscopia.
<b>T0</b>	No hay evidencia de tumor primario
<b>Tis</b>	Carcinoma <i>in situ</i>
<b>T1</b>	Tumor < 3 cm en su mayor diámetro, rodeado por pulmón o pleura visceral, sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal que el bronquio lobar (sin invasión del bronquio principal)
<b>T1a</b>	Tumor < 2 cm en su mayor diámetro
<b>T1b</b>	Tumor > 2 cm pero < 3 cm en su mayor diámetro
<b>T2</b>	Tumor > 3 cm pero < 7 cm o tumor con alguna de las siguientes características: (Tumores T2 < 5 cm se clasificarán como T2a si tienen alguna de las siguientes características: Afecta al bronquio principal, está a más de 2cm distal de la carina, invade la pleura visceral, asociado con atelectasis o pneumonitis obstructiva que se extiende a la región hilar pero no afecta a todo el pulmón)
<b>T2a</b>	Tumor > 3 cm pero < 5 cm en su mayor diámetro
<b>T2b</b>	Tumor > 5 cm pero < 7 cm en su mayor diámetro
<b>T3</b>	Tumor > 7 cm o uno que invada directamente alguna de las siguientes estructuras: Pared torácica (incluyendo tumores del sulcus superior), diafragma, nervio frénico, pleura mediastinal, pericardio parietal; o un tumor en el bronquio principal < 2 cm distal de la carina pero sin afectarla; Atelectasis asociada o pneumonitis obstructiva de todo el pulmón; o Nódulos del tumor separados en el mismo lóbulo.
<b>T4</b>	Tumor de cualquier tamaño que invada alguna de las siguientes estructuras: Mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpo vertebral, carina; O existencia de Nódulo(s) separado(s) del tumor en un lóbulo diferente ipsilateral.
<b>N: (Ganglios linfáticos)</b>	
<b>NX</b>	Los ganglios linfáticos regionales no pueden evaluarse.
<b>N0</b>	No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales
<b>N1</b>	Hay metástasis en los ganglios linfáticos peribronquiales y/o hilares ipsilaterales y ganglios intrapulmonares, incluyendo la afectación por extensión directa.
<b>N2</b>	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) mediastinales ipsilateral y/o subcarinales
<b>N3</b>	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) mediastinales contralaterales, hilares contralaterales, escalénicas contralaterales o homolaterales, o supraclaviculares
<b>M: Metastasis</b>	
<b>MX</b>	Metástasis a distancia no pueden ser evaluadas
<b>M0</b>	No hay metástasis a distancia
<b>M1</b>	Metástasis a distancia presentes
<b>M1a</b>	Nódulo(s) separados del tumor en un lóbulo conralateral; Tumor con nódulos pleurales o derrame pleural/pericardial maligno
<b>M1b</b>	Existen metástasis a distancia

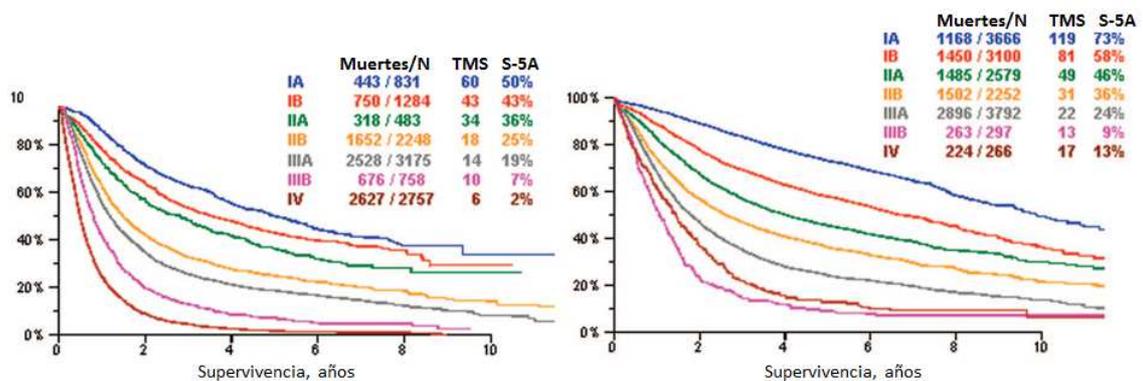
El estadiaje TNM, permite agrupar diferentes estadiajes resultantes que recibirán el mismo tratamiento y que tienen supervivencias similares. Se clasifican en los siguientes estadiajes: Carcinoma oculto (Tx), Estadio 0 (TIS), y en los estadiajes IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB y IV. La clasificación de cada tipo en su estadiaje según TNM se puede apreciar en la Tabla 3. Así se determina, por ejemplo, que los pacientes con estadiaje IA, IB, IIA y IIB, son susceptibles de tratamiento quirúrgico, y algunos pacientes IIIa pueden ser tratados quirúrgicamente después de quimioterapia neoadyuvante.

**Tabla 3.** En esta tabla podemos observar cómo queda la clasificación de los estadios según el estadiaje TNM. Modificado del estadiaje TNM para CPCNP del 2007(79).

T/M	Subgrupo	N0	N1	N2	N3
<b>T1</b>	T1a	IA	IIA	IIIA	IIIB
	T1b	IA	IIA	IIIA	IIIB
<b>T2</b>	T2a	IB	IIA	IIIA	IIIB
	T2b	IIA	IIIB	IIIA	IIIB
<b>T3</b>		IIIB	IIIA	IIIA	IIIB
<b>T4</b>		IIIA	IIIA	IIIB	IIIB
<b>M1</b>	M1a o M1b	IV	IV	IV	IV

### Pronóstico

El CPCNP tiene una baja supervivencia, de ahí que las ratios de incidencia y mortalidad sean similares. La supervivencia a 5 años depende del estadiaje de la enfermedad (Figura 9). En estadios primarios se considera potencialmente curable mediante resección quirúrgica, pero muchos pacientes recaen a largo plazo. Los pacientes con estadio I, II y IIIA tienen una supervivencia del 50-43%, 36-25% y del 19% respectivamente(79) . La influencia del subtipo histológico en el pronóstico de los pacientes no es del todo clara, pero sí que parece que a medida que los tumores son más indiferenciados la supervivencia es menor(80).



**Figura 9.** Pronóstico en pacientes de CPCNP según el estadiaje de la enfermedad. A la izquierda vemos según estadiaje clínico, y a la derecha según estadiaje patológico. TMS= tiempo medio de supervivencia; S-5A: Supervivencia a 5 años. Modificado de(79).

Otros factores importantes en pronóstico son la edad y sexo. La edad avanzada y el sexo masculino representan factores de mal pronóstico(81)(82).

Muchas de las proteínas resultantes de las alteraciones genéticas que hemos visto que se desarrollan en el CPCNP tienen papel pronóstico en los pacientes, gracias a eso, algunos

biomarcadores se han desarrollado para la clínica y se actualizan hoy en día, pero solo sirven para pequeños grupos de pacientes, como por ejemplo el estatus mutacional de *EGFR*.

La baja supervivencia y la alta cantidad de recurrencias después de la cirugía completa, apuntan a la necesidad de encontrar nuevos biomarcadores pronósticos necesarios para medir objetivamente y evaluar los procesos patológicos o la respuesta farmacológica para una estrategia terapéutica específica(83). El estudio de los miRNAs y de los exosomas, es en el ámbito del descubrimiento de biomarcadores -tanto para diagnóstico, pronóstico y resistencia a tratamiento-, un campo en continua investigación, tal y como veremos en los apartados 1.2 y 1.3.

## **Tratamiento**

Los tratamientos para el CPCNP incluyen la cirugía, la quimioterapia, terapias dirigidas, inmunoterapia, la radioterapia o una combinación de éstos. Como hemos comentado, el estadiaje TNM se utiliza para planificar el tratamiento idóneo en cada caso.

El tratamiento quirúrgico es el más idóneo, ya que es el que resulta en una mayor supervivencia, aunque solo puede realizarse en pacientes con estadios no avanzados. Las principales intervenciones quirúrgicas realizadas en pacientes con CP son la lobectomía, la pneumonectomía, y las resecciones extendidas. De éstas, la lobectomía es la técnica óptima y se puede realizar por toracotomía o toracoscopia asistida por video(84)(85).

En cuanto a la radioterapia, que hasta los años 90 se basaba en dos dimensiones para tratar el CP localizado, ha evolucionado de forma que a día de hoy, se dispone de máquinas de tres dimensiones (3DCRT) que permiten definir mucho mejor la masa tumoral, y producir una dosis más acotada en la zona tumoral(86). Además, contamos con otras técnicas como la radioterapia de intensidad modulada(87). Aun así, la radioterapia tiene asociadas diferentes tipos de toxicidad que pueden resultar en un riesgo para los pacientes(88).

La quimioterapia utilizada hoy en día en primera línea suele aplicar un agente antitumoral que es el cisplatino o el carboplatino, en combinación con algún otro antitumoral como el etopósido, vinorelbina, paclitaxel o docetaxel(89). No se han encontrado variaciones significativas en la combinación de éstas, para proponer un estándar en el tratamiento quimioterapéutico, pero sí que se ha observado que la combinación Premetrexed/Cisplatino confiere más supervivencia que Gemcitabina/Cisplatino en los pacientes con subtipo histológico no escamoso. La *European Society for Medical Oncology (ESMO)*, recomienda un total de cuatro ciclos, con una continuación del régimen de quimioterapia en pacientes que no

progresan(89). El número de ciclos de la quimioterapia suele ser de tres a 6 ciclos, pero en recientes estudios se ha observado que el resultado es similar, teniendo mayor toxicidad a mayor número de ciclos(90)(91). Actualmente, nos movemos hacia un nuevo paradigma del tratamiento del CP al conocer cada vez más mutaciones que hacen posible una medicina y terapia personalizadas.

En los pacientes con estadio I, la resección quirúrgica, en concreto la lobectomía(92), suele ser el único tratamiento realizado, basándose en las observaciones de bajas recurrencias después de los años de cirugía. Solo en algunos pacientes IB está indicada la utilización de quimioterapia. En los pacientes con estadio II sin complicaciones, el tratamiento de referencia es la resección quirúrgica seguida de quimioterapia adyuvante.

En los pacientes con estadio III, en los años 90 se observó que la combinación de RT con la quimioterapia ofrecían unos mejores resultados de supervivencia(93). La quimioterapia adyuvante ha resultado el tratamiento estándar en los pacientes con estadios que van de IB a IIIA. Los pacientes con estadiaje IIIa, pueden ser subsidiarios de un tratamiento con quimioterapia neoadyuvante seguida de resección quirúrgica(94). En los pacientes con T3 mayor o igual a 7cm, el uso de terapia neoadyuvante no se ha visto asociada a una mejora en la supervivencia(95) .

El tratamiento de segunda línea con Docetaxel, Pemetrexed o con Erlotinib está indicado en los casos que progresan después de cuatro ciclos de quimioterapia basada en platino(96)(97)(98). En el caso de Pemetrexed, se podría continuar el tratamiento de mantenimiento en los pacientes con subtipo no escamoso y EGFR no mutado y que no recibieron tratamiento con Pemetrexed en primera línea. Erlotinib es un inhibidor de la tirosin-kinasa del EGFR, que se administra de forma oral y tiene menos efectos adversos. Erlotinib también se utiliza como tratamiento de tercera línea en pacientes sin mutación inicial de *EGFR*(99). En el caso de los pacientes con translocación de *ALK*, el tratamiento en primera línea es la terapia basada en platino en preferencia combinada con Pemetrexed. En segunda línea el tratamiento estándar para estos pacientes es Crizotinib, inhibidor de la función de ALK. Otros casos a tener en cuenta son los pacientes con otras alteraciones genéticas como Her2, donde el tratamiento con Trastuzumab o Dacomitinib puede ser beneficioso(100).

Además existen los tratamientos de inmunoterapia, que envuelven el uso de anticuerpos monoclonales como el Cetuximab o Trastuzumab, el uso de vacunas terapéuticas, o los tratamientos con inhibidores de los *checkpoints* del sistema inmune entre otros(101). Respecto los inhibidores de los puntos de control del sistema inmune, el tratamiento con

Nivolumab y Pembrolizumab están aprobados como tratamiento de segunda línea en pacientes con estadios avanzados, y recientemente se ha visto que Nivolumab no es útil como tratamiento de primera línea. Estos dos tratamientos tienen como diana el Programed Death Receptor 1 (PD-1) que se encuentra en linfocitos T, células NK, y evitan así la inhibición por parte de las células tumorales que expresan el ligando de PD-1 del sistema inmune(102).

Los pacientes con estadio avanzado suelen ser sintomáticos y necesitan una intervención rápida. Normalmente ésta se trata de quimioterapia. En aquellos pacientes que en el momento del diagnóstico tienen un PS menor a 2, se suele determinar el subtipo histológico para decidir el tipo de tratamiento. En los escamosos, normalmente el tratamiento es a base de platino inicialmente y se sigue hasta el mantenimiento. En los no escamosos, su tratamiento será a base de platino hasta su mantenimiento, y se suele realizar un test genético para buscar alteraciones presentes y poder tratar además con bevacizumab si son elegibles. También en primera línea se puede utilizar Cetuximab mas terapia basada en platino(103). Los pacientes con PS igual a 2 suelen responder menos a la quimioterapia, y los pacientes con PS igual a 3 no suelen ser candidatos para esta.

Otras situaciones clínicas para su tratamiento son los casos de oligometástasis, es decir, presencia de menos de 3 sitios metastásicos. En concreto, en metástasis cerebrales, se puede realizar una esterotaxia y radiocirugía o solo cirugía para evitar los efectos que el tumor puede ocasionar en el cerebro. Otros casos especiales serían los cánceres de pulmón multifocales que también tienen unas directivas de tratamiento especiales.

## 1.2 microRNAs

### 1.2.1 Descubrimiento y características

El descubrimiento de los ácidos ribonucleicos (ARN) no codificantes supuso un cambio en la genética del siglo XX. Se pensaba que las regiones intergénicas no tenían mucha importancia y recibían el nombre de ADN basura. A partir de la secuenciación del genoma humano(104)(105), se descubrió el sorprendente hecho de que solo 20.000 genes, que conformaban menos del 2% de todo el genoma, codificaban proteínas. Mediante el proyecto ENCODE (*Encyclopaedia of DNA Elements*)(106)(107), se descubrió que hay una gran parte del genoma, hasta el 80%, que no codifica por proteínas pero que podría tener alguna función bioquímica(108). Estas regiones que codificaran ARNs no codificantes se han estudiado en las últimas décadas por su importancia en muchos procesos biológicos y patológicos(109)(110).

Uno de estos tipos de ARNs no codificantes son los microRNAs (miRNAs). Son un tipo de ARNs no codificantes de proteína pequeños, que tienen una longitud final del miRNA maduro formada por entre 19-23 nucleótidos. El primer miRNA descrito, Lin-4, se encontró en el nematodo *Caenorhabditis elegans* en el año 1.993(111) por Victor Ambros, Rosalind Lee y Rhonda Feinbaum, y hasta la fecha más de 1.500 miRNAs se han descrito(112). Los miRNAs se encuentran muy conservados entre especies, como es el ejemplo el miRNA let-7, el segundo miRNA descrito también en *C. elegans* en el año 2.000(113), que está prácticamente conservado en todos los animales y se descubrió también su homólogo en la especie humana(114)(115).

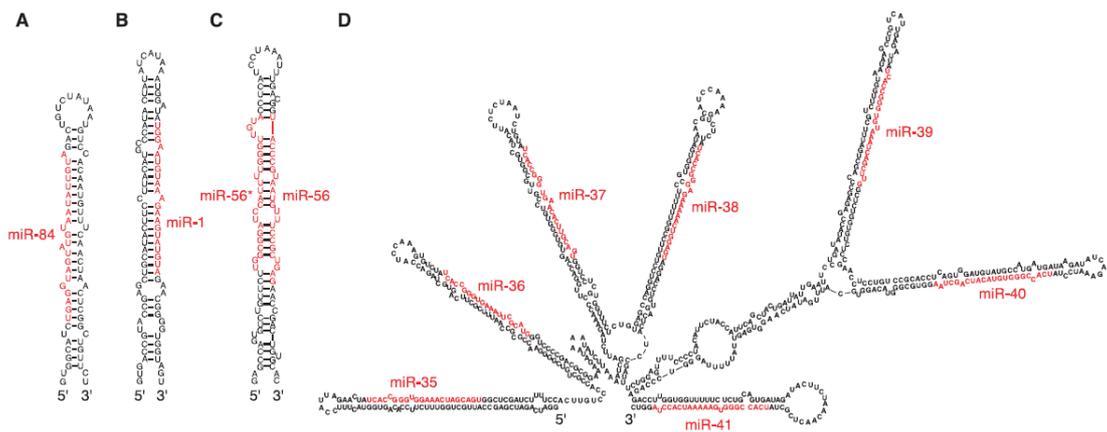
Muchos miRNAs parecen ser cruciales para el correcto desarrollo embrionario(116)(117). Los cambios en la expresión de miRNAs pueden estar provocados por cambios epigenéticos, control transcripcional, regulación de la maduración o la edición post transcripcional del miRNA(118). Algunos miRNAs están localizados en regiones intergénicas y regiones cromosómicas frágiles por lo que suelen estar desregulados en procesos tumorales(119)(120). Los miRNAs participan en diferentes procesos biológicos como la proliferación celular, diferenciación o apoptosis (121). Un mismo miRNA puede tener diferentes dianas y un ARNm puede estar regulado por varios miRNAs haciendo esta red de reguladores bastante compleja (122). Mediante predicciones computacionales se ha llegado a la conclusión de que la regulación por miRNAs se puede estar dando en más de la mitad de genes codificantes para proteínas(123).

Las secuencias de los miRNAs se pueden consultar en diferentes bases de datos, pero la base de datos oficial es miRbase ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)). Otras bases de datos que podemos encontrar son microRNA ([www.microrna.org](http://www.microrna.org)), coGemir ([www.cogemir.tigem.it](http://www.cogemir.tigem.it)), deepBase ([www.deepbase.sysu.edu.cn](http://www.deepbase.sysu.edu.cn)), miRGEN ([www.diana.pcbi.upenn.edu/mirgen.html](http://www.diana.pcbi.upenn.edu/mirgen.html)), miRNA map ([www.mirnamap.mbc.nctu.edu](http://www.mirnamap.mbc.nctu.edu)) entre otras.

Los miRNAs humanos reciben como nomenclatura “hsa” como prefijo del nombre del miRNA, por ejemplo: hsa-miR-21. El número del miRNA, en el caso del ejemplo el 21, suele ser secuencial respecto a su descubrimiento. Si además la secuencia de un miRNA maduro proviene de diferentes transcritos, se pueden designar como hsa-miR-X-1 o hsa-miR-X-2. Además, hay veces que un mismo precursor puede dar lugar a dos secuencias, en esos casos, la secuencia que se cree que será la principal recibe el nombre de hsa-miR-X, y la otra hsa-miR-X\*. En los casos en que no se sabe cuál es la secuencia principal, se denominan como hsa-miR-X-5p y hsa-miR-X-3p según del brazo del que provengan. Los casos de Lin-14 y Let-7 son excepciones de la numeración establecida por razones históricas al ser los dos primeros miRNA descubiertos(124).

### **1.2.2 Biogénesis y mecanismos de acción**

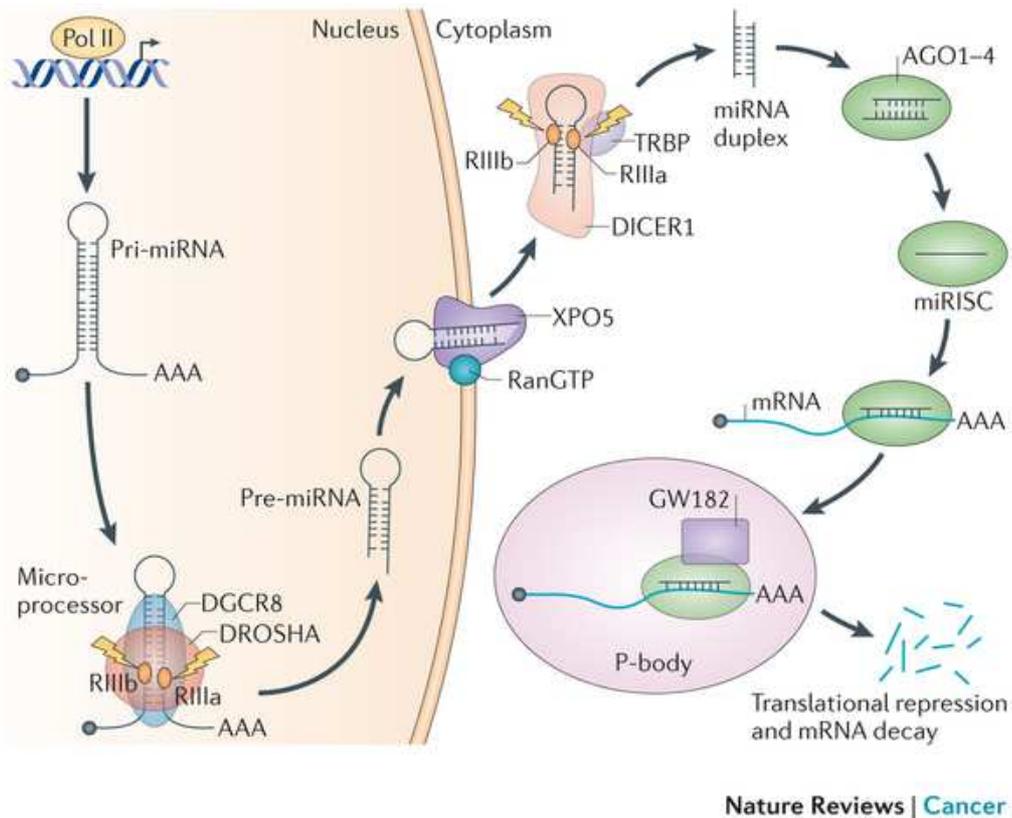
Los genes de miRNAs se pueden encontrar tanto en regiones intergénicas como en regiones intrónicas o exónicas de genes codificantes para proteína. Muchos de éstos, en mamíferos se encuentran muy próximos, formando *clusters* y transcritos desde la misma unidad de transcripción(125). Estos genes codificantes para miRNAs son más largos que el miRNA maduro, esto es debido a que los miRNAs son transcritos en la mayoría de casos por la ARN polimerasa II, y en algunos casos por la ARN polimerasa III(126), en forma de un miRNA primario (pri-miRNA) que necesitará ser procesado para dar lugar al miRNA maduro(127). Este proceso es complejo, pero hoy en día está bastante bien estudiado y lo podemos ver representado en la Figura 11. El pri-miRNA tiene una estructura del tipo *stem-loop*, que puede contener la secuencia de uno o varios miRNAs.



**Figura 10.** Estructura en stem loop de los pri-miRNAs. Podemos apreciar en rojo marcadas las secuencias de los futuros miRNAs maduros tanto en la cadena 5' (A) o 3' (B) , y observar que en algunos casos las dos cadenas codifican para un miRNA(C). Tambien se observa en la imagen un cluster de miRNAs (D) que se transcriben en forma de un único pri-miRNA(128).

La maduración del miRNA empieza en el núcleo cuando el pri-miRNA se une a la proteína DiGeorge syndrome Critical Region Gene 8 (DGCR8) y después, la endonucleasa RNasa III Drosha corta el pri-miRNA en el precursor de miRNA (pre-miRNA) que todavía mantiene la forma de *stem-loop* de unos 70 nucleótidos (nt). Este es el momento en que si los miRNAs están transcritos por un mismo pri-miRNA se separan.

Las proteínas RanGTP y Exportina5 (XPO5) transportarán el pre-miRNA al citoplasma para que continúe allí su maduración(129). En el citoplasma el pre-miRNA es procesado inicialmente por la proteína Dicer que se asociará con la proteína *Tar RNA-Binding Protein* (TRBP), obteniéndose así el miRNA dúplex de unos 22 nucleótidos(130). Después, el miRNA dúplex se separa en sus dos cadenas, y el miRNA maduro se unirá a el complejo *RNA-induced silencing complex* (RISC), formado por las proteínas Argonata (Ago2), y GW182(131)(132) formando el complejo miRISC.



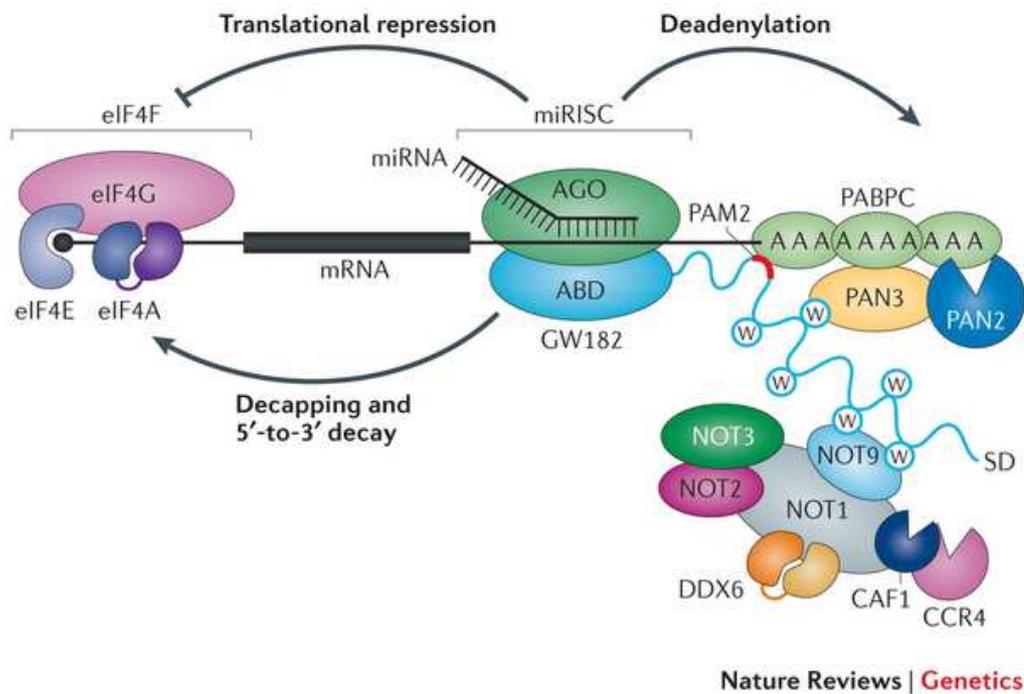
**Figura 11.** Biogénesis de los miRNAs, desde su síntesis en el núcleo, el inicio de su maduración en el mismo, y finalización en el citoplasma(133).

Es entonces cuando se podrá dar lugar a uno de los mecanismos principales de actuación de los miRNAs, uniéndose a la 3' *Untranslated Region* (UTR) de su ARN mensajero (ARNm) diana(134)(135). Esta unión a través del complejo RISC dependerá de la complementariedad de la región 5' del miRNA con la región 3'UTR del RNAm diana(134). El grado de complementariedad viene dado principalmente por una secuencia que recibe el nombre de "seed sequence" en el miRNA que tiene de 2 a 8 nucleótidos, que cuando es totalmente complementaria con el ARNm diana producirá la degradación del mismo, a través de la escisión mediada por la proteína AGO, y cuando la complementariedad no es completa se produce un bloqueo temporal de la traducción a proteína del mismo mediante el reclutaje de otras proteínas(136)(134).

La degradación del ARNm mediada por el complejo miRISC también puede venir dada por su deadenilación, es decir, la eliminación de los residuos poli-Adenina que se encuentran en su extremo 3'. Seguidamente a la deadenilación se produce el *decapping* del ARNm, que consiste en la eliminación de un residuo de Guanina que le confiere estabilidad. Después el ARNm puede ser degradado por la exoribonucleasa 1 (XRN1). La inhibición de la traducción a proteína

del ARNm está producida por la interferencia en la actividad o el ensamblaje del *eukaryotic Initiation Factor 4F* (eIF4F)(137). Estos mecanismos de acción los podemos ver representados en la Figura 12.

También se han descrito otras funciones independientes de RISC para los miRNAs. Una de ellas es la *Decoy Activity*, en que un miRNA se puede unir directamente a una proteína bloqueando así la unión de otras proteínas a ésta (138). Además, se ha descrito la función de activación de forma específica de la traducción del ARNm cuando éstos se unen a su región 5'UTR (139)(140). Por último, también pueden inducir la expresión de genes cuando se unen al ADN, en concreto a través de las zonas promotoras(141)(142).



**Figura 12.** En la imagen se muestran algunas de las funciones a las que pueden dar lugar los miRNAs en el silenciamiento génico. Una de ellas es la deadenilación del ARNm diana, y como podemos observar en la imagen es llevada a cabo por la reclutación de las proteínas *Cytoplasmic Poly(a)-Binding protein* (PABPC), junto con PAN2-PAN3 Y CCR4-NOT. También se muestra la función de de capping y decay que suelen seguir a la deadenilación y la función de represión translacional mediante la inhibición de eIF4f(136).

### 1.2.3 Identificación de dianas de microRNAs

Como hemos comentado, un miRNA puede regular muchos ARNm dianas, que a su vez pueden estar regulados por muchos miRNAs. Para identificar estas dianas, tanto los ARNm a los que se unirá un miRNA, como los miRNAs que se unirán en un ARNm, a partir del año 2.000 se crearon diferentes herramientas informáticas que permitían predecir estas interacciones. Estas herramientas hoy en día han evolucionado mucho, con bases de datos mucho más ampliadas debido a toda la investigación que se ha realizado, en continua expansión, y entre otras características tienen en cuenta el grado de complementariedad de las secuencias “*seed sequence*” del miRNA y las regiones *canónicas* en las 3’UTR de los ARNm. Esta predicción de apareamientos entre las secuencias se basa en el apareamiento conservado de Watson-Crick(143). De todas formas, las herramientas de las que disponemos hoy en día no tienen únicamente este apareamiento en cuenta, sino que algunas también predicen uniones no canónicas, cuentan con análisis de conservación evolucionaria o modelos biofísicos. Algunos ejemplos de estas herramientas computacionales las podemos ver en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Herramientas para la predicción de interacciones de los miRNAs.

Nombre	Dirección electrónica
TargetScan	<a href="http://www.targetscan.org">www.targetscan.org</a>
Diana-Tool	<a href="http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=tarbase/index">http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=tarbase/index</a>
miRò	<a href="http://ferrolab.dmi.unict.it/miro">http://ferrolab.dmi.unict.it/miro</a>
microMUMMIE	<a href="https://ohlerlab.mdc-berlin.de/software/microMUMMIE_99/">https://ohlerlab.mdc-berlin.de/software/microMUMMIE_99/</a>
EIMMo	<a href="https://omictools.com/elmmo-tool">https://omictools.com/elmmo-tool</a>
PARma	<a href="https://www.bio.ifi.lmu.de/PARma">https://www.bio.ifi.lmu.de/PARma</a>
MIRZA	<a href="https://omictools.com/mirza-genome-wide-tool">https://omictools.com/mirza-genome-wide-tool</a>

Después las dianas predecidas necesitan de su validación funcional, y para esto se han desarrollado diferentes técnicas. Un ejemplo de éstas, son el ensayo Renilla-Luciferasa, o la medición de proteínas después de inhibir o re-expresar los niveles de miRNAs(144).

#### 1.2.4 microRNAs en cáncer

Después de que el primer estudio describiera la delección del loci de miR-15 y miR-16 en el 68% de los pacientes con leucemia linfática crónica (CLL), una gran cantidad de publicaciones posteriores empezaron a estudiar la expresión alterada de miRNAs en diferentes tipos de cáncer(145)(146). En la actualidad, muchos estudios han permitido correlacionan expresión de miRNAs con diferentes tipos de tumores, pudiendo en algunos casos realizar firmas de miRNAs para identificar tipos concretos de cáncer(135).

Los mecanismos por los que se desregula la expresión de los miRNAs en cáncer pueden ser amplificaciones, delecciones, metilación de la zona promotora del ADN, entre otras(147)(122)(148). También se han identificado *Single Nucleotide Polimorfism* (SNP) en los genes de miRNAs (miR-SNPs) que modifican la afinidad del miRNA hacia su ARN diana(149). De manera interesante, en cáncer se ha visto que algunas proteínas encargadas de la maduración de los miRNAs pueden estar infraexpresadas, como el caso de DROSHA y DICER(133). Debido a la gran variedad de ARNm que pueden regular los miRNAs no es de extrañar que su desregulación esté relacionada con procesos tumorales.

Dependiendo de los ARNm diana que tengan los miRNAs pueden actuar como supresores tumorales o como oncogenes (Onco-miRs). Aquellos miRNAs que suelen estar infraexpresados en cáncer, que actúan inhibiendo oncogenes, son los miRNAs supresores tumorales; mientras que los miRNAs que suelen estar sobreexpresados suelen estar inhibiendo genes supresores tumorales y son los Onco-miRs(150)(151). De todas formas cabe destacar que el rol que tendrá el miRNA depende del contexto en el que nos encontremos. Como ejemplo, miR-29 se ha visto asociado a funciones supresoras tumorales en CP(152), y en contraste se ha relacionado con funciones oncogénicas en cáncer de mama(153) .

Actualmente se conocen muchos miRNAs con efectos tumorigenicos y supresores tumorales, tanto *in vitro* como en experimentos *in vivo*. Estos experimentos estudian la habilidad que pueden tener los miRNAs para resistencia a tratamiento(154), supervivencia celular(155), mecanismos de regulación energética(156), favorecer o frenar metástasis(157), entre otros. También muchos estudios han podido evaluar la expresión de los miRNAs en muestras tumorales de pacientes para correlacionarlos con diferentes características clínico-patológicas y supervivencia, y en la actualidad la investigación de miRNAs circulantes en sangre los está postulando como biomarcadores estrella para el diagnóstico y pronóstico en pacientes.

### 1.2.5 microRNAs en cáncer de pulmón

Existen muchos estudios en relación a la expresión de diferentes miRNAs en CP. Hoy en día se conoce el mecanismo de acción concreto de muchos y el papel que tienen en el desarrollo del CP. La importancia de los miRNAs como biomarcadores de CP radica en la utilidad que se ha encontrado tanto para diagnóstico como para predecir el pronóstico de determinados grupos.

La mayoría de estudios hasta hace unos años se centraban en la expresión o patrones de expresión de diferentes miRNAs en los tejidos de los pacientes, ya fuera bien en el tejido tumoral solamente o comparándolo con su tejido normal. Los primeros miRNAs en encontrarse desregulados en CP fueron los miRNAs Let-7(158). Let-7 forma un clúster que se encuentra en una localización que frecuentemente esta delecionada en CP(147) y algunos estudios han comprobado su papel pronóstico en los pacientes(159).

En el estudio de Yahinara *et al*, se identificaron 40 miRNAs que podían distinguir el tejido tumoral del tejido normal de pacientes de CP de estadiaje I y clasificación histológica adenocarcinoma(160). De estos 40 miRNAs, la expresión baja del Let-7a-2 y la alta expresión de miR-155 correlacionaba con un mal pronóstico de los pacientes. El hecho de que la familia de Let-7 regule diferentes oncogenes, hace que este clúster se comporte como supresor tumoral.

miR-155 fue el primer miRNA postulado como oncogén(161). Otro miRNA con papel oncogénico en CP es el miR-21, que se encuentra sobreexpresado, y tiene como dianas entre otros ARNm, el transcrito de MSH2, una proteína necesaria para el proceso de reparación del ADN(162). Además, inhibe reguladores negativos de la vía de K-RAS, produciendo así un efecto de supresión de la muerte celular y al inhibir entre otros PTEN produce proliferación celular.

Los miRNAs miR-16 y miR-34a forman parte de la via de p53. En el caso de miR-34a se ha visto que en los pacientes con mutaciones en p53 tienen mayor probabilidad de recaída que los pacientes con niveles altos del miRNA(163).

