



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

**ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO BASADO EN LA
EXTRACCIÓN DE EXOSOMAS PARA EL ANÁLISIS DE
NUEVOS BIOMARCADORES DEL CÁNCER**

**ESTABLECEMENTO DUN PROTOCOLO BASEADO NA
EXTRACCIÓN DE EXOSOMAS PARA A ANÁLISE DE NOVOS
BIOMARCADORES DO CANCRO**

**ESTABLISHMENT OF A PROTOCOL BASED ON
EXTRACTION OF EXOSOMES FOR THE ANALYSIS OF NEW
CANCER BIOMARKERS**

Macarena Quiroga Fernández

Tutora: Angélica Figueroa Conde-Valvís



DRA. ANGÉLICA FIGUEROA CONDE-VALVÍS

INFORMA:

Que el presente Trabajo de Fin de Máster presentado por la alumna Macarena Quiroga Fernández y titulado

“Establecimiento de un protocolo basado en la extracción de exosomas para el análisis de nuevos biomarcadores del cáncer”

“Establecimiento dun protocolo baseado na extracción de exosomas para a análise de novos biomarcadores do cancro”

“Establishment of a protocol base don exosome extraction for the analysis of new cáncer biomarkers”

ha sido realizado bajo su dirección y autoriza su presentación para que pueda ser juzgado por el tribunal correspondiente.

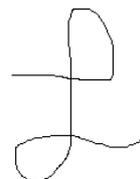
Y para que así conste, expide y firma el presente informe en A Coruña, a 22 de mayo de 2020.

Fdo.

**FIGUEROA
CONDE-VALVIS
ANGELICA -
52988974X**

Firmado digitalmente
por FIGUEROA CONDE-
VALVIS ANGELICA -
52988974X
Fecha: 2020.05.21
18:28:14 +02'00'

Fdo.



ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1. Características de las células epiteliales.....	3
2.2. Uniones adherentes y E-cadherina.....	4
2.3. Relación de la E-cadherina y la carcinogénesis.....	5
2.4. Transición epitelio-mesénquima (TEM).....	6
2.5. Importancia de la E3-ubiquitina ligasa Hakai durante la progresión tumoral.....	8
2.6. Nuevos roles de Hakai durante la proliferación tumoral y la oncogénesis.....	9
2.7. Importancia de Hakai como diana terapéutica.....	10
2.8. Biopsia líquida.....	10
2.9. Posibles metodologías empleadas en la biopsia líquida.....	12
3. Hipótesis	17
4. Objetivos	17
5. Metodología	18
5.1. Extracción de exosomas.....	18
5.2. Extracción del ARN.....	18
5.3. Transcripción inversa.....	20
5.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) cuantitativa.....	21
6. Plan de trabajo	23
7. Cuestiones éticas	24
8. Aplicabilidad	24
9. Plan para la difusión de los resultados	24
10. Recursos necesarios	25
11. Bibliografía	27

1. RESUMO/RESUMEN/ABSTRACT

RESUMEN

Hakai es una proteína E3 ubiquitina-ligasa que se une a la molécula E-cadherina, dando lugar a su internalización y posterior degradación. La pérdida de E-cadherina se asocia con un menor grado de diferenciación y una mayor invasión y metástasis. Por esta razón, es importante destacar la influencia de Hakai en el cáncer: se trata de una potencial diana molecular para el tratamiento de dicha patología. El presente estudio tiene como objetivo la puesta a punto en el laboratorio de una nueva tecnología basada en biopsia líquida para analizar la expresión de Hakai como marcador diagnóstico temprano de la progresión tumoral. Para ello, llevaremos a cabo la extracción de exosomas a partir de muestras de diferentes pacientes. Esta es una técnica no invasiva, que tiene múltiples ventajas en relación a otras prácticas más rutinarias y frecuentes en la actualidad para la detección del cáncer y un diagnóstico precoz del mismo.

RESUMO

Hakai é unha proteína E3 ubiquitina-ligasa que se une á molécula E-cadherina, dando lugar á súa interiorización e posterior degradación. A perda de E-cadherina asóciase a un menor grao de diferenciación e a unha maior invasión e metástase. Por este motivo, é importante resaltar a influencia de Hakai no cancro: trátase dunha potencial diana molecular para o tratamento desta patoloxía. O obxectivo deste estudo é o desenvolvemento no laboratorio dunha nova tecnoloxía baseada na biopsia líquida para analizar a expresión de Hakai como marcador diagnóstico precoz da progresión do tumor. Para iso, levaremos a cabo a extracción de exosomas de mostras de diferentes pacientes. Trátase dunha técnica non invasiva, que presenta múltiples vantaxes en relación con outras prácticas máis rutineiras e frecuentes na actualidade para a detección do cancro e o seu diagnóstico precoz.

ABSTRACT

Hakai is an E3 ubiquitin-ligase protein that binds to the E-cadherin molecule, leading to its internalization and subsequent degradation. E-cadherin loss is associated with a lower degree of differentiation and increased invasion and metastasis. For this reason, it's important to highlight the influence of Hakai in cancer: it is a potential molecular target for the treatment of this pathology. The objective of this study is the development in the laboratory of a new technology based on liquid biopsy to analyze the expression of Hakai as an early diagnostic marker of tumor progression. For this, we will carry out the extraction of exosomes from samples from different patients. This is a non-invasive technique, which has multiple advantages in relation to other more routine and frequent practices at present for the detection of cancer and its early diagnosis.

2. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las enfermedades más estudiadas actualmente, debido a su gran incidencia en la mortalidad y la morbilidad a nivel mundial. Se predice que una de cada cuatro personas va a padecerlo, una cifra que ha aumentado en las últimas décadas, debido al cambio de hábitos y a una mayor esperanza de vida. Algunos se heredan, y en general todos están influidos por factores ambientales, el envejecimiento etc. Estamos constantemente expuestos a una gran variedad de agentes que causan cáncer, denominados carcinógenos (Roy & Saikia, 2016). La transformación celular es consecuencia de la acumulación de mutaciones de diferentes tipos: de pérdida de función (genes supresores de tumores) y de ganancia de función (protooncogenes). Estas mutaciones afectan a genes que codifican moléculas involucradas en diferentes procesos fundamentales a lo largo del desarrollo: la señalización de factores de crecimiento, el control del ciclo celular, el rescate de la apoptosis, el mantenimiento de los telómeros... Todo ello, contribuye al mantenimiento proliferativo ilimitado de las células cancerosas: no existe un control de la producción y liberación de señales promotoras del crecimiento y la división celular, como ocurre en los tejidos normales. En las células tumorales hay un gran desequilibrio homeostático (Hanahan & Weinberg, 2011). Además, estas tienen la capacidad de invadir tejidos adyacentes y distantes, donde los nutrientes y el espacio no son limitantes. Este proceso se denomina metástasis, y es la causa del 90% de las muertes por cáncer en humanos. Por otra parte, la mayoría de los tumores malignos son carcinomas, que surgen de la transformación de las células epiteliales, en las que tiene lugar un proceso denominado transición epitelio-mesénquima (TEM) (Castosa *et al.*, 2018).