Otra familia de miRNAs bastante estudiada en el CP es la familia del miR-200, donde la expresión de todos sus miembros menos del miR-141, se encuentra sobreexpresada en los pacientes de CPCNP y los niveles altos de miR-200c y miR-141 se relacionan con una peor supervivencia(164). Esta familia de miRNAs ha sido estudiada por su importante papel en el proceso de transición de epitelio a mesénquima (TEM)(165) y en las células de CP, la transfección con miR-200c reduce la migración celular(164).

Algunas investigaciones han estudiado la presencia de los miRNAs en diferentes fluidos en CPCNP. Muchos estudios se están centrando hoy en día en la detección de los miRNAs en fluidos biológicos al ser muestras menos invasivas que en la muestra quirúrgica. Uno de los fluidos que se han estudiado para la detección de miRNAs en el CP es el lavado broncoalveolar (BAL)(166), aunque la mayoría se están centrando en las muestras de plasma o suero.

Además del posible uso de los miRNA como biomarcadores para diagnóstico y pronóstico, otra utilidad que pueden tener es la de identificar la resistencia a tratamientos. Por ejemplo, en un estudio de miRNAs en plasma de pacientes de CPCNP con mutación activadora de EGFR, se detectó que los altos niveles de miR-21 y miR-218 eran posibles marcadores de resistencia al tratamiento recibido(167). En el estudio llevado a cabo por Silva *et al*, con 78 pacientes de CPCNP, se detectó que la expresión de determinados miRNAs en vesículas en el plasma de los pacientes tenía correlación con la supervivencia de los mismos, haciendo patente la utilidad de las vesículas extracelulares en los pacientes de CPCNP(168).

### 1.3 Vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares (EVs), del inglés *Extracellular vesicles*, son todas aquellas partículas que las células liberan al medio extracelular bien de forma activa o pasiva o por la formación de vesículas durante el proceso de muerte celular. Así pues, existen diferentes tipos de Evs, y se pueden clasificar de diferentes formas, siendo las más utilizadas aquellas que categorizan según su origen subcelular y tamaño (169) (Figura 13).

Por un lado, encontramos los **cuerpos apoptóticos**, que se consideran vesículas extracelulares resultantes de aquellas células que producen una muerte programada y que se destruyen formando vesículas de entre 1.000-5.000 nanómetros (nm)(170).

Por otro lado, encontramos las **microvesículas**, dentro de las cuales se encuentran todas aquellas vesículas que se liberan directamente de la membrana plasmática y que tienen un diámetro entre 100-1.000nm. Un ejemplo de estas microvesículas o también llamadas micropartículas con papel oncogénico o tumoral serían los oncosomas(171).

Por otra parte, encontramos los **exosomas**, que son vesículas de unos 30-100nm que se forman dentro de los cuerpos multivesiculares (MVB). Los exosomas son liberados al espacio extracelular cuando los MVB se fusionan con la membrana plasmática y serán más explicados en los siguientes apartados de este capítulo(169).

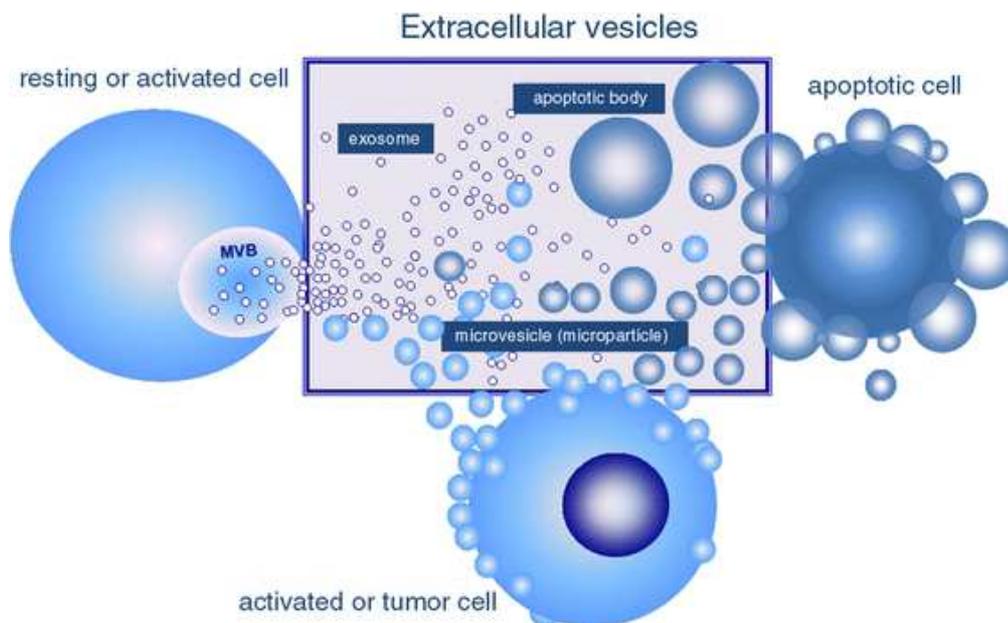


Figura 13. Diferentes tipos de vesículas extracelulares(172).

### 1.3.1 Exosomas

Los exosomas son vesículas extracelulares de unos 30-100nm de forma esférica y formadas por una bicapa lipídica(173). Uno de los primeros estudios que los caracterizó tuvo lugar en el año 1.987, cuando Johnstone *et al*, vieron que estas vesículas de origen endosomal eran liberadas durante la maduración de los reticulocitos conteniendo el receptor de la transferrina para así deshacerse de él(174).

Diez años más tarde, se describió que linfocitos B(175) y células dendríticas (DC)(176), también podían liberar vesículas similares de origen endosomal. En el caso del estudio con linfocitos B, liderado por Raposo *et al*, se demostró que los exosomas liberados por los linfocitos B cultivados *in vitro* contenían el complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II), y que podían efectuar una respuesta mediada por el mismo en linfocitos T(175). Poco después, el estudio conducido por el grupo de Zitvogel, demostró que los exosomas liberados por las DC, células presentadoras de antígeno, también podían contener MHC I y II, y moléculas co-estimuladoras para linfocitos T. Además, estos exosomas eran capaces al ser inoculados en forma de vacuna libre de células en ratones de eliminar o detener el crecimiento de tumores en ratones a través de una respuesta de Linfocitos T(176).

Desde entonces el interés en el estudio de los exosomas ha ido en aumento, y su liberación se ha descrito en muchos tipos celulares diferentes, células epiteliales(177)(178), células neuronales(179), keratinocitos(180), fibroblastos(181), y células tumorales entre otras(182). La primera importancia biológica descrita sobre los exosomas fue el descubrimiento de los exosomas como forma de comunicación intercelular, mediante la transferencia de ARNm y miRNAs(183)(184).

Además de aislar exosomas de células en cultivo, ha sido posible aislar exosomas de varios fluidos biológicos humanos(185), entre ellos semen(186), leche materna(187)(188), lavado broncoalveolar(189)(190), plasma(191) y orina(192). Estos avances en el estudio de los exosomas han hecho que se aprecien como posibles biomarcadores para diferentes enfermedades, y tanto sus mecanismos de regulación, como la identificación de moléculas en la superficie o en el interior de exosomas circulantes son un tema en auge en el estudio del cáncer(193).

### 1.3.2 Biogénesis de los exosomas.

La biogénesis de los exosomas empieza con la formación de vesículas intraluminales (ILV) en los endosomas primarios. La formación de las ILVs se produce mediante la deformación de la membrana del endosoma hacia el interior(194), y en este proceso algunas proteínas y lípidos son transferidos a las ILVs, y citosol queda encerrado en el interior(169). Durante el proceso de formación de las ILVs el endosoma se convierte en un cuerpo multivesicular (MVB). Este proceso esta esquematizado en la Figura 14.

Para la formación de las ILVs el mecanismo más conocido es el dependiente de ESCRT (del inglés *endosomal sorting complex required for transport*)(195), aunque también hay indicios de mecanismos independientes de ESCRT. ESCRT está formado por cuatro complejos que están compuestos por 30 proteínas, más proteínas asociadas, como por ejemplo Alix. El complejo ESCRT-0 reconoce proteínas en la membrana del endosoma, el complejo ESCRT-I y II se relacionan con la deformación de la membrana hacia el interior del endosoma para formar la ILV y la transferencia de diferentes compuestos, y el complejo ESCRT-III parece que está envuelto en la escisión de las ILVs. Varias proteínas se han visto implicadas en este mecanismo, y muchas de ellas son utilizadas como marcadores exosomales, como es el caso de Tsg101, Alix o CD63(196). Algunos marcadores exosomales utilizados se pueden ver en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Marcadores más utilizados para la detección de exosomas. Modificado de (197).

Nombre	Peso molecular (KDa)	Enriquecido
ALIX	96	Media
ANNEXIN II	38	Bajo
Calnexin	96	Marcador negativo
CD9	25	Alto
CD63	50-60	Alto
CD81	50-60	Alto
MHCII	30	Alto
Tsg101	44	Medio

El mecanismo independiente de ESCRT, se descubrió al bloquear los cuatro complejos ESCRT y observar que la formación de MVB no se detenía(198). Sobre este mecanismo independiente de ESCRT se han visto dos proteínas implicadas en el procesamiento de lípidos, concretamente la nSMase(199) (neutral sphingomielinase) que produce la hidrólisis de la esfingomielina a ceramida y la fosfolipasa D2, que produce ácido fosfatídico a partir de fosfatidilcolina.

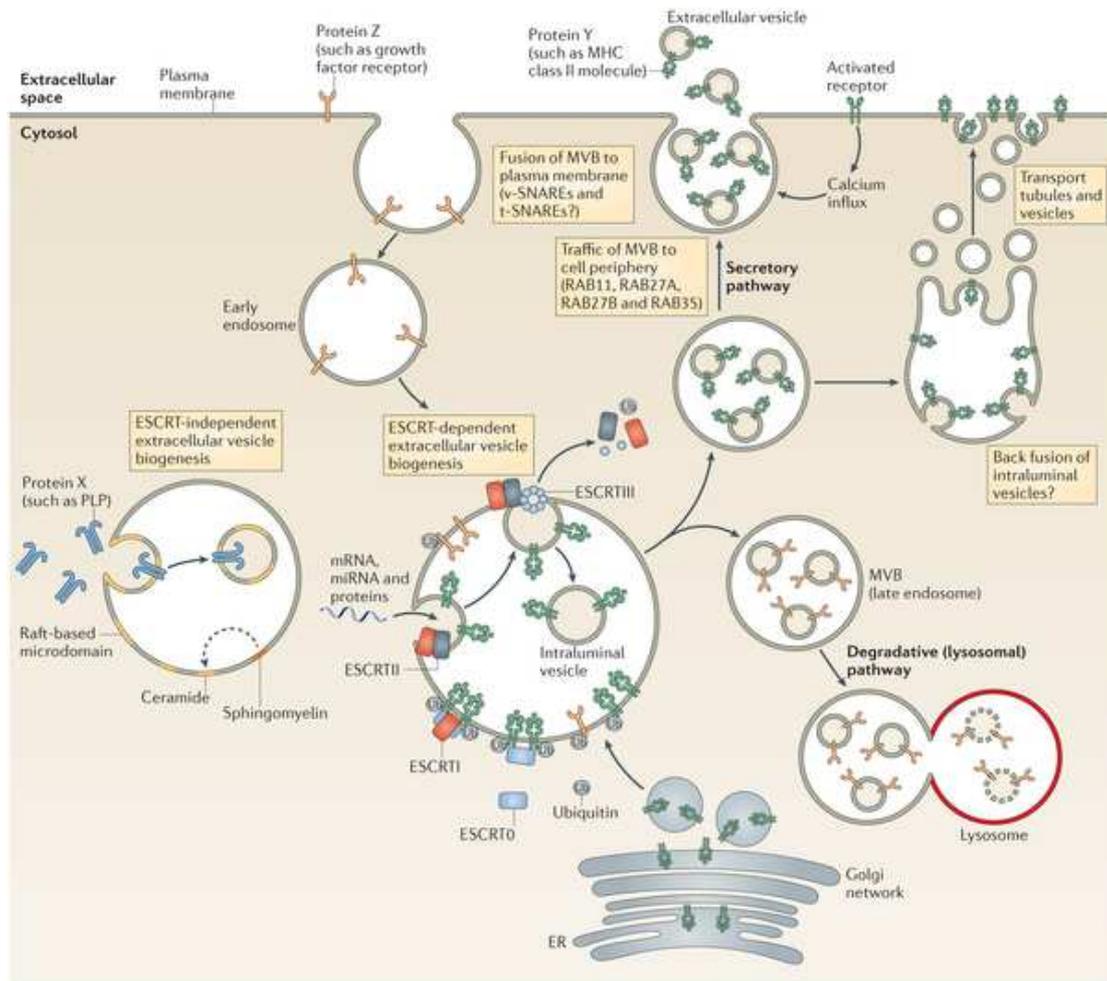
### **1.3.3 Secreción de los exosomas.**

Para la liberación de las ILVs al espacio extracelular los MVB deben fusionarse con la membrana plasmática, convirtiendo así los ILVs en exosomas(200)(194). En este proceso las proteínas que más se han estudiado son la familia de proteínas Rab. Las proteínas Rab están relacionadas con el transporte vesicular entre diferentes compartimentos.

La primera proteína de esta familia que se observó que estaba relacionada con la liberación de exosomas fue la proteína Rab11(201). Más tarde, también otras proteínas de la familia Rab se han visto implicadas en la liberación de exosomas, entre ellas Rab27a(202), Rab27b(203) y Rab35(204).

Los mecanismos en los que pueden estar implicadas las proteínas Rab son entre otros los procesos de formación de las ILVs, interacción del MVB con el citoesqueleto y también la fusión con la membrana plasmática. En concreto, al inhibir Rab27a se observó que los MVB tenían un tamaño mayor y que se acumulaban en la membrana plasmática, en cambio, la inhibición de Rab27b, provocaba que los MVB se distribuyeran en la zona perinuclear(203). Además, al silenciar dos efectores de Rab27, Slp4 y Slac2b, el resultado era el mismo que al inhibir Rab27. En células de CPCNP, EPI64, una proteína activadora Rab-GTPasa para Rab27a se ha relacionado con la liberación de exosomas(205). La sobreexpresión de EPI64 produce una mayor liberación de exosomas en las células A549 actuando a través de Rab27a pero no de Rab27b.

Otras proteínas que se han relacionado con el mecanismo de liberación de exosomas son las proteínas SNARE (Figura 14), entre ellas Ykt6, que se explicara en el apartado 1.4.



Nature Reviews | Immunology

**Figura 14.** Esquema sobre la biogénesis y liberación de exosomas. Se pueden apreciar las dos vías de formación de exosomas: dependiente e independiente de ESCRT. También están descritas proteínas que intervienen en el transporte de los cuerpos multivesiculares como las proteínas RAB y la postulación de la función de las proteínas SNARE en este proceso(206).

### 1.3.4 Contenido de los exosomas

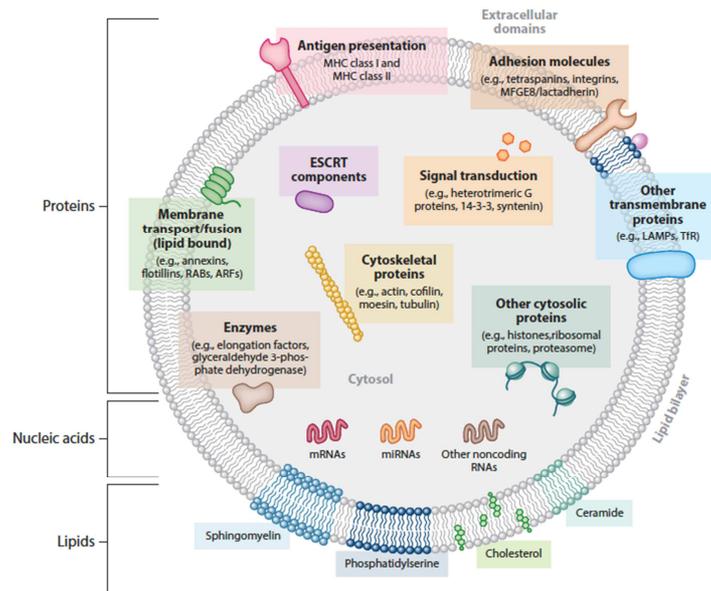
Los exosomas están formados por una bicapa lipídica. En comparación con la membrana plasmática, la bicapa lipídica de los exosomas se ha descrito que está enriquecida en lípidos como la esfingomiélinea(207), fosfatidilserina y colesterol(208). También otros lípidos que se han encontrado enriquecidos en exosomas son la ceramida(199) y el gangliósido GM3.

El contenido protéico de los exosomas es variado y específico. Aunque la población de exosomas no es homogénea y su contenido protéico puede variar, se han descrito como marcadores exosomales proteínas que encuentran presentes en la gran mayoría de

poblaciones de exosomas. Los exosomas contienen proteínas específicas de membrana, pero también de origen citosólico y de la vía endocítica. Algunas de las proteínas en las que suelen estar enriquecidos son las tetraspaninas como CD9, CD81 y CD63, que hoy en día se suelen utilizar como marcadores exosomales(209), así como otras proteínas como Tsg101, Alix, Flotilin y Hsp70(196). Además, en la superficie de los exosomas podemos encontrar algunos receptores o ligandos(196). En su interior podemos encontrar diferentes tipos de moléculas, así como proteínas, lípidos y, diferentes ácidos nucleicos. Diferentes tipos de proteínas se han encontrado en el interior, como algunas de los complejos ESCRT, enzimas y proteínas transductoras de señal entre otras. Normalmente los exosomas no contienen proteínas de retículo endoplasmático, mitocondrias o del núcleo celular(210).

Otro tipo de moléculas que podemos encontrar en los exosomas son ácidos nucleicos. Los que están más estudiados por su elevada concentración respecto a otros tipos de ácidos nucleicos son los miRNAs. Además, fueron los primeros ácidos nucleicos en ser descritos presentes en los exosomas junto con ARNm(184) y, pueden ejercer su función biológica en las células receptoras de los exosomas. Un hecho interesante, es que también se pueden encontrar pre-miRNAs en los exosomas con la maquinaria de maduración de los mismos y ésta puede tener lugar en los propios exosomas(211). Además, a parte de los miRNAs también se han descrito otros ARNs no codificantes en los exosomas, como los *long-non-coding* RNAs (lncRNAs)(212)(213). Recientemente se ha detectado la presencia en exosomas de moléculas de ADN(214) de doble hebra en los que se podían detectar mutaciones de *KRAS* y de *TP53*. En la Figura 15 podemos ver el dibujo de un exosoma con todas las posibles moléculas que puede contener.

Cabe destacar la creación de diferentes bases de datos que contienen los resultados que se van obteniendo de los estudios realizados con exosomas y que ayudan a su difusión. Con este fin podemos encontrar la **Exosome Content Database**(215), consultable a través de su página web [www.exocarta.org](http://www.exocarta.org), donde se detalla el contenido de diferentes poblaciones de exosomas caracterizados; **Vesiclepedia** con su herramienta FunRich para analizar los datos, o la base de datos de RNAs circulantes **Mirandola**. En la Tabla 6 podemos observar las 24 proteínas más identificadas en exosomas según Exocarta.



**Figura 15.** Esquema de un exosoma. Podemos apreciar la membrana lipídica y el posible contenido exosomal(169).

**Tabla 6.** Lista de las 24 proteínas más comúnmente identificadas en los análisis proteómicos de exosomas según la base de datos proteómicos Exocarta.

Proteínas identificadas en exosomas	
HSPA8	SDCBP
CD9	PDCD6IP
GAPDH	ALB
ACTB	YWHAZ
CD63	EEF2
CD81	ACTG1
ANXA2	LDHA
ENO1	HSP90AB1
HSP90AA1	ALDOA
EEF1A1	MSN
PKM2	ANXA5
YWHAE	PGK1

### 1.3.5 Implicaciones de los exosomas en cáncer.

A finales del s. XIX Paget postuló su teoría del “*seed-and-soil*” (216), es decir, la preparación del nicho premetastático por parte del tumor. Desde entonces, muchas investigaciones se han centrado en los mecanismos de metástasis de los tumores y de las interacciones del tumor con el microambiente. En los últimos años, el estudio de las vesículas extracelulares ha abierto todo un campo de investigación en este aspecto, debido entre otras cosas, a que son de gran interés en el ámbito del descubrimiento de biomarcadores por reducir la complejidad de los fluidos totales(217).

Se ha observado que los exosomas pueden ejercer varias funciones importantes en el desarrollo del cáncer(218), jugando un papel importante en la comunicación intercelular(219), en el crecimiento celular e inicio de la migración celular y metástasis(220).

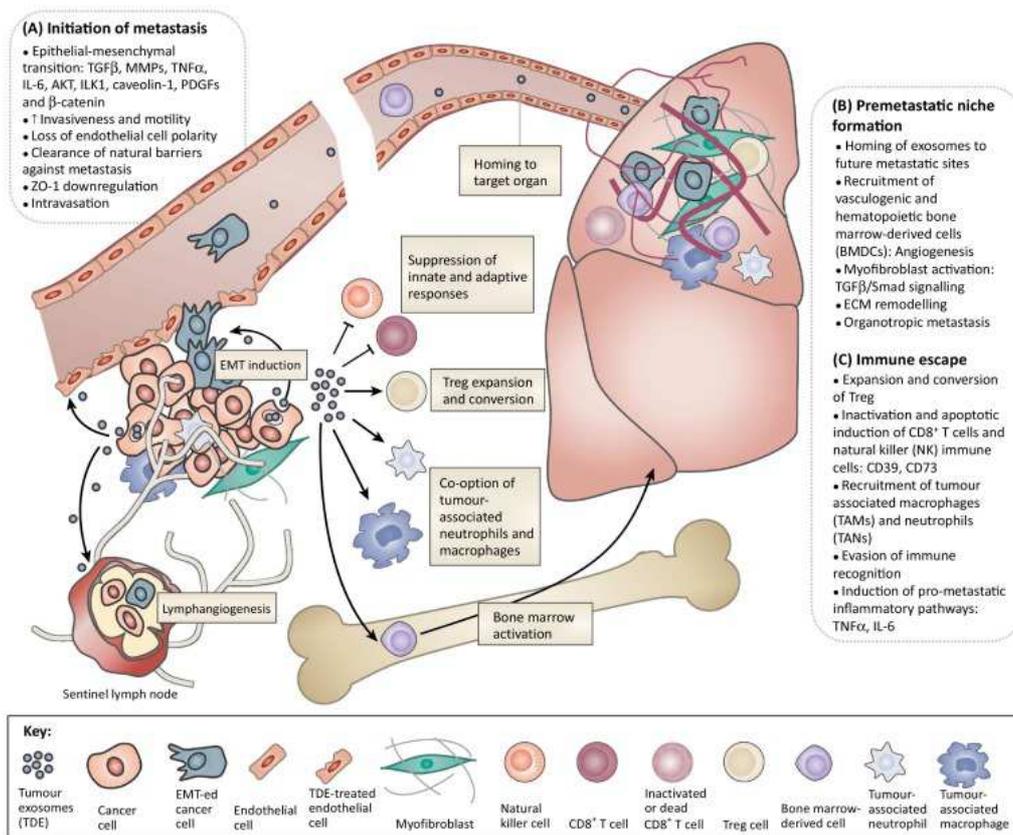
El estudio de los exosomas liberados por las células tumorales ha llevado a la observación de que estos pueden provocar cambios en células normales hacia un fenotipo tumoral(221). Además, la inyección de exosomas aislados de suero de pacientes de cáncer de mama, pero no los de controles, pueden provocar la formación de tumores en ratones(211). Los exosomas derivados de células tumorales también pueden favorecer el crecimiento de otras células tumorales mediante la transferencia de factores contenidos en los mismos(218). También se ha descrito la capacidad de los exosomas para inducir angiogénesis, necesaria para el crecimiento tumoral(222).

Otra función importante que se ha observado de los exosomas derivados de células tumorales es la capacidad de conferir propiedades de resistencia a tratamiento *in vitro*. Por ejemplo en el estudio de Lv et al, exosomas aislados de células de cáncer de mama tratadas con docetaxel eran capaces de conferir resistencia a la apoptosis mediada por este fármaco en otras células en cultivo(223). De una manera similar, la línea celular de cáncer de pulmón A549 se expuso a cisplatino, se aislaron los exosomas del medio de cultivo y se añadieron a otras células en cultivo más tratamiento con cisplatino. Se observó también que el tratamiento con los exosomas de las células expuestas al tratamiento confería una resistencia a las células receptoras(224).

Otra de las características más importantes que se ha descrito que pueden llevar a cabo los exosomas tumorales junto a la regulación del microambiente tumoral, es la regulación del nicho premetastático(225) y en el proceso de metástasis en general(220)(226) (Figura 16). Este

proceso envuelve desde la regulación de la transición epitelio-mesénquima(227), hasta el organotropismo de los exosomas para la formación del nicho premetastático(228)(229). Con este fin, el novedoso artículo de Hoshino *et al*, demostró que las integrinas presentes en los exosomas se relacionaban con un tipo de metastasis u otro ( $\alpha6\beta4$  y  $\alpha6\beta1$  se asociaban a metastásis pulmonar, y  $\alpha v\beta5$  a metástasis hepática)(230).

La regulación del sistema inmune por parte del tumor resulta muy importante en el desarrollo del cáncer(231). Se ha observado que mediante exosomas, las células tumorales pueden generar un microambiente inmunosuprimido gracias a eliminar la actuación de las células efectoras del sistema inmune y produciendo la expansión de células inmunosupresoras(232) (233). Por ejemplo, los exosomas de células tumorales de próstata contienen el ligando de NKG2D en su superficie que producen una disminución de NKG2D en la superficie de linfocitos “natural killers” (NK), eliminando así su función citotóxica(234).



**Figura 16.** Algunas de las funciones que se han descrito sobre los exosomas en la iniciación de la metástasis, formación del nicho premetastático e inmuno modulación(220).

Además, el estudio de los exosomas derivados de pacientes de cáncer se hace visible en el reciente estudio de Melo et al, donde se demuestra que los exosomas que contienen GPC1 en su superficie provienen de las células tumorales y que éstos solo se encuentran en los pacientes de cáncer de próstata(235). Este hecho abre las puertas a la investigación en otros tipos de cáncer para encontrar otros biomarcadores exosomales que nos permitan desarrollar herramientas para el diagnóstico y predecir el pronóstico de los pacientes.

### **1.3.6 Exosomas en cáncer de pulmón**

El estudio de los exosomas en CPCNP en la actualidad está siendo muy importante y está en continuo avance. Un estudio en la línea celular A549 demostró que las células expuestas a cisplatino podían liberar exosomas que transferían resistencia al mismo a otras células a través de cambios en la expresión de miRNAs en su contenido(224) . Otro estudio parecido, demostró que los exosomas derivados de células tratadas con gefitinib podían alterar la sensibilidad de otras células al cisplatino(236). En líneas celulares de cáncer de pulmón también se ha estudiado el papel que puede tener p53 en la liberación de exosomas. Al someter las células a estrés, un producto regulado por p53, TSAP, se observó que tenía un papel importante al aumentar la liberación de exosomas(237).

Diferentes estudios se han centrado en la detección de exosomas en pacientes para diagnosticar la enfermedad. En este sentido, se han estudiado los exosomas y su contenido en varios fluidos biológicos humanos. Se observó que en los exosomas el contenido de EGFR en plasma (238) y el contenido de LRG1 en orina eran posibles biomarcadores de CP(239).

Un primer estudio realizado por Jakobsen *et al*, que utilizó un microarray de proteínas, identificó un panel de 30 marcadores en la superficie de exosomas aislados de plasma útiles para diferenciar pacientes de controles. Este estudio, cabe decir que fue realizado en 109 pacientes de estados avanzados de la enfermedad y en controles, pero un factor muy importante es que solo se necesitaron 10µl de plasma de cada paciente(240). Otro estudio reciente, analiza también a través de un *microarray* de proteína para exosomas, diferencias en exosomas aislados de plasma de pacientes y de controles, identificando así CD151, CD171, y tetraspanina 8, como marcadores de exosomas tumorales en los pacientes(241).

En el estudio liderado por Rabinowits *et al*, se observó que la concentración total de exosomas en plasma era más elevada en pacientes que en controles(242). También varios estudios han

investigado la expresión diferencial en exosomas de miRNAs entre pacientes de CPCNP y controles sanos. En el estudio de Rabinowits se detectó la expresión diferencial de 12 miRNAs (miR-17-3p, miR-21, miR-106a, miR-146, miR-155, miR-191, miR-192, miR-203, miR-205, miR-210, miR-212, miR-214) en los exosomas aislados de plasma entre 27 pacientes de adenocarcinoma respecto a controles sanos(242).

Otro estudio comparó la cantidad de exosomas y de miRNAs, en este caso en 30 pacientes de CPCNP, en plasma y en lavado broncoalveolar de estos comparándolo con controles sanos. En este caso se observó que en plasma y en el lavado broncoalveolar tanto en los pacientes como en los controles había más cantidad de exosomas en plasma. Además, al comparar la cantidad entre pacientes y controles, se observó mayor cantidad de exosomas en las muestras de pacientes. Analizaron también el contenido de miRNAs, y se encontró también un mayor contenido de miRNAs en plasma que en el lavado broncoalveolar de los pacientes. Cuando cuantificaron los miRNAs, los más elevados en plasma de pacientes fueron los siguientes: miR-16, miR-20a, miR-195, Let-7a, miR-223, miR-21, Let-7b, miR-106b, miR-92a y Let-7g(190).

Interesantemente, el estudio realizado por Aushev *et al*, compara los niveles de miRNAs libres y en exosomas de pacientes de carcinoma escamoso antes y después de la cirugía, y detecta que hay varios miRNAs que disminuyen en plasma al remover el tumor miR-205, miR-19a, miR-19b, miR-30b, y miR-20a, y que sorprendentemente estos se encuentran altos en exosomas tumorales(243). En conjunto, las características de los principales estudios de exosomas en pacientes de CPCNP las podemos ver en la Tabla 7.

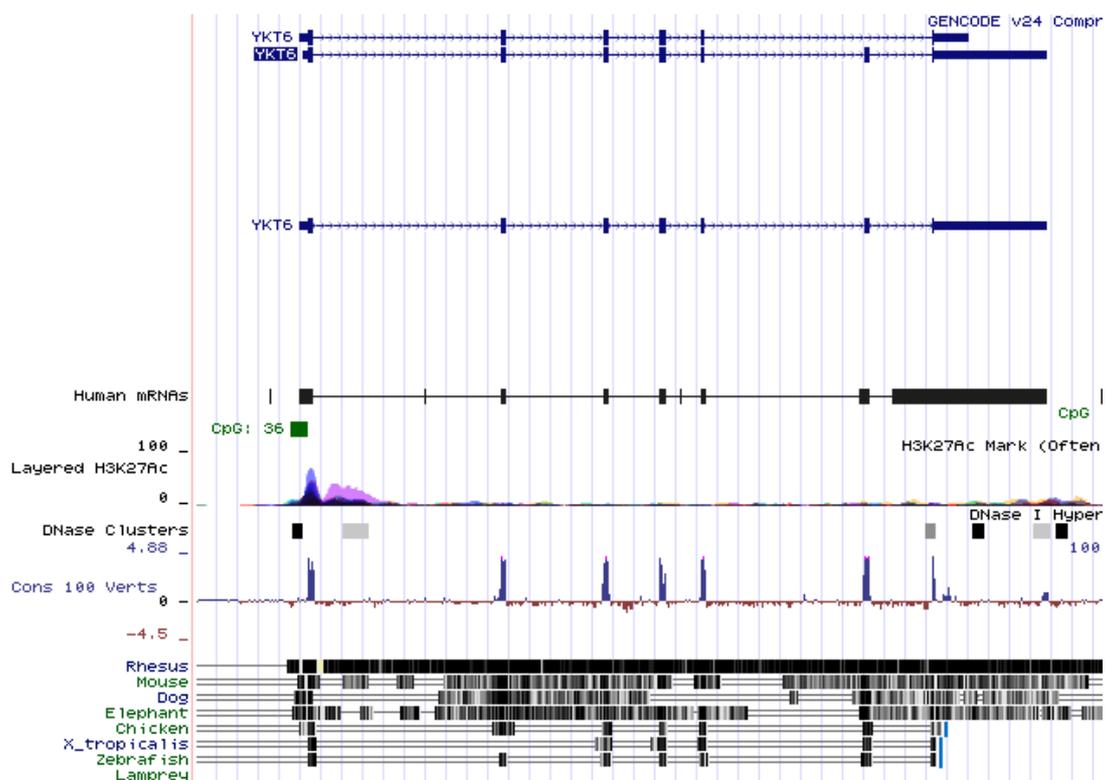
**Tabla 7.** Principales estudios que envuelven exosomas en pacientes de CPCNP.

<b>marcador</b>	<b>Tipo de fluido</b>	<b>Tipo de pacientes</b>	<b>referencia</b>
<b>EGFR</b>	Plasma	CPCNP	(238)
<b>LRG1</b>	Orina	CPCNP y controles	(239)
<b>miR-17-3p, miR-21, miR-106a, miR-146, miR-155, miR-191, miR-192, miR-203, miR-205, miR-210, miR-212, miR-214</b>	Plasma	Adenocarcinoma y controles	(242)
<b>miR-16, miR-20a, miR-195, Let-7a, miR-223, miR-21, Let-7b, miR-106b, miR92a, Let-7g</b>	Plasma y Lavado broncoalveolar	CPCNP y controles	(190)
<b>30 marcadores</b>	Plasma	CPCNP avanzados y controles	(240)
<b>CD151, CD171, y tetraspanina 8</b>	Plasma	CPCNP y controles	(241)
<b>miR-30b, miR-30c, miR-103, miR-122, miR-195, miR-203, miR-221, miR-222</b>	Plasma	CPCNP y controles	(244)
<b>miR-205, miR-19a, miR-19b, miR-30b, miR-20a</b>	Plasma pre y post operación.	Carcinoma Escamoso.	(243)

## 1.4 YKT6

### 1.4.1 Principales características de YKT6

YKT6 es un gen que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 7 (7p13)(Figura 17). Codifica por una proteína *N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor* (SNARE) de 26KDa. Las proteínas SNARE tienen un dominio *coiled-coil* (hélice superenrollada), y se pueden clasificar en R-SNARE o Q-SNARE dependiendo si en el centro de este dominio encontramos una arginina o una glutamina respectivamente. Ykt6 es en concreto una R-SNARE que se encuentra muy conservada desde levaduras hasta humanos(245), y un estudio demuestra que Ykt6 de levadura se puede substituir por la forma de mamífero funcionalmente(246). En mamíferos se ha descrito como una proteína necesaria para la vía de secreción constitutiva de proteínas (247).



**Figura 17.** Diagrama de la región del cromosoma 7 donde se encuentra el gen YKT6 (UCSC Genome Browser on Human Dec. 2013)

Como muchas SNARE, se trata de una proteína que está asociada al tránsito vesicular y en procesos de fusión de membranas, incluyendo funciones en tránsito de retículo endoplasmático (RE) a Golgi (interaccionando con syntaxin 5, GS28, y Bet1)(248)(246), intragolgi(249) y transporte de endosoma a Golgi (mediante GS15, syntaxin5 y GS28(250)).

Ykt6 se ha visto sobreexpresada en células neuronales de rata(251) y en células neuroendocrinas PC12 formando agregados resistentes a proteasas(252), donde se ha visto que su sobreexpresión puede alterar el ciclo celular, abriendo así la posibilidad que además tenga una función más allá de la típica SNARE.