2.1. Características de las células epiteliales

Las células epiteliales se caracterizan por una distribución localizada de moléculas de adhesión (como cadherinas e integrinas), por la organización polarizada del citoesqueleto y por la presencia de una membrana basal.

Estas células se unen entre sí, formando una capa celular adhesiva fuerte con importantes funciones de barrera. Estas uniones permiten mantener la estructura y forma tisular adecuada (Pérez-Moreno *et al.*, 2003; Aparicio *et al.*, 2014). Determinan la polaridad y diferenciación celular, y participan en el mantenimiento homeostático. Los contactos célula-célula están regulados durante el desarrollo embrionario y en enfermedades como la formación de tumores (Aparicio *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2019).

En general, los vertebrados poseen tres sistemas de unión intercelular: uniones gap, canales que permiten la transferencia directa célula-célula de iones y moléculas pequeñas; uniones estrechas, el principal determinante de la función de barrera epitelial; y las uniones de anclaje, que incluyen desmosomas y uniones adherentes (AJ), que se asocian con el citoesqueleto para mediar el comportamiento celular y tisular (Figura 1). En conjunto, todas ellas, constituyen el complejo de unión intercelular. Los complejos contienen receptores transmembrana, generalmente glicoproteínas, que median la unión en la superficie extracelular y determinan la especificidad de la respuesta intracelular. Las proteínas citoplasmáticas asociadas a estos receptores los unen estructuralmente al citoesqueleto. Esto permite que células individuales de una lámina epitelial funcionen como un tejido coordinado. Las uniones intercelulares funcionan para integrar una serie de procesos que van desde la dinámica del citoesqueleto hasta la proliferación, transcripción y diferenciación (Pérez-Moreno *et al.*, 2003; Tian *et al.*, 2011).

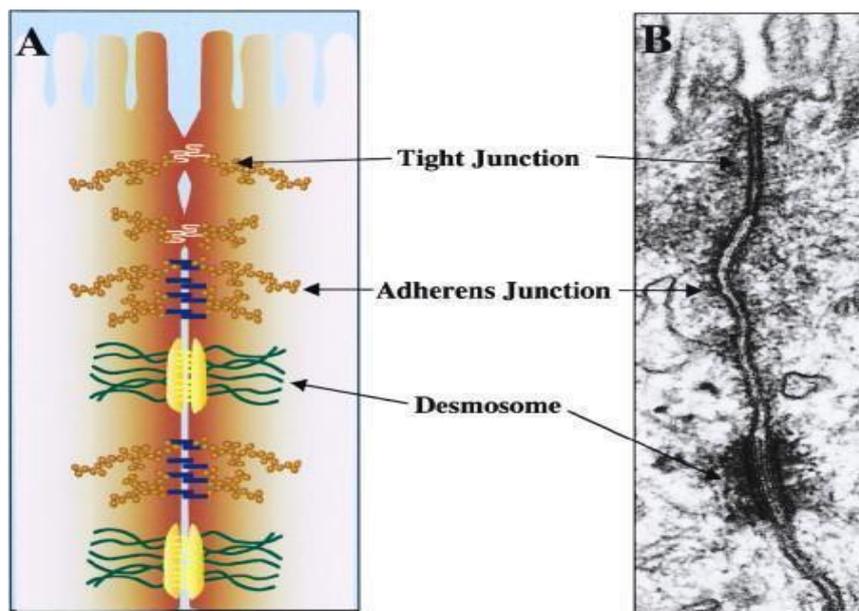


Figura 1. Composición de los tres tipos de uniones intercelulares. (A) Diagrama de los tres tipos principales de uniones intercelulares en células epiteliales. (B) Micrografía electrónica que muestra la ultraestructura de las uniones adherentes, desmosomas y uniones estrechas entre dos células epiteliales intestinales murinas. Figura obtenida de Pérez-Moreno *et al.* (2003).

2.2. Uniones adherentes y E-cadherina

Aunque todos los tipos de uniones son funcionalmente importantes, se ha demostrado que las uniones adherentes tienen un papel clave no sólo en la dirección de la organización celular coordinada y los movimientos dentro de los epitelios, sino también en la transmisión de la

información desde el medio ambiente al interior de las células. Estas uniones median el reconocimiento celular, la adhesión, la morfogénesis y la integridad tisular (Pérez-Moreno *et al.*, 2003; Aparicio *et al.*, 2014).

Las AJ se identificaron por primera vez mediante análisis ultraestructural, observándose placas electrodensas en las membranas entre las células epiteliales. Son estructuras dependientes de cadherina y reguladas por calcio (Ca^{2+}). Están unidas al citoesqueleto por microfilamentos de actina, contribuyendo en gran medida a las distintas morfologías, la polaridad, los planos de huso mitótico y los movimientos celulares de los tejidos en desarrollo. Defectos en este tipo de uniones pueden contribuir a la aparición de una gran cantidad de defectos de desarrollo y a enfermedades humanas (Pérez-Moreno *et al.*, 2003; Aparicio *et al.*, 2012).

Las uniones adherentes están formadas por un grupo de proteínas transmembrana de tipo I, denominadas cadherinas. Estas comprenden más de 20 miembros. El mejor caracterizado es la E-cadherina, una proteína transmembrana que presenta dos dominios: uno extracelular, que forma interacciones homofílicas dependientes de Ca^{2+} con otros dominios extracelulares de E-cadherina y es responsable de la adhesión célula-célula; y un dominio citoplasmático, muy conservado, que está unido al citoesqueleto de actina a través de su interacción con varias cateninas (α -catenina, β -catenina y p120-catenina) (Figueroa *et al.*, 2007; Aparicio *et al.*, 2012; Aparicio *et al.*, 2013; Aparicio *et al.*, 2014).

2.3. Relación de la E-cadherina y la carcinogénesis

Los contactos celulares dependientes de cadherina no son estáticos, sino que se modulan durante diferentes procesos fisiológicos y patológicos como la mitosis, la transición epitelio-mesénquima durante la progresión tumoral y el desarrollo embrionario. Los tumores epiteliales se caracterizan por la pérdida parcial o completa de la E-cadherina a medida que avanzan hacia la neoplasia maligna. Múltiples estudios demuestran su papel anti-invasivo y anti-metastásico, se considera un potente supresor tumoral (Chin & Lim, 2019; Aparicio *et al.*, 2012).