Una función muy interesante es el posible rol que se encontró entre ykt6 y la liberación de exosomas que contienen Wnt. Las proteínas Wnt son importantes en el desarrollo tumoral (253). En el estudio llevado a cabo por Gross *et al*, Identificaron Ykt6 mediante un *screening* de ARNs de interferencia como un posible regulador de la liberación de exosomas en *Drosophila*. En este estudio observaron que tanto en *Drosophila melanogaster* como en células de mamífero, la inhibición de YKT6 producía un bloqueo en la secreción de marcadores exosomales y de Wnt que quedaban en los compartimentos endosomales. En primer lugar, mediante un experimento in vivo con *Drosophila*, inhibieron Ykt6 mediante un ARN de interferencia, y observaron que Wg (Wingless, Wnt de *Drosophila*) se acumulaba en el interior de las células productoras, que la cantidad de Wg liberada disminuía y que en este estudio funcional la disminución de la liberación de Wg producía una reducción de la expresión del gen *senseless* en las células próximas, alterando así la formación del disco control. Al estudiar la regulación exosomal observaron que el marcador exosomal CD63 así como Wg quedaban dentro de las células también en *Drosophila*. Para estudiar si el rol de Ykt6 podía estar conservado, inhibieron el componente Tsg101 parte de ESCRT 0, comprobando que este es necesario para la liberación del marcador exosomal CD81, y Wnt3A. Al utilizar un ARN de interferencia contra Ykt6 observaron un efecto similar, indicando que Ykt6 disminuye la liberación de exosomas. También midieron la actividad de Wnt en el sobrenadante de las células, detectando al inhibir tanto Tsg101 como Ykt6, una disminución de la actividad de Wnt del 50% comparada con el control. Además, en las células HEK293 la inhibición de YKT6 producía que el marcador exosomal CD63 fuera transferido de los MVB a los lisosomas para su degradación(254).

### 1.4.2 Mecanismos de regulación de YKT6

Las proteínas SNARE suelen contener tres regiones: dominio regulatorio N-terminal(255), un dominio central conservado o “*core domain*” que contiene el motivo SNARE que tiene unos 60-70 aminoácidos y, un dominio C-terminal transmembrana que funciona como anclaje(256)(Figura 18).

En la forma citosólica, el extremo N-terminal tiene un papel regulatorio en la función de la proteína ya que interacciona con el SNARE *core domain* impidiendo así su función. En el caso de YKT6 se ha descrito que su N-terminal tiene una secuencia característica de pliegues que recibe el nombre de dominio “*longin*”(257). Al contrario que la mayoría de proteínas SNARE, Ykt6 no contiene un dominio transmembrana para su anclaje, sino que presenta en su C-terminal un motivo consenso de prenylación “caja CAAX (Cysteine-Aliphatic-Aliphatic-X)” (258), que se puede palmitoilar en su primera cisteína, y farnesilizar en la segunda, y que permite su inserción en la membrana(259). Ykt6 se puede encontrar tanto en citoplasma como unido a membrana, y en las dos formas se encuentra farnesilada(259) pero para su unión a la membrana las dos modificaciones lipídicas son necesarias y solo la forma unida a membrana es activa(251).

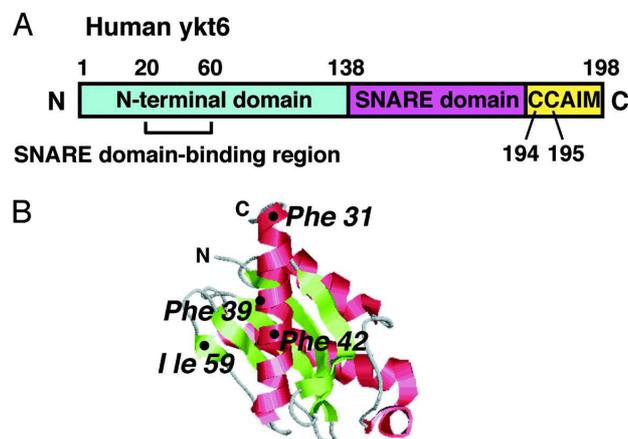


Figura 18. Estructura de Ykt6(259).

Además el gen YKT6 esta precedido por una isla CpG, bien conocidas por el posible efecto en la regulación epigenética que podría estar afectando la expresión del gen.

### 1.4.3 Estudio de YKT6 en cáncer

La expresión de algunas proteínas SNARE se ha relacionado con el proceso de inflamación y del desarrollo de cáncer(260). En el caso de YKT6, pocos estudios han realizado investigación entre su expresión y procesos tumorales. En 2.004 un estudio publicado por Kluger *et al*, analizó mediante un microarray de cDNA diferencias en la expresión de genes en líneas celulares de cáncer de mama de ratón que diferían en su capacidad invasiva, y así detectó que *ykt6* aumentaba en fenotipos más agresivos y que podían dar lugar a metástasis(261). Otro estudio, este caso en 2.007, liderado por Ooe *et al*, analizó 186 muestras tumorales de pacientes de cáncer de mama. Investigaron la relación entre el estado mutacional de p53 con la respuesta a tratamiento y analizaron un total de 2.412 genes para identificar cuales estaban diferencialmente expresados según el estado mutacional de p53 y respuesta al tratamiento de docetaxel. *YKT6* fue uno de los genes que al analizar los resultados se vio que estaba sobreexpresado en los tumores que tenían p53 mutados y que se asociaban con una baja respuesta al docetaxel. Además su estudio *in vitro* demostró en las células de cáncer de mama MCF-7, que la inhibición de *YKT6* mediante un *small interfering RNA* (siRNA) producía un aumento de la apoptosis cuando estas se trataban con docetaxel(262).

## **2. Hipótesis y objetivos**



## 2.1 Hipótesis

En los últimos años el estudio de los exosomas, unas vesículas extracelulares de 30-100nm liberadas por una gran variedad de tipos celulares, se ha incrementado al observarse las funciones que éstos pueden tener en la progresión del cáncer. Una de las funciones que los exosomas pueden llevar a cabo es, entre otras, la modulación del microambiente tumoral, favoreciendo un fenotipo más agresivo a través de la transferencia de miRNAs a las células vecinas, y al poder realizar inmunosupresión. Otra de las funciones importantes que se han descrito en los exosomas liberados por las células tumorales, es la preparación del nicho premetastático, detectándose en su superficie diferentes marcadores, integrinas, que favorecen la metástasis de forma organotrópica.

El hecho de que los exosomas se hayan encontrado en gran variedad de fluidos, entre ellos plasma y orina, hace que sean unos buenos candidatos a biomarcadores en cáncer, habiéndose detectado proteínas en la superficie de éstos que permiten diagnosticar pacientes con cáncer de pulmón.

Aunque en la actualidad gran parte de los mecanismos de biogénesis y liberación de exosomas han sido caracterizados, aún sigue siendo poco conocida la función de algunas proteínas en estos procesos, y se postula a que la función podría depender del tipo celular. En este sentido, Ykt6, es una proteína que se ha observado ser necesaria para la liberación de exosomas que contienen Wnt en su superficie tanto en modelos de *Drosophila melanogaster*, como en modelo *in vitro* con la línea celular de mamífero HEK293. Además, la expresión del gen *YKT6* aunque no se ha estudiado hasta la fecha en cáncer de pulmón, se ha postulado como un posible biomarcador pronóstico en otro tipo de tumores.

Consideramos que estudiar la posible función de *YKT6*, en la liberación de exosomas en CP, así como sus miRNAs reguladores, podría ser de gran utilidad para mejorar el conocimiento del desarrollo tumoral y nos permitiría identificar nuevos biomarcadores para el CP.

## **2.2 Objetivos**

Basándonos en esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

### **2.2.1 Objetivo general**

Estudiar la función de YKT6 en la liberación de exosomas y su regulación por miRNAs en líneas celulares de cáncer de pulmón de célula no pequeña, y estudiar la expresión de YKT6 en pacientes de cáncer de pulmón de célula no pequeña.

### **2.2.2 Objetivos específicos**

- 1) Estudiar la función de YKT6 en la liberación de exosomas en líneas celulares de CP.
- 2) Identificar y validar YKT6 como diana de miRNAs en líneas celulares de CP.
- 3) Estudiar la afectación en la liberación de exosomas mediante la regulación de YKT6 mediante miRNAs.
- 4) Analizar los niveles de expresión de YKT6 en tejido tumoral y normal de pacientes de CP.
- 5) Analizar los niveles de expresión de los miRNAs validados como reguladores de YKT6 en tejido tumoral y normal de pacientes de CP.
- 6) Determinar si los niveles de expresión de YKT6 se asocian a recaída y supervivencia en los pacientes de CP.

### **3. Material y métodos**



### **3.1 Estudio *in vitro* con línea celular A549**

Para la presente tesis todos los experimentos *in vitro* se han realizado con la línea celular A549 (DMSZ ACC 107). Se trata de una línea celular de cáncer de pulmón establecida en 1972 mediante cultivo de explantes de tumor de pulmón de un paciente hombre caucásico de 58 años. Sobre esta línea celular inicialmente se describió que pueden inducir tumores en ratones atímicos, y son capaces de sintetizar lecitina a través de la ruta de la citicolina. Es positiva para citoqueratina 7, 8, 17, 18, 19 y vimentina, y negativa para desmina, endotelina, EpCAM y neurofilamento.

Las células A549 se han cultivado en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino, penicilina y estreptomycin, y se ha mantenido en incubadora en las siguientes condiciones: 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.

### **3.2 Inhibición de YKT6 con DsiRNA para evaluar la liberación de exosomas**

La inhibición de YKT6 se llevó a cabo en la línea celular A549 utilizando un *Dicer-substrate short interfering RNA* (DsiRNA) contra YKT6 (Ref. HSC.RNAI.N006555.12.8, IDT) y como control un DsiRNA control (Ref. DS NC1, IDT).

Las células se cultivaron 24 horas antes de la transfección plantando inicialmente 1 millón de células en placas Petri de 10cm de diámetro (Cell culture dish Ref. 664160, Cellstar). El conteo de las células se realizó mediante la máquina Countess (Invitrogen). Se utilizó una concentración final de DsiRNA 50nM en un volumen final de 6ml de medio de cultivo fueron transfectados utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) con los siguientes pasos:

1. Realizamos una master mix en tubos eppendorf con Opti-MEM (750µl) (Opti-MEM®, Reduced Serum Medium, Gibco) y 6µl del DsiRNA correspondiente, y en otra Opti-Mem (744µl) en el que diluimos la Lipofectamina 2000 (15µl), dejándolo incubar cinco minutos a temperatura ambiente.
2. A cada tubo eppendorf de Opti-Mem con el DsiRNA le añadimos la misma cantidad del otro eppendorf de Opti-Mem con Lipofectamina 2000, haciendo un volumen de 1,5mL. Golpeamos suavemente para homogeneizar y dejamos incubar 25 minutos más.
3. Durante este tiempo cambiamos el medio de las células por 4,5mL de medio sin antibiótico.
4. Pasada la incubación, añadimos el producto en la placa oportuna gota a gota.

5. Pasadas 4-6 horas cambiamos el medio por medio con antibiótico para evitar contaminaciones.
6. La eficiencia de la transfección e inhibición de YKT6 se midió a las 48h mediante Western Blot. Además, realizamos cambio de medio y cultivamos 48h más para aislar exosomas.

### **3.3 Extracción de proteína y cuantificación de proteína total**

Para la extracción de proteína total de las células utilizamos Buffer de lisis de células (CLB) (Ref.9803, Cell Signaling) suplementado con 10% PMSF 0,1M. El protocolo realizado es el siguiente:

1. Realizamos un lavado de la placa donde encontramos las células con 2mL de PBS y lo retiramos.
2. Añadimos 2mL de tripsina para arrancar las células y dejamos incubar 4 minutos a 37°C.
3. Añadimos 4mL de medio con FBS para neutralizar la tripsina y resuspender las células arrancadas de la base de la placa de cultivo.
4. Transferimos las células arrancadas a un tubo falcon de 15 ml y centrifugamos a 2.500g durante 5 minutos.
5. Retiramos todo el sobrenadante y resuspendemos el pellet de células en 1mL de PBS, lo transferimos a un eppendorf y volvemos a centrifugar durante 5 minutos a 2.500g.
6. Retiramos todo el sobrenadante y depositamos el eppendorf con el pellet de células en hielo.
7. Añadimos 100-200µl de CLB a las células y resuspendemos pipeteando vigorosamente.
8. Dejamos en hielo de 30 minutos a 1 hora, realizando vortex cada 10 minutos.
9. Centrifugamos a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, y conservamos el sobrenadante donde se encuentran las proteínas extraídas.

Para la cuantificación de proteínas extraídas realizamos el ensayo de cuantificación colorimétrica de proteína Bradford. Para esto, realizamos una recta estándar con diferentes concentraciones conocidas de BSA (23209,Pierce) a partir de la dilución de 1mg/ml.

1. Realizamos las diluciones de proteína para cuantificar en una placa de 96 pocillos. Añadiremos 199,5µl de agua y 0,5µl de muestra, realizando duplicados de cada muestra. Además realizamos la recta patrón.

2. Añadimos tapando de la luz 50µl de reactivo Bradford (Bradford 1x Dye Reagent #5000205, Biorad) procediendo a su resuspensión con la pipeta. Este paso debe realizarse rápidamente para evitar variedad debida al usuario.
3. Incubamos tapado de la luz durante 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Realizamos la lectura de la absorbancia de los pocillos a 595nm en el espectrofotómetro VERSAmax microplate reader de Molecular Devices.
1. Extrapolamos la concentración de proteína de las muestras a partir de la recta estándar.

### **3.4 Western Blot**

Para la detección de proteínas mediante anticuerpos, los anticuerpos primarios utilizados han sido Ykt6 (H00010652-M03, Tebu-bio),  $\alpha$ -tubulina (T6074, Sigma-Aldrich) y Tsg101 (ab83, abcam). El procedimiento para el western blot (WB) es el siguiente:

1. Cargamos 20µg de proteína total o el pellet aislado de exosomas previamente desnaturalizados a 97°C durante 10 minutos en geles NuPAGE del 4-12% (NW04120BOX, Invitrogen).
  - a. Para las proteínas extraídas de células calculamos la concentración necesaria para los 20µg de proteína total y lo llevamos a un volumen final de 40µl de tampón de carga consistente en 10µl de NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X), 4µl de 10X Bolt® Sample Reducing Agent, y H<sub>2</sub>O hasta el volumen final.
  - b. Para los exosomas, resuspendimos el pellet en 40µl de tampón de carga consistente en 10µl de NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X), 4µl de 10X Bolt® Sample Reducing Agent, y 26µl de H<sub>2</sub>O.
2. Realizamos la electroforesis durante 45-90 minutos, a 80V y unos 100 mAmp con el Novex Bolt Mini gel Tank con el buffer de electroforesis MES (MES SDS Running buffer (20x), B0002, Novex).
3. La transferencia de los geles se realiza a membranas de PVDF mediante la máquina I-blot (Life technologies) con el programa 0.
4. En el caso de las membranas de exosomas, antes de realizar el bloqueo, realizamos una tinción con Ponceau (P7170, Sigma-Aldrich), durante 5 minutos, escaneamos la imagen y realizamos tres lavados con agua de 5 minutos.
5. Las membranas se bloquearon 1h en 15mL de TBS-T 0,05% con 0,75g de leche desnatada en polvo.

- a. Para la realización de TBS-T 0,05% utilizamos TBS ( Tris Buffered Saline, 10x, BP2471-1, Fisher Scientific) diluyéndolo primero 1:10, para obtener 1L de TBS 1x, y después le añadimos 500µl de Tween 20 (P7949, Sigma-Aldrich).
6. Se realizan tres lavados con TBS-T 0,05%.
7. Después se incuban las membranas en rotación a 4°C hasta el día siguiente con los anticuerpos primarios. Esto se realiza en 5mL de TBS-T 0,05% mas 1µl de anticuerpo anti-YKT6, o 10µl de anticuerpo anti-TSG101.
  - a. La incubación con el anticuerpo anti-Tubulina se realiza durante 1 hora a temperatura ambiente, en 15mL de TBS-T 0,05% más 7,5µl de anticuerpo.
8. El siguiente paso consiste en tres lavados con 10ml de TBS-T 0,05% para eliminar los restos de anticuerpo no unidos.
9. Incubamos las membranas con 3µl de anticuerpo secundario anti-ratón (A9044, Sigma-Aldrich) en 15mL de TBS-T 0,05%.
10. Se realizan tres lavados, los dos primeros con TBS-T 0,05%, y el último con TBS-T.
11. Finalmente se revela la señal con el Novex® *ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit* (WP20005, Invitrogen) y se obtiene la imagen Chemidoc System (Bio-Rad).
12. La intensidad de las bandas se cuantifica con la ayuda del programa Quantity One versión 4.2.6.

### **3.5 Estudio de la regulación de YKT6 por miRNAs**

#### ***Estudio in silico***

Para estudiar los miRNAs que regulan la 3'UTR de YKT6, se seleccionaron miRNAs teniendo en cuenta su potencial *in silico*, es decir, la probabilidad generada mediante algoritmos basados en diferentes scores para predecir la complementariedad del miRNA y su ARNm diana y la investigación bibliográfica de los miRNAs resultantes. Para este fin utilizamos las bases de datos TargetScan ([www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)) y miRó (<http://ferrolab.dmi.unict.it/miro>). Se tuvieron en cuenta aquellos miRNAs que estaban predichos por más de 4 bases de datos según miRò como putativos miRNAs reguladores de YKT6 y por TargetScan, teniendo en cuenta el apareamiento tipo 7mer-m8 y 7mer-A1 de los miRNAs conservados entre vertebrados y mamíferos.

## **Clonación de la región 3'UTR de YKT6 para la validación de target de miRNAs**

Para validar los miRNAs seleccionados utilizamos el ensayo del vector reportero Renilla-luciferasa.

Para este ensayo la 3'UTR de YKT6, que tiene una longitud de 2.1 kilo bases (kb), se clonó mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) utilizando cebadores que contienen los sitios de restricción SgfI y PmeI (forward: 5' **GCG ATC GCC** GGA AAC AAA ACT CAT GCT reverse: 5' **GTT TAA ACC** CCT GAA GCA CAA AGA AAG C). Las condiciones de la PCR son las siguientes: 50ng de ADN extraído de tejido normal de un paciente, y utilizamos el kit de Takara LA (Laboratorios Conda) por cada reacción: 8µl de dNTPs, 5 µl de Buffer, 4,7 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl de Taq, 1 µl de primer Forward(10nM) y 1 µl de primer reverse (10nM) en un volumen final de 50 µl. Las condiciones del termociclador (Flezycler, Analytikjena) fueron las siguientes:

94°C 1minuto, [94°C 30 segundos, 60°C 1 minuto, 72°C 1 minuto 50 segundos] x20ciclos, 72°C 15 minutos, y después se mantuvo a 4°C hasta su utilización.

El producto de PCR se clonó en un vector TOPO TA (Applied Biosystem) y se transformó en las bacterias competentes *Escherichia coli* TOP10F' (Life technologies). Para esto se siguieron los siguientes pasos:

1. Añadimos 1µl de producto de PCR a 1µl de vector comercial.
2. Esperamos 5 minutos a temperatura ambiente y dejamos en hielo.
3. Descongelamos el vial de las bacterias en hielo.
4. Añadimos el vector a las bacterias, homogeneizamos ligeramente dando golpecitos con el dedo, sin pipetear, e incubamos en hielo durante 30 minutos.
5. Una vez pasado este tiempo incubamos el vial a 42°C durante 30 segundos sin agitar y lo ponemos rápidamente en hielo.
6. Le añadimos 250µl de medio SOC (Ref. 15544034, Invitrogen) al vial y dejamos incubar a 37°C en rotación durante 1 hora.
7. Pasado el tiempo de incubación añadimos 50µl en placas de agar (22700-025, Invitrogen) suplementado con kanamicina 50mg/mL (11815-024, Life technologies)

Los clones positivos se seleccionaron por resistencia a kanamicina, se colocaron en tubos de 15ml con 5ml de Agar líquido (12780-052, Invitrogen) suplementado con kanamicina a 50mg/mL y se dejaron incubar a 37°C en agitación. A las cuatro horas de crecimiento de las colonias, se obtuvieron 50µl de cada tubo para la comprobación por PCR del inserto de YKT6. Estos 50µl de bacterias en cultivo se pusieron en el termociclador a 98°C durante 10 minutos

para lisar las bacterias, y seguidamente se centrifugó a 14.000rpm durante 5 minutos. Con el sobrenadante se realizó la PCR para comprobar si el inserto de YKT6 estaba presente. Además, los clones positivos para el inserto de YKT6 se enviaron a secuenciar a través de STABvida a una concentración de 20ng/μl con un volumen final de 20 μl, junto con los encebadores forward y reverse para YKT6. Para poder extraer y purificar los vectores se realiza una miniprep. Para la realización de la miniprep utilizamos el kit QIAprep Spin Miniprep Kit (27104, Qiagen). Los pasos realizados son los siguientes:

1. Centrifugamos los 5mL de medio de cultivo de las bacterias a 2.000rpm durante 10 minutos para obtener el pellet de bacterias.
2. Resuspendemos el pellet de bacterias en 250 μl de buffer P1 y lo transferimos a un tubo de microcentrífuga.
3. Añadimos 250 μl de buffer P2 e invertimos varias veces el tubo hasta que la solución se vuelva clara.
4. Añadimos 350 μl de buffer N3 y mezclamos rápidamente.
5. Centrifugamos 10 minutos a 13.000 rpm.
6. Obtenemos el sobrenadante del paso 5 y lo añadimos a una columna Quiaprep spin.
7. Centrifugamos la columna durante 60 segundos y descartamos el líquido que ha pasado por la columna.
8. Añadimos 750 μl de buffer PE a la columna y centrifugamos 60 segundos. Retiramos el líquido que ha pasado por la columna.
9. Centrifugamos 1 minuto más para eliminar cualquier resto líquido de la columna
10. Ponemos la columna en un tubo eppendorf limpio y eludimos el ADN añadiendo 50 μl de buffer EB en el centro de la columna. Dejamos reposar 1 minuto, y después centrifugamos 1 minuto a 13.000 rpm.

Después 1μg del vector TOPO TA con el inserto seleccionado de YKT6, y 1μg del vector psiCHECK2 (Promega) (Figura 20) se digirieron y linearizaron respectivamente con enzimas de restricción: En un volumen final de 40 μl, a cada uno le añadimos las siguientes cantidades de enzimas de restricción: 4μl de NEB2, 1μL de PmeI, 0,5 μl de SgfI, y también 0,25 μl de BSA. El programa utilizado para linealizar fue de 37°C hasta el día siguiente y después paramos la reacción con 20 minutos a 65°C.

La 3'UTR de YKT6 procedente del vector TOPO TA y el vector psiCHECK2 linearizado se purificaron en un gel de agarosa (AG-0520, Ecogen) 1%, con el kit QIAquick gel extraction kit (28704, Qiagen):

1. Recortamos la banda a purificar del gel de agarosa con un bisturí.
2. Pesamos la banda de gel recortado la pasamos a un tubo eppendorf y le añadimos tres volúmenes de buffer QG por cada volumen de gel (por 100mg de gel añadimos 300µL de buffer QG).
3. Incubamos la mezcla a 50°C durante 10 minutos. Realizamos vortex cada 2 minutos para ayudar a disolver el gel.
4. Añadimos un volumen de isopropanol y mezclamos.
5. Pasamos todo el producto del tubo eppendorf a una de las columnas del kit y la ubicamos en uno de los tubos de colección.
6. Centrifugamos a 13.000 rpm durante 1 minuto. Y eliminamos el producto filtrado.
7. Añadimos 500µL de buffer QG a la columna y centrifugamos durante 1 minuto a 13.000rpm. Eliminamos el filtrado.
8. Para lavar la columna añadimos 750µL de buffer PE a la columna y dejamos incubar durante 5 minutos. Centrifugamos durante 1 minuto a 13.000rpm.
9. Eliminamos el filtrado y volvemos a centrifugar la columna vacia para eliminar restos de buffer de lavado.
10. Para eludir el ADN añadimos 50µL de buffer EB al centro de la columna y dejamos incubar durante 1 minuto
11. Traspamos la columna a un tubo eppendorf nuevo y centrifugamos durante 1 minuto a 13.000rpm.

Una vez purificados, introducimos la 3'UTR procedente del vector TOPOTA en el vector Psicheck2 linearizado con DNA ligasa T4 (M0202S, New England Biolabs) en la zona de clonación localizada en la zona *downstream* del gen reportero Renilla Luciferasa.

Para la ligación tuvimos en cuenta la fórmula:

$$\frac{ng \text{ vector} \times \text{tamaño inserto (kb)}}{\text{Tamaño vector (kb)}} \times \frac{6}{1} = ng \text{ de Inserto}$$

Las condiciones de la ligación fueron las siguientes: 4µl de buffer de ligación 10x, 7,2µl de vector psiCHECK2, 25,6µl de inserto de 3'UTR de YKT6, 0,5µl de T4 ligasa y 2,7µl de H<sub>2</sub>O para



2. Lavamos con PBS el pellet y volvemos a centrifugar a 2.500g 5 minutos.
3. Añadimos 100  $\mu$ l de buffer PLB a cada pellet. Dejamos 30 minutos realizando vortex cada 5 minutos.
4. Mientras pasan estos 30 minutos preparamos los reactivos LARII y StopGlo:
  - a. LARII es una pastilla que se debe disolver en el líquido que lleva el mismo kit
  - b. Para 10ml de buffer StopGlo necesitamos 0,2mL de StopGlo substrate.
  - c. Para saber el volumen que necesitamos de cada uno: siempre se necesitan 900  $\mu$ l para llenar la máquina, más 100 $\mu$ l por cada pocillo, más 100 $\mu$ l para un pocillo que será el blanco.
5. Cargamos los reactivos en la máquina, y en una placa de 96 pocillos de fondo blanco (3917, Costar), de cada tubo con buffer PLB rellenamos tres pocillos con 30 $\mu$ l que serán las réplicas.
6. Realizamos la lectura con el programa simplicity y la opción Promega DLR\_ Dual measurement en el luminómetro Orion II (Berthold)

Los miRNAs significativos en el estudio Renilla-luciferasa se validaron por WB durante el estudio de la transfección de miRNAs para evaluar la liberación de exosomas (apartado 3.6)

### **3.6 Inhibición de YKT6 con miRNAs para evaluar la liberación de exosomas**

La inhibición de YKT6 mediante miRNAs se llevó a cabo en la línea celular A549 utilizando los pre-miRNAs seleccionados y como control negativo el pre-miRNA control.

Las células se cultivaron 24 horas antes de la transfección plantando inicialmente 3 millones de células en placas Petri de 10cm de diámetro (Cell culture dish Ref. 664160, Cellstar). La cuantificación de las células se realizó mediante la máquina Countess (Invitrogen). Se utilizó una concentración final de DsiRNA 50nM en un volumen final de 6ml de medio de cultivo fueron transfectados utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) con los siguientes pasos:

1. Realizamos una master mix en tubos eppendorf con Opti-Mem (750 $\mu$ l) y el DsiRNA correspondiente (6 $\mu$ l), y en otra Opti-Mem (744 $\mu$ l) en el que diluimos la Lipofectamina 2000 (15 $\mu$ l), dejándolo incubar cinco minutos a temperatura ambiente.
2. A cada tubo eppendorf de Opti-Mem con el ARN le añadimos la misma cantidad del otro eppendorf de Opti-Mem con Lipofectamina 2000, haciendo un volumen de 1,5mL. Golpeamos suavemente para homogeneizar y dejamos incubar 25 minutos más.

3. Durante este tiempo cambiamos el medio de las células por 4,5mL de medio sin antibiótico.
4. Pasada la incubación, añadimos el producto en la placa oportuna gota a gota.
5. Pasadas 4-6 horas cambiamos el medio por medio con antibiótico para evitar contaminaciones.
6. A las 48 horas recogemos el medio de cultivo para aislar exosomas mediante ultracentrifugación, y extraemos proteína celular.

### **3.7 Ensayo de proliferación celular**

La proliferación celular la estudiamos con el kit CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay de Promega. Este ensayo que mide la reducción de las sales de tetrazolio (MTS) por las células viables dando lugar a un compuesto cuantificable colorimétricamente que es el formazán. La formación de formazán es directamente proporcional al número de células viable. Para este ensayo se realiza la medición de la absorbancia a 490nm una vez cada 24h hasta las 72h. Se realizan los siguientes pasos:

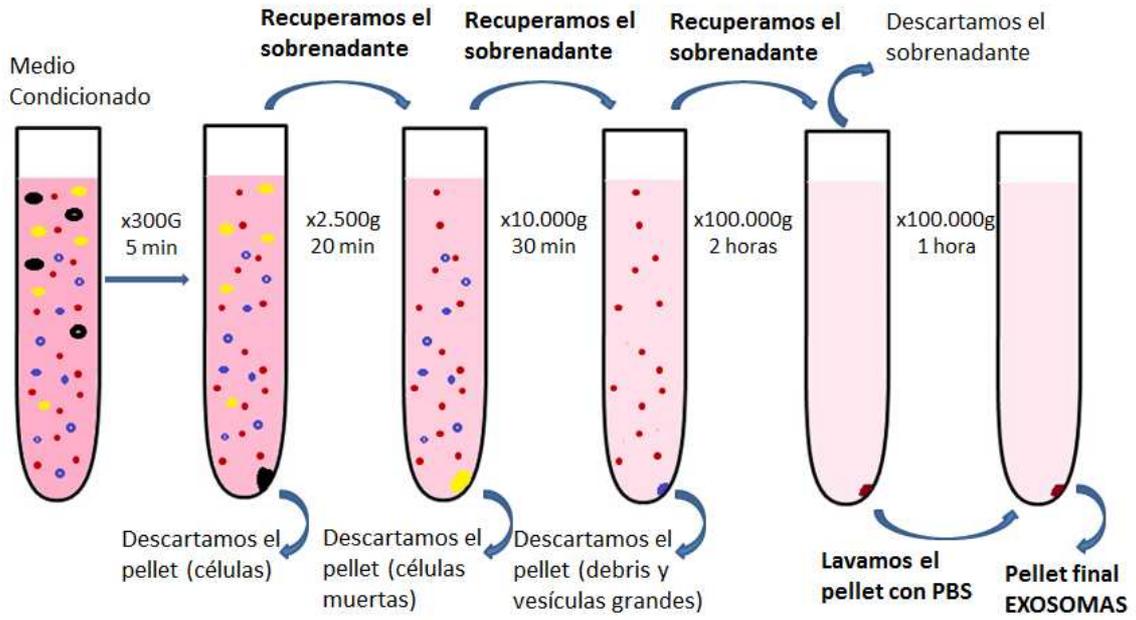
2. Sembramos en placas de 6 pocillos (6 well cell culture plate, cellstar) 500.000 células y transfectamos con Lipofectamina 2000 o bien los DsiRNA contra YKT6 y control, o bien los pre-miRNAs seleccionados para analizar.
3. Al día siguiente replaqueamos las células en placas de 96 pocillos (96 well cell culture cluster, costar), depositando un total de 2.000 células por pocillo en un volumen final de 100 µl. Realizamos tres réplicas para cada condición, y varias placas, una para cada día de medición necesario.
  - a. Para esto lo primero será eliminar el medio de cultivo de las células.
  - b. Seguidamente realizamos un lavado de las células con PBS.
  - c. Retiramos el PBS y añadimos 0,5mL de Tripsina (Invitrogen) precalentada a 37 °C. y dejamos incubar 2 minutos a 37°C.
  - d. Añadimos 1mL de medio de cultivo con FBS para inhibir la tripsina, resuspendiendo y arrancando las células del fondo de la placa.
  - e. Transferimos las células a un tubo falcon de 15mL y centrifugamos a 2.500G durante 5 minutos para obtener el pellet de células.
  - f. Resuspendemos en 1mL el pellet y cuantificamos las células mediante la máquina Countess.
4. Añadimos 20µl de producto MTS a cada pocillo pipeteando varias veces y dejamos 45 minutos en el incubador de células.

5. Pasado este tiempo realizamos la lectura de la absorbancia de la placa a una densidad óptica de 490nm en el espectrofotómetro VERSAmax microplate reader de Molecular Devices.

### **3.8 Aislamiento de Exosomas.**

Para el aislamiento de exosomas se utilizó tanto medio condicionado de las células A549, como plasma (125 µl) de pacientes de CPNP. Las células A549 se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS) libre de exosomas (Exosome depleted FBS, A2720801, Gibco). Es importante la utilización de este tipo de FBS ya que el FBS normal contiene gran cantidad de exosomas. El aislamiento se realizó en el medio condicionado (6mL) de las células cultivadas durante 48h mediante el procedimiento de ultracentrifugación que consta de los siguientes pasos que podemos ver esquematizados en la Figura 21:

1. Centrifugación del medio 300g durante cinco minutos para eliminar células, recuperamos el sobrenadante.
2. Centrifugación durante 20 minutos a 2.500g para eliminar células muertas, y recuperamos el sobrenadante.
3. Centrifugación durante 30 minutos a 10.000g para eliminar debris y partículas grandes.
4. El siguiente paso consta de traspasar el sobrenadante a tubos de ultracentrifugación de policarbonato (355630, Beckman Coulter), y de la realización de la ultracentrifugación a 100.000g durante 2 horas para precipitar los exosomas con el rotor 70.1Ti y la Ultracentrifugadora Optima L-100xp de Beckman Coulter.
5. Eliminamos el sobrenadante donde encontraremos otras vesículas extracelulares y hacemos un lavado del pellet con 7mL de PBS y volvemos a centrifugar a 100.000g durante 1 hora para volver a precipitar los exosomas.
6. Resuspendemos el pellet en 20µl de tampón de carga de western blot o en 100µl de PBS.



**Figura 21.** Esquema del protocolo de aislamiento de exosomas utilizado.

### **3.9 Caracterización y cuantificación de los exosomas.**

Para la caracterización de los exosomas aislados se utilizaron tres técnicas:

#### **Crio Microscopia electrónica de transmisión (Cryo-TEM)**

Los exosomas resuspendidos en PBS fueron visualizados en un microscopio Jeol JEM 2011 trabajando con un voltaje de aceleración de 200kv en la Unidad de microscopia de la Universidad Autónoma de Barcelona. Para ello 3µl de la muestra se vitrificaron en una rejilla TEM Quantifoil® 1.2/1.3. Cada muestra se preparó en forma de fina lámina y fue sumergida rápidamente en etano líquido en la crioestación Leica EM CPC. Las rejillas se transfirieron a un 626 Gatan criosoporte y se mantuvieron a -179°C durante la captación de las imágenes. Las micrografías se grabaron en un Gatan Ultrascan cooled CCD cámara bajo un baja dosis de electrones para minimizar la radiación del rayo de electrones.

#### **Nanoparticle Trafficking Analysis (NTA)**

El estudio del movimiento browniano y de la dispersión de la luz de las partículas se realizó mediante el instrumento Nanosight LM10 (Malvern), que nos permitió ver la distribución de los tamaños de la muestra. Para ello se cargó una dilución 1:10 de la muestra en PBS y se grabaron tres replicas en video con los siguientes parámetros: cámara a 30 FPS, Nivel de la cámara 15, temperatura de 24,8°C, y grabación de video durante 60 segundos. Después el Software NTA de Nanosight analizó los datos por triplicado y generó un PDF con los resultados.

#### **Cuantificación de Tsg101 exosomal**

La cuantificación de TSG101 se realizó mediante Western Blot. Para el WB de exosomas se cargó el pellet de exosomas resuspendidos en 40µl de tampón de carga previamente desnaturalizado a 97°C 10 minutos. Realizamos la electroforesis y transferencia como se explica en el apartado 3.5, y las membranas se incubaron con el anticuerpo contra la proteína exosomal TSG101 (abcam ab83).

### **3.10 Pacientes**

En el trabajo se ha incluido una serie retrospectiva de 98 pacientes de CPCNP diagnosticados y operados entre 2007 y 2013 en el Hospital Clinic de Barcelona. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado por escrito de acuerdo a la declaración de Helsinki y el proyecto ha sido revisado y aprobado por el comité ético de la investigación clínica (CEIC) del Hospital Clinic de Barcelona. Las muestras de las que disponemos son muestras congeladas guardadas a -80°C. Las características clinicopatológicas principales se muestran en la Tabla 8.

### **3.11 Extracción ARN de muestras de tejido**

El ARN total de las muestras se obtiene con la técnica de Trizol Reagent (Invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante. Para realizarlo se siguen los siguientes pasos:

1. Añadimos 1ml de Trizol por cada 50-100mg de muestra de tejido y se homogeniza con un bisturí en una placa de Petri.
2. Recogemos el homogenizado y lo pasamos a un tubo eppendorf, vorteamos rápidamente y dejamos incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Añadimos 0,2ml de cloroformo y agitamos 15 segundos. Incubamos el tubo 15 minutos a temperatura ambiente.
4. Centrifugamos a 12.000g 15 minutos a 4°C y observaremos que se produce una separación de fases: Fase acuosa superior donde encontramos ARN, Interfase blanquecina donde encontramos ADN, y una fase orgánica inferior de color rosa donde encontraremos proteínas y lípidos.
5. Aislamos la fase acuosa superior con una micropipeta con cuidado de no disruptir las fases formadas y lo pasamos a un tubo nuevo.
6. Precipitamos el ARN añadiendo 0,5ml de isopropanol e invertimos el tubo varias veces para mezclarlo. Incubamos la muestra 5-10 min a temperatura ambiente.
7. Centrifugamos la muestra a 12.000g durante 10 minutos para precipitar el ARN.
8. Descartamos el sobrenadante y le añadimos 1ml de etanol 75%. Realizamos un vortex para despegar el pellet del fondo y lavarlo con el etanol.
9. Volvemos a centrifugar la muestra a 7.500g durante 5 minutos para precipitar el ARN, y eliminamos todo el sobrenadante. Dejamos acabar de secar al aire.
10. Resuspendemos el ARN en agua RNase free e incubamos 10 minutos a 60°C para después cuantificar su concentración con Nanodrop (Modelo ND-1000).

**Tabla 8.** Características clinicopatológicas de los pacientes. Podemos observar algunas de las características de los pacientes, la frecuencia de sus valores, y el p-valor resultado del análisis mediante log-rank test para SLE y SG.

Características	Valor	N (%)	SLE	SG
<b>Sexo</b>	Hombre	77 (78.6)	0.0741	0.0267
	Mujer	21 (21.4)		
<b>Edad, años</b>	Media (Rango)	68 (33 - 83)	0.198	0.251
	<=65	43 (43.9)		
	>65	55 (56.1)		
<b>ECOG PS</b>	0	9 (9.2)	0.6906	0.3695
	1	89 (88.8)		
<b>Estadaje</b>	I	58 (59.2)	0.0096	0.0866
	II	21 (21.4)		
	III	19 (19.4)		
<b>Histología</b>	Adenocarcinoma	51 (52)	0.2393	0.2714
	Carcinoma Escamoso	39 (39.8)		
	Otros	8 (8.2)		
<b>Tipo de cirugía</b>	Lobectomía/Bilobectomía	84 (85.7)	0.873	0.5719
	Pneumonectomía	7 (7.1)		
	Resección atípica	7 (7.1)		
<b>Tabaquismo</b>	Fumador	33 (33.7)	0.6209	0.0819
	Ex fumador	52 (53.1)		
	No fumador	10 (10.2)		
	Desconocido	3 (3.1)		
<b>Tratamiento adjuvante</b>	Si	33 (33.7)	0.6137	0.6564
	No	65 (66.3)		
<b>Recaída</b>	No	62 (63.3)		
	si	36 (36.7)		
<b>Mutación TP53</b>	Si	22 (22.4)	0.6207	0.9094
	No	73 (74.5)		
	Desconocido	3 (3.1)		
<b>Mutación KRAS</b>	Si	17 (17.3)	0.1826	0.1056
	No	79 (80.6)		
	Desconocido	2 (2)		

ECOG PS= Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status. SLE= Supervivencia libre de enfermedad. SG= Supervivencia global.

### 3.12 Cuantificación de ARNm y miRNAs

#### ARNm

Para la cuantificación del RNAm, 500ng del RNA total se retrotranscribió (RT-PCR) con el High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (PE Applied Biosystem, Foster City, CA). Las reacciones de la transcriptasa reversa constan de 500ng en un volumen final de 10 $\mu$ l, 2 $\mu$ l de buffer de RT 10x, 0,8 $\mu$ l de dNTPs, 2 $\mu$ l de Random Primers, 1 $\mu$ l de RNase Inhibitor (N8080119, Applied biosystems), en un volumen final de 20 $\mu$ l. Las placas con el resultante de la master más el ARN de cada paciente se introdujeron en un termociclador con las siguientes condiciones: 10 minutos a 25 $^{\circ}$ C, 2h a 37 $^{\circ}$ C, 5 minutos a 85 $^{\circ}$ C y después a 4 $^{\circ}$ C hasta su uso o congelación.

El cDNA obtenido se usó para realizar Real Time PCR cuantitativa en una máquina Step One Time PCR System (Applied Biosystem). Cada reacción se realizó en un volumen final de 10 $\mu$ l de los cuales 1 $\mu$ l corresponde al producto final de la RT-PCR, 5 $\mu$ l a Taqman universal PCR master mix 2x, 0,5 $\mu$ l de primer Taqman y 3,5 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O. Las reacciones se incubaron en placas de 96 pocillos ópticos a 50 $^{\circ}$ C durante 2 minutos, 40 ciclos de 95 $^{\circ}$ C durante 10 minutos y 95 $^{\circ}$ C durante 15 segundos, y finalmente a 60 $^{\circ}$ C durante 1 minuto. Los valores de CT de YKT6 (Ref. Hs01127135\_m1, Applied Biosystems) se normalizaron con el control endógeno RNA18S (Ref. Hs99999901\_s1, Applied Biosystems) y la cuantificación relativa se realizó con el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

#### miRNAs

Para la cuantificación de los miRNAs, 10ng del ARN total se retrotranscribió (RT-PCR) con primers específicos para cada miRNA mediante el kit Taqman miRNA Reverse Transcription kit (Life Technologies). Las reacciones de la transcriptasa reversa contenían 10ng de RNA, 0,075 $\mu$ l de dNTPs, 0.075 $\mu$ l de buffer, 1.5 $\mu$ l de primer comercial miRNA Taqman y 0.5 $\mu$ l de transcriptasa reversa MultiScribe, en un volumen final de 7.5 $\mu$ l. Cada reacción se incubó en termociclador 30minutos a 16 $^{\circ}$ C, 30 minutos a 42 $^{\circ}$ C, y 5 minutos a 85 $^{\circ}$ C.

El cDNA obtenido para cada miRNA, se usó para realizar Real Time PCR cuantitativa en una máquina Step One Time PCR System (Applied Biosystem). Cada reacción se realizó en un volumen final de 10 $\mu$ l de los cuales 0,7 $\mu$ l corresponde al producto final de la RT-PCR, 5 $\mu$ l a Taqman universal PCR master mix 2x, y 1 $\mu$ l de primer 20x (Taqman MicroRNA Assays). Las reacciones se incubaron en placas de 96 pocillos ópticos a 50 $^{\circ}$ C durante 2 minutos, 40 ciclos de 95 $^{\circ}$ C durante 10 minutos y 95 $^{\circ}$ C durante 15 segundos, y finalmente a 60 $^{\circ}$ C durante 1 minuto. Los valores de CT de los miRNAs miR-134 (Ref. 000459, Applied Biosystems) y miR-135b (Ref.

000461, Applied Biosystems) se normalizaron con el control endógeno miR-191 (Ref. 002299, Applied Biosystems) y la cuantificación relativa se realizó con el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### **3.13 Extracción ADN**

El ADN de las muestras se extrae con el kit DNeasy blood & tissue (Ref.69506, Qiagen). Para realizarlo se siguen los siguientes pasos:

1. Ponemos 25mg de tejido en una placa de petri
2. Añadimos 360µl de Buffer ATL
3. Trituramos el tejido al máximo con la ayuda de un bisturí
4. Pipeteamos el lisado y lo pasamos a un tubo eppendorf de 1,5ml
5. Añadimos 20µl de Proteinasa K
6. Realizamos un vortex fuerte durante 15 segundos
7. Incubamos a 55°C de 1 a 3 horas
8. Realizamos un vortex fuerte durante 15 segundos
9. Añadimos 200µl de buffer AL
10. Realizamos un vortex fuerte durante 15 segundos
11. Incubamos a 70°C durante 10 minutos
12. Realizamos un vortex fuerte durante 15 segundos
13. Añadimos 200µl de etanol absoluto
14. Realizamos un vortex fuerte durante 15 segundos
15. Pasamos toda la solución a una de las columnas del kit
16. Centrifugamos a 8.000 rpm durante 1 minuto
17. Descartamos el filtrado
18. Añadimos 500µl de buffer AW1
19. Centrifugamos a 8.000 rpm durante 1 minuto
20. Descartamos el filtrado
21. Añadimos 500µl de buffer AW2
22. Centrifugamos a 14.000rpm durante 3 minutos
23. Descartamos el tubo colector y lo cambiamos por un nuevo
24. Volvemos a centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto
25. Pasamos la columna a un tubo eppendorf de 1,5ml nuevo rotulado
26. Añadimos 100µl de buffer AE precalentado a 55°C y lo incubamos 5 minutos a 55°C.
27. Centrifugamos a 8.000 rpm durante 1 minuto
28. Cuantificamos el ADN con Nanodrop (Modelo ND-1000).

### 3.14 Análisis de estado mutacional de TP53 y KRAS

Para estudiar el estado mutacional de TP53 y KRAS realizamos la PCR y secuenciación del producto de los exones 5, 6, 7 y 8 de TP53 y el exón 2 de KRAS para examinar el estado mutacional de los codones 12 y 13. Las secuencias de los encebadores para cada PCR se pueden comprobar en la Tabla 9.

Para la realización de la PCR utilizamos el kit Takara LA con las siguientes condiciones: 50ng de ADN, y por cada reacción: 4µl de dNTPs, 2,5µl de Buffer, 2µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,25µl de Taq polimerasa, 0,5µl de primer Forward (10nM) y 0,5 µl de primer Reverse (10nM) en un volumen final de 25 µl. En el caso de la PCR para KRAS, en lugar de 2µl de MgCl<sub>2</sub> se utilizan 2,5µl de MgCl<sub>2</sub>.

**Tabla 9.** Secuencia de los primers utilizados para la realización de las PCRs

Primer	Secuencia
<b>KRAS F</b>	TTA ACC TTA TGT GTG ACA TGT T
<b>KRAS R</b>	AGA ATG GTC CTG CAC CAG TAA
<b>P53 F5</b>	GTT TCT TTG CTG CCG TCT C
<b>P53 R5</b>	GAG CAA TCA GTG AGG AAT CAG
<b>P53 F6</b>	AGA GAC GAC AGG GCT GGT T
<b>P53 R6</b>	CTT AAC CCC TCC TCC CAG AG
<b>P53 F7</b>	CTT GCC ACA GGT CTC CCC AA
<b>P53 R7</b>	AGG GGT CAG AGG CAA GCA GA
<b>P53 F8</b>	GGG ACA GGT AGG ACC TGA TTT
<b>P53 R8</b>	TAA CTG GAC CCT TGG TCT CC

Las condiciones del termociclador (Flezy cycler, Analytikjena) fueron las siguientes: 94°C 1 minuto, [94°C 30 segundos, X°C 1 minuto, 72°C 1 minuto] Nciclos, 72°C 10 minutos y después se mantuvo a 4°C hasta su utilización.

Para KRAS, TP53 exon 5, TP53 exon 6, TP53 exon 8, X= 60°C. Para TP53 exon 7 X= 67°C.

Para KRAS, TP53 exon 6, TP53 exon 7, TP53 exon 8, N= 35. Para TP53 exon 5 N= 38.

Después el producto de PCR se envió a secuenciar a través de la empresa StabVida.

### **3.15 Análisis estadístico**

Las comparaciones entre dos grupos se realizaron mediante la prueba t-Student con el programa Graphpad y también se utilizó para realizar el análisis de correlación de Pearson entre expresión de miRNAs y expresión de YKT6. Se utilizó el programa R con el paquete MaxStat (263) para encontrar un punto idóneo que nos separase los pacientes según niveles altos o bajo de expresión para analizar supervivencia. La Supervivencia libre de enfermedad (SLE) se calculó en función del día de cirugía hasta el día de recaída o de muerte, y la supervivencia global (SG) se calculó desde el día de cirugía hasta el día de la muerte o última visita. La SLE Y SG se analizó según el método Kaplan-Meyer.



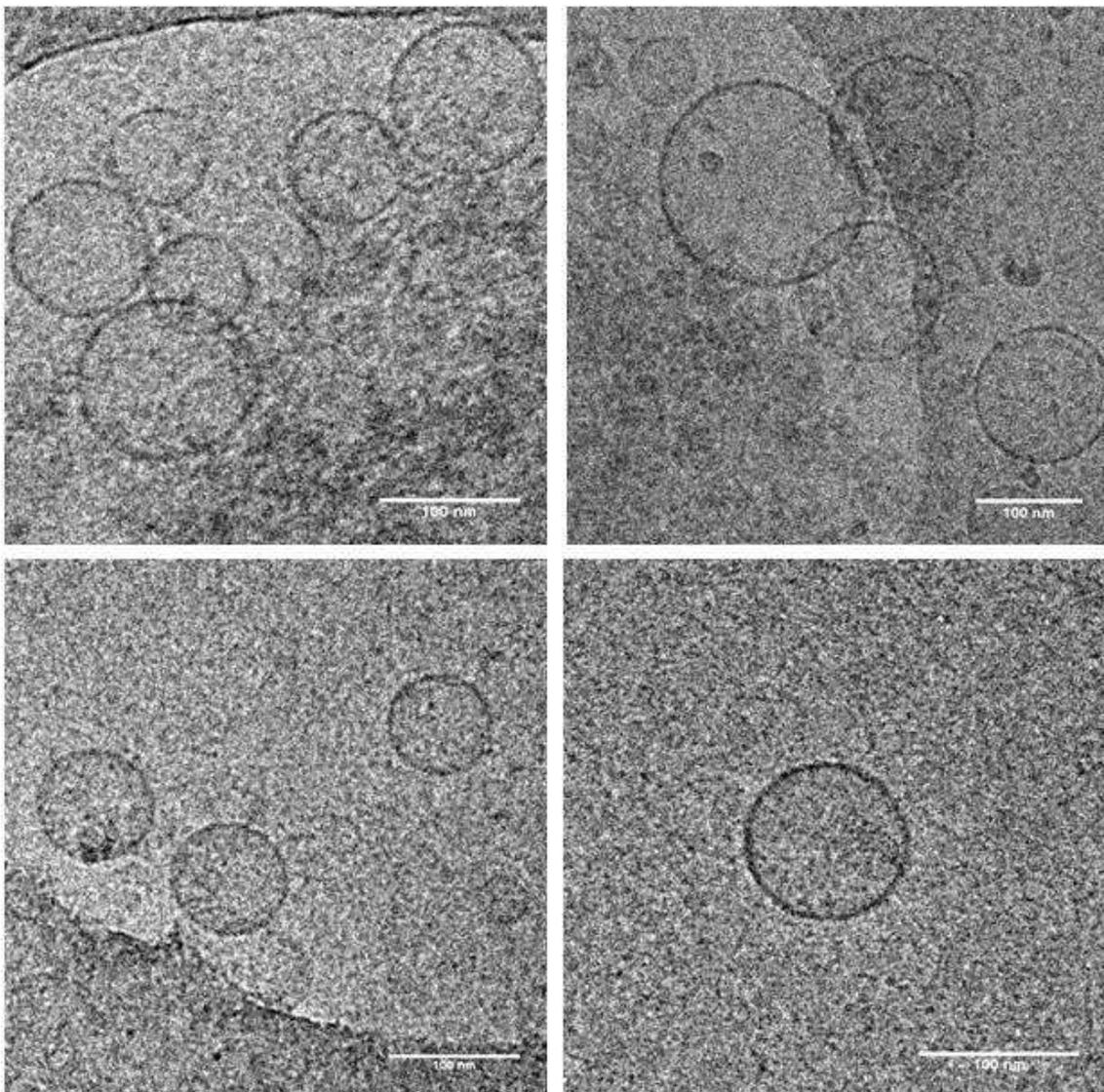
## 4. Resultados



## Aislamiento y caracterización de exosomas liberados por células A549

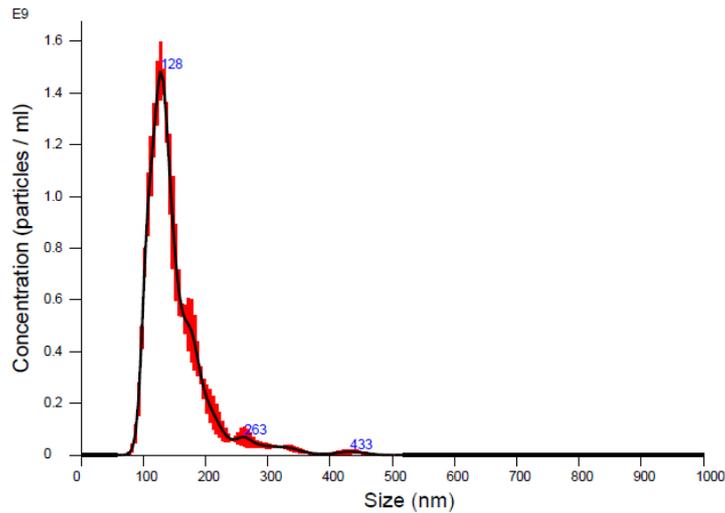
Para caracterizar y estar seguros de que el protocolo de aislamiento de exosomas mediante ultracentrifugación funcionaba correctamente en primer lugar caracterizamos los exosomas aislados y resuspendidos en PBS mediante cryo-TEM. Las muestras analizadas corresponden a dos réplicas de exosomas aislados del medio condicionado de células A549.

Los resultados obtenidos de analizar las imágenes de microscopía electrónica, muestran que los exosomas aislados tienen forma de vesículas redondeadas formadas por una bicapa lipídica con un diámetro de alrededor de 100nm (Figura 22).

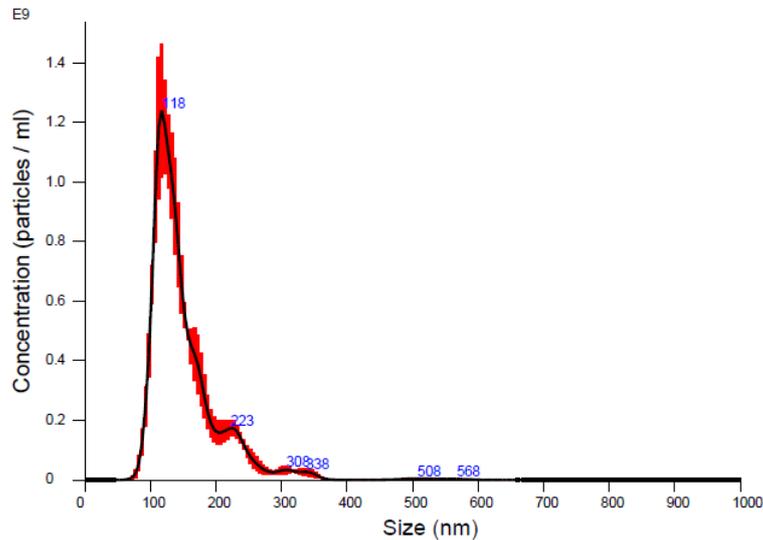


**Figura 22.** Exosomas aislados del medio de cultivo de las células A549 vistos por cryo-TEM a 30.000X

En segundo lugar, con el fin de caracterizar la población exosomal, realizamos el análisis de los exosomas aislados resuspendidos en PBS mediante NTA con la máquina Nanosight también en estas dos réplicas de exosomas aislados. Los resultados obtenidos con esta técnica muestran una población homogénea de nanopartículas con una moda de 128nm (130.6 +/- 3.5nm) y de 118 (121.7 +/- 5.0 nm) en las dos réplicas respectivamente. Los resultados los podemos ver en la Figura 23 y Figura 24.



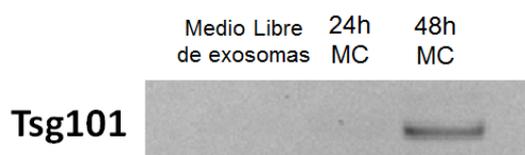
**Figura 23.** Histograma resultante de la medición de los exosomas aislados por Nanosight en la muestra 1.



**Figura 24.** Histograma resultante de la medición de los exosomas aislados por Nanosight en la muestra 2.

Por último la realización del western blot de los exosomas aislados nos mostró la presencia del marcador exosomal Tsg101. En el western blot cargamos los exosomas aislados de una muestra de medio suplementado con FBS libre de exosomas sin cultivar para comprobar que

este estaba libre de marcador exosomal, también de los exosomas aislados de medio condicionado a las 24 y 48h respectivamente. Con ello pudimos apreciar que a las 48h detectábamos más cantidad de exosomas, por lo que utilizamos este tiempo para incubar las células y aislar exosomas en los experimentos (Figura 25).

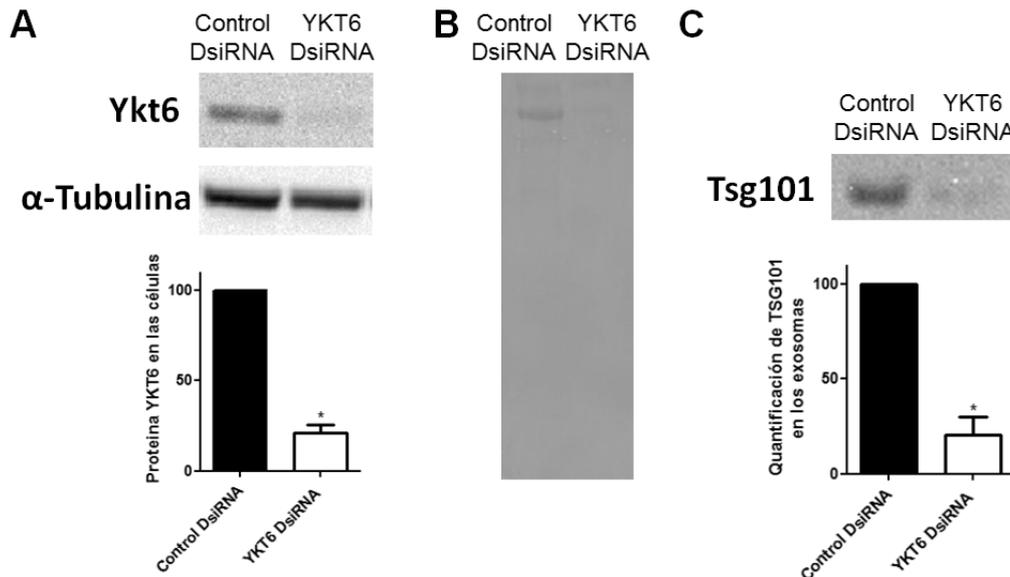


**Figura 25.** En esta imagen podemos observar los resultados del western blot para el marcador exosomal Tsg101 en los exosomas aislados. Se aprecia que no hay marcador en el medio libre de exosomas, y que la banda se hace visible tras la cultivación de las células durante 48 horas (48h MC).

### **Disminución de la liberación de exosomas al inhibir YKT6**

El efecto de la inhibición de YKT6 mediante DsiRNA se analizó mediante western blot después de transfectar las células A549 con un DsiRNA específico para YKT6 o un DsiRNA control. Observamos que las células transfectadas con el DsiRNA para YKT6 tenían unos niveles de proteína Ykt6 un 78.8% menor que las células control ( $p=0.023$ ). El control de carga utilizado fue la proteína  $\alpha$ -tubulina. Figura 26A.

Antes de extraer la proteína celular, obtuvimos el sobrenadante de las células y realizamos el aislamiento de los exosomas mediante ultracentrifugación. Para analizar los niveles de exosomas aislados realizamos un western blot para cuantificar el marcador exosomal Tsg101. En el análisis de la bandas de western blot observamos que en aquellas células transfectadas con el DsiRNA contra YKT6, en las que veíamos la reducción de proteína Ykt6, también encontramos una disminución en la densidad de la banda del marcador exosomal Tsg101 respecto a los controles. Observándose así una disminución significativa de la liberación de exosomas al inhibir YKT6 ( $p=0.013$ ) Figura 26B.



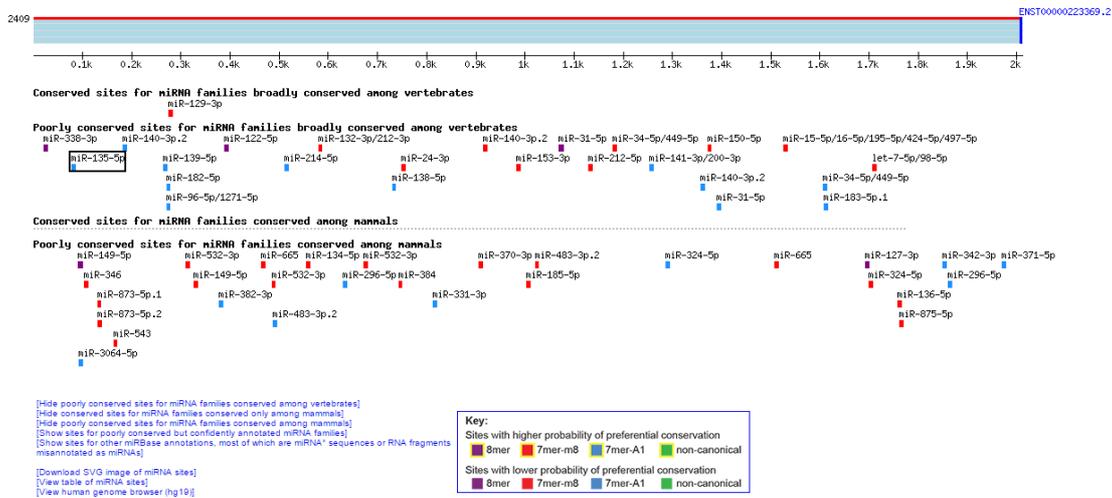
**Figura 26.** A: Podemos ver los resultados del western blot para las proteínas ykt6 y  $\alpha$ -tubulina en las células transfectadas con los DsiRNA para YKT6 y DsiRNA control. Debajo podemos observar la cuantificación de las bandas respecto al control de carga. B: Tinción de la membrana de PVDF mediante Ponceau, observamos menor tinción del carril donde encontramos los exosomas aislados de las células tratadas con DsiRNA para YKT6. C: Podemos observar las bandas resultantes del western blot realizado del aislamiento de exosomas de estas mismas células para el marcador exosomal Tsg101 y debajo la cuantificación total de la banda. Todos los experimentos se realizaron en triplicado y los datos se muestran como la media  $\pm$  ESM. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

### Regulación de YKT6 por miRNAs y efectos en la liberación de exosomas

Mediante targetScan y Mirò identificamos que YKT6 podría ser una diana putativa de los siguientes miRNAs: miR-34a, miR141, miR-134, miR-135a, miR-135b y miR-370 (Figura 27).

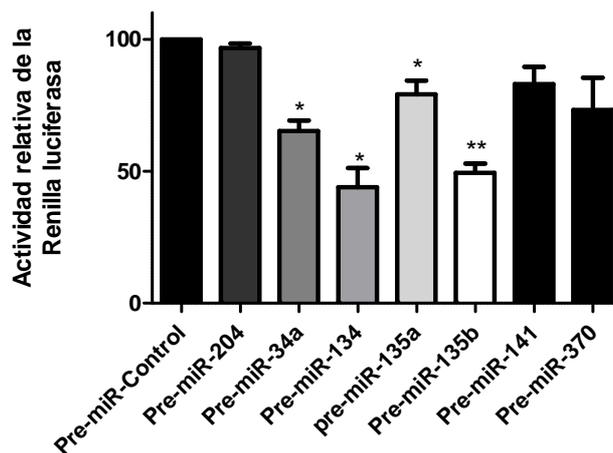
Para validar este hallazgo, en primer lugar realizamos el ensayo del vector reportero de Renilla Luciferasa. Para ello transfectamos las células A549 con el vector modificado psiCHECK2 con la 3'UTR del gen YKT6 y, por un lado los miRNAs seleccionados en el estudio *in silico*, y por otro lado un miRNA control (utilizamos el miR-204 como control negativo ya que no tenía como diana predicha la 3'UTR de YKT6 *in silico*, y el miR-control Negativo #2, que es un control negativo standard). A las 24 horas de la transfección, se midieron los niveles de Firefly luciferasa y Renilla luciferasa. Observamos que cuatro de los seis miRNAs seleccionados disminuían significativamente la actividad y por lo tanto regulaban directamente la 3'UTR de YKT6.

Human YKT6 ENST00000223369.2 3' UTR length: 2012



**Figura 27.** Resultado de la búsqueda *in silico* de posibles dianas de YKT6 en TargetScan. Entre otros, observamos que miR-34a, miR-141, miR-134, miR-135a, miR-135b y miR-370 son posibles miRNAs que regulan YKT6.

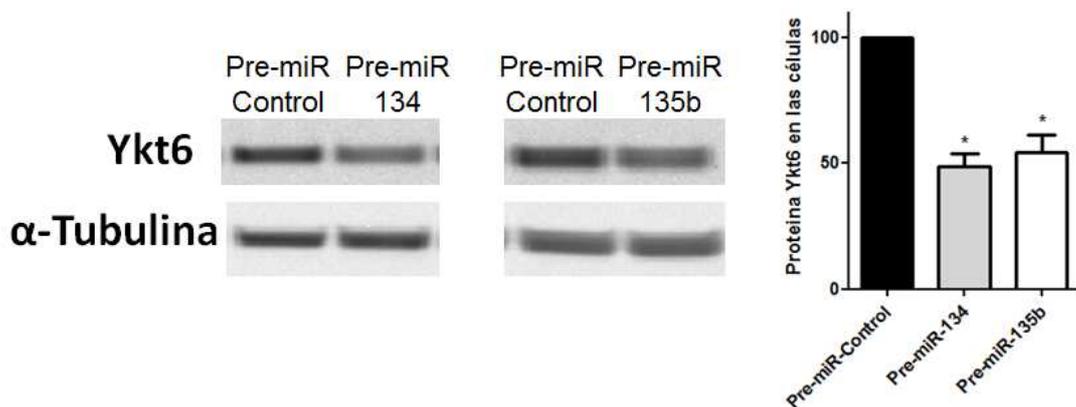
La disminución observada en la actividad de los miRNAs significativos en el experimento fueron de 34.75 % ( $p=0.019$ ) el miR-34a; 56.01% ( $p=0.022$ ) miR-134; 20.85% ( $p=0.02$ ) miR-135a y 50.61% miR-135b ( $p=0.002$ ) (Figura 28).



**Figura 28.** Actividad relativa de Renilla luciferasa en las células A549 transfectadas con el vector modificado psiCHECK2 con la 3'UTR de YKT6 y cotransfectadas con los diferentes miRNAs seleccionados. Podemos observar los 4 miRNAs que disminuyen significativamente la actividad (pre-miR34a, pre-miR-134, pre-miR135a, pre-miR-135b), junto a miR-141 y miR-370 que no son significativos, el pre-miRNA control y el pre-miRNA-204 como control negativo también al no tener como diana predicha YKT6. Todos los experimentos se realizaron en triplicado y los datos se muestran como la media  $\pm$  ESM. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$

Una vez obtenidos los resultados del experimento de validación por Renilla-luciferasa, seleccionamos los miRNAs miR-134 y miR-135b para su consiguiente validación mediante western blot ya que fueron los miRNAs observados con una disminución mayor al 50% respecto al control.

Para esto transfectamos las células con los dos pre-miRNAs y extrajimos las proteínas de las células tras 48 horas. Después realizamos un western blot para detectar los niveles de proteína de Ykt6 y como control de carga analizamos de nuevo los niveles de  $\alpha$ -tubulina. La cuantificación de las bandas de proteína Ykt6 relativa a las bandas de  $\alpha$ -tubulina, nos mostró que las células transfectadas con los miRNAs tenían menos proteína Ykt6 que las transfectadas con el pre-miRNA control. En concreto observamos una reducción de la cantidad de proteína Ykt6 con el miR-134 del 51,45% ( $p=0.011$ ) y con el miR-135b del 45.53% ( $p=0.022$ ) respecto a las células control (Figura 29).

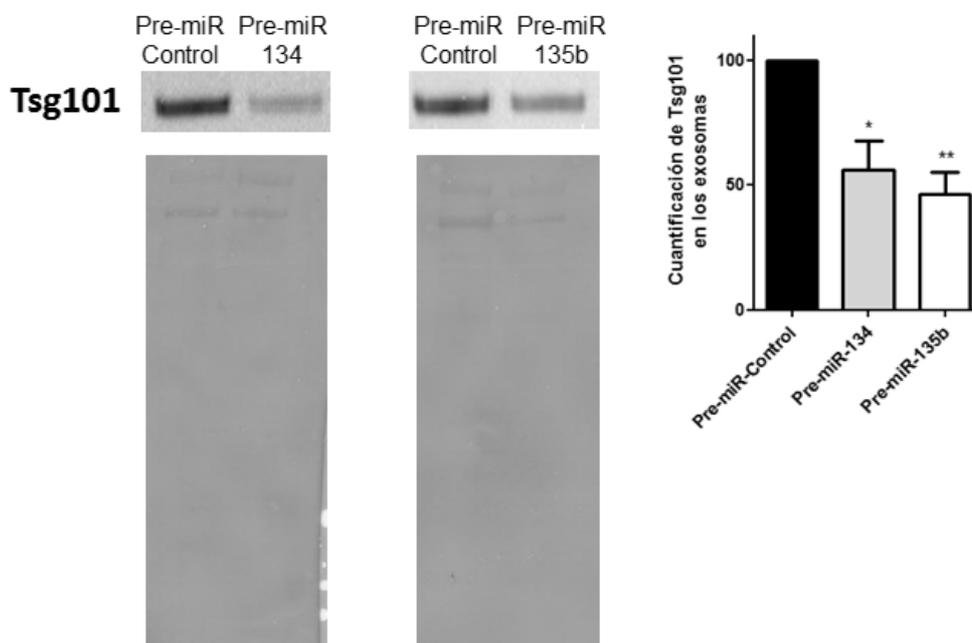


**Figura 29.** En esta imagen podemos observar los resultados del western blot para Ykt6 en las células transfectadas con pre-miR-134, pre-miR-135b y pre-miRNA control. Observamos las bandas de las proteínas Ykt6 y  $\alpha$ -tubulina y a la derecha podemos ver los niveles de proteína Ykt6 una vez relativizados al control de carga. Todos los experimentos se realizaron en triplicado y los datos se muestran como la media  $\pm$  ESM. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$

En este caso también antes de realizar la extracción de proteína retiramos el medio condicionado de las células en cultivo transfectadas para realizar el aislamiento de exosomas.

Realizamos el aislamiento de exosomas mediante ultracentrifugación, y posteriormente realizamos western blot con el marcador exosomal Tsg101. Al analizar las bandas de western blot para Tsg101, observamos que tanto en las células transfectadas con pre-miR-134 como con pre-miR-135b mostraban menos marcador exosomal que las células control. En concreto observamos que la disminución de la liberación de exosomas producida por la transfección de

las células por miR-134 era del 43,92% ( $p=0.032$ ) y por miR-135b del 53.43 ( $p=0.008$ ) respecto al control (Figura 30).