Debido a su gran importancia en clínica, se han realizado numerosas investigaciones referentes a su regulación y expresión. Estas abarcan distintos niveles, desde marcas epigenéticas, como la hipermetilación del promotor de la E-cadherina o el silenciamiento transcripcional por medio de represores (Snail/Slug, Twist o ZEB1), hasta modificaciones

postraduccionales como la fosforilación, la glucosilación y la proteólisis (Aparicio *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que la cadherina está regulada negativamente por endocitosis. En las células epiteliales, la activación de tirosina quinasas como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) c-Met y el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos o Src, induce la dispersión celular y una morfología similar a los fibroblastos. Met y Src, tienen una papel clave en este proceso, debido a que fosforilan los residuos de tirosina del dominio citoplasmático de la E-cadherina. Una proteína llamada Hakai se identificó como la responsable de la unión a la E-cadherina una vez fosforilada, mediando su internalización por endocitosis y posterior degradación (Fujita *et al.*, 2002; Aparicio *et al.*, 2012).

2.4. Transición epitelio-mesénquima (TEM)

La transición epitelio-mesénquima (TEM) es un proceso mediante el cual las células epiteliales pierden su morfología y polaridad apical-basal y adquieren un nuevo fenotipo propio de células mesenquimales. Estas se caracterizan por tener una elevada movilidad, una reorganización en el citoesqueleto de actina y pérdidas de adhesión célula-célula y célula-matriz. Todo esto, favorece la capacidad migratoria celular, lo que promueve la progresión tumoral y la metástasis. La TEM fue descrita por primera vez durante el desarrollo embrionario, concretamente, a nivel de la remodelación de los tejidos durante la embriogénesis y durante la morfogénesis de los órganos. Actualmente, se considera un evento crucial a lo largo del desarrollo del carcinoma (Tiang, 2011; Aparicio *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2020).

Durante la transición epitelio-mesénquima, se produce la pérdida de una molécula clave en los contactos celulares, la E-cadherina. Como ya se describió anteriormente, esta se considerada el miembro mejor caracterizado de las uniones adherentes en las células epiteliales. La pérdida de E-cadherina se asocia con un menor grado de diferenciación y una mayor invasión y metástasis (Aparicio *et al.*, 2013).

Además de la disminución en la expresión de E-cadherina, la TEM se caracteriza por la regulación negativa de otros genes específicos de las células epiteliales; como los componentes de las uniones estrechas (ZO1), de los desmosomas (Desmoplakin), las citoqueratinas y la laminina, así como la inducción de marcadores mesenquimales (N-

cadherina, vimentina...) (Figura 2). Estos procesos se desencadenan en respuesta a numerosas señales extracelulares, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Aparicio *et al.*, 2015).

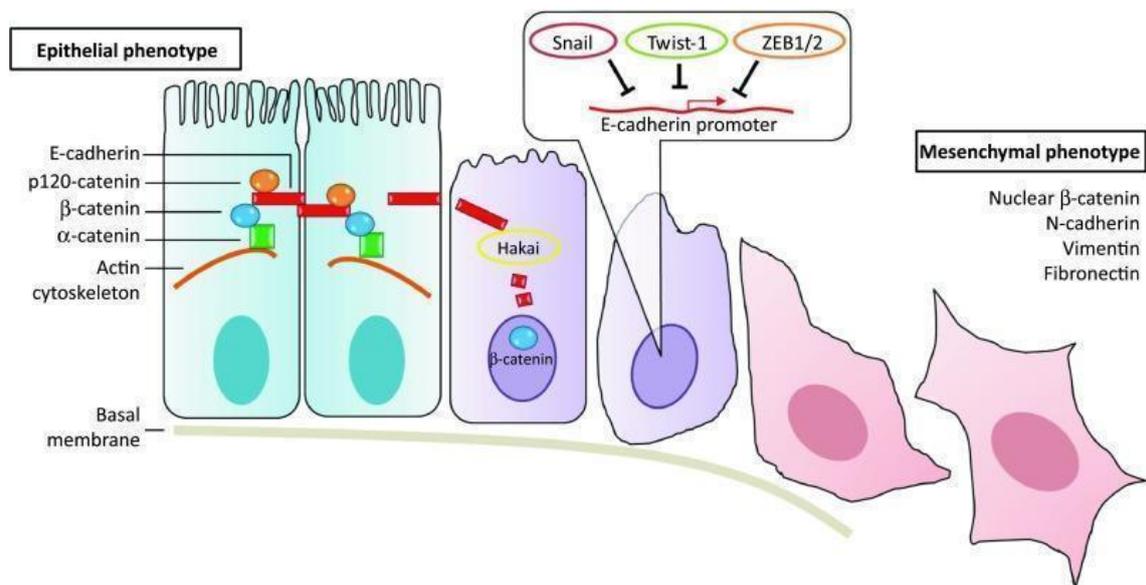


Figura 2. Transición epitelial a mesenquimal. Las células epiteliales (*izquierda*) están estrechamente interconectadas por E-cadherina en las uniones adherentes. Esta proteína está unida al citoesqueleto de actina a través de diferentes cateninas (p120-catenina, β -catenina, α -catenina). Durante la EMT, la E-cadherina puede regularse negativamente mediante represores transcripcionales (como Snail, Twist-1 y ZEB1 / 2), o mediante reguladores postraduccionales (como Hakai). La pérdida de marcadores epiteliales está acompañada por la inducción de vimentina, N-cadherina y fibronectina, por el aumento de los niveles de β -catenina nuclear y por la adquisición de un fenotipo mesenquimatoso (*derecha*). Figura obtenida de Aparicio *et al.* (2013).

La TEM se clasifica en tres subtipos diferentes, en base a su función y a las rutas en las que está involucrada. El tipo I está relacionado con el desarrollo embrionario. El tipo II es fundamental para la reparación del tejido, puede causar fibrosis en los órganos y se desencadena por señales inflamatorias como el TGF- β . Finalmente, el tipo III está asociado con el cáncer y puede ser inducido por factores de crecimiento como por ejemplo HGF (Van der Horst *et al.*, 2012).

Es importante tener en cuenta que la TEM en el cáncer, por lo general, no es una transición completa, sino una etapa transitoria y reversible (Van der Horst *et al.*, 2012). El proceso inverso se denomina transición mesénquima-epitelio (TME). Esta es necesaria para la

colonización metastásica una vez que las células malignas se extravasan y encuentran su nicho en órganos distantes. El fenotipo epitelial resulta más favorable en este caso, debido a que las células deben adherirse al entorno que las rodea. Esto puede ocurrir bajo la influencia del microambiente de los nuevos tejidos colonizados. La capacidad de las células de adoptar un destino celular alternativo, diferenciarse en otro linaje celular (transdiferenciación) o desdiferenciarse y volver a un estado menos diferenciado, se denomina plasticidad celular, y es un proceso fundamental en el desarrollo de la metástasis (Van der Horst *et al.*, 2012; Aparicio *et al.*, 2015).