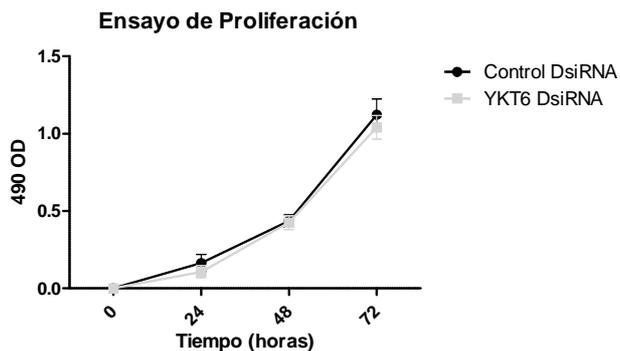


**Figura 30.** En esta imagen podemos observar el resultado del western blot de los exosomas aislados en las células transfectadas con miRNAs. Se observa una mayor densidad de banda en los exosomas que provienen de las células transfectadas con el pre-miRNA control que en los exosomas que provienen de las células transfectadas con pre-miR-134 o pre-miR135b. A la derecha podemos ver la cuantificación total de la banda del marcador exosomal respecto al control. Todos los experimentos se realizaron en triplicado y los datos se muestran como la media  $\pm$  ESM. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$

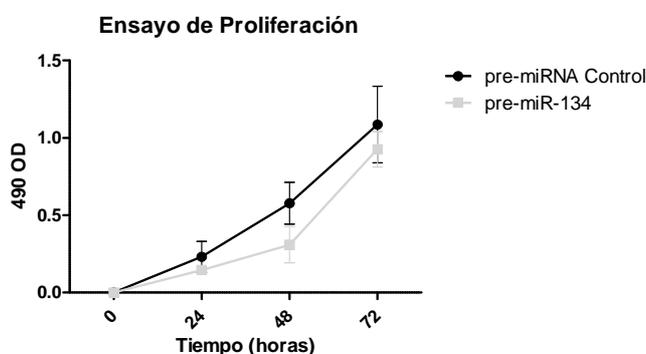
### Efecto de la inhibición de YKT6 en la proliferación celular

Para estudiar el efecto de la inhibición de YKT6 mediante DsiRNA y mediante pre-miRNAs realizamos el estudio de proliferación celular con el ensayo MTS. El análisis a lo largo de 72 horas, reveló que no había diferencias significativas en la proliferación de las células donde se había inhibido YKT6 utilizando un DsiRNA respecto a las células control (Figura 31).

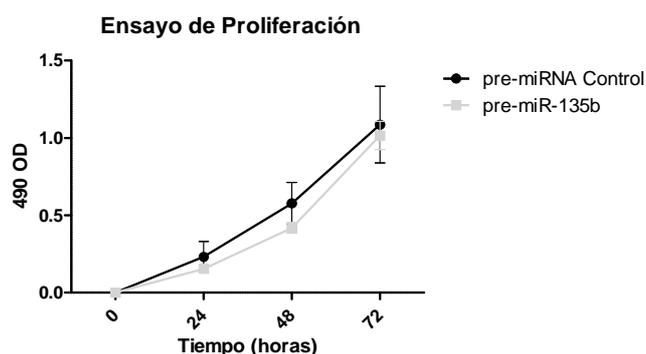
Aunque al transfectar las células con miR-134 y miR-135b (Figura 32 y Figura 33), observamos una pequeña disminución en la proliferación, esta no resulta significativa y no se explicaría por la afectación de YKT6, debido a que la transfección con el DsiRNA contra YKT6 no modificaba la proliferación celular (Figura 31).



**Figura 31.** Curvas de proliferación de las células transfectadas con DsiRNA tratadas con MTS realizadas con los valores de absorbancia a 490nm. Todos los experimentos se realizaron en triplicado y los datos se muestran como la media  $\pm$  ESM. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$



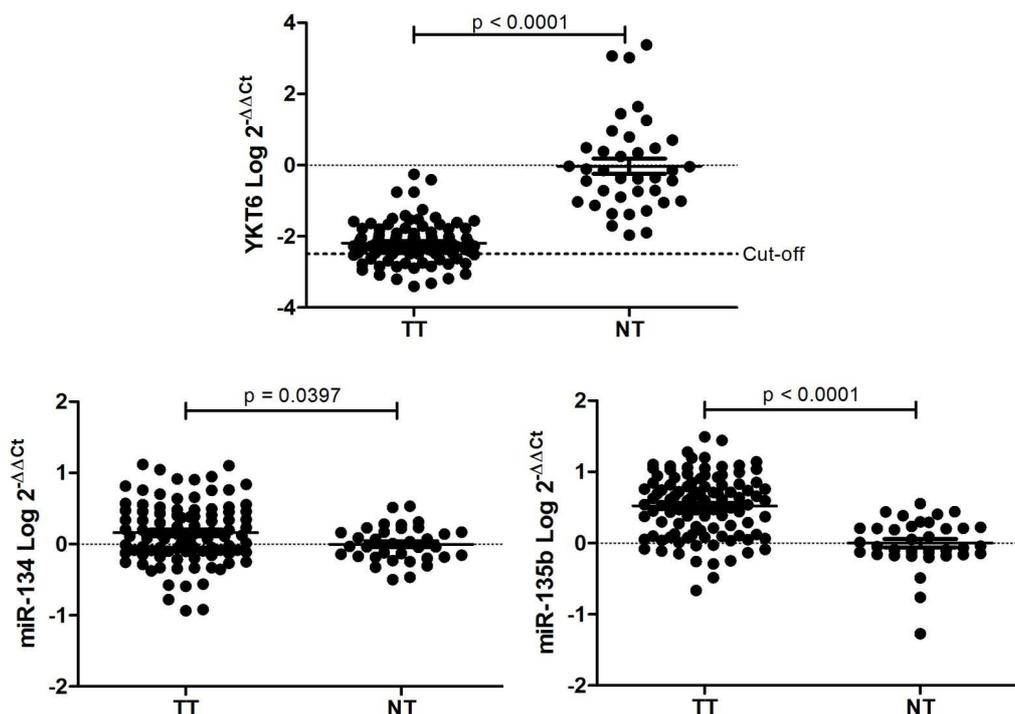
**Figura 32.** Curvas de proliferación de las células transfectadas con miR-134 o control tratadas con MTS realizadas con los valores de absorbancia a 490nm. Todos los experimentos se realizaron en triplicado y los datos se muestran como la media  $\pm$  ESM. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$



**Figura 33.** Curvas de proliferación de las células transfectadas con miR-135b o control tratadas con MTS realizadas con los valores de absorbancia a 490nm. Todos los experimentos se realizaron en triplicado y los datos se muestran como la media  $\pm$  ESM. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

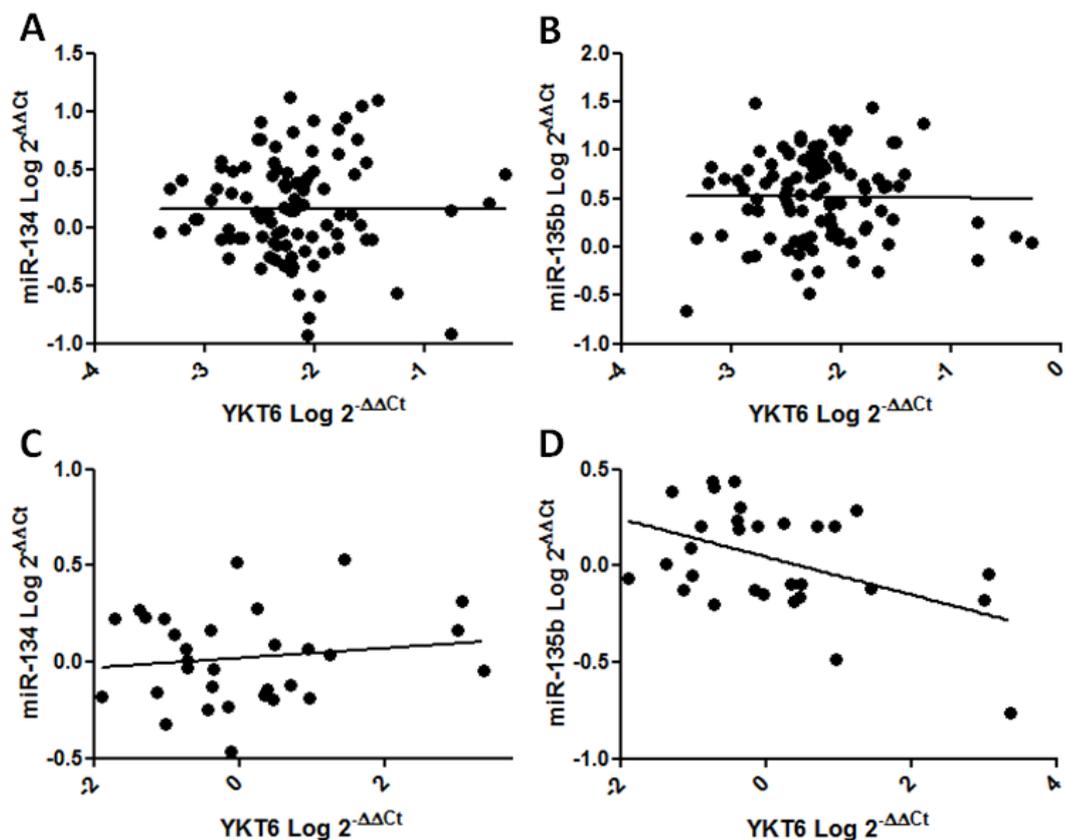
### Expresión de YKT6, miR-134 y miR-135b en pacientes de CPCNP

Evaluamos los niveles de expresión de YKT6 y de sus dos miRNAs reguladores miR-134 y miR-135b en tejido tumoral y tejido normal en la serie de 98 pacientes de CPCNP. Observamos que los niveles de ARNm de YKT6 se encuentran infraexpresados en tejido tumoral respecto al tejido normal ( $p < 0.0001$ ), y que en contraste los niveles tanto de miR-134 como de miR-135b estaban sobreexpresados en tejido tumoral respecto al tejido normal ( $p = 0.0397$ ) y ( $p < 0.0001$ ) respectivamente. (Figura 34).



**Figura 34.** Expresión de YKT6, miR-134 y miR-135b en tejido tumoral (TT) y normal (NT) en 98 pacientes de CPCNP. Se analizaron 98 tejidos tumorales y 38 tejidos normales pareados. La calibración se realizó con la mediana de los tejidos normales respecto a los que se calculó la expresión relativa de todas las muestras. Como control endógeno para la expresión de YKT6 se utilizó 18s y para los miRNAs se utilizó miR-191 como control endógeno. La expresión se calculó con el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Cuando realizamos un análisis para correlacionar los niveles de expresión de YKT6 con los de los miRNAs, no pudimos observar ninguna correlación significativa. De todas formas, en el tejido normal apareado, sí que observamos una correlación inversa entre los niveles de expresión de miR-135b y YKT6; Correlación de Pearson ( $r = -0.471$ ,  $p = 0.009$ ); Rho de Spearman ( $r = -0.368$ ,  $p = 0.045$ ) (Figura 35).



**Figura 35.** Gráfico que muestra la correlación de miR-134 y miR-135b con YKT6 en el tejido tumoral (A y B) N=98; y la correlación de miR-134 y miR-135b con YKT6 en el tejido normal (C y D) N=30.

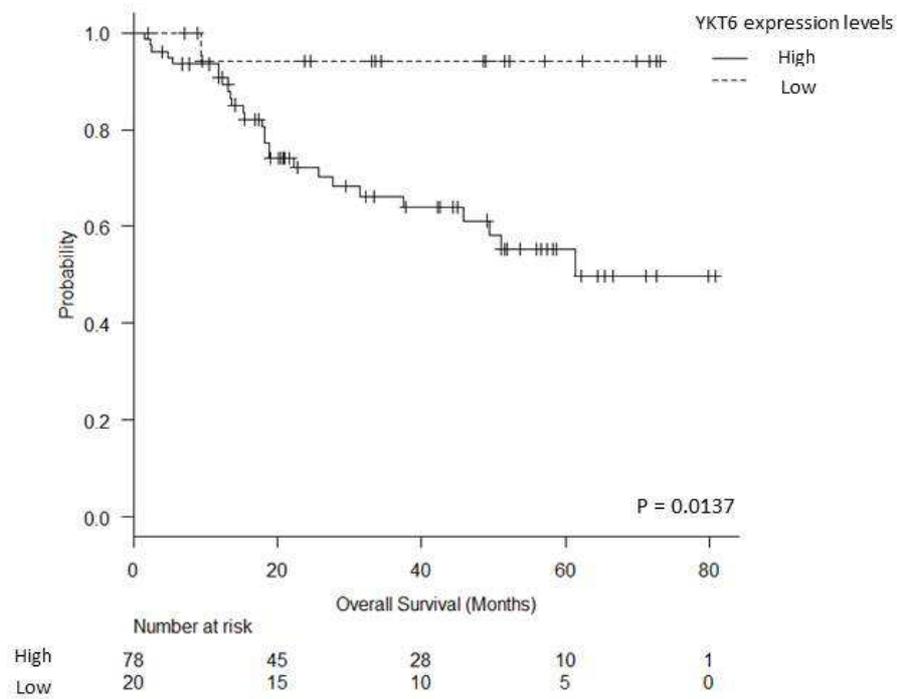
### Niveles altos de YKT6 como marcador de mal pronóstico

Para analizar la supervivencia de los pacientes se utilizó el paquete MaxStat para R que determinó el punto de corte óptimo para distinguir niveles altos de bajos en la expresión de YKT6 con valor pronóstico en los pacientes de CPCNP. Obtuvimos un punto de corte en el percentil 75 para clasificar a los pacientes que separaba dos grupos pronósticos, marcado en forma de *cut off* en el gráfico de expresión de YKT6 en tejido tumoral y normal de la Figura 35.

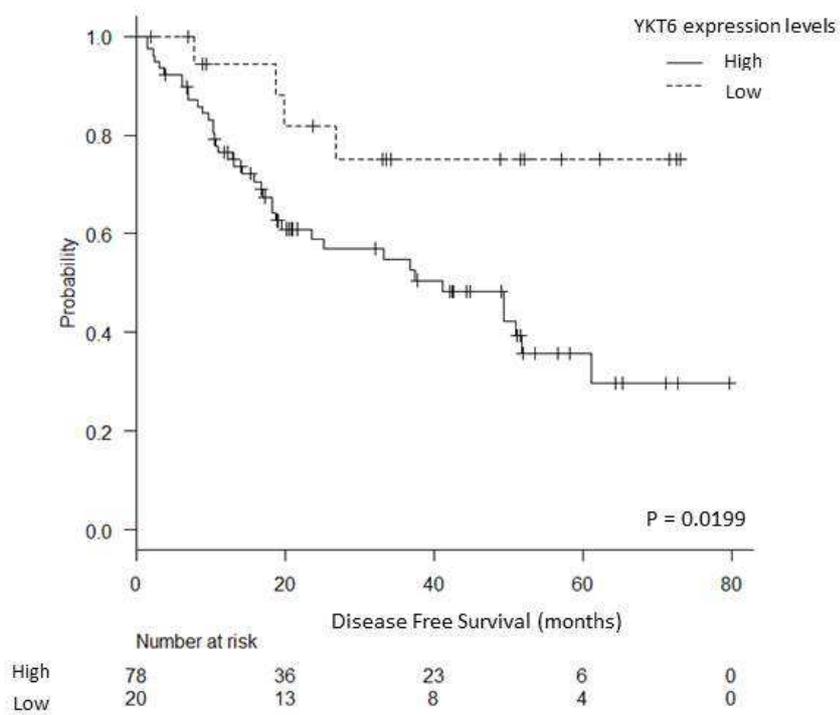
En la serie de 98 pacientes observamos que los pacientes clasificados en el grupo de alta expresión de YKT6 se asociaban a una peor supervivencia global ( $p=0.0137$ ). La media de supervivencia global fue de 54,07 meses (95%CI, 46,3-61,8) para los pacientes con niveles altos de expresión de YKT6, mientras que fue de 69,3 (95%CI, 62,2-76,4) meses para los pacientes con niveles bajos de expresión de YKT6 (Figura 36).

También observamos que los pacientes clasificados en el grupo de alta expresión de YKT6 se asociaban a una peor supervivencia libre de enfermedad ( $p=0.0199$ ) (Figura 37). La media de supervivencia libre de enfermedad fue de 42,1 meses (95%CI, 34,5-49,7) para los pacientes

con niveles altos de expresión de YKT6, mientras que fue de 59,5 meses (95%CI, 47,9-71,1) para los pacientes con niveles bajos de expresión de YKT6 (Figura 37).



**Figura 36.** Supervivencia global de acuerdo a los niveles de expresión de YKT6.



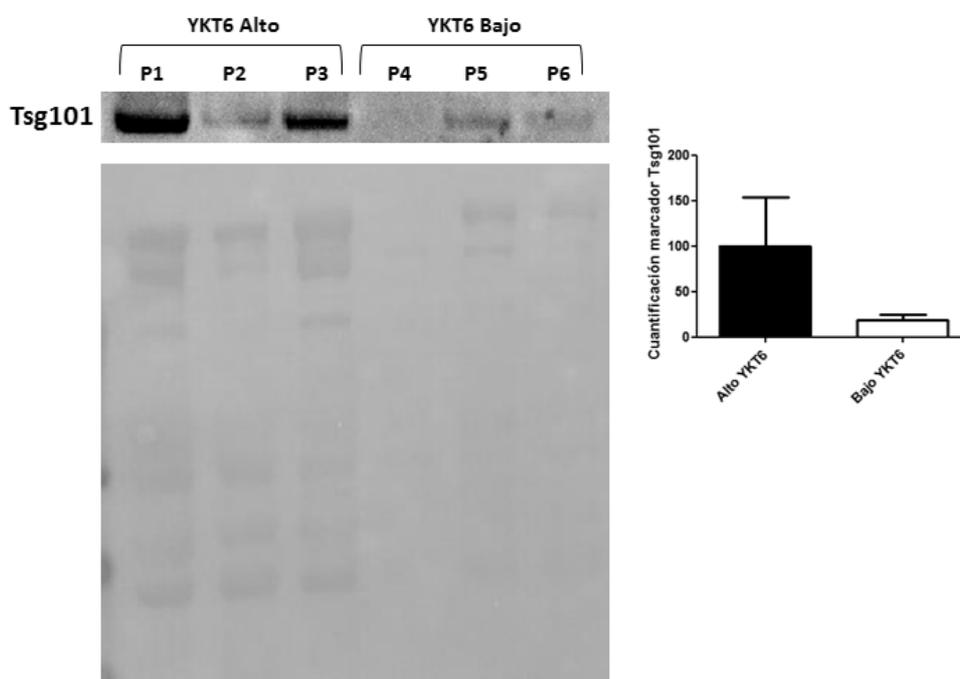
**Figura 37.** Supervivencia libre de enfermedad de acuerdo a los niveles de expresión de YKT6.

## Niveles de exosomas circulantes en pacientes de CPCNP según niveles de YKT6

Debido a que observamos que los pacientes con niveles bajos de YKT6 tienen un mejor pronóstico, y a que los experimentos *in vitro* nos mostraron que la inhibición de YKT6 resultaba en una menor liberación de exosomas, en un análisis exploratorio decidimos investigar si en los pacientes con bajos niveles de expresión de YKT6 en el tumor también encontrábamos menos niveles de exosomas circulantes en plasma que en los pacientes con niveles altos.

Para esto, seleccionamos seis pacientes de nuestra cohorte clasificados según nuestro punto de corte de expresión de YKT6 para el estudio de pronóstico de los que teníamos muestras disponibles de plasma. Seleccionamos así tres pacientes con niveles altos y tres pacientes con niveles bajos de YKT6. Aislamos los exosomas de plasma mediante ultracentrifugación y los detectamos mediante western blot con el marcador exosomal Tsg101.

Los resultados de la cuantificación total de la banda de marcador exosomal nos muestran que en los pacientes con niveles altos de expresión de YKT6 en el tumor hay más cantidad de exosomas circulantes en plasma que en los pacientes con niveles bajos de YKT6 (Figura 38).



**Figura 38.** En esta imagen podemos observar el resultado del western blot de los exosomas aislados de plasma de los pacientes de CPCNP. Se observa una mayor densidad de banda de marcador exosomal Tag101 en los exosomas que provienen de los pacientes con niveles altos de YKT6 (P1, P2, P3) que en los pacientes con niveles bajos de YKT6 (P4, P5, P6), así como tinción de proteína mediante la tinción de la membrana de PVDF mediante Ponceau. Al lado podemos observar el gráfico de la cuantificación relativa de marcador Tsg101.

## 5. Discusión

Con la realización de la presente tesis, hemos estudiado la producción y liberación de exosomas en la línea celular de cáncer de pulmón A549, observando que la inhibición de la proteína SNARE Ykt6 produce una disminución considerable en la cantidad de exosomas totales liberados. Además, hemos estudiado la regulación de YKT6 mediada por miRNAs, identificando miRNAs capaces de inhibir su traducción a proteína del ARNm, y así modulando la liberación de exosomas indirectamente. Finalmente hemos estudiado los niveles de expresión de YKT6 en muestras de pacientes de CPCNP, observando que los pacientes con altos niveles de YKT6 tienen una supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad más corta y que esto se podría asociar a diferencias en los niveles de exosomas liberados al torrente sanguíneo por el tumor.

Los exosomas derivados de células tumorales son biomarcadores prometedores para el diagnóstico y pronóstico de los pacientes de cáncer. La liberación de exosomas se ha observado como un posible marcador pronóstico en algunos tumores, como en cáncer colorectal, donde los niveles de exosomas circulantes en plasma se correlacionan con una peor supervivencia(264). Los exosomas circulantes en sangre se han relacionado también a la preparación del nicho premetastático, observándose que la presencia en su superficie de diferentes tipos de integrinas media el proceso de metástasis de forma organotrópica. Además, la presencia de otras proteínas, por ejemplo el caso de EGFR(238) o de LRG1(239), en exosomas aislados de plasma u orina respectivamente, son de utilidad diagnóstica en cáncer de pulmón. El hecho de que la presencia de exosomas en pacientes de cáncer, derive en un peor pronóstico, hace que el estudio de los mecanismos de liberación de exosomas sea de interés clínico.

Debido a que algunas proteínas concretas involucradas en la biogénesis y liberación de exosomas se han observado necesarias en algunos tipos celulares, pero no afectan a la liberación de exosomas en otros tipos celulares, debe realizarse el estudio en cada caso concreto, como por ejemplo en cáncer, para determinar si una proteína está implicada en la liberación de exosomas por ese tipo celular y estudiar si los niveles de proteína en el tumor podrían ser marcadores sustitutos de los niveles de exosomas.

En el proceso de liberación de exosomas se ha observado que las proteínas SNARE podrían tener un papel importante. Las proteínas SNARE son mediadores clave en los eventos de

fusión de membranas en la vía secretora. Ykt6 es una proteína SNARE única, debido a que le falta el motivo C-terminal transmembrana, y está altamente conservada desde levaduras hasta humanos(265). Su localización se ha observado en el citosol, en la membrana y en las zonas perinucleares en células, y se ha visto implicada en múltiples pasos del transporte de vesículas en levaduras. Además, la inhibición de YKT6 en modelos de *Drosophila melanogaster* y estudios *in vitro* con células de mamífero HEK293 han demostrado que es necesaria para la liberación de exosomas que contienen Wnt. En las células de mamífero se observó que al inhibir YKT6 tanto el marcador exosomal CD81 como Wnt quedaban retenidos en los cuerpos multivesiculares donde se forman los exosomas, y que además CD63 era transferido a los lisosomas para su degradación. De todas formas, el proceso exacto en el que está involucrado YKT6, bien en la formación de los exosomas como vesículas intraluminales dentro de los cuerpos multivesiculares o bien en la fusión de estos con la membrana para su liberación se desconoce. Tomados en conjunto, estos hallazgos sugieren que Ykt6 es una proteína clave en la liberación de exosomas que se encuentra altamente regulada(265)(266).

Nuestros hallazgos han demostrado que la inhibición de YKT6 afecta gravemente la liberación de exosomas en la línea celular de cáncer de pulmón A549. Por otra parte, hemos identificado 6 miRNAs que podrían regular YKT6. De estos, validamos que 4 miRNAs, miR-34a, miR-134, miR-135a y miR-135b, participan en la regulación de YKT6 mediante el ensayo Renilla-Lucifera. Además, seleccionamos los dos miRNAs que afectaban de forma más efectiva YKT6, miR-134 y miR-135b, y validamos por western blot que disminuían los niveles de proteína Ykt6. La inhibición de YKT6 resultante de incrementar los niveles de miR-134 y miR-135b en la línea celular A549 también disminuye la liberación de exosomas.

En las muestras de pacientes de cáncer de pulmón de célula no pequeña, encontramos que los niveles de expresión del ARNm de YKT6 estaba infraexpresado en el tejido tumoral respecto al tejido normal del pulmón, mientras que los niveles de expresión de los miRNAs miR-134 y miR-135b se encontraban sobreexpresados en el tumor respecto al tejido normal, sugiriendo que que las diferencias en los niveles de expresión de YKT6 podrían deberse a la expresión diferencial de sus miRNAs reguladores. Aunque no encontramos una correlación negativa significativa entre los niveles de expresión de los miRNAs con la expresión de YKT6 en el tejido tumoral de los pacientes, en tejido normal sí que encontramos una correlación negativa entre los niveles de expresión de YKT6 y miR-135b, que podría explicar que la desregulación de la expresión de este miRNA en los tejidos tumorales lleve a la infraexpresión de YKT6.

De todas formas, una explicación alternativa para este hallazgo podría estar relacionada con la producción de un microambiente hipóxico durante el rápido crecimiento del tumor. Bajo condiciones de hipoxia, muchos genes, incluido YKT6, pueden sufrir cambios en los niveles de expresión. Por ejemplo, la expresión de YKT6 se ve infraexpresada significativamente en condiciones de hipoxia (1% O<sub>2</sub>) en células humanas epiteliales del túbulo proximal renal(267).

Durante la revisión bibliográfica, no se encontraron estudios que compararan la expresión de YKT6 entre tejido tumoral y normal, pero la proteína Rab27a, parte de la familia de Rab, que está involucrada en la regulación de la producción de exosomas y de su liberación, se ha visto infraexpresado en muestras de tumor en el carcinoma hepatocelular(268). En línea con nuestros resultados, miR-135b se ha visto sobreexpresado en células de cáncer de pulmón de célula no pequeña altamente invasivo(269) y miR-134 se ha visto sobreexpresado en tumores de pulmón, aunque no se ha encontrado correlación entre sus niveles de expresión y características clinicopatológicas o supervivencia(116).

Pocos estudios han examinado el impacto de la expresión de YKT6 en la supervivencia de los pacientes de cáncer. Nuestro hallazgo de que los niveles altos de YKT6 se asocian a una peor prognosis concuerdan con estudios previos en cáncer de mama, donde se identificó YKT6 como un posible gen relacionado con fenotipos invasivos y a tumorigénesis en líneas celulares(261). Además, los niveles altos de YKT6 se han postulado como un posible mecanismo de resistencia al tratamiento con docetaxel en tumores de cáncer de mama con p53 mutado(262). Interesantemente, un estudio *in silico*, en línea con nuestros resultados determina YKT6 como un factor pronóstico en cáncer de pulmón, donde los pacientes con altos niveles de YKT6 tienen una menor supervivencia global(270).

Los niveles altos de YKT6 en el tumor podrían llevar a una mayor liberación de exosomas, provocando un fenotipo más agresivo y una peor prognosis, ya que se conoce que los exosomas derivados de las células tumorales están involucrados en las capacidades de invasión celular, modulación del microambiente tumoral y diseminación del cáncer(220)(226). En un pequeño subconjunto de los pacientes de nuestro estudio, pudimos observar que aquellos pacientes clasificados para altos niveles de expresión de YKT6 tenían más exosomas en plasma que los pacientes con bajos niveles. Aunque estos resultados tienen que ser validados con un mayor número de muestras y técnicas, proporcionan los primeros indicadores de que los niveles de expresión de YKT6 en el tumor podrían actuar como marcador sustituto de los niveles de exosomas en plasma. Cabe señalar que otros genes relacionados con la liberación de exosomas se han relacionado previamente a cáncer. Por

ejemplo niveles altos de RAB27B se han correlacionado a mal pronóstico en cáncer de vejiga(271), páncreas(272), cáncer colorectal(273), y carcinoma hepatocelular(268).

En conclusión, vemos que el estudio e identificación de genes codificantes de proteína y de miRNAs involucrados en la liberación de exosomas pueden ser utilidad pronostica en pacientes de cáncer de pulmón de célula no pequeña. Hemos demostrado que la inhibición de YKT6 se asocia a una reducción remarcable de la liberación de exosomas en una línea celular de cáncer de pulmón y que los niveles bajos de expresión de YKT6 se asocian con un mejor pronóstico en los pacientes de CPCNP. Además, hemos identificado varios miRNAs que regulan los niveles de expresión de YKT6. El rol de estos miRNAs y de YKT6 en la liberación de exosomas y pronóstico en pacientes de cáncer requiere próximas investigaciones.

## 6. Conclusiones

1. YKT6 es un gen crucial para el proceso de liberación de exosomas en la línea celular A549 de CPCNP ya que su inhibición deriva en una reducción drástica en la liberación de exosomas.
2. Los miRNAs, miR-134 y miR-135b, participan en la regulación de los niveles celulares de YKT6.
3. miR-134 y miR-135b regulan la liberación de exosomas a través de su gen diana YKT6.
4. Los niveles de expresión de YKT6 se encuentran infraexpresados en el tejido tumoral respecto al tejido normal de los pacientes de cáncer de pulmón de célula no pequeña.
5. Los niveles de expresión de YKT6 son de utilidad pronóstico en los pacientes de cáncer de pulmón de célula no pequeña, al diferenciar un grupo de pacientes con niveles altos de expresión que tienen una menos supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad.
6. Los niveles YKT6 se relacionan con los niveles de exosomas en plasma de sangre periférica de los pacientes de cáncer de pulmón de célula no pequeña.



## 7. Bibliografía

1. I. A. for R. on C. W. H. O. IARC., GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. *GLOBOCAN* (2012).
2. American Cancer Society, Cancer facts & figures 2016 (2016).
3. J. R. Q. Jaume Galceran, Alberto Ameijide, Marià Carulla, Antonio Mateos, et al, Estimaciones de la incidencia y la supervivencia del cáncer en España y su situación en Europa. *Red Española Regist. Cáncer* (2014).
4. R. L. Siegel, K. D. Miller, A. Jemal, Cancer statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* **66**, 7–30 (2016).
5. N. Howlader *et al.*, SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012, National Cancer Institute. 2015).
6. B. L. Egleston, S. I. Meireles, D. B. Flieder, M. L. Clapper, Population-based trends in lung cancer incidence in women. *Semin. Oncol.* **36**, 506–15 (2009).
7. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al, SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013. *Natl. Cancer Inst.* (2016).
8. J.-C. Soria *et al.*, Chemoprevention of lung cancer. *Lancet Oncol.* **4**, 659–669 (2003).
9. M. J. Thun *et al.*, Early landmark studies of smoking and lung cancer. *Lancet Oncol.* **11**, 1200 (2010).
10. F. Mueller, Tabakmissbrauch und Lungencarcinom. *Zeitschrift für Krebsforsch.* (1939).
11. R. DOLL, A. B. HILL, Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. *Br. Med. J.* **2**, 739–48 (1950).
12. E. L. WYNDER, E. A. GRAHAM, Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma; a study of 684 proved cases. *J. Am. Med. Assoc.* **143**, 329–36 (1950).
13. S. Gandini *et al.*, Tobacco smoking and cancer: A meta-analysis. *Int. J. Cancer.* **122**, 155–164 (2008).
14. S. S. Hecht, Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *Curr. Cancer Res.* **6**, 53–74 (2011).
15. S. S. Hecht *et al.*, Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *Lancet Oncol.* **3**, 461–469 (2002).
16. D. Tang *et al.*, Association between carcinogen-DNA adducts in white blood cells and lung cancer risk in the physicians health study. *Cancer Res.* **61**, 6708–12 (2001).
17. M. F. Denissenko, A. Pao, M. Tang, G. P. Pfeifer, Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science.* **274**, 430–2 (1996).
18. K. Rikova *et al.*, Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell.* **131**, 1190–203 (2007).
19. J. E. Tyczynski, F. Bray, D. M. Parkin, Lung cancer in Europe in 2000: epidemiology, prevention, and early detection. *Lancet Oncol.* **4** (2003).

20. P. Correa, E. Fontham, L. Williams Pickle, Y. Lin, W. Haenszel, PASSIVE SMOKING AND LUNG CANCER. *Lancet*. **322**, 595–597 (1983).
21. S. De Matteis, D. Consonni, P. A. Bertazzi, Exposure to occupational carcinogens and lung cancer risk. Evolution of epidemiological estimates of attributable fraction. *Acta Biomed. l'Ateneo Parm.* **79**, 34–42 (2008).
22. J. Lissowska *et al.*, Family history and lung cancer risk: international multicentre case-control study in Eastern and Central Europe and meta-analyses. *Cancer Causes Control*. **21**, 1091–104 (2010).
23. A. G. Hussein, H. F. Pasha, H. M. El-Shahat, D. M. Gad, M. M. Toam, CYP1A1 gene polymorphisms and smoking status as modifier factors for lung cancer risk. *Gene*. **541**, 26–30 (2014).
24. R. Kazma *et al.*, Lung cancer and DNA repair genes: multilevel association analysis from the International Lung Cancer Consortium. *Carcinogenesis*. **33**, 1059–64 (2012).
25. M. Campayo *et al.*, Single nucleotide polymorphisms in tobacco metabolism and DNA repair genes and prognosis in resected non-small-cell lung cancer. *J. Surg. Res.* **167**, e5-12 (2011).
26. M. T. Landi *et al.*, A genome-wide association study of lung cancer identifies a region of chromosome 5p15 associated with risk for adenocarcinoma. *Am. J. Hum. Genet.* **85**, 679–91 (2009).
27. T. Truong *et al.*, Replication of lung cancer susceptibility loci at chromosomes 15q25, 5p15, and 6p21: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium. *J. Natl. Cancer Inst.* **102**, 959–71 (2010).
28. R. Sherva *et al.*, Association of a single nucleotide polymorphism in neuronal acetylcholine receptor subunit alpha 5 (CHRNA5) with smoking status and with “pleasurable buzz” during early experimentation with smoking. *Addiction*. **103**, 1544–52 (2008).
29. T. E. Thorgeirsson *et al.*, A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature*. **452**, 638–42 (2008).
30. I. Le Jeune *et al.*, The incidence of cancer in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK. *Respir. Med.* **101**, 2534–2540 (2007).
31. D. S. Ettinger *et al.*, Non-small cell lung cancer, version 2.2013. *J Natl Compr Canc Netw*. **11**, 645–53; quiz 653 (2013).
32. A. M. Varghese *et al.*, Small-cell lung cancers in patients who never smoked cigarettes. *J. Thorac. Oncol.* **9**, 892–6 (2014).
33. Y. Kato, T. B. Ferguson, D. E. Bennett, T. H. Burford, Oat cell carcinoma of the lung. A review of 138 cases. *Cancer*. **23**, 517–24 (1969).
34. G. P. Kalemkerian *et al.*, Small cell lung cancer. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* **11**, 78–98 (2013).
35. R. Govindan *et al.*, Changing epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results database. *J. Clin. Oncol.* **24**, 4539–44 (2006).
36. International Agency for Research on Cancer *et al.*, *WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart* (2004).

37. W. D. Travis *et al.*, International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society: international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma: executive summary. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **8**, 381–5 (2011).
38. S. A. Khuder, Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: A meta-analysis. *Lung Cancer.* **31**, 139–148 (2001).
39. J. F. Tomashefski, D. H. Dail, D. H. Dail, *Dail and Hammar's pulmonary pathology* (Springer, 2008).
40. J. Heck, Lung Cancer in a US Population with Low to Moderate Arsenic Exposure. *Environ. Health Perspect.* (2009).
41. M. Campayo *et al.*, A dual role for KRT81: a miR-SNP associated with recurrence in non-small-cell lung cancer and a novel marker of squamous cell lung carcinoma. *PLoS One.* **6**, e22509 (2011).
42. Z. Chen, C. M. Fillmore, P. S. Hammerman, C. F. Kim, K.-K. Wong, Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat. Rev. Cancer.* **14**, 535–546 (2014).
43. J. P. Sullivan, J. D. Minna, J. W. Shay, Evidence for self-renewing lung cancer stem cells and their implications in tumor initiation, progression, and targeted therapy. *Cancer Metastasis Rev.* **29** (2010).
44. Z. Chen, C. M. Fillmore, P. S. Hammerman, C. F. Kim, K.-K. Wong, Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat. Rev. Cancer.* **14**, 535–546 (2014).
45. M. R. Davidson, A. F. Gazdar, B. E. Clarke, The pivotal role of pathology in the management of lung cancer. *J. Thorac. Dis.* **5 Suppl 5**, S463-78 (2013).
46. P. R. Tata *et al.*, Dedifferentiation of committed epithelial cells into stem cells in vivo. *Nature.* **503**, 218–23 (2013).
47. C. T. Jordan, M. L. Guzman, M. Noble, Cancer Stem Cells. *N Engl J Med.* **355**, 1253–61 (2006).
48. J. E. Visvader, Cells of origin in cancer. *Nature.* **469**, 314–22 (2011).
49. N. Zakaria *et al.*, Human non-small cell lung cancer expresses putative cancer stem cell markers and exhibits the transcriptomic profile of multipotent cells. *BMC Cancer.* **15**, 84 (2015).
50. D. Warshawsky, J. R. Landolph, *Molecular carcinogenesis and the molecular biology of human cancer* (CRC, Taylor and Francis, 2006).
51. A. K. Greenberg *et al.*, Preneoplastic lesions of the lung. *Respir. Res.* **3**, 13 (2002).
52. D. Hanahan, R. A. Weinberg, The hallmarks of cancer. *Cell.* **100**, 57–70 (2000).
53. D. Hanahan *et al.*, Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* **144**, 646–674 (2011).
54. C. Swanton, R. Govindan, Clinical Implications of Genomic Discoveries in Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **374**, 1864–1873 (2016).
55. E. Brzezińska, A. Dutkowska, A. Antczak, The significance of epigenetic alterations in lung carcinogenesis. *Mol. Biol. Rep.* **40**, 309–25 (2013).

56. R. S. Herbst, J. V Heymach, S. M. Lippman, Molecular Origins of Cancer Lung Cancer. *N Engl J Med.* **359**, 1367–80 (2008).
57. D. S. Krause, R. A. Van Etten, Tyrosine Kinases as Targets for Cancer Therapy. *N Engl J Med.* (2005).
58. T. J. Grob *et al.*, Heterogeneity of ERBB2 amplification in adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and large cell undifferentiated carcinoma of the lung. *Mod. Pathol. Publ.* (2012).
59. T. Sasaki, S. J. Rodig, L. R. Chirieac, P. A. Jänne, The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *Eur. J. Cancer.* **46**, 1773–80 (2010).
60. G. J. Riely, J. Marks, W. Pao, KRAS mutations in non-small cell lung cancer. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **6**, 201–5 (2009).
61. P. P. Massion *et al.*, Early involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in lung cancer progression. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **170**, 1088–94 (2004).
62. C. Fumarola, M. A. Bonelli, P. G. Petronini, R. R. Alfieri, Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer. *Biochem. Pharmacol.* **90**, 197–207 (2014).
63. A. Mogi, H. Kuwano, TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 583929 (2011).
64. H. F. Horn, K. H. Vousden, Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene.* **26**, 1306–1316 (2007).
65. S. L. Harris, A. J. Levine, The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene.* **24**, 2899–2908 (2005).
66. K. W. Tam *et al.*, CDKN2A/p16 inactivation mechanisms and their relationship to smoke exposure and molecular features in non-small-cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* **8**, 1378–88 (2013).
67. N. Ohtani, K. Yamakoshi, A. Takahashi, E. Hara, The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J. Med. Invest.* **51**, 146–53 (2004).
68. H. S. Zhang, A. A. Postigo, D. C. Dean, Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by p16INK4a, TGFbeta, and contact inhibition. *Cell.* **97**, 53–61 (1999).
69. R. A. Kratzke *et al.*, Rb and p16INK4a expression in resected non-small cell lung tumors. *Cancer Res.* **56**, 3415–20 (1996).
70. R. J. Shaw *et al.*, The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 3329–35 (2004).
71. D. B. Shackelford, R. J. Shaw, The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer.* **9**, 563–75 (2009).
72. M. Sanchez-Cespedes *et al.*, Inactivation of LKB1/STK11 is a common event in adenocarcinomas of the lung. *Cancer Res.* **62**, 3659–62 (2002).
73. S. Taga, T. Osaki, A. Ohgami, H. Imoto, K. Yasumoto, Prognostic impact of telomerase activity in non-small cell lung cancers. *Ann. Surg.* **230**, 715–20 (1999).

74. C.-Q. Zhu *et al.*, Amplification of telomerase (hTERT) gene is a poor prognostic marker in non-small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer*. **94**, 1452–9 (2006).
75. V. K. Anagnostou *et al.*, High expression of BCL-2 predicts favorable outcome in non-small cell lung cancer patients with non squamous histology. *BMC Cancer*. **10**, 186 (2010).
76. D. E. Ost, S.-C. J. Yeung, L. T. Tanoue, M. K. Gould, Clinical and organizational factors in the initial evaluation of patients with lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. **143**, e121S–41S (2013).
77. V. R. D. Kakhki, Positron emission tomography in the management of lung cancer. *Ann. Thorac. Med.* **2**, 69–76 (2007).
78. Y. H. Kim, H. Nagai, H. Ozasa, Y. Sakamori, M. Mishima, Therapeutic strategy for non-small-cell lung cancer patients with brain metastases (Review). *Biomed. reports*. **1**, 691–696 (2013).
79. P. Goldstraw *et al.*, The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J. Thorac. Oncol.* **2**, 706–714 (2007).
80. Z. Sun *et al.*, Histologic grade is an independent prognostic factor for survival in non-small cell lung cancer: an analysis of 5018 hospital- and 712 population-based cases. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **131**, 1014–20 (2006).
81. F. Tas, Age is a prognostic factor affecting survival in lung cancer patients. *Oncol. Lett.* (2013).
82. A. L. Visbal *et al.*, Gender differences in non-small-cell lung cancer survival: an analysis of 4,618 patients diagnosed between 1997 and 2002. *Ann. Thorac. Surg.* **78**, 209–15; discussion 215 (2004).
83. Biomarkers Definitions Working Group., Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* **69**, 89–95 (2001).
84. R. J. Ginsberg, L. V Rubinstein, Randomized trial of lobectomy versus limited resection for T1 N0 non-small cell lung cancer. Lung Cancer Study Group. *Ann. Thorac. Surg.* **60**, 615–22–3 (1995).
85. T. D. Yan, D. Black, P. G. Bannon, B. C. McCaughan, Systematic review and meta-analysis of randomized and nonrandomized trials on safety and efficacy of video-assisted thoracic surgery lobectomy for early-stage non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **27**, 2553–62 (2009).
86. H. Wagner, Image-guided conformal radiation therapy planning and delivery for non-small-cell lung cancer. *Cancer Control*. **10**, 277–88 (2003).
87. X. Hu *et al.*, Is IMRT Superior or Inferior to 3DCRT in Radiotherapy for NSCLC? A Meta-Analysis. *PLoS One*. **11**, e0151988 (2016).
88. B. Emami *et al.*, Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **21**, 109–22 (1991).
89. J. Vansteenkiste *et al.*, 2nd ESMO Consensus Conference on Lung Cancer: early-stage non-small-cell lung cancer consensus on diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **25**, 1462–74 (2014).

90. P. B. Bach *et al.*, Benefits and harms of CT screening for lung cancer: a systematic review. *JAMA*. **307**, 2418–29 (2012).
91. P. Maisonneuve *et al.*, Lung cancer risk prediction to select smokers for screening CT--a model based on the Italian COSMOS trial. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. **4**, 1778–89 (2011).
92. W. J. Scott *et al.*, Treatment of non-small cell lung cancer stage I and stage II: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*. **132**, 234S–242S (2007).
93. A. Juretic, H. Sobat, M. Samija, Combined modality therapy of non-small cell lung cancers. *Ann. Oncol.* **10 Suppl 6**, 93–8 (1999).
94. A. Carretta *et al.*, Results of surgical treatment after neoadjuvant chemotherapy for stage III non-small cell lung cancer. *World J. Surg.* **32**, 2636–42 (2008).
95. A. C. Moreno *et al.*, Impact of preoperative radiation on survival of patients with T3N0 &gt;7-cm non-small cell lung cancers treated with anatomic resection using the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *J. Surg. Res.* **184**, 10–18 (2013).
96. T. E. Stinchcombe, M. A. Socinski, Considerations for second-line therapy of non-small cell lung cancer. *Oncologist*. **13 Suppl 1**, 28–36 (2008).
97. T. Ciuleanu *et al.*, Maintenance pemetrexed plus best supportive care versus placebo plus best supportive care for non-small-cell lung cancer: a randomised, double-blind, phase 3 study. *Lancet (London, England)*. **374**, 1432–40 (2009).
98. F. Cappuzzo *et al.*, Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet. Oncol.* **11**, 521–9 (2010).
99. F. A. Shepherd *et al.*, Erlotinib in Previously Treated Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **353**, 123–132 (2005).
100. F. Cappuzzo, L. Bemis, M. Varella-Garcia, *HER2* Mutation and Response to Trastuzumab Therapy in Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **354**, 2619–2621 (2006).
101. F. A. Shepherd, J.-Y. Douillard, G. R. Blumenschein, Immunotherapy for non-small cell lung cancer: novel approaches to improve patient outcome. *J. Thorac. Oncol.* **6**, 1763–73 (2011).
102. J. He, Y. Hu, M. Hu, B. Li, Development of PD-1/PD-L1 Pathway in Tumor Immune Microenvironment and Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer. *Sci. Rep.* **5**, 13110 (2015).
103. R. Pirker *et al.*, Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet (London, England)*. **373**, 1525–31 (2009).
104. H. Chial, DNA sequencing technologies key to the Human Genome Project. *Nat. Educ.* **1**, 219 (2008).
105. J. C. Venter *et al.*, The sequence of the human genome. *Science*. **291**, 1304–51 (2001).
106. ENCODE Project Consortium *et al.*, Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*.

- 447, 799–816 (2007).
107. J. R. Ecker *et al.*, Genomics: ENCODE explained. *Nature*. **489**, 52–5 (2012).
  108. R. P. Alexander, G. Fang, J. Rozowsky, M. Snyder, M. B. Gerstein, Annotating non-coding regions of the genome. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 559–571 (2010).
  109. T. R. Mercer, M. E. Dinger, J. S. Mattick, Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 155–9 (2009).
  110. L. He, G. J. Hannon, MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 522–31 (2004).
  111. R. C. Lee, R. L. Feinbaum, V. Ambros, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. **75**, 843–854 (1993).
  112. S. L. Ameres, P. D. Zamore, Diversifying microRNA sequence and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 475–88 (2013).
  113. B. J. Reinhart *et al.*, The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. **403**, 901–6 (2000).
  114. G. Ruvkun *et al.*, Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*. **408**, 86–89 (2000).
  115. A. E. Pasquinelli *et al.*, Expression of the 22 nucleotide *let-7* heterochronic RNA throughout the Metazoa: a role in life history evolution? *Evol. Dev.* **5**, 372–8.
  116. F. Mirzadeh Azad *et al.*, Two lung development-related microRNAs, miR-134 and miR-187, are differentially expressed in lung tumors. *Gene* (2015).
  117. L. P. Lim, M. E. Glasner, S. Yekta, C. B. Burge, D. P. Bartel, Vertebrate microRNA genes. *Science*. **299**, 1540 (2003).
  118. M. Ha, V. N. Kim, Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 509–24 (2014).
  119. M. Esteller, Non-coding RNAs in human disease. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 861–74 (2011).
  120. M. D. Jansson, A. H. Lund, MicroRNA and cancer. *Mol. Oncol.* **6**, 590–610 (2012).
  121. J. Krutzfeldt, M. N. Poy, M. Stoffel, Strategies to determine the biological function of microRNAs (2006).
  122. R. Garzon, G. Marcucci, C. M. Croce, Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 775–89 (2010).
  123. R. C. Friedman, K. K.-H. Farh, C. B. Burge, D. P. Bartel, Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* **19**, 92–105 (2009).
  124. V. Ambros *et al.*, A uniform system for microRNA annotation. *RNA*. **9**, 277–9 (2003).
  125. A. Rodriguez, S. Griffiths-Jones, J. L. Ashurst, A. Bradley, Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* **14**, 1902–10 (2004).
  126. G. M. Borchert, W. Lanier, B. L. Davidson, RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 1097–1101 (2006).
  127. R. I. Gregory *et al.*, The Microprocessor complex mediates the genesis of

- microRNAs. *Nature*. **432**, 235–240 (2004).
128. N. C. Lau, L. P. Lim, E. G. Weinstein, D. P. Bartel, An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* (80-. ). **294** (2001).
  129. J. Winter, S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory, S. Diederichs, Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* (2009).
  130. T. P. Chendrimada *et al.*, TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. **436**, 740–4 (2005).
  131. Y. Kim, V. N. Kim, MicroRNA Factory: RISC Assembly from Precursor MicroRNAs. *Mol. Cell*. **46**, 384–386 (2012).
  132. G. Meister, Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 447–459 (2013).
  133. S. Lin, R. I. Gregory, MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat. Publ. Gr.* **15** (2015), doi:10.1038/nrc3932.
  134. D. P. Bartel, MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*. **136** (2009), pp. 215–233.
  135. G. A. Calin, C. M. Croce, MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer*. **6**, 857–866 (2006).
  136. S. Jonas, E. Izaurralde, Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat. Rev. Genet.* **16**, 421–33 (2015).
  137. G. MATHONNET *et al.*, MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science*. **317**, 1764–7 (2007).
  138. A. M. Eiring *et al.*, miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell*. **140**, 652–65 (2010).
  139. P. A. Thibault *et al.*, Regulation of Hepatitis C Virus Genome Replication by Xrn1 and MicroRNA-122 Binding to Individual Sites in the 5' Untranslated Region. *J. Virol.* **89**, 6294–311 (2015).
  140. I. Lee *et al.*, New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Res.* **19**, 1175–83 (2009).
  141. S. Gonzalez, D. G. Pisano, M. Serrano, Mechanistic principles of chromatin remodeling guided by siRNAs and miRNAs. *Cell Cycle*. **7**, 2601–8 (2008).
  142. B. Khraiweh *et al.*, Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell*. **140**, 111–22 (2010).
  143. E. Huntzinger, E. Izaurralde, Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 99–110 (2011).
  144. F. Akbari Moqadam, R. Pieters, M. L. den Boer, The hunting of targets: challenge in miRNA research. *Leukemia*. **27**, 16–23 (2013).
  145. G. A. Calin *et al.*, Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 15524–9 (2002).
  146. E. Bandrés *et al.*, Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol.*

- Cancer*. **5**, 29 (2006).
147. G. A. Calin *et al.*, Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 2999–3004 (2004).
  148. F. Sato, S. Tsuchiya, S. J. Meltzer, K. Shimizu, MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J.* **278**, 1598–609 (2011).
  149. D. Chacon-Cortes *et al.*, Genetic association analysis of miRNA SNPs implicates MIR145 in breast cancer susceptibility. *BMC Med. Genet.* **16**, 107 (2015).
  150. A. Esquela-Kerscher, F. J. Slack, Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **6**, 259–69 (2006).
  151. H. Lan, H. Lu, X. Wang, H. Jin, MicroRNAs as Potential Biomarkers in Cancer: Opportunities and Challenges. *Biomed Res. Int.* **2015**, 125094 (2015).
  152. M. Fabbri *et al.*, MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 15805–10 (2007).
  153. C. A. Gebeshuber, K. Zatloukal, J. Martinez, miR-29a suppresses tristetraprolin, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis. *EMBO Rep.* **10**, 400–5 (2009).
  154. J. Ma, C. Dong, C. Ji, MicroRNA and drug resistance. *Cancer Gene Ther.* **17**, 523–31 (2010).
  155. D. Y. Lee, Z. Deng, C.-H. Wang, B. B. Yang, MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 20350–5 (2007).
  156. B. Chen *et al.*, Roles of microRNA on cancer cell metabolism. *J. Transl. Med.* **10**, 228 (2012).
  157. N. Pencheva, S. F. Tavazoie, Control of metastatic progression by microRNA regulatory networks. *Nat. Cell Biol.* **15**, 546–54 (2013).
  158. P. Joshi, J. Middleton, Y.-J. Jeon, M. Garofalo, MicroRNAs in lung cancer. *World J. Methodol.* **4**, 59–72 (2014).
  159. J. Takamizawa *et al.*, Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* **64**, 3753–6 (2004).
  160. N. Yanaihara *et al.*, Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell.* **9**, 189–98 (2006).
  161. P. S. Eis *et al.*, Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 3627–32 (2005).
  162. Y.-X. Zhang *et al.*, Cisplatin upregulates MSH2 expression by reducing miR-21 to inhibit A549 cell growth. *Biomed. Pharmacother. = Biomédecine pharmacothérapie.* **67**, 97–102 (2013).
  163. E. Gallardo *et al.*, miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Carcinogenesis.* **30**, 1903–9 (2009).
  164. R. Tejero *et al.*, miR-141 and miR-200c as markers of overall survival in early stage non-small cell lung cancer adenocarcinoma. *PLoS One.* **9**, e101899 (2014).

165. C.-J. Chang *et al.*, p53 regulates epithelial–mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. *Nat. Cell Biol.* **13**, 317–323 (2011).
166. M. Rodríguez *et al.*, Different exosome cargo from plasma/bronchoalveolar lavage in non-small-cell lung cancer. *Genes. Chromosomes Cancer.* **53**, 713–24 (2014).
167. S. Wang *et al.*, Identification of plasma microRNA profiles for primary resistance to EGFR-TKIs in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with EGFR activating mutation. *J. Hematol. Oncol.* **8**, 127 (2015).
168. J. Silva *et al.*, Vesicle-related microRNAs in plasma of nonsmall cell lung cancer patients and correlation with survival. *Eur. Respir. J.* **37**, 617–23 (2011).
169. M. Colombo, G. Raposo, C. Théry, Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**, 255–289 (2014).
170. R. Crescitelli *et al.*, Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J. Extracell. vesicles.* **2** (2013).
171. D. Di Vizio *et al.*, Oncosome formation in prostate cancer: association with a region of frequent chromosomal deletion in metastatic disease. *Cancer Res.* **69**, 5601–9 (2009).
172. B. György *et al.*, Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 2667–88 (2011).
173. W. Stoorvogel, M. J. Kleijmeer, H. J. Geuze, G. Raposo, The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic.* **3**, 321–30 (2002).
174. R. M. Johnstone, M. Adam, J. R. Hammond, L. Orr, C. Turbide, Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* **262**, 9412–20 (1987).
175. G. Raposo *et al.*, B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* **183**, 1161–72 (1996).
176. L. Zitvogel *et al.*, Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Med.* **4**, 594–600 (1998).
177. G. van Niel *et al.*, Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology.* **121**, 337–49 (2001).
178. A. Lukic *et al.*, Pulmonary epithelial cancer cells and their exosomes metabolize myeloid cell-derived leukotriene C4 to leukotriene D4. *J. Lipid Res.* **57**, 1659–69 (2016).
179. K. Yuyama *et al.*, A potential function for neuronal exosomes: sequestering intracerebral amyloid- $\beta$  peptide. *FEBS Lett.* **589**, 84–8 (2015).
180. A. Lo Cicero *et al.*, Exosomes released by keratinocytes modulate melanocyte pigmentation. *Nat. Commun.* **6**, 7506 (2015).
181. V. Luga, J. L. Wrana, Tumor-stroma interaction: Revealing fibroblast-secreted exosomes as potent regulators of Wnt-planar cell polarity signaling in cancer metastasis. *Cancer Res.* **73**, 6843–7 (2013).
182. M. Tkach *et al.*, Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell.* **164**, 1226–1232 (2016).

183. J. Ratajczak, M. Wysoczynski, F. Hayek, A. Janowska-Wieczorek, M. Z. Ratajczak, Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*. **20**, 1487–95 (2006).
184. H. Valadi *et al.*, Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 654–659 (2007).
185. A. V. Vlassov, S. Magdaleno, R. Setterquist, R. Conrad, Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1820**, 940–948 (2012).
186. M. N. Madison, R. J. Roller, C. M. Okeoma, Human semen contains exosomes with potent anti-HIV-1 activity. *Retrovirology*. **11**, 102 (2014).
187. Q. Zhou *et al.*, Immune-related MicroRNAs are Abundant in Breast Milk Exosomes. *Int. J. Biol. Sci.* **8**, 118–123 (2012).
188. M. I. Zonneveld *et al.*, Recovery of extracellular vesicles from human breast milk is influenced by sample collection and vesicle isolation procedures. *J. Extracell. vesicles*. **3** (2014).
189. B. Levänen *et al.*, Altered microRNA profiles in bronchoalveolar lavage fluid exosomes in asthmatic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* **131**, 894–903 (2013).
190. M. Rodríguez *et al.*, Different exosome cargo from plasma/bronchoalveolar lavage in non-small-cell lung cancer. *Genes, Chromosom. Cancer*. (2014).
191. C. Lässer *et al.*, Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J. Transl. Med.* **9**, 9 (2011).
192. A. Øverbye *et al.*, Identification of prostate cancer biomarkers in urinary exosomes. *Oncotarget*. **6**, 30357–76 (2015).
193. P. Vader *et al.*, Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy. *Trends Mol. Med.* **20**, 385–393 (2014).
194. J. Kowal, M. Tkach, C. Théry, Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **29C**, 116–125 (2014).
195. M. Colombo *et al.*, Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J. Cell Sci.* **126**, 5553–65 (2013).
196. C. Théry, L. Zitvogel, S. Amigorena, Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 569–79 (2002).
197. C. Théry, S. Amigorena, G. Raposo, A. Clayton, Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol.* (2006).
198. S. Stuffers, C. Sem Wegner, H. Stenmark, A. Brech, Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic*. **10**, 925–37 (2009).
199. K. Trajkovic *et al.*, Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*. **319**, 1244–7 (2008).
200. K. Denzer, M. J. Kleijmeer, H. F. Heijnen, W. Stoorvogel, H. J. Geuze, Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J. Cell Sci.* **113 Pt 19**, 3365–74 (2000).

201. A. Savina, M. Vidal, M. I. Colombo, The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J. Cell Sci.* **115**, 2505–15 (2002).
202. A. Bobrie *et al.*, Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression. *Cancer Res.* **72**, 4920–30 (2012).
203. M. Ostrowski *et al.*, Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat. Cell Biol.* **12**, 19–30–13 (2010).
204. C. Hsu *et al.*, Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J. Cell Biol.* **189**, 223–232 (2010).
205. W. Li *et al.*, Rab27A regulates exosome secretion from lung adenocarcinoma cells A549: involvement of EPI64. *APMIS.* **122**, 1080–7 (2014).
206. P. D. Robbins, A. E. Morelli, Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 195 (2014).
207. K. Laulagnier *et al.*, Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem. J.* **380**, 161–71 (2004).
208. A. Llorente *et al.*, Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* **1831**, 1302–1309 (2013).
209. A. Bobrie, M. Colombo, G. Raposo, C. Théry, Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic.* **12**, 1659–68 (2011).
210. M. Frydrychowicz, A. Kolecka-Bednarczyk, M. Madejczyk, S. Yasar, G. Dworacki, Exosomes - structure, biogenesis and biological role in non-small-cell lung cancer. *Scand. J. Immunol.* **81**, 2–10 (2015).
211. S. A. Melo *et al.*, Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis. *Cancer Cell.* **26**, 707–721 (2014).
212. A. Ahadi *et al.*, Long non-coding RNAs harboring miRNA seed regions are enriched in prostate cancer exosomes. *Sci. Rep.* **6**, 24922 (2016).
213. X. Huang *et al.*, Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics.* **14**, 319 (2013).
214. C. Kahlert *et al.*, Identification of doublestranded genomic dna spanning all chromosomes with mutated KRAS and P53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *J. Biol. Chem.* **289**, 3869–3875 (2014).
215. S. Keerthikumar *et al.*, “ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo” (2016), , doi:10.1016/j.jmb.2015.09.019.
216. S. Paget, THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. *Lancet.* **133**, 571–573 (1889).
217. S. Boukouris, S. Mathivanan, Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers. *Proteomics. Clin. Appl.* **9**, 358–67 (2015).
218. X. Zhang *et al.*, Exosomes in cancer: small particle, big player. *J. Hematol. Oncol.* **8**, 83 (2015).
219. M. Simons, G. Raposo, Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 575–81 (2009).

220. N. Syn, L. Wang, G. Sethi, J.-P. Thiery, B.-C. Goh, Exosome-Mediated Metastasis: From Epithelial-Mesenchymal Transition to Escape from Immunosurveillance. *Trends Pharmacol. Sci.* **37**, 606–17 (2016).
221. B. Soldevilla *et al.*, Tumor-derived exosomes are enriched in  $\Delta Np73$ , which promotes oncogenic potential in acceptor cells and correlates with patient survival. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 467–78 (2014).
222. I. V Miller, T. G. P. Grunewald, Tumour-derived exosomes: Tiny envelopes for big stories. *Biol. Cell* (2015).
223. M. Lv *et al.*, Exosomes mediate drug resistance transfer in MCF-7 breast cancer cells and a probable mechanism is delivery of P-glycoprotein. *Tumour Biol.* **35**, 10773–9 (2014).
224. X. Xiao *et al.*, Exosomes: Decreased Sensitivity of Lung Cancer A549 Cells to Cisplatin. *PLoS One.* **9**, e89534 (2014).
225. Y. Liu *et al.*, Tumor Exosomal RNAs Promote Lung Pre-metastatic Niche Formation by Activating Alveolar Epithelial TLR3 to Recruit Neutrophils. *Cancer Cell.* **30**, 243–256 (2016).
226. H. Peinado *et al.*, Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* **18**, 883–91 (2012).
227. C. A. Franzen *et al.*, Urothelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition after exposure to muscle invasive bladder cancer exosomes. *Oncogenesis.* **4**, e163 (2015).
228. G. K. Alderton, Metastasis: Exosomes drive premetastatic niche formation. *Nat. Rev. Cancer.* **12** (2012), pp. 447–447.
229. Y. Liu, X. Cao, Organotropic metastasis: role of tumor exosomes. *Cell Res.* **26**, 149–150 (2016).
230. A. Hoshino *et al.*, Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature.* **527** (2015).
231. H.-G. Zhang, W. E. Grizzle, Exosomes and cancer: a newly described pathway of immune suppression. *Clin. Cancer Res.* **17**, 959–64 (2011).
232. A. Clayton, Cancer cells use exosomes as tools to manipulate immunity and the microenvironment. *Oncoimmunology.* **1**, 78–80 (2012).
233. D. D. Taylor, C. Gercel-Taylor, Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated immunosuppressive microenvironments. *Semin. Immunopathol.* **33**, 441–54 (2011).
234. M. Lundholm *et al.*, Prostate tumor-derived exosomes down-regulate NKG2D expression on natural killer cells and CD8+ T cells: mechanism of immune evasion. *PLoS One.* **9**, e108925 (2014).
235. S. A. Melo *et al.*, Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* (2015).
236. X.-Q. Li *et al.*, Exosomes derived from gefitinib-treated EGFR-mutant lung cancer cells alter cisplatin sensitivity via up-regulating autophagy. *Oncotarget.* **7**, 24585–95 (2016).
237. X. Yu, S. L. Harris, A. J. Levine, The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res.* **66**, 4795–801 (2006).

238. T. Yamashita *et al.*, Epidermal growth factor receptor localized to exosome membranes as a possible biomarker for lung cancer diagnosis. *Pharmazie*. **68**, 969–73 (2013).
239. Y. Li, Y. Zhang, F. Qiu, Z. Qiu, Proteomic identification of exosomal LRG1: a potential urinary biomarker for detecting NSCLC. *Electrophoresis*. **32**, 1976–83 (2011).
240. K. R. Jakobsen *et al.*, Exosomal proteins as potential diagnostic markers in advanced non-small cell lung carcinoma. *J. Extracell. vesicles*. **4**, 26659 (2015).
241. B. Sandfeld-Paulsen *et al.*, Exosomal Proteins as Diagnostic Biomarkers in Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **0**, 1462–1474 (2016).
242. G. Rabinowits, C. Gerçel-Taylor, J. M. Day, D. D. Taylor, G. H. Kloecker, Exosomal MicroRNA: A Diagnostic Marker for Lung Cancer. *Clin. Lung Cancer*. **10**, 42–46 (2009).
243. V. N. Aushev *et al.*, Comparisons of microRNA patterns in plasma before and after tumor removal reveal new biomarkers of lung squamous cell carcinoma. *PLoS One*. **8**, e78649 (2013).
244. M. Giallombardo *et al.*, Exosomal miRNA Analysis in Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) Patients' Plasma Through qPCR: A Feasible Liquid Biopsy Tool. *J. Vis. Exp.* (2016), doi:10.3791/53900.
245. V. Rossi *et al.*, Longins and their longin domains: regulated SNAREs and multifunctional SNARE regulators, *Trends Biochem Sci.* (2004).
246. J. A. McNew *et al.*, Ykt6p, a prenylated SNARE essential for endoplasmic reticulum-golgi transport. *J. Biol. Chem.* **272**, 17776–17783 (1997).
247. D. E. Gordon, L. M. Bond, D. A. Sahlender, A. A. Peden, A targeted siRNA screen to identify SNAREs required for constitutive secretion in mammalian cells. *Traffic*. **11**, 1191–204 (2010).
248. T. Zhang, W. Hong, Ykt6 forms a SNARE complex with syntaxin 5, GS28, and Bet1 and participates in a late stage in endoplasmic reticulum-Golgi transport. *J. Biol. Chem.* **276**, 27480–7 (2001).
249. Y. Xu, S. Martin, D. E. James, W. Hong, GS15 forms a SNARE complex with syntaxin 5, GS28, and Ykt6 and is implicated in traffic in the early cisternae of the Golgi apparatus. *Mol. Biol. Cell*. **13**, 3493–507 (2002).
250. G. Tai *et al.*, Participation of the syntaxin 5/Ykt6/GS28/GS15 SNARE complex in transport from the early/recycling endosome to the trans-Golgi network. *Mol. Biol. Cell*. **15**, 4011–22 (2004).
251. H. Hasegawa *et al.*, Mammalian ykt6 is a neuronal SNARE targeted to a specialized compartment by its profilin-like amino terminal domain. *Mol. Biol. Cell*. **14**, 698–720 (2003).
252. N. Thayanidhi *et al.*, R-SNARE ykt6 resides in membrane-associated protease-resistant protein particles and modulates cell cycle progression when over-expressed. *Biol. Cell*. **104**, 397–417 (2012).
253. M. Kahn, Can we safely target the WNT pathway? *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 513–32 (2014).
254. J. C. Gross, V. Chaudhary, K. Bartscherer, M. Boutros, Active Wnt proteins are

- secreted on exosomes. *Nat. Cell Biol.* **14**, 1036–45 (2012).
255. W. Wen *et al.*, Lipid-Induced conformational switch controls fusion activity of longin domain SNARE Ykt6. *Mol. Cell.* **37**, 383–95 (2010).
  256. R. B. Sutton, D. Fasshauer, R. Jahn, a T. Brunger, Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature.* **395**, 347–353 (1998).
  257. F. Filippini *et al.*, Longins: A new evolutionary conserved VAMP family sharing a novel SNARE domain. *Trends Biochem. Sci.* **26** (2001).
  258. L. Ayong, T. DaSilva, J. Mauser, C. M. Allen, D. Chakrabarti, Evidence for prenylation-dependent targeting of a Ykt6 SNARE in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **175**, 162–168 (2011).
  259. M. Fukasawa, O. Varlamov, W. S. Eng, T. H. Söllner, J. E. Rothman, Localization and activity of the SNARE Ykt6 determined by its regulatory domain and palmitoylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 4815–20 (2004).
  260. J. Meng, J. Wang, Role of SNARE proteins in tumorigenesis and their potential as targets for novel anti-cancer therapeutics. *Biochim. Biophys. Acta.* **1856**, 1–12 (2015).
  261. H. M. Kluger *et al.*, cDNA microarray analysis of invasive and tumorigenic phenotypes in a breast cancer model. *Lab. Invest.* **84**, 320–31 (2004).
  262. A. Ooe, K. Kato, S. Noguchi, Possible involvement of CCT5, RGS3, and YKT6 genes up-regulated in p53-mutated tumors in resistance to docetaxel in human breast cancers. *Breast Cancer Res. Treat.* **101**, 305–15 (2007).
  263. T. L. B. Hothorn, On the exact distribution of maximally selected rank statistics. *Comput. Stat. Data Anal.* (2002).
  264. J. Silva *et al.*, Analysis of exosome release and its prognostic value in human colorectal cancer. *Genes. Chromosomes Cancer.* **51**, 409–18 (2012).
  265. Y. Kweon, A. Rothe, E. Conibear, T. H. Stevens, Ykt6p is a multifunctional yeast R-SNARE that is required for multiple membrane transport pathways to the vacuole. *Mol. Biol. Cell.* **14**, 1868–81 (2003).
  266. A. Volchuk *et al.*, Countercurrent distribution of two distinct SNARE complexes mediating transport within the Golgi stack. *Mol. Biol. Cell.* **15**, 1506–18 (2004).
  267. S. Beyer, M. M. Kristensen, K. S. Jensen, J. V. Johansen, P. Staller, The histone demethylases JMJD1A and JMJD2B are transcriptional targets of hypoxia-inducible factor HIF. *J. Biol. Chem.* **283**, 36542–52 (2008).
  268. W.-W. Dong *et al.*, Differential expression of Rab27A/B correlates with clinical outcome in hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* **18**, 1806–13 (2012).
  269. C.-W. Lin *et al.*, MicroRNA-135b promotes lung cancer metastasis by regulating multiple targets in the Hippo pathway and LZTS1. *Nat. Commun.* **4**, 1877 (2013).
  270. H. Mizuno *et al.*, PrognoScan: a new database for meta-analysis of the prognostic value of genes. *BMC Med. Genomics.* **2**, 18 (2009).
  271. M. S. Ostensfeld *et al.*, Cellular disposal of miR23b by RAB27-dependent exosome release is linked to acquisition of metastatic properties. *Cancer Res.* **74**, 5758–71 (2014).

272. H. Zhao *et al.*, Correlation Between RAB27B and p53 Expression and Overall Survival in Pancreatic Cancer. *Pancreas* (2015).
273. J. Bao *et al.*, Rab27b is a potential predictor for metastasis and prognosis in colorectal cancer. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2014**, 913106 (2014).