2.5. Importancia de la E3-ubiquitina ligasa Hakai durante la progresión tumoral

En el año 2002, Fujita *et al* descubrieron una nueva proteína E3 ubiquitina-ligasa que se unía a la molécula E-cadherina. Esta se denominó Hakai, que significa destrucción en japonés, debido a su papel en la internalización y posterior degradación de la misma. Este proceso es dependiente de ubiquitina y en él, actúan tres tipos de enzimas: la enzima activadora de ubiquitina (E1), la enzima conjugadora de ubiquitina (E2) y una variedad de enzimas con actividad ubiquitina-ligasa (E3), que proporcionan la especificidad de reconocimiento al sustrato. Hakai, también conocida como CBL1, funciona como una E3 ubiquitina-ligasa para la E-cadherina, uniéndose a su dominio citoplasmático después de la fosforilación en residuos de tirosina por una tirosina quinasa llamada v-Src. La familia Src desempeña un papel fundamental en la regulación de diversas funciones biológicas asociadas a cambios en la morfología; como la transformación maligna, la plasticidad celular y la modulación de la adhesión intercelular durante la EMT. Hakai induce la ubiquitinación del complejo E-cadherina junto con las enzimas E1 y E2, seguido por la endocitosis de la molécula, alterando así las uniones célula-célula y facilitando la motilidad celular (Fujita *et al.*, 2002; Aparicio *et al.*, 2012).

Hakai posee tres dominios: un dominio RING, una secuencia corta de reconocimiento de pTyr y un dominio rico en prolina. El dominio de unión a pTyr (HYB) consiste en un homodímero, donde los monómeros están dispuestos en una configuración anti-paralela, y cada uno de ellos consta de un dominio RING-finger y un dominio corto pTyr-B. Este dominio está implicado en la unión de Hakai a sus moléculas diana, y se ha visto que está presente en otras E3 ubiquitina-ligasas que normalmente se encuentran disminuidas en cáncer. Esto sugiere que HYB podría ser una diana específica en las terapias dirigidas para el tratamiento del dicha patología (Fujita *et al.*, 2002; Mukherjee *et al.*, 2012).

2.6. Nuevos roles de Hakai durante la proliferación tumoral y la oncogénesis

La sobreexpresión de Hakai afecta no sólo a los contactos célula-célula, sino también a la proliferación celular de manera independiente de E-cadherina. Se han estudiado dos proteínas a través de las cuales Hakai puede regular la proliferación celular: PSF (factor de splicing asociado a PTB) y la ciclina D1. El PSF es una proteína de unión a ARN multifuncional, implicada en la regulación de varios procesos celulares, como la transcripción, el procesamiento del ARN y la descondensación del ADN. Ésta se une a transcritos que codifican para proteínas relacionadas con el cáncer. Hakai aumenta la capacidad de PSF para unirse a estos ARNm. Por otro lado, la ciclina D1 es una proteína característica del ciclo celular, necesaria para la transición G1/S. La sobreexpresión de Hakai promueve el avance de la fase G0 / G1 a la S, y por lo tanto, la expresión de la ciclina D1. En conjunto, estos datos indican que la sobreexpresión de Hakai induce una mayor tasa de proliferación (Figuroa *et al.*, 2009a; Figuroa *et al.*, 2009b; Figuroa *et al.*, 2012; Figuroa *et al.*, 2019).

Además, se ha documentado que la sobreexpresión de Hakai reduce la adhesión de las células MDCK (Madin-Darby canine kidney) al sustrato. En estos estudios, se incuban varios clones de células que sobreexpresan Hakai y células MDCK normales. Tras realizar diversos lavados con PSB (tampón fosfato salino), se observa el levantamiento de las células sobreexpresadas de la placa. Por el contrario, las células normales, permanecen unidas al sustrato tras la adición del PSB, siendo necesaria la tripsina para separarlas de la placa. Esta observación sugiere que la sobreexpresión de Hakai conduce a una reducción de las adherencias al sustrato celular (Rodríguez-Rigueiro *et al.*, 2011).

Finalmente, se ha visto que Hakai puede afectar al fenotipo celular en diversas líneas epiteliales de manera independiente de la molécula E-cadherina. Las células que expresan shRNA de E-cadherina no muestran las protuberancias puntiagudas que se observan en las células que sobreexpresan Hakai. Además, en estas últimas, Hakai se encuentra al final de la protuberancia, donde la quinasa FAK (Focal Adhesion Kinase) también está enriquecida, lo que indica que Hakai puede estar involucrado en la regulación de la extensión dinámica y la retracción de estas estructuras, influyendo en la movilidad celular (Rodríguez-Rigueiro *et al.*, 2011).

2.7. Importancia de Hakai como diana terapéutica

Teniendo en cuenta los numerosos estudios realizados en los últimos años acerca de Hakai, cabe destacar su gran importancia en el cáncer y otras patologías, y con ello la necesidad de ampliar el conocimiento sobre esta proteína. Se trata de una diana molecular para el tratamiento del carcinoma, por lo que es preciso conocer el mecanismo por el cual media su acción durante la progresión tumoral (Aparicio *et al.*, 2012).

Por otra parte, es importante identificar nuevos sustratos de Hakai en humanos, tanto en el núcleo, como en el citoplasma, con el fin de determinar su influencia en el fenotipo celular, incluida la capacidad de invasión tumoral y la adhesión célula-sustrato. Un estudio reciente describió mediante análisis proteómico nuevas proteínas potencialmente reguladas por Hakai, como HSP90 y Annexin A2 entre otras (Díaz-Díaz *et al.*, 2017; Díaz-Díaz *et al.*, 2020). Además, se necesita profundizar más en las investigaciones sobre las funciones independientes de ubiquitina de Hakai. Concluyendo, Hakai puede desempeñar diferentes roles en distintas condiciones fisiológicas o patológicas, por lo que es importante estudiar la influencia de las diferentes vías de señalización en Hakai e investigar su utilidad clínica potencial como objetivo terapéutico para el cáncer (Aparicio *et al.*, 2012).

Además, se ha demostrado que Hakai puede emplearse como biomarcador para el diagnóstico temprano en cáncer de colon (Figuroa *et al.*, 2011; Figuroa *et al.*, 2011; Castosa *et al.*, 2018).