## **8. Anexos**

### **8.1 Publicación a la que ha dado lugar la tesis**



## YKT6 expression, exosome release, and survival in non-small cell lung cancer

Marc Ruiz-Martinez<sup>1</sup>, Alfons Navarro<sup>1</sup>, Ramón M. Marrades<sup>2</sup>, Nuria Viñolas<sup>3</sup>, Sandra Santasusagna<sup>1</sup>, Carmen Muñoz<sup>1</sup>, Josep Ramírez<sup>4</sup>, Laureano Molins<sup>5</sup>, Mariano Monzo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Molecular Oncology and Embryology Laboratory, Department of Human Anatomy and Embryology, School of Medicine, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Department of Pneumology, Institut Clínic del Tórax (ICT), Hospital Clinic de Barcelona, University of Barcelona, IDIBAPS, CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Department of Medical Oncology, Institut Clínic Malalties Hemato-Oncològiques (ICMHO), Hospital Clinic de Barcelona, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain

<sup>4</sup>Department of Pathology, Centro de Diagnóstico Biomédico (CDB), Hospital Clinic de Barcelona, University of Barcelona, IDIBAPS, CIBERES, Barcelona, Spain

<sup>5</sup>Department of Thoracic Surgery, Institut Clínic del Tórax (ICT), Hospital Clinic de Barcelona, University of Barcelona, Barcelona, Spain

**Correspondence to:** Mariano Monzo, **email:** mmonzo@ub.edu

**Keywords:** YKT6, exosomes, NSCLC, miR-134, miR-135b

**Received:** February 11, 2016

**Accepted:** May 19, 2016

**Published:** June 6, 2016

### ABSTRACT

**Background:** Cancer-derived exosomes are involved in metastasis. YKT6 is a SNARE protein that participates in the regulation of exosome production and release, but its role in non-small cell lung cancer (NSCLC) has not been examined.

**Materials and Methods:** Ultracentrifugation-purified exosomes from the A549 cell line were studied by CRYO-TEM, nanoparticle tracking analysis and western blot (TSG101 marker). YKT6 was inhibited using a DsiRNA and selected pre-microRNAs. MicroRNAs targeting YKT6 were validated by Renilla/Luciferase assay and western blot. YKT6 expression and its prognostic impact were analyzed in 98 tissue specimens from resected NSCLC patients.

**Results:** Membranous nanosized vesicles (mode size: 128nm) with TSG101 protein were purified from A549 cells. YKT6 inhibition reduced exosome release by 80.9%. We validated miR-134 and miR-135b as miRNAs targeting YKT6, and transfection with the pre-miRNAs also produced a significant reduction in exosome release. The analysis of YKT6 in tumor samples showed that patients with high levels had shorter disease-free and overall survival.

**Conclusions:** YKT6 is a key molecule in the regulation of exosome release in lung cancer cells and is in turn precisely regulated by miR-134 and miR-135b. Moreover, YKT6 levels impact prognosis of resected NSCLC patients.

### INTRODUCTION

Exosomes are small vesicles (40-100nm) released by cells are crucial to normal and pathological intercellular communication [1]. They can contain functional proteins and nucleic acids, including non-coding RNAs [2]. In cancer cells, exosomes can take part in different functions, including proximal and distal regulation [3].

Cancer cells are able to modulate the microenvironment through the release of exosomes, which participate in the modification of the surrounding stroma [4]. Moreover, cancer-derived exosomes can protect tumor cells by inhibiting the recognition of cancer cells by the immune system [5]. Interestingly, through exosomes, cancer cells can transfer mutant genes such as K-RAS, which can promote malignization of the recipient cells [6]. In this

line, evidence suggests that tumor-derived exosomes can participate in the formation of the premetastatic niche [7].

Exosome biogenesis starts with the formation of intraluminal vesicles in endosomal compartments. This results in a multivesicular body that needs to be transported and fused with the plasma membrane to release the exosomes [1, 8]. Exosome production and release is precisely regulated by several proteins, including Rab [9–11] and SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-Sensitive-Factor Attachment Receptor) family proteins [4]. Increasing evidence suggests that tumor cells release an excessive amount of exosomes, which may influence tumor initiation, growth, progression, metastasis, and drug resistance [3]. EPI64, which specifically activates Rab27a, has been related to the regulation of exosome release in the lung cancer cell line A549 [12]. The study of proteins involved in exosome production and secretion is a promising source of biomarkers in cancer.

YKT6 is a SNARE protein involved in the mechanisms of cell membrane fusion, associated with vesicular transit [13], and it has been identified as a key protein for release of WNT3A-containing exosomes in HEK293 cells [14]. In breast cancer cells, YKT6 overexpression was associated with an aggressive phenotype *in vitro*, and with the ability of breast epithelia to metastasize when injected intravenously into mice [15]. Interestingly, in breast cancer patient samples, YKT6 was upregulated in p53-mutated tumors that were resistant to docetaxel, while the *in vitro* silencing of YKT6 in breast cancer cells enhanced docetaxel-induced apoptosis [16]. However, the possible role of YKT6 as a prognostic marker has not been examined in other tumors, including non-small-cell lung cancer (NSCLC), where prognosis is dismal, with 5-year survival rates of 19-50% in surgically resected patients [17].

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs which negatively regulate translation by binding to their 3'UTR mRNA target [18]. miRNAs are involved in the regulation of different biological processes, such as cell proliferation, differentiation and apoptosis [18]. Although several miRNAs have been predicted to target YKT6, to the best of our knowledge, none has yet been validated.

In order to further clarify the role of YKT6 and its regulating miRNAs in the release of exosomes in NSCLC, we have studied YKT6 inhibition *in vitro* and examined its effect on exosome release. In addition, we have examined the impact of YKT6 expression in tumor samples on outcome of resected NSCLC patients.

## RESULTS

### Exosome purification and YKT6 inhibition in the A549 cell line

To verify that exosomes were correctly purified, we studied the exosome product obtained from supernatant

of the A549 cell line by three methods: cryo-TEM, nanoparticle tracking analysis (NTA), and western blot using the exosomal marker TSG101. Cryo-TEM identified membranous nano-sized vesicles (Figure 1A). NTA showed a uniform population of nanoparticles from exosome isolations with a mode of 128nm (130.6 +/- 3.5nm) (Figure 1B). Finally, western blot showed clear expression of TSG101 in our samples (Figure 1C).

Both the mRNA and the protein of YKT6 were detected in the A549 cell line and YKT6 inhibition using a DsiRNA resulted in a 78.8% reduction of YKT6 protein levels in comparison with control cells (p=0.023) (Figure 1D). We then studied whether YKT6 inhibition decreases exosome release. Interestingly, cells with YKT6 inhibited released 80.9% fewer exosomes than control cells (p=0.013), as measured by western blot with the exosomal marker TSG101 (Figure 1E).

### miRNA regulation of YKT6 and exosome release

Using TargetScan and miRò databases, six miRNAs were selected as potential miRNAs targeting YKT6: miR-34a, miR-141, miR-134, miR-135a, miR-135b and miR-370. To validate that these miRNAs target YKT6, we performed a *Renilla/Luciferase* assay. The *Renilla/Luciferase* assay showed no significant differences between cells transfected with pre-miR-204, which is not predicted to target YKT6, and pre-miRNA negative control. However, in comparison with control, *Renilla luciferase* activity was 34.75%, 56.01%, 20.85% and 50.61% lower with pre-miR-34a (p=0.019), pre-miR-134 (p=0.022), pre-miR-135a (p=0.02) and pre-miR-135b (p=0.002), respectively. No significant differences were detected in cells transfected with pre-miR-370 or pre-miR-141 (Figure 2A).

Since the greatest decrease in *Renilla luciferase* activity was associated with miR-134 and miR-135b, these two miRNAs were selected for further study. We evaluated by western blot if changes in miR-134 and miR-135b levels correlated with changes in YKT6 protein levels. After transfection with pre-miRNAs, a reduction of 51.45% and 45.53% of YKT6 protein levels was observed for miR-134 (p=0.011) and miR-135b (p=0.022) (Figure 2B).

Finally, we evaluated whether these miRNAs could impact exosome release. Western blot analysis showed that in comparison with control, exosome release decreased by 43.92% in cells transfected with pre-miR-134 (p=0.032) and by 53.43% in cells transfected with miR-135b (p=0.008) (Figure 2C).

### YKT6, miR-134 and miR-135b expression in patient samples

All 98 patients included in the study had pathologically confirmed stage I-III NSCLC. The majority

were males, and 87% had Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status (PS) 1. Only 33.7% received adjuvant therapy. The main characteristics of the patients are described in Table 1.

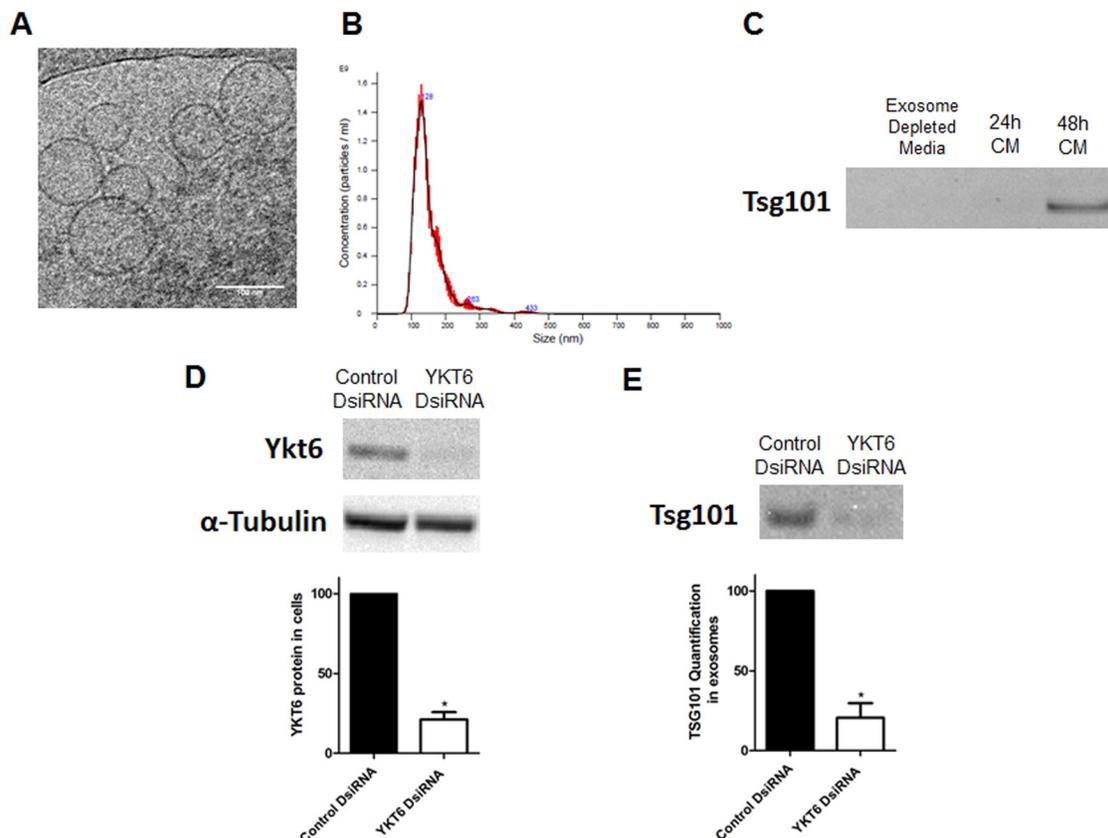
RealTime-PCR analysis showed that YKT6 was expressed at lower levels in tumor than in normal tissue ( $p < 0.0001$ ) (Figure 3A). In contrast, both miR-134 ( $p < 0.0397$ ) and miR-135b ( $p < 0.001$ ) were expressed at higher levels in tumor than in normal tissue (Figure 3B-3C). When we performed a correlation analysis between miR-134 and miR-135b expression and YKT6 expression, we could not identify a significant correlation between YKT6 and the two miRNAs in tumor tissue. However, in the paired normal tissue, we observed a significant inverse correlation between miR-135b and YKT6 ( $r = -0.368$ ,  $p = 0.045$ ).

### YKT6 mRNA expression, patient outcome, and exosome release

Only YKT6 expression was associated with clinical outcome. According to the optimal cutoff

determined by MaxStat (80th percentile), patients were classified in two groups: high ( $n = 78$ ) and low ( $n = 20$ ) YKT6 levels. Mean disease-free survival (DFS) was 42.1 months (95%CI, 34.5-49.7) for patients with high YKT6 expression and 59.5 months (95%CI, 47.9-71.1) for those with low expression ( $p = 0.0199$ ) (Figure 4A). Mean overall survival (OS) was 54.07 months (95%CI, 46.3-61.8) for patients with high YKT6 expression, compared to 69.3 months (95% CI, 62.2-76.4) for those with low expression ( $p = 0.0137$ ) (Figure 4B). No association was found between YKT6 expression levels in tumor and any clinicopathological or molecular characteristics.

Since high levels of YKT6 may lead to increased release of exosomes and hence poorer prognosis, in an exploratory analysis, we studied the plasma exosome levels of six patients of our cohort with available samples. The patients were classified according to their tumor YKT6 levels as high ( $n = 3$ ) or low ( $n = 3$ ). Patients with high YKT6 levels had more exosomes in plasma than those with low levels (Figure 5).



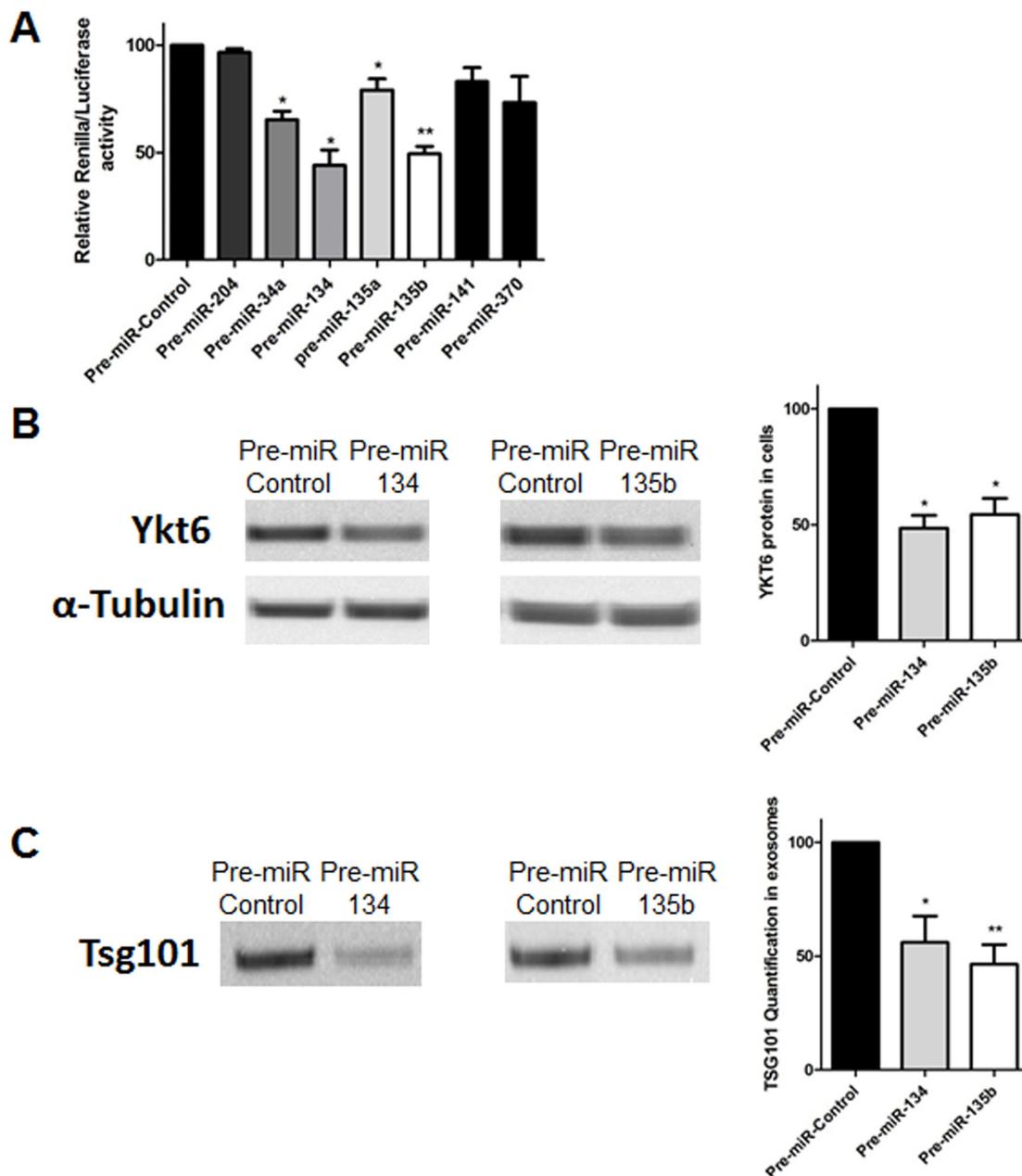
**Figure 1: Exosome characterization, and YKT6 inhibition and effect on exosome release.** A. Electronic microscopic image of exosomes identified by Cryo-TEM; B. Results of nanoparticle tracking analysis of exosomes; C. Western Blot using TSG101 marker in exosome depleted media used as negative control and 24h and 48h supernatant from A549 cell line cultured with exosome depleted media; D. Western blots of A549 cells transfected with control or YKT6 DsiRNA and quantification to relative loading control  $\alpha$ -tubulin; E. Western blot of exosomes isolated from A549 cells transfected with control or YKT6 DsiRNA and quantification of the exosomal marker TSG101. All experiments were performed in triplicate and data was shown as mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ .

## DISCUSSION

In the present study, we have studied exosome production and release in the A549 cell line and observed how the inhibition of the SNARE protein YKT6 produced a crucial downregulation in overall exosome levels. Moreover, we have examined the miRNA-mediated regulation of YKT6 and identified miRNAs able to inhibit YKT6 translation and thus indirectly modulate exosome

release. Finally, we studied YKT6 expression in NSCLC patient samples and found that patients with high levels of YKT6 had shorter DFS and OS.

Cancer-derived exosomes are promising markers for diagnosis and prognosis in cancer patients. Exosome release has been shown to be a potential prognostic marker in some tumors, such as colorectal cancer, where the level of circulating exosomes correlates with poor prognosis and shorter survival [19]. In lung cancer, exosomal EGFR



**Figure 2: YKT6 inhibition by miRNAs and effect on exosome release.** A. Renilla luciferase activity in A549 cells transfected with selected miRNAs and control. B. Western blots of A549 cells transfected with control, pre-miR-134 or pre-miR-135b and quantification of YKT6 signal relative to loading control  $\alpha$ -tubulin. C. Western blot of exosomes isolated from A549 cells transfected with control, pre-miR-134 or pre-miR-135b and quantification of the exosomal marker TSG101. All experiments were performed in triplicate and data was shown as mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

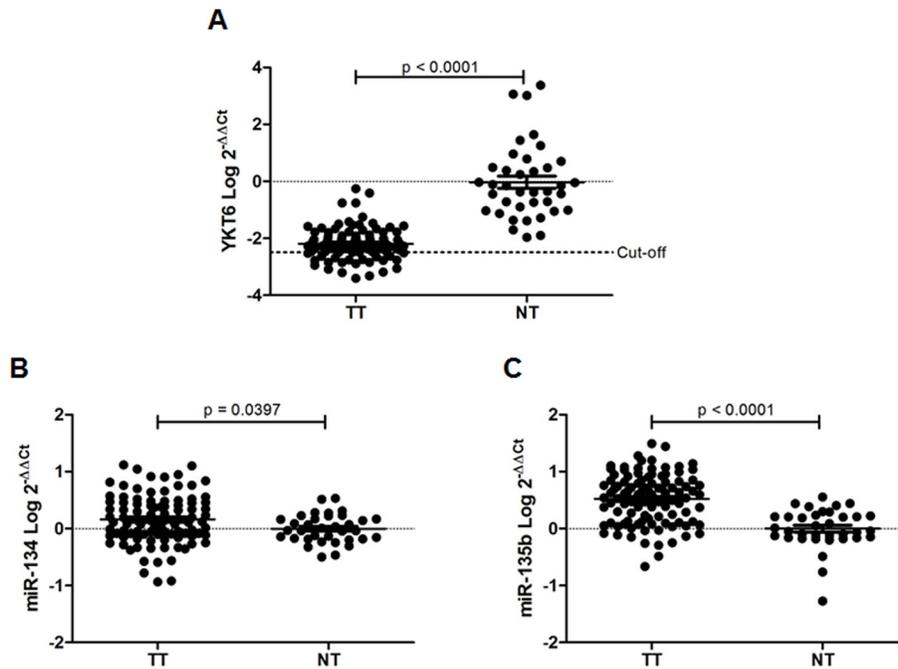
**Table 1: Patient characteristics and univariate p-value for disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) in 98 patients with non-small-cell lung cancer**

Characteristics	Value	N (%)	DFS	OS
<b>Sex</b>	Male	77 (78.6)	0.0741	0.0267
	Female	21 (21.4)		
<b>Age, yrs</b>	Mean (Range)	68 (33 - 83)	0.198	0.251
	<=65	43 (43.9)		
	>65	55 (56.1)		
<b>ECOG PS</b>	0	9 (9.2)	0.6906	0.3695
	1	89 (88.8)		
<b>Stage</b>	I	58 (59.2)	0.0096	0.0866
	II	21 (21.4)		
	III	19 (19.4)		
<b>Histology</b>	Adenocarcinoma	51 (52)	0.2393	0.2714
	Squamous cell carcinoma	39 (39.8)		
	Others	8 (8.2)		
<b>Type of surgery</b>	Lobectomy/ Bilobectomy	84 (85.7)	0.873	0.5719
	Pneumonectomy	7 (7.1)		
	Atypical resection	7 (7.1)		
	Current smoker	33 (33.7)		
<b>Smoking history</b>	Former Smoker	52 (53.1)	0.6209	0.0819
	Never smoker	10 (10.2)		
	Unknown	3 (3.1)		
<b>Adjuvant treatment</b>	Yes	33 (33.7)	0.6137	0.6564
	No	65 (66.3)		
<b>Relapse</b>	No	62 (63.3)		
	Yes	36 (36.7)		
<b>TP53 mutations</b>	Yes	22 (22.4)	0.6207	0.9094
	No	73 (74.5)		
	Unknown	3 (3.1)		
<b>KRAS mutations</b>	Yes	17 (17.3)	0.1826	0.1056
	No	79 (80.6)		
	Unknown	2 (2)		

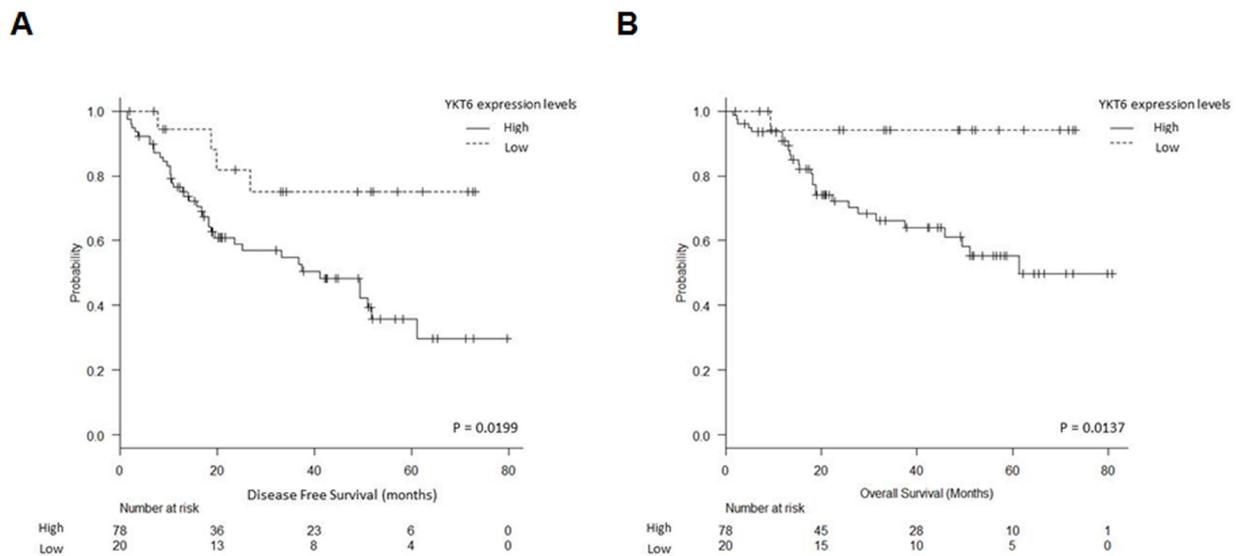
ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; PS, performance status

protein levels have been postulated as a biomarker for lung cancer diagnosis [20]. Proteins involved in the regulation of exosome production and release in tumor cells, such as SNARE proteins, could be surrogate markers of exosome levels. SNARE proteins are key mediators in membrane fusion events in the secretory pathway [21, 22]. YKT6,

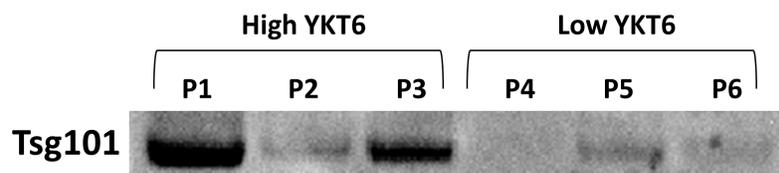
a unique SNARE protein that is highly conserved from yeast to human [23], has been observed in cytosol, membrane and perinuclear locations in cells and has been implicated in multiple steps of vesicle transport in yeast. Taken together, these findings suggest that YKT6 is a tightly regulated key protein in exosome release [23,



**Figure 3: YKT6, miR-134 and miR-135b in tissue samples from NSCLC patients.** A. YKT6, B. miR-134, and C. miR-135 expression in 98 tumor tissue (TT) and 38 normal tissue (NT) samples from patients with NSCLC.



**Figure 4: YKT6 expression and patient outcome.** A. Disease-free survival and B. overall survival in 98 NSCLC patients according to YKT6 mRNA expression levels.



**Figure 5: Exosome quantification in plasma from NSCLC patients.** Six patients from the studied cohort with available plasma samples at diagnosis were selected for exosome analysis. Three of them were classified as high and three as low according to YKT6 levels in their tumor tissue.

24]. Here, we have shown that inhibition of YKT6 greatly affects exosome release in the lung cancer cell line A549. Moreover, we have identified two miRNAs that participate in the regulation of YKT6 levels: miR-134 and miR-135b. Furthermore, inhibition of YKT6 resulting from increasing miR-134 and miR-135b levels decreases overall exosome levels in the cells.

In NSCLC patient samples, YKT6 mRNA levels were downregulated in tumor compared to normal lung tissue, while miR-134 and miR-135b levels were upregulated in tumor compared to normal tissue, suggesting that the differences in YKT6 expression could be due to the differential expression of the regulatory miRNAs. However, an alternative explanation could be related to the hypoxic microenvironment produced by rapid tumor growth. Under hypoxic conditions, several genes, including YKT6, suffer changes in their expression levels. For example, YKT6 expression is significantly downregulated in hypoxic conditions (1% O<sub>2</sub>) in human renal proximal tubule epithelial cells [25].

To the best of our knowledge, no previous study has compared YKT6 expression in tumor and paired normal tissue, but the RAB family protein Rab27B, which is also involved in the regulation of exosome production and release, was downregulated in tumor samples from hepatocellular carcinoma [26]. In line with our results, miR-135b was upregulated in highly invasive NSCLC cells [27] and miR-134 was upregulated in lung tumors, though no correlation was found between miR-134 and clinicopathological characteristics or survival [28].

Few studies have examined the impact of YKT6 expression on outcome in cancer patients. Our finding that high YKT6 expression was associated with poor prognosis is in line with previous studies in breast cancer, where YKT6 was identified as a gene that may be linked to invasive phenotypes and to tumorigenesis in breast cancer cell lines [15]. Moreover, high YKT6 expression has also been postulated as a mechanism of docetaxel resistance in p53-mutated breast tumors [16]. High levels of YKT6 in the tumor may lead to increased release of exosomes, leading to a more aggressive phenotype and poorer prognosis, since it is known that cancer-derived exosomes are involved in the invasive phenotype and in the formation of the premetastatic niche [7]. Among a small subset of our patients, those with high YKT6 levels had more exosomes in plasma than those with low levels. Although these preliminary results require further validation with a greater number of plasma samples, they provide the first indications that YKT6 levels in the tumor may act as a surrogate of exosome levels in plasma. Of note, other genes related to exosome release have also been previously related to cancer; for example, high Rab27B levels have been linked to poor prognosis in bladder [29], pancreatic [30] and colorectal cancer [31] and hepatocellular carcinoma [26].

In conclusion, the present study is a first step towards the identification of coding genes and miRNAs involved in the regulation of exosome release that can influence prognosis in NSCLC. We have shown that YKT6 downregulation is associated with a remarkable reduction in exosome release in an NSCLC cell line and that low YKT6 expression is associated with better clinical outcome in NSCLC patients. Moreover, we have identified several miRNAs that regulate YKT6 levels. The role of these miRNAs and YKT6 in exosome release and patient outcome warrants further investigation.

## MATERIALS AND METHODS

### Exosome purification

A549 cells were cultured in DMEM (Gibco) supplemented with + 10% exosome-depleted FBS (Life Technologies) and 5% penicillin-streptomycin. Exosome isolation was performed from 48h conditioned media (6ml) by sequential centrifugation method at 4°C (300G 5', 2,500G 20', 10,000G 30') followed by Ultracentrifugation 100,000G 2h, pellet washed with DPBS and ultracentrifuged again 100,000G 1h (Optima L-100 XP Ultracentrifuge with 70.1Ti Rotor and Polycarbonate Tubes, Beckman Coulter).

### Exosome characterization and quantification

PBS resuspended exosomes were studied by cryo transmission electron microscopy (cryo-TEM) in a Jeol JEM 2011 transmission electron microscope at the Microscope Facility of the Autonomous University of Barcelona. To study the size of the purified vesicles nanoparticle tracking analysis (NTA) on a NanoSight LM10 (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) was used and analyzed with NTA 3.0 software (Malvern).

To quantify the overall exosome product, samples were resuspended in LDS Sample buffer with reducing agent (Invitrogen) and analyzed by Western blot using the exosome marker TSG101 [32]. The whole product of purified exosomes were separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide electrophoresis in Bolt 4–12% BisTris gels under reducing conditions and transferred to PVDF membranes with I-Blot (Life Technologies). Membranes were incubated with mouse monoclonal TSG101 antibody (ab83, Abcam). Antibody binding was revealed by incubation with antimouse IgG HRP conjugate secondary antibody (A 9044, Sigma-Aldrich). Chemiluminescence was detected using Novex ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit and read in Chemidoc System (Bio-Rad). The protein density of the bands was quantified using Quantity One software.

## YKT6 inhibition

50nM of control DsiRNA (Negative Control DS NC1, Integrated DNA Technologies[IDT]) or YKT6 DsiRNA (HSC.RNAI.N006555, IDT) were transfected on the A549 cells using lipofectamine 2000 (Invitrogen) as per manufacturer's protocol. 48h after transfection cells were lysated for protein extraction and YKT6 protein levels were quantified by Western blot.

## Identification and validation of miRNAs targeting YKT6

TargetScan ([www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)) and miRò (<http://ferrolab.dmi.unict.it/index.html>) databases were used to identify putative miRNAs targeting YKT6. To validate the potential miRNAs identified a *Renilla/Luciferase* assay was performed in A549 cells using a modified psiCHECK-2 vector with the 3'UTR region of YKT6. The 3'UTR region of *YKT6* was amplified using primers with Sgf and PmeI restriction sites (underlined): Forward primer 5'-GCGATCGCCGGAAACAAAACCTCATGCT-3'; Reverse Primer 5'-GTTTAAACCCCTGAAGCACAAAGAAAGC-3'. The PCR product was cloned into a TOPO TA vector using TOP10F' *Escherichia coli* competent cells (Invitrogen). Positive clones were selected by Kanamycin resistance and verified by Sanger sequencing. The selected clones were then digested and cloned into psiCHECK-2 vector. The modified psiCHECK-2 vector was confirmed by sequencing.

To perform the *Renilla/Luciferase* assay cells were transfected with 500ng of the modified psiCHECK-2 vector and 100nM of selected pre-miRNA/pre-miR miRNA Negative Control #2 (Invitrogen). *Renilla luciferase* and *Firefly luciferase* activity was measured 24h after transfection with the Promega Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) in a luminometer Versa Max Microplate Reader.

The effect of the miRNAs shown to be significant in the *Renilla/Luciferase* assay were then confirmed by Western blot and selected for further study.

## Western blot

Western Blot analysis was performed as previously described [33] using the following primary antibodies: YKT6 (H00010652-M03, Tebu-bio) and  $\alpha$ -tubulin (T 6074, Sigma-Aldrich).

## Patient tissue samples

Between 2007 and 2013, tumor tissue samples were prospectively collected from 98 NSCLC patients who underwent complete surgical resection in our institution. In addition, paired normal tissue samples from 38 of these patients were also available. Samples were collected immediately after surgery, frozen at -80°C, and kept for

further processing. Approval for the study was obtained from the institutional ethics committee of the Hospital Clinic of Barcelona, Spain. Written informed consent was obtained from each participant in accordance with the Declaration of Helsinki.

## RNA extraction and mRNA and miRNA quantification

Total RNA was extracted using Trizol total RNA isolation reagent (Invitrogen) as per the manufacturer's protocol. Total RNA was reverse transcribed with High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). cDNA obtained was used for quantitative real-time PCR in Step One Time PCR System for YKT6 (Hs01127135\_m1) (Applied Biosystems). Cycle thresholds (Ct) for YKT6 were normalized to Ct for RNA18S (Hs99999901\_s1), and relative quantification was calculated using  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

miR-134 and miR-135b expression was assessed using TaqMan MicroRNA Assays (miR-134: 00459; 135b: 000461) (Life Technologies) as per the manufacturer's instructions. miRNA Ct were normalized with miR-191 Ct.

## Statistical methods

Comparison of continuous values was performed with Student's t-test. DFS was calculated from the time of surgical treatment to the date of relapse or death from any cause and OS was calculated from the time of surgical treatment to the date of death from any cause. DFS and OS were calculated using the Kaplan-Meier method. Optimal cut-off points of YKT6 mRNA and miRNAs expression were assessed by means of maximally selected log-rank statistics using the Maxstat package (version 2.8.1; R statistical package). All analyses were performed R version 2.13. Statistical significance was set at  $p \leq 0.05$ .

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dra. Cristina Malagelada and Nuria Martin for their support in the isolation and detection of exosomes. We thank Dr. Hernando A. Del Portillo and Joan Josep Segui for their support in aspects of NTA.

## CONFLICTS OF INTEREST

All authors declare no conflicts of interest.

## GRANT SUPPORT

This work was supported by grants from: AECC-Catalunya 2013 (AN); SDCSD of University of Barcelona (MM); PI12/00405 from Plan Nacional de I+D+I y cofinanciado por el ISCIII-Subdirección General de

Evaluación y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), (Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR), Societat Catalana de Pneumologia (SOCAP) (RMM). MR and SS are APIF fellows from University of Barcelona.