2.8. Biopsia líquida

La detección temprana del cáncer puede mejorar significativamente los resultados terapéuticos y el pronóstico del paciente. La biopsia de tejido es el método más común para la detección y el diagnóstico de tumores, sin embargo, está limitada debido a diferentes factores: 1- la dificultad para la obtención de las muestras, 2- su reducida sensibilidad y precisión, 3- los altos costes del procedimiento, y 4- la incapacidad para distinguir entre tumores heterogéneos e invasividad. Debido a todos estos inconvenientes, en los últimos años, está aumentando el uso de una nueva prueba genética mínimamente invasiva, la biopsia líquida. Esta técnica se emplea para la detección del cáncer y un diagnóstico precoz del mismo, el monitoreo de la progresión tumoral, la evaluación de la respuesta terapéutica y el pronóstico clínico, y la detección de tumores recurrentes y refractarios (Sato *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2020).

Los marcadores más comunes de la biopsia líquida son los ácidos nucleicos tumorales circulantes (ctDNA y ctRNA), las células tumorales circulantes (CTC), las vesículas extracelulares derivadas del tumor (tdEV) y las plaquetas educadas por el tumor (TEP) (Wu *et al.*, 2020) (Figura 3).

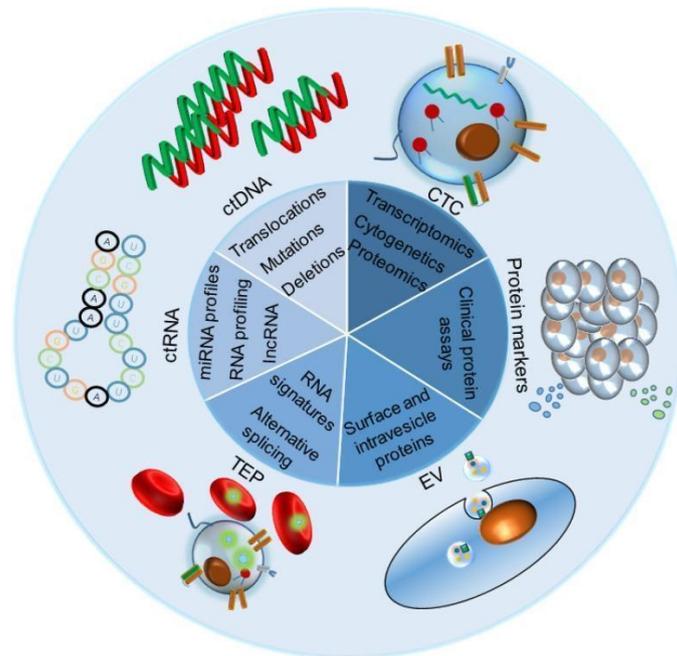


Figura 3. Los marcadores de biopsia líquida (LBM) comúnmente utilizados. Proteínas tumorales circulantes, ADNc de tumor circulante, células tumorales circulantes (CTC), vesículas extracelulares (EV) derivadas de tumor, ctRNA de tumor circulante y plaquetas de tumor (TEP). Figura obtenida de Wu *et al.* (2020).

Todas estas moléculas son liberadas al torrente sanguíneo por las células tumorales. Tienen los mismos defectos genéticos que la célula de origen, como mutaciones puntuales, reordenamientos, amplificaciones e incluso variaciones de copia genética. Por lo tanto, pueden detectarse las alteraciones moleculares tumorales a partir de estos marcadores. Respecto a los ácidos nucleicos tumorales circulantes, es común encontrar en el torrente sanguíneo fragmentos de ADN tumoral (ADNc), sin embargo, las moléculas de ARN, debido a su gran inestabilidad, no sobreviven en este medio, con la excepción de los microARN. Además, como se mencionó anteriormente, en la biopsia líquida puede obtenerse información de las células a partir de las vesículas extracelulares como los exosomas y las plaquetas. Los exosomas, aislados por primera vez hace 30 años, son vesículas a nanoescala que contienen proteínas y ácidos nucleicos encerrados en una bicapa lipídica. Son secretadas por la mayoría de los tipos celulares. Además, representan un novedoso sistema de administración terapéutica. Sin embargo, las técnicas actuales de aislamiento, como la ultracentrifugación, no

dan lugar a un alto nivel de pureza. Esto representa un desafío en la investigación tecnológica (Melo *et al.*, 2015; Bardetelli & Pantel, 2017).

Además, hay que tener en cuenta que aunque en la mayoría de casos en la biopsia líquida se emplean muestras de sangre, casi todos los fluidos corporales, como la orina, saliva, esputo, heces, líquido cefalorraquídeo y líquido de laguna, son biomarcadores de cáncer adecuados para esta técnica (Wu *et al.*, 2020).

Hace 150 años Ashworth descubrió las células tumorales circulantes, y desde entonces se han desarrollado múltiples técnicas para el cribado, la detección y el diagnóstico de tumores. Durante este período, varios hitos de nuevos descubrimientos o nuevas tecnologías han promovido en gran medida el desarrollo práctico de la biopsia líquida (Wu *et al.*, 2020) (Figura 4).

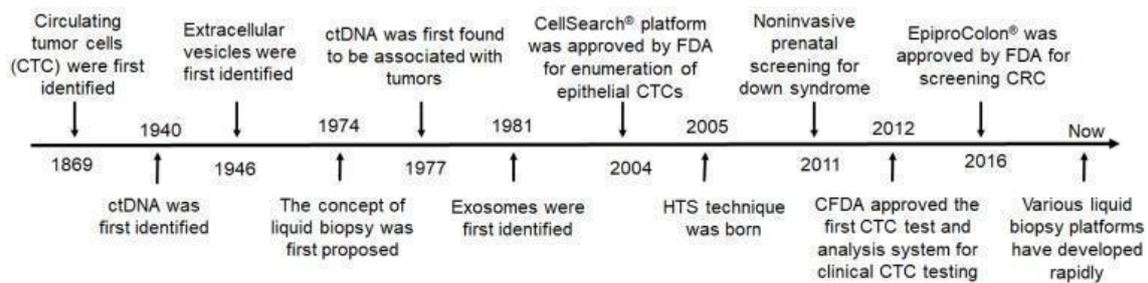


Figura 4. Los hitos en el desarrollo de las biopsias líquidas. CRC: cáncer colorrectal; CFDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de China; FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos; HTS: Secuenciación de alto rendimiento. Figura obtenida de Wu *et al.* (2020).

2.9. Posibles metodologías empleadas en la biopsia líquida

Como ya se mencionó anteriormente, entre los marcadores más comunes de la biopsia líquida destacan los ácidos nucleicos tumorales circulantes (ctDNA y ctRNA), las células tumorales circulantes (CTC) y las vesículas extracelulares derivadas del tumor (tdEV).

En base a ello, cabe destacar las posibles metodologías empleadas para llevar a cabo dicha técnica y con ello, realizar un diagnóstico precoz y eficiente del cáncer.

Células tumores Circulantes (CTCs)

A lo largo del desarrollo tumoral, durante la progresión maligna, surgen una gran multitud de células con elevada capacidad invasiva y metastásica. Estas son las denominadas células tumorales circulantes (CTC) y en conjunto constituyen un biomarcador fiable para el

pronóstico del cáncer. Estas deben purificarse, aislarse y lisarse para obtener el DNA o RNA correspondiente (Bardetelli & Pantel, 2017).

Para llevar a cabo el aislamiento de estas células, se emplean numerosas técnicas basadas en aspectos biológicos, fisicoquímicos y funcionales. Uno de los métodos más empleados depende de la expresión superficial de los marcadores epiteliales. Estos se expresan en epitelios normales y tumores epiteliales pero están ausentes en los leucocitos mesenquimales y, por lo tanto, se utilizan con frecuencia para distinguir las células cancerosas de las sanguíneas. Un ejemplo es el CellSearch[®], un método que recoge las células epiteliales de la sangre con la ayuda de perlas magnéticas recubiertas de EpCAM. El problema de esta identificación es su incapacidad para distinguir entre las subpoblaciones de las CTC. Se podría emplear un gran cóctel con diferentes marcadores que cubran todos los fenotipos potenciales de las CTC, sin embargo, pueden aumentar la probabilidad de que las células sanguíneas expresen alguno de estos marcadores, dando lugar a resultados falsos positivos. Por otra parte, hay que tener en cuenta que las células del carcinoma pueden experimentar una transición epitelio-mesénquima (EMT) donde se reduce significativamente la expresión de estos marcadores, resultando en este caso falsos negativos (Alix-Panabières & Pantel, 2014).

Además, estas células también pueden separarse de las sanguíneas en función de su tamaño, densidad y propiedades dieléctricas mediante filtración, microfluídica, centrifugación diferencial, densitometría y di-electroforesis. Todos estos métodos tienen sus ventajas, pero debido a la rareza, vulnerabilidad y heterogeneidad de las CTC, ninguno de ellos puede recoger un número suficiente de células para aplicaciones clínicas de forma independiente. Por lo tanto, es preciso la combinación de dos o más técnicas para mejorar el enriquecimiento de las CTC en las biopsias líquidas (Figura 5) (Wu *et al.*, 2020).

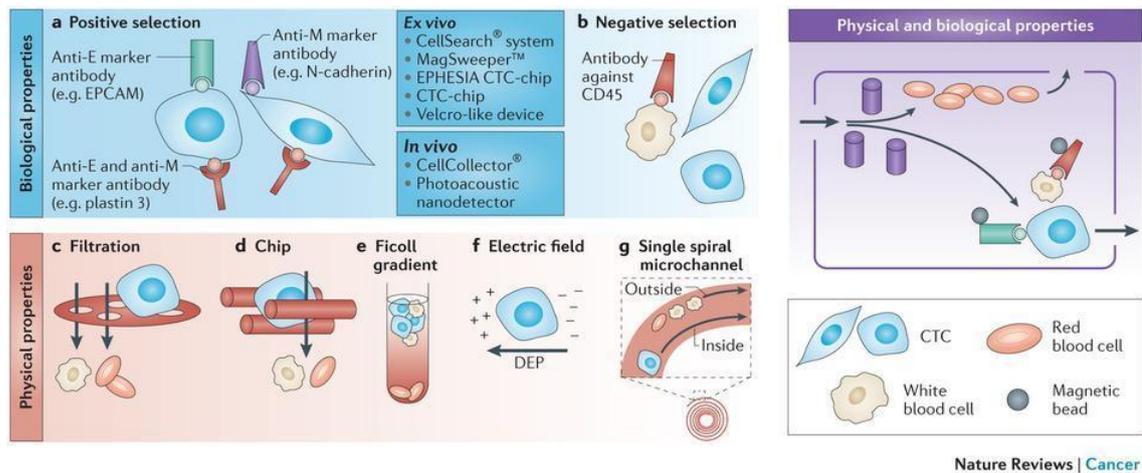


Figura 5. Técnicas empleadas para el aislamiento de las células tumorales circulantes (CTC), basadas en sus propiedades biológicas, físicas y funcionales. a: Selección positiva; b: Selección negativa; c: Filtración; d: Chip; e: Gradiente de Ficoll; f: Campo eléctrico; g: Microcanal en espiral simple. Figura obtenida de Alix-Panabières & Pantel. (2014).

Una vez aisladas, estas células pueden analizarse por medio de la técnica qPCR, la tecnología de espectroscopía mutacional basada en PCR digital (dPCR) y las herramientas de secuenciación de nueva generación o NGS (Next-Generation Sequencing). Además, se pueden emplear métodos citogenéticos como la hibridación fluorescente in situ (FISH) para identificar reordenamientos cromosómicos específicos del tumor (Wu *et al.*, 2020).

Aunque el estudio in vitro de las células tumorales circulantes puede servir para llevar a cabo una detección temprana del cáncer, tiene multitud de limitaciones. Por un lado, el procesamiento de la muestra y las condiciones de cultivo inadecuadas pueden causar un daño irreversible a las CTC. Además, los numerosos pasos celulares a lo largo de un mantenimiento prolongado pueden afectar en gran medida a los rasgos genéticos y epigenéticos de dichas células, dando lugar a la modificación del fenotipo inicial (Wu *et al.*, 2020).

Finalmente, las CTC, por lo general, no aparecen en la sangre periférica de los enfermos, lo que dificulta su detección con gran sensibilidad y especificidad (Alix-Panabières & Pantel, 2014).

Ácidos nucleicos tumorales circulantes (ctDNA y ctRNA)

Los ácidos nucleicos tumorales circulantes (ctDNA y ctRNA) se liberan de las células cancerosas primarias o metastásicas tras sufrir los procesos de apoptosis o necrosis. Numerosos estudios confirman la presencia de estas moléculas en el suero o el plasma de los pacientes oncológicos, por lo que se consideran biomarcadores fiables para la detección de

esta enfermedad. Los niveles de DNA en la sangre periférica varían de 30 ng/ml en sujetos sanos a 180 ng/ml en pacientes con cáncer, de modo que aunque otras situaciones patológicas puedan provocar un aumento en los niveles de este, su presencia cuando existen tumores es muy acusada. (Schwarzenbach *et al.*, 2011; Husain & Velculescu, 2017).

El estudio de los ctDNA y ctRNA en la biopsia líquida se centra en la detección de mutaciones genéticas y metilaciones. Una técnica destacada es El COBAS[®], la primera prueba diagnóstica basada en ADNc. Esta se basa en la mutación EGFR v2 (Roche Diagnostics) para determinar la respuesta a los inhibidores de la tirosina quinasa (TKI) del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Otra prueba importante, sobre todo a nivel del cáncer de colon rectal, es EpiProColon[®], basada en el patrón de metilación del gen SEPT9 (Schwarzenbach *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2020).