## REFERENCES

1. Simons M, Raposo G. Exosomes–vesicular carriers for intercellular communication. *Current opinion in cell biology*. 2009; 21:575-581.
2. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*. 2007; 9:654-659.
3. Webber J, Yeung V, Clayton A. (2015). *Extracellular vesicles as modulators of the cancer microenvironment*. *Seminars in cell & developmental biology: Elsevier*, pp. 27-34.
4. Webber JP, Spary LK, Sanders AJ, Chowdhury R, Jiang W, Steadman R, Wymant J, Jones AT, Kynaston H, Mason MD. Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes. *Oncogene*. 2014.
5. Taylor DD, Gercel-Taylor C. (2011). *Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated immunosuppressive microenvironments*. *Seminars in immunopathology: Springer*, pp. 441-454.
6. Beckler MD, Higginbotham JN, Franklin JL, Ham A-J, Halvey PJ, Imasuen IE, Whitwell C, Li M, Liebler DC, Coffey RJ. Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2013; 12:343-355.
7. Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, García-Santos G, Ghajar CM. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature medicine*. 2012; 18:883-891.
8. Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, Raposo G. The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic*. 2002; 3:321-330.
9. Bobrie A, Krumeich S, Reyat F, Recchi C, Moita LF, Seabra MC, Ostrowski M, Théry C. Rab27a supports exosome-dependent and-independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression. *Cancer research*. 2012; 72:4920-4930.
10. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fagnet I, Raposo G, Savina A, Moita CF, Schauer K, Hume AN, Freitas RP. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature cell biology*. 2010; 12:19-30.
11. Hsu C, Morohashi Y, Yoshimura S-i, Manrique-Hoyos N, Jung S, Lauterbach MA, Bakhti M, Grønborg M, Möbius W, Rhee J. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A–C. *The Journal of cell biology*. 2010; 189:223-232.
12. Li W, Hu Y, Jiang T, Han Y, Han G, Chen J, Li X. Rab27A regulates exosome secretion from lung adenocarcinoma cells A549: involvement of EPI64. *APMIS*. 2014; 122:1080-1087.
13. Gordon DE, Bond LM, Sahlender DA, Peden AA. A targeted siRNA screen to identify SNAREs required for constitutive secretion in mammalian cells. *Traffic*. 2010; 11:1191-1204.
14. Gross JC, Chaudhary V, Bartscherer K, Boutros M. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nature cell biology*. 2012; 14:1036-1045.
15. Kluger HM, Kluger Y, Gilmore-Hebert M, DiVito K, Chang JT, Rodov S, Mironenko O, Kacinski BM, Perkins AS, Sapi E. cDNA microarray analysis of invasive and tumorigenic phenotypes in a breast cancer model. *Laboratory investigation*. 2004; 84:320-331.
16. Ooe A, Kato K, Noguchi S. Possible involvement of CCT5, RGS3, and YKT6 genes up-regulated in p53-mutated tumors in resistance to docetaxel in human breast cancers. *Breast cancer research and treatment*. 2007; 101:305-315.
17. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, Postmus PE, Rusch V, Sobin L, Committee IAfItSoLCIS. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *Journal of thoracic oncology*. 2007; 2:706-714.
18. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009; 136:215-233.
19. Silva J, Garcia V, Rodriguez M, Compte M, Cisneros E, Veguillas P, Garcia J, Dominguez G, Campos - Martin Y, Cuevas J. Analysis of exosome release and its prognostic value in human colorectal cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2012; 51:409-418.
20. Yamashita T, Kamada H, Kanasaki S, Maeda Y, Nagano K, Abe Y, Inoue M, Yoshioka Y, Tsutsumi Y, Katayama S. Epidermal growth factor receptor localized to exosome membranes as a possible biomarker for lung cancer diagnosis. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013; 68:969-973.
21. Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*. 1993; 362:318-324.
22. Weber T, Zemelman BV, McNew JA, Westermann B, Gmachl M, Parlati F, Söllner TH, Rothman JE. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell*. 1998; 92:759-772.
23. McNew JA, Søgaard M, Lampen NM, Machida S, Ye RR, Lacomis L, Tempst P, Rothman JE, Söllner TH. Ykt6p, a prenylated SNARE essential for endoplasmic

- reticulum-Golgi transport. *Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272:17776-17783.
24. Volchuk A, Ravazzola M, Perrelet A, Eng WS, Di Liberto M, Varlamov O, Fukasawa M, Engel T, Söllner TH, Rothman JE. Countercurrent distribution of two distinct SNARE complexes mediating transport within the Golgi stack. *Molecular biology of the cell*. 2004; 15:1506-1518.
  25. Beyer S, Kristensen MM, Jensen KS, Johansen JV, Staller P. The histone demethylases JMJD1A and JMJD2B are transcriptional targets of hypoxia-inducible factor HIF. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283:36542-36552.
  26. Dong W-W, Mou Q, Chen J, Cui J-T, Li W-M, Xiao W-H. Differential expression of Rab27A/B correlates with clinical outcome in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2012; 18:1806-1813.
  27. Lin C-W, Chang Y-L, Chang Y-C, Lin J-C, Chen C-C, Pan S-H, Wu C-T, Chen H-Y, Yang S-C, Hong T-M. MicroRNA-135b promotes lung cancer metastasis by regulating multiple targets in the Hippo pathway and LZTS1. *Nature communications*. 2013; 4:1877.
  28. Azad FM, Naeli P, Malakootian M, Baradaran A, Tavallaei M, Ghanei M, Mowla S. Two lung development-related microRNAs, miR-134 and miR-187, are differentially expressed in lung tumors. *Gene*. 2016; 577:221-226.
  29. Ostenfeld MS, Jeppesen DK, Laurberg JR, Boysen AT, Bramsen JB, Primdal-Bengtson B, Hendrix A, Lamy P, Dagnaes-Hansen F, Rasmussen MH. Cellular disposal of miR23b by RAB27-dependent exosome release is linked to acquisition of metastatic properties. *Cancer research*. 2014; 74:5758-5771.
  30. Zhao H, Wang Q, Wang X, Zhu H, Zhang S, Wang W, Wang Z, Huang J. Correlation Between RAB27B and p53 Expression and Overall Survival in Pancreatic Cancer. *Pancreas*. 2016; 45:204-210.
  31. Bao J, Ni Y, Qin H, Xu L, Ge Z, Zhan F, Zhu H, Zhao J, Zhou X, Tang X. Rab27b Is a Potential Predictor for Metastasis and Prognosis in Colorectal Cancer. *Gastroenterology research and practice*. 2014; 2014.
  32. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current protocols in cell biology*. 2006;3.22. 21-23.22. 29.
  33. Diaz T, Navarro A, Ferrer G, Gel B, Gaya A, Artells R, Bellosillo B, Garcia-Garcia M, Serrano S, Martínez A. Lestaurtinib inhibition of the Jak/STAT signaling pathway in hodgkin lymphoma inhibits proliferation and induces apoptosis. *PLoS one*. 2011; 6:e18856.

## **8.2 Revisiones del artículo publicado**





18 May 2016

Prof. Mikhail V. Blagosklonny  
Editor, *Oncotarget*

RE: YKT6 expression, exosome release, and survival in non-small-cell lung cancer

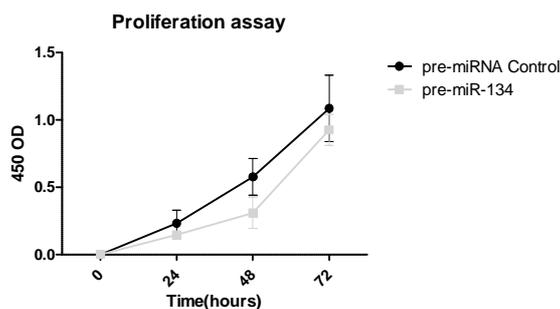
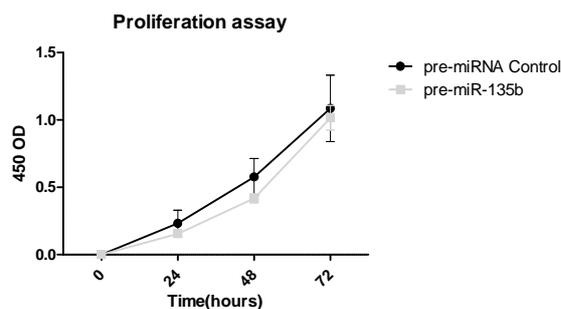
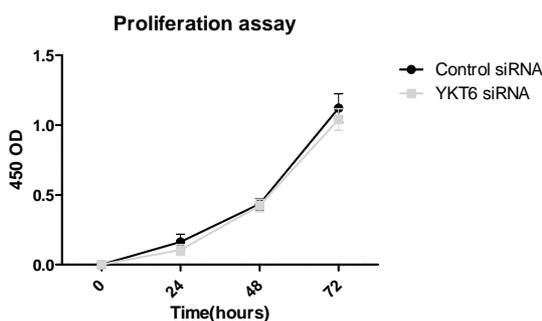
Dear Prof. Blagosklonny:

Thank you for your email of 15 March 2016, informing us of the reviewers' comments on our referenced manuscript. We have modified the manuscript based on these comments as follows:

### Reviewer #1:

*I would suggest the authors to comment the effects of the down-regulation of YKT6, following the introduction of miR134 and miR135b, in terms of changes in the proliferation or apoptosis status of A549 cell line.*

**Our reply:** As suggested by this reviewer we have studied how the inhibition of YKT6 by a siRNA or using pre-miRNAs affects proliferation of A549 cells. When we inhibited YKT6 using a siRNA we did not observe significant differences in proliferation (Figure below). Despite the transfection of A549 cells with pre-miR-135b and pre-miR-134a showed some reduction in proliferation as compared with control cells, this reduction not reached significance. However, the effect on proliferation caused by these miRNAs cannot be explained by their target YKT6, since the inhibition of YKT6 is not directly related to proliferation. For this reason we have not included this information in the manuscript.





**Reviewer #2:**

*Ruiz-Martinez et al report on the role of YKT6 on exosome release, emphasizing its role in NSCLC. The work is interesting and provides novel insights on the role of exosomes in this type of cancer. However there are some issues that should be further discussed:*

*Expression of YKT6 in NSCLC is lower than in normal tissue. If high YKT6 is to be of poor prognostic factor in NSCLC it is difficult to understand why normal tissue express higher levels of this mRNA than tumoural cells. This issue should be further addressed and discussed*

**Our reply:** We have further commented and referenced this issue in the Discussion as follows:

In NSCLC patient samples, YKT6 mRNA levels were downregulated in tumor compared to normal lung tissue, while miR-134 and miR-135b levels were upregulated in tumor compared to normal tissue, suggesting that the differences in YKT6 expression could be due to the differential expression of the regulatory miRNAs. Moreover, another explanation could be related with the hypoxic microenvironment produced by the rapid tumor growth. In these hypoxic conditions several genes suffer changes in their expression levels, including YKT6. It has been described that YKT6 expression is significantly downregulated in hypoxic conditions (1% O<sub>2</sub>) in human renal proximal tubule epithelial cells [25]. This could also explain why YKT6 is downregulated in tumor tissue in comparison with normal tissue.

*Was there a correlation between microRNA expression levels and YKT6 expression levels in NSCLC?*

**Our reply:** We have performed a correlation analysis between miRNA (miR-134 and miR-135b) expression and YKT6 expression. We could not identify a significant correlation in tumor tissue between YKT6 and the two miRNAs. However, when we performed the same analysis in the paired normal tissue, we observed a significant inverse correlation between miR-135b and YKT6 ( $r=-0.368$ ,  $p=0.045$ ). We have included this information in Results as follows:

RealTime-PCR analysis showed that YKT6 was expressed at lower levels in tumor than in normal tissue ( $p<0.0001$ ) (Fig. 3A). In contrast, both miR-134 ( $p<0.0397$ ) and miR-135b ( $p<0.001$ ) were expressed at higher levels in tumor than in normal tissue (Fig. 3B-C). When we performed a correlation analysis between miRNA (miR-134 and miR-135b) expression and YKT6 expression we could not identify a significant correlation between YKT6 and the two miRNAs in tumor tissue. However, in the paired normal tissue, we observed a significant inverse correlation between miR-135b and YKT6 ( $r=-0.368$ ,  $p=0.045$ ).

*The authors should include data on exosome release in NSCLC patients with high and low expression of YKT6 in order to confirm the hypothesis of the work.*

**Our reply:** As requested by this reviewer we have analyzed the exosome levels in plasma samples from patients and correlated with YKT6 levels in the tumor. For the analysis we selected 6 patients from the studied cohort with available plasma sample from peripheral blood at diagnosis. Three of them were classified as high and 3 as low according YKT6 levels in the tumor tissue. Despite the low number of patients analyzed, we observed that the patients with high YKT6 showed more exosomes in plasma than the low YKT6 patients. This information is included in the new Figure 5 and in Discussion as follows:



High levels of YKT6 in the tumor may lead to increased release of exosomes, leading to a more aggressive phenotype and poorer prognosis, since it is known that cancer-derived exosomes are involved in the invasive phenotype and in the formation of the premetastatic niche. In this line, we have studied the exosome levels in plasma of 6 patients of our cohort with available plasma sample from peripheral blood. The patients were classified according the YKT6 levels in the tumor tissue in 2 groups: high (n=3) and low (n=3). We observed that high YKT6 patients had more exosomes in plasma than low YKT6 patients (Figure 5). These preliminary results with a few numbers of patients require further validation with a great number of plasma samples, but point out that YKT6 levels in the tumor may act as a surrogate of exosome levels in plasma.

### **Associate Editor Comments:**

Manuscript, especially Abstract, should be edited.

Please, delete irrelevant "general" phrases and sentences. Delete unneeded words. Simplify. Use short sentences. Some Introductory sentences are irrelevant or are not needed. Shorten MS, especially Discussion.

Try to avoid vague words: regulate, modulate, affect, manipulate, interact, play role, target, closely related, dependent, mediated, impact

Instead use concrete words: increase, decrease, stimulate/activate, inhibit/suppress, bind, correlate.

For example, instead of "regulate" use either increase or decrease, activate or inhibit.

**Our reply:** We edited the manuscript according the Associate editor comments.

We have submitted a clean copy of the revised manuscript, as well as a copy with the edits tracked. Please let us know if you require any further information at this time.

Sincerely,

**Mariano Monzo, MD, PhD**

School of Medicine

University of Barcelona

Casanova 143

08036 Barcelona

Phone: 934021903

mmonzo@ub.edu



### **8.3 Conferencia oral a la que ha dado lugar la tesis**





# ISEV

INTERNATIONAL SOCIETY FOR  
EXTRACELLULAR VESICLES

## The Fifth International Meeting of ISEV ISEV2016

Rotterdam, The Netherlands, 4 – 7 May, 2016

### Abstracts

ISEV2016 is organized by

#### **The Local Organizing Committee**

Chair Edit I Buzás (Hungary), Aled Clayton (United Kingdom), Dolores Di Vizio (USA), Juan Manuel Falcon-Perez (Spain), Guido Jenster (The Netherlands), Lorraine O'Driscoll (Ireland), Yong Song Gho (South Korea), Marjolein van Driel (The Netherlands), Hans van Leeuwen (The Netherlands), Guillaume van Niel (France), Marca HM Wauben (The Netherlands), Kenneth W Witwer (USA), María Yáñez-Mó (Spain)

#### **Together with the Executive ISEV Board (2014 – 2016)**

**President:** Jan Lötvall

**Secretary General:** Clotilde Théry

**Interim Treasurer:** Kenneth W Witwer

**Executive Chair Science/Meetings:** Marca Wauben

**Executive Chair Education:** Yong Song Gho

**Executive Chair Communication:** Andrew Hill

**Members at Large:** Peter Quesenberry, Kenneth W Witwer, Susmita Sahoo, Dolores Di Vizio, Chris Gardiner, Edit I Buzás, Hidetoshi Tahara, Suresh Mathivanan, Igor Kurochkin

## Room: Jurriaanse

### Symposium Session 3 - Cell biology and EVs I

Chairs: *Michael Graner and Matias Ostrowski*

11:00-12:30 p.m.

#### OW3.1

##### The role of S-palmitoylation in the biogenesis of skeletal muscle-derived extracellular vesicles and the structural organization of their membrane

Daniele P. Romancino<sup>1</sup>, Valentina Buffa<sup>1</sup>, Samuele Raccosta<sup>2</sup>, Antonietta Notaro<sup>1</sup>, Ines Ferrara<sup>1</sup>, Alessandra d'Azzo<sup>3</sup>, Vincenzo Martorana<sup>2</sup>, Mauro Manno<sup>2</sup> and Antonella Bongiovanni<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Institute of Biomedicine and Molecular Immunology (IBIM), National Research Council (CNR), Palermo, Italy; <sup>2</sup>Institute of Biophysics, National Research Council (CNR), Palermo, Italy; <sup>3</sup>Genetics Department, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA

**Introduction:** Skeletal muscle (SkM) cells can release Alix-positive exosomes directly from their sarcolemma, suggesting a new paradigm for understanding how muscles communicate with adipose tissue, the brain or tumours. Our goals, here, were to understand how muscle cells generate these vesicles, to evaluate their heterogeneity and membrane structure, and to determine what regulates them. **Methods:** We have used an integrated biological/biophysical approach to determine whether protein lipidation (i.e. S-palmitoylation) affects the localization of extracellular vesicle (EV) modulator(s), EV biogenesis, cargo selection or other processes by (i) evaluating post-translational S-palmitoylation of EV proteins as well as their cell membrane and EV protein levels and (ii) characterizing EV heterogeneity and membrane structure in dispersion using dynamic light scattering (DLS), atomic force microscopy, small-angle X-ray scattering and small-angle neutron scattering. **Results:** By coupling these data, we were able to determine that Alix is S-palmitoylated and that palmitoylation inhibition altered its subcellular localization and protein interaction. Furthermore, the biophysical analyses of SkM-EVs showed that the structural organization of the lipid bilayer of palmitoylated-inhibited exosomes is qualitatively different compared to non-treated exosomes. **Conclusion:** We propose that S-palmitoylation might regulate the proper function of Alix in SkM EV biogenesis, support the interactions among the exosome-specific regulators/biomarkers and maintain proper EV membrane structural organization. Beside its biological relevance, our study sets the route for a comprehensive structural characterization of EV, which is expected to be crucial in EV-based therapies to be employed in the tissue regeneration field, for example, to help in recovery from muscle atrophy and/or injury.

Italian Ministry for Education, University, and Research in the framework of the Flagship Project NanoMAX.

#### OW3.2

##### Unexpected cytosolic protein localization on the surface of extracellular vesicles

Sarah Stewart, Florian Gessler, Stefano Pluchino and Kevin Moreau  
 University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom

Extracellular vesicles (EVs) contain many specific proteins, both cytosolic and membrane bound. The current model for extracellular vesicle biogenesis dictates that the subcellular location of proteins should be reflected in the EV architecture, where cytosolic proteins are in the lumen and cell surface proteins are on the outside of EVs. This is consistent with the conventional protein trafficking pathway for cell surface localization, whereby proteins destined for the plasma membrane (or secretion) must contain a signal sequence to target them to the secretory pathway. It is clear that receptors

anchored in the membrane are retained in the correct orientation and RNAs are in the lumen of EVs. However, there is limited data on the packaging and location of other proteins commonly identified in EVs. Annexin A2 is a cytosolic calcium-dependent membrane-binding protein consistently identified in EVs. Using biochemical approaches, we show that annexin A2 localizes to both the lumen and the surface of EVs. Based on this result, we are now investigating the function of annexin A2 on the surface of EVs. Additionally, we are using mass spectrometry analysis to identify other proteins expressed on the surface of EVs. The presence of cytosolic proteins on the surface of EVs raises questions about their trafficking and may provide further insight into EV packaging and function. It is possible that proteins are specifically packaged on the outer membrane of EVs. In which case, EVs may provide a pathway for unconventional protein trafficking to the cell surface. Understanding this unconventional protein trafficking pathway is extremely important and will uncover a novel fundamental cellular process.

#### OW3.3

##### Investigation of the molecular mechanism of cargo editing in human PMN-derived EVs

Balázs Bartos, Attila Mocsai, David Szombath, Márton Ákos Lorincz and Erzsébet Ligeti  
 Department of Physiology, Semmelweis University, Budapest, Hungary

**Introduction:** In our previous studies, we demonstrated that the neutrophilic granulocytes are able to produce different types of extracellular vesicles (EVs) after different stimulation. EVs that were generated after stimulation by opsonized particles have an inhibiting effect on bacterial growth. The aim of this study was to investigate the role of certain immune-receptors (FcR, C3R) and src tyrosine kinases in the production of antibacterial EVs. **Methods:** We isolated polymorphonuclear cells from peripheral blood of healthy donors. After different biological stimulations, EVs were separated by two-step centrifugation and filtration. EVs were counted by EV-optimized flow cytometry. EV protein amount was measured by Bradford assay, and granule proteins were detected by western blotting. Antibacterial effect of different EVs was analysed by bacterial survival test. **Results:** We found that isolated stimulation of beta2 integrines or Fc receptors or pattern recognition receptors increased the EV production. Combined stimulation has additive effect on EV generation. In contrast to superoxide production and phagocytosis, inhibition of src kinases did not interfere with EV production. However, cargo protein and biological function of EVs depend on src kinases. **Conclusion:** EV production of neutrophils can be increased and modified both through integrine and Fc receptor stimulation, independent of the process of phagocytosis or superoxide production. Src kinases do not play a role in EV generation but through EV quality control and cargo editing they do influence the biological function of produced EVs.

#### OW3.4

##### YKT6 regulation of exosome release is mediated by microRNAs and impacts prognosis in non-small-cell lung cancer

Marc Ruiz Martinez<sup>1</sup>, Sandra Santasusagna<sup>1</sup>, Alfons Navarro<sup>1</sup>, Joan J. Castellano<sup>1</sup>, Jorge Moises<sup>2</sup>, Nuria Viñolas<sup>3</sup>, Carmen Muñoz<sup>1</sup>, Joan Seguí<sup>4</sup>, Ramon M. Marrades<sup>2</sup>, Josep Ramirez<sup>5</sup>, Hernando A. Del Portillo<sup>4</sup>, Oriol Caritg<sup>1</sup>, Anna Cordeiro<sup>1</sup>, Laureano Molins<sup>6</sup> and Mariano Monzo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Molecular Oncology and Embryology Laboratory, Human Anatomy Unit, School of Medicine, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Department of Pneumology, Institut Clínic Del Tórax (ICT), Hospital Clinic de Barcelona, University of Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Institut Clínic Malalties Hemato-Oncològiques (ICMHO), Hospital Clinic de Barcelona, University of Barcelona, Spain; <sup>4</sup>CREA at Isglobal Institute For Global Health, Hospital Clinic - Universitat de Barcelona, Spain; <sup>5</sup>Department of Pathology, Centro De Diagnóstico Biomédico (CDB), Hospital Clinic De Barcelona, University of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>6</sup>Department of Thoracic Surgery, Institut Clínic Del Tórax (ICT), Hospital Clinic de Barcelona, University of Barcelona, Barcelona, Spain

**Introduction:** Non-small-cell lung cancer (NSCLC) has a dismal prognosis, highlighting the need for new prognostic markers. The role of exosomes and their regulatory genes in intercellular communication is a promising research area. YKT6 is involved in the control of exosome release and has been linked to poor prognosis in breast cancer but its role in NSCLC has not been studied. We aim to examine the role of YKT6 in exosome release and to identify its regulating microRNAs (miRNAs) in vitro, and to evaluate the prognostic impact of YKT6 in NSCLC. **Methods:** After 48 h of YKT6 inhibition, exosomes were isolated by ultracentrifugation, characterized by nanoparticle tracking analysis and Cryo-TEM and quantified by western blot using the exosomal marker TSG101. miRNAs targeting YKT6 were validated by Renilla-Luciferase assay and western blot. In tumour and normal tissue specimens from 98 surgically resected NSCLC patients, YKT6 expression levels were assessed and correlated with disease-free survival (DFS) and overall survival (OS). Informed consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki, and Hospital Clinic ethics committee approved the study. **Results:** A549 cells with YKT6 inhibition had an 80.9% reduction in exosome release ( $p = 0.01$ ). Renilla-Luciferase assay identified miR-134 and miR-135b as miRNAs targeting YKT6. In A549 cells transfected with pre-miR-134 or pre-miR-135b, YKT6 protein levels decreased by 51.45% ( $p = 0.01$ ) and 45.53% ( $p = 0.02$ ), respectively, while exosome release decreased by 43.92% ( $p = 0.03$ ) and 53.43% ( $p = 0.008$ ), respectively. In patient samples, YKT6 expression was lower and miR-134 and miR-135b expression was higher in tumour than in normal tissue. Patients with lower YKT6 expression had longer DFS ( $p = 0.02$ ) and OS ( $p = 0.01$ ). **Conclusions:** Our findings are a first step towards a greater understanding of the role of exosome release and their regulatory genes in NSCLC and their potential role as new prognostic markers.

### OW3.5

**Scavenger receptor A blockade leads to tumour accumulation of systemically administered extracellular vesicles bearing interleukin-15**  
Dionysios C. Watson<sup>1</sup>, Avinash Srivatsan<sup>2</sup>, Defne Bayik<sup>3,4</sup>, Gang Niu<sup>2</sup>, Barbara K. Felber<sup>5</sup>, Ihsan Gursel<sup>4</sup>, Xiaoyuan Chen<sup>2</sup> and George N. Pavlakis<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Human Retrovirus Section, National Cancer Institute, Frederick, Maryland, USA; <sup>2</sup>Laboratory of Molecular Imaging and Nanomedicine, National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA; <sup>3</sup>Cancer and Inflammation Program, National Cancer Institute, Frederick, Maryland, USA; <sup>4</sup>Department of Molecular Biology and Genetics, Bilkent University, Ankara, Turkey; <sup>5</sup>Human Retrovirus Pathogenesis Section, National Cancer Institute, Frederick, Maryland, USA

**Introduction:** We identified the scavenger receptor A family (SR-A) as responsible for the rapid clearance by liver macrophages of systemically delivered therapeutic extracellular vesicles (EVs). We hypothesized that blocking SR-A would decrease liver uptake, resulting in improved tissue distribution of therapeutic EV bearing interleukin-15 (IL-15), which stimulate NK and T-cells, as an in vivo anti-cancer therapy. **Methods:** HEK293 cells expressing heterodimeric IL-15 (IL-15:IL-15Ra [hetIL-15]) were grown in a hollow-fiber bioreactor. EV-bearing hetIL-15 were purified from conditioned medium by differential ultracentrifugation. EVs were stained with SytoGreen

RNAselect or DiR, and unincorporated dye removed by gel filtration. Uptake of SytoGreen-stained EVs by cell lines and human primary cells was monitored in vitro by flow cytometry in the presence of specific scavenger receptor A and B blockers. Biodistribution of DiR-stained EVs delivered into healthy and 4T1 (mouse breast cancer cell line) tumour-bearing mice treated with dextran sulphate (SR-A blocker) was monitored in vivo by fluorescence imaging. **Results:** Dextran sulphate blocked EV uptake in the SR-A1+ mouse macrophage RAW264.7 cell line and in human primary monocytes, but had no effect in SR-A1(-) cell lines, such as 4T1. Combining selective SR-AI and SR-BI blockers decreased EV uptake additively. A single injection of dextran sulfate resulted in 50% reduction of EV liver uptake together with an increase of free plasma EVs 2 h after treatment. Finally, pretreatment with dextran sulfate of tumour-bearing mice led to an increase, compared to untreated control mice, of EV uptake by the tumour over 24 h. **Summary/conclusion:** SR-A is responsible for EV clearance by the liver. Blocking this receptor enhances EV pharmacokinetics and distribution to tissues, including tumours. These effects could be improved by combination of several SR inhibitors and the use of therapeutic EV bearing tissue-specific targeting ligands.

### OW3.6

**Binding of EVs is regulated by CD44-hyaluronan interactions and induce EMT-like changes in target cells**

Uma Arasu<sup>1</sup>, Ashik Jawahar Deen<sup>2</sup>, Sanna Oikari<sup>2</sup>, Riikka Kärrnä<sup>1</sup>, Arto Koistinen<sup>2</sup>, Kai Härkönen<sup>2</sup>, Kirsi Rilla<sup>2</sup>, Pia Siljander and Elisa Lazaro-Ibañez<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomedicine, University of Eastern Finland, Kuopio, Finland; <sup>2</sup>SIB Labs, University of Eastern Finland, Kuopio, Finland; <sup>3</sup>Division of Biochemistry and Biotechnology, Department of Biosciences, University of Helsinki, Helsinki, Finland; <sup>4</sup>Division of Pharmaceutical Biosciences, Faculty of Pharmacy, University of Helsinki, Helsinki, Finland

Hyaluronan (HA) is the most abundant and essential polysaccharide of the extracellular matrix for maintenance of normal tissues, but it also creates a favourable microenvironment for growth of tumour cells. HA is synthesized by specific plasma membrane-bound enzymes, hyaluronan synthases (HASs). The HASs activate growth of extremely long filopodia and shedding of HA-coated extracellular vesicles (EVs). EVs are suggested to interact with their target cells by utilizing receptors on the vesicular surface, such as CD44, which is the most common receptor for HA. The aim of this work was to study these interactions and their effects on target cells. The HA-coated EVs secreted by GFP-HAS3 overexpressing cells were shown to carry GFP-HAS3 (both as protein and mRNA) using techniques like immunoblotting and qPCR. Moreover, confocal microscopy and correlative light and electron microscopy showed that GFP-HAS3 containing EVs (i.e. HAS3-EVs) induced morphological changes and increased the size of pericellular HA coat of the target cells. HA secretion of the target cells to the culture medium was also increased as analysed by ELISA-like assay. Furthermore, adding an excess of HA oligosaccharides in the incubation medium to displace HA from the receptors, Streptomyces hyaluronidase digestion to remove the HA coat or treatment with CD44 blocking antibody regulated the vesicle binding to the target cell, thereby showing that HA-CD44 interactions are important for EVs binding to the target cells. HAS-induced EVs act as carriers for HA on their surface and are potential vehicles in preparing the premetastatic niches. Furthermore, CD44-HA interactions may act as universal mechanism facilitating cellular binding of EVs. This may result in signals to modify the target cells functions like paving way for benign cells to become metastatic. Moreover, HA-induced EVs could be utilized as diagnostic tools and targets of therapy.



## **8.4 Carta de aceptación comunicación oral**



## MARC RUIZ MARTINEZ

---

**De:** contact@isev.org  
**Enviado el:** martes, 09 de febrero de 2016 21:15  
**Para:** MARC RUIZ MARTINEZ  
**Asunto:** ISEV2016 Abstract Acceptance - Oral

### **Abstract Program number: 307**

**Abstract: YKT6 regulation of exosome release is mediated by microRNAs and impacts prognosis in non-small-cell lung cancer**

Dear Marc Ruiz,

Thank you for having submitted the abstract listed above for the 2016 Congress of the International Society for Extracellular Vesicles (ISEV2016), taking place in Rotterdam, located in the Netherlands, from 4-7 May 2016.

On behalf of the Scientific Program Committee, it is our great pleasure to inform you that this abstract has been accepted as:

#### **ORAL presentation**

in the session YKT6 regulation of exosome release is mediated by microRNAs and impacts prognosis in non-small-cell lung cancer

Date: 05/04/2016

Time: 11:00 - 12:30

We kindly request that you strictly adhere to the time schedule as mentioned. The time slot includes the discussion. At a later stage, we will send you exact instructions on the preparation of your presentation.

Please note that the presenting author needs to register for the congress in order to present the abstract. If you have not yet registered, we invite you to register as soon as possible. Note, space is limited for Education Day sessions and will likely sell out quickly.

For registration, please visit the congress registration website:

[https://talley.ungerboeck.com/prod/SignIn.aspx?ReturnUrl=%2fprod%2femc00%2fregister.aspx%3fOrgCode%3d10%26EvtID%3d5035%26AppCode%3dREG%2520&OrgCode=10&EvtID=5035&SessionID=ej8fg7fb3fbk&DictSeq=46&Lang=\\*%26AppCode=REG&CultureInfo=fy-NL](https://talley.ungerboeck.com/prod/SignIn.aspx?ReturnUrl=%2fprod%2femc00%2fregister.aspx%3fOrgCode%3d10%26EvtID%3d5035%26AppCode%3dREG%2520&OrgCode=10&EvtID=5035&SessionID=ej8fg7fb3fbk&DictSeq=46&Lang=*%26AppCode=REG&CultureInfo=fy-NL)

Please also note that residents from some countries require a visa to enter the Netherlands. An official support letter can be requested during online registration. Please start the visa process as soon as possible. Do not hesitate to contact us if you encounter any difficulty.

For questions regarding your registration, please contact [contact@isev.org](mailto:contact@isev.org)

We look forward to meeting you in Rotterdam and remain at your disposal for any further information you may require.

Sincerely yours,

**The ISEV 2016 registration & abstract management team**

On behalf of:

Jan Lötvall, President of the International Society for Extracellular Vesicles (ISEV)

Marca Wauben, Chair of Conferences

Edit Buzas, President of the Local Organizing Committee, ISEV2016

& the Scientific Program Committee

## 8.5 Otras publicaciones en las que he participado y abstracts enviados a congresos

### Artículos

- miR-141 and miR-200c as markers of overall survival in early stage non-small cell lung cancer adenocarcinoma. Tejero R, Navarro A, Campayo M, Viñolas N, Marrades RM, Cordeiro A, **Ruíz-Martínez M**, Santasusagna S, Molins L, Ramirez J, Monzó M. PLoS One. 2014 Jul.
- Identifying High-Risk Stage II Colon Cancer Patients: A Three-MicroRNA-Based Score as a Prognostic Biomarker. Caritg O, Navarro A, Moreno I, Martínez-Rodenas F, Cordeiro A, Muñoz C, **Ruiz-Martinez M**, Santasusagna S, Castellano JJ, Monzó M. Clin Colorectal Cancer. 2016 May.

### Congresos

- LincRNA-p21 Impacts Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer Adenocarcinoma Patients. J. Moises, J. Castellano, J. Ramirez, A. Cordeiro<sup>2</sup>, N. Vinolas, A. Saco, **M. Ruiz**, S. Santasusagna, F. Aya, L. Molins, A. Navarro, M. Monzo, R.M. Marrades. American Thoracic Society annual congress 2016. San Francisco May 13-May 18.
- LOS PIWIRNAS, ARNS NO CODIFICANTES GERMINALES. ESTÁN ACTIVOS EN EL LINFOMA DE HODKIN Y ACTÚAN COMO MARCADORES PRONÓSTICOS. Navarro Alfons, Cordeiro Anna, Gaya Anna, Gonzalez Farre Blanca, Diaz Beya, Marina, Fuster Dolors, Tejero Rut, **Ruiz Marc**, Santasusagna Sandra, Muñoz Carmen, Caritg Oriol, Martinez Carmen, Martinez Antonio, Monzo Mariano. LVI Congreso Nacional de la SEHH – XXX Congreso Nacional de la SETH.

- GERMLINE SMALL NON CODING RNAS, PIWIRNAS, ARE EXPRESSED IN HODGKIN LYMPHOMA: THE ROLE OF PIWIRNA-651 AS PROGNOSTIC FACTOR IN HODGKIN LYMPHOMA. Navarro Alfons, Cordeiro Anna, Gaya Anna, Gonzalez Farre Blanca, Diaz Beya, Marina, Fuster Dolors, Tejero Rut, **Ruiz Marc**, Santasusagna Sandra, Muñoz Carmen, Caritg Oriol, Martinez Carmen, Martinez Antonio, Monzo Mariano. 19th Congress of the European Hematology Association
- Variaciones genéticas en la via PIWI/piRNA tienen impacto pronóstico en la supervivencia libre de enfermedad en el linfoma de Hodgkin clásico. Cordeiro Anna, Navarro Alfons, Gaya Anna, Martínez Carmen, Gonzalez-Farré Blanca, Díaz-Baeyá Marina, Castellano Joan Josep, **Ruiz-Martinez Marc**, Santasusagna Sandra, Muñoz Carmen, Martínez Antonio, Monzó Mariano. LVIII congreso nacional de la sociedad española de hematología y hemoterapia (SEHH) – XXXII congreso nacional de la sociedad española de trombosis y hemostasia (SETH).