Sin embargo, pese a la gran utilidad de las pruebas mencionadas anteriormente, cabe destacar la existencia de un gran número de inconvenientes ligados a ellas que pueden resultar en su ineficiencia para obtener resultados fiables. Por un lado, hay que tener en cuenta que los tejidos normales pueden tener mutaciones asociadas en sus genes, descartando la exclusividad de estas en los ácidos nucleicos tumorales. Por otra parte, el estudio de mutaciones genéticas debe realizarse de forma aislada en algunas enfermedades donde ya están descritas anomalías en loci específicos. El estudio conjunto de todas ellas con el cáncer podría resultar en datos erróneos (Heitzer *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2020).

Por otra parte, para realizar el análisis de los ácidos nucleicos tumorales circulantes, se usa la técnica de amplificación PCR y la secuenciación de nueva generación o NGS. La primera prueba realizada fue la PCR específica de alelo. Esta se emplea para la identificación de los polimorfismos de una sola base (SNPs). Actualmente, se usan otras tecnologías más avanzadas: PCR digital (dPCR), PCR digital de gotas (ddPCR) y perlas, emulsión, amplificación y magnetismo (BEAMing). Todas ellas destacan por su gran sensibilidad y precisión, así como su rapidez y sus reducidos costes. Sin embargo, están limitadas por su baja capacidad de multiplexación; no pueden analizar una gran cantidad genes de forma simultánea. Hoy en día, la secuenciación del DNA tumoral se realiza mediante las técnicas de secuenciación de nueva generación. Estas han supuesto una verdadera revolución a la hora de llevar la biopsia líquida, permitiendo analizar en paralelo multitud de secuencias de ADN (Crowley *et al.*, 2013; Dogliotti *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2020).

Por último, es importante resaltar la baja sensibilidad de las técnicas en las primeras etapas del cáncer. En los tumores incipientes, la liberación de los ctDNA y ctRNA por parte de las células es reducida, pudiendo ser despreciables para su detección. Para mejorar la eficiencia, la biopsia líquida debe realizarse a partir de las inmediaciones del tumor, lo más próximo posible al mismo. Esto supone un gran desafío técnico (Wu *et al.*, 2020).

En la siguiente figura se observan las ventajas y desventajas relativas a la biopsia de tejido, el análisis de las células tumorales circulantes y el ADN tumoral circulante (Wyatt & Gleave, 2015) (Figura 6):

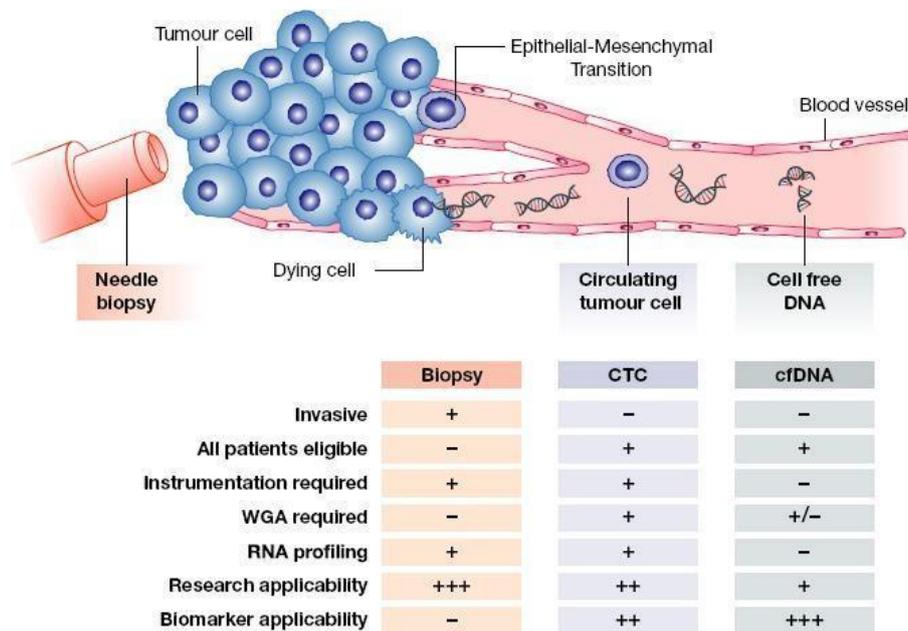


Figura 6. Debilidades y fortalezas relativas a la biopsia de tejido, el análisis de las células tumorales circulantes y al ADN tumoral circulante. WGA= *whole-genome amplification*. Figura obtenida de Wyatt & Gleave. (2015).

Exosomas

Como ya se mencionó anteriormente, los exosomas son vesículas extracelulares que permiten la comunicación celular mediante el transporte de proteínas, ADN y/o ARN. En los últimos años, estas vesículas se han convertido en uno de los principales focos de atención para el estudio en torno al diagnóstico precoz del cáncer: se ha observado que las células oncológicas liberan una cantidad significativamente mayor de exosomas que las células sanas. Además, estas moléculas se han encontrado en prácticamente todos los fluidos corporales, lo que sugiere su relevante participación en diversos procesos fisiológicos y patológicos. Por todo ello, los exosomas, en concreto las proteínas y el ARN presentes en la luz y la membrana de

estos, son considerados marcadores biológicos de interés en la determinación de múltiples enfermedades, entre las que destaca el cáncer (Wu *et al.*, 2020).

Actualmente, debido al estudio exponencial en este campo de la investigación, hay una gran heterogeneidad entre los posibles procedimientos para aislar este tipo de moléculas, en base a la naturaleza de la muestra, el volumen, el grado de pureza deseado y el uso final previsto de estas. La ultracentrifugación diferencial es el método más extendido y estandarizado: es compatible con el procesamiento de grandes volúmenes de muestra y permite obtener preparaciones enriquecidas en grandes o pequeñas vesículas en base al uso de diferentes fuerzas de centrifugación (Torrano *et al.*, 2016).

Finalmente, es importante destacar las ventajas del empleo de las vesículas extracelulares, y especialmente de los exosomas, en la técnica de la biopsia líquida. Por un lado, los exosomas son específicos del tejido, característica esencial para ser considerados biomarcadores. Por otra parte, estas moléculas son capaces de transportar y proteger la carga de su tejido originario. Además, la cantidad de vesículas extracelulares circulantes es significativamente mayor en comparación con la de las CTC mencionadas anteriormente, pudiendo ser indicativa de la existencia de tumores (Torrano *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2020).

En base a lo mencionado anteriormente, con las ventajas y desventajas de las diferentes metodologías, he considerado enfocar mi proyecto de la detección precoz del cáncer mediante la biopsia líquida a la extracción de exosomas. El último desafío es definir en qué medida estas moléculas son un reflejo del panorama molecular del tumor.

3. HIPÓTESIS

En base a los antecedentes, nuestra hipótesis de partida es que el empleo de la nueva tecnología basada en biopsia líquida nos permitirá analizar marcadores diagnóstico tempranos de la progresión tumoral, basándonos en marcadores de exosomas.

4. OBJETIVOS

1. Valoración de diferentes marcadores para implementar en el diagnóstico precoz del cáncer empleando la biopsia líquida.
2. Puesta a punto de un protocolo de extracción de exosomas para el diagnóstico precoz basado en biopsia líquida.

3. Demostrar la eficacia del método de extracción de exosomas empleando de biopsia líquida.
4. Análisis de algún marcador de exosomas específico para el diagnóstico precoz del cáncer.

5. METODOLOGÍA

Para llevar a cabo este proyecto, con el fin de poner a punto la técnica y determinar su viabilidad, se emplearán 40 muestras de suero de diferentes pacientes con cáncer de colon rectal y sanos, cifra suficiente para obtener resultados con gran significación. Estas se obtendrán a partir del CHUAC Biobank integrado en la Red Española de Biobancos de Plataforma Hospitalaria.

5.1. Extracción de exosomas

Para proceder con la extracción de exosomas de las muestras serológicas, se hará uso del Kit comercial ExoGAG, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Este destaca por su elevada rapidez y especificidad en la optimización del aislamiento. El kit está constituido únicamente por el reactivo de precipitación, basado en las interacciones entre la solución de precipitación y los glicosaminoglicanos (GAGs) presentes en los exosomas. Se mantiene a temperatura ambiente. El volumen de la muestra de suero que se usará es de 500 µl. Tras una serie de centrifugaciones y una rápida incubación en hielo, se obtendrá el producto deseado, los exosomas purificados.

5.2. Extracción del ARN

Tras la obtención de los exosomas, se procederá con la extracción del ARN. Para ello, se empleará el kit comercial *Total Exosome RNA and Protein Isolation*, diseñado para el aislamiento de ARN y proteínas a partir de una sola preparación de exosoma enriquecida. El kit está formado por los siguientes compuestos (Tabla 1):

Tabla 1. Componentes del kit comercial *Total Exosome RNA and Protein Isolation*, su función y temperatura de almacenamiento.

Componentes	Función	Temperatura de almacenamiento
Tampón de resuspensión de Exosomas	Permite que el sedimento de exosomas se disuelva	4°C
Solución desnaturizante 2X	Desnaturaliza las proteínas a partir de la rotura de puentes disulfuro	4°C
Ácido-fenol:cloroformo	Separa la fase acuosa (con el ARN) de la fase orgánica (con ADN y proteínas)	4°C
Solución de lavado 1 mRNA	Permite la obtención de ARN purificado	Temperatura Ambiente
Solución de lavado 2/3	Permite la obtención de ARN purificado	Temperatura Ambiente
Solución de elución	Recupera el ARN adherido a la columna de filtro	4°C

Además, el kit incluye un conjunto de tubos recolectores y columnas de filtro, necesarios para la obtención del ARN.

En primer lugar, se añadirá el tampón de resuspensión a la muestra de exosomas obtenida a partir del paso anterior, favoreciendo así la disolución del sedimento. Pasados unos minutos de incubación, se adicionará la solución desnaturizante 2X. Esta debe estar previamente mezclada con 2-mercaptoetanol. La importancia de añadir esta solución reside en su capacidad para desnaturizar las proteínas, evento crucial en la purificación del ARN. Posteriormente, siguiendo el orden de la tabla anterior, se añadirá un tercer compuesto, el

ácido-fenol:cloroformo, un producto químico que debe manipularse con extrema precaución debido a su elevada toxicidad. Para mezclarse, debe usarse una centrifugadora. El ácido-fenol:cloroformo tiene la capacidad de separar el sobrenadante, la fase acuosa donde se encuentra el ARN, de la fase orgánica, formada por ADN y proteínas. Se pasará exclusivamente la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf y se añadirá etanol 100%, con el fin de descartar la posible contaminación adherida al ARN. Finalmente, se pasará el volumen formado por la mezcla lisado/etanol a una columna de filtro, montada sobre un tubo recolector y se procederá a una serie de lavados que tienen como objetivo la purificación del ARN. Para ello se usarán las soluciones de lavado 1 mRNA y 2/3, a las que previamente se les añadirá etanol 100%. Tras una serie de centrifugaciones, se obtendrá el ARN purificado adherido al filtro de la columna. Para recuperar el contenido, se agregará la solución de elución.

Tras la obtención del ARN, se medirá la concentración (ng/μl) y la pureza (ratio 260/280nm) de las muestras con el espectrofotómetro UV-Vis Spectrophotometer Q5000 (QUAWELL).

5.3. Transcripción inversa

La transcripción inversa, transcripción reversa o retrotranscripción es un proceso biológico que implica la generación de una cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN) denominado ADN complementario (ADNc) a partir de un ácido ribonucleico (ARN). Este procedimiento es crucial en el experimento; a partir del ADNc formado podrá cuantificarse la expresión génica. Para ello, se usará el kit comercial "NZY First-Strand cDNA Synthesis", que incluye todos los componentes necesarios para sintetizar la molécula de interés, con la excepción del ARN, obtenido anteriormente. Estos compuestos son:

- Una mezcla preparada llamada NZYRT 2 ×, formada por una combinación de hexámeros aleatorios, cebadores oligo (dT)₁₈, dNTPs, MgCl₂ y un tampón RT optimizado.
- Una mezcla de enzimas NZYRT, constituida por la transcriptasa inversa NZY y el inhibidor de ribonucleasas NZY para proteger el ARN.
- La RNasa H (de *E. coli*) para degradar el ARN de forma específica tras la formación del ADNc.

En primer lugar, para llevar a cabo la retrotranscripción, deben añadirse a un tubo de microcentrífuga libre de nucleasas los compuestos mencionados anteriormente, con la

excepción de la RNasa H. Además, se incluirá el ARN, pudiendo variar la cantidad de partida de 10 pg a 5 pg. La muestra se introducirá en un termociclador con el siguiente programa (Tabla 2):

Tabla 2. Programa de retrotranscripción usado en el termociclador.

	Temperatura	Tiempo
1° Incubación	25 °C	10 min
2° Incubación	50 °C	30 min
Inactivación de la reacción	85 °C	5 min

Tras finalizar los ciclos anteriores de variación térmica, se añadirá la NZY RNasa H a la mezcla anterior y se dejará incubando a 37 °C durante 20 minutos. La función de esta enzima es la eliminación específica del ARN que no se ha retrotranscrito. Este procedimiento mejorará la sensibilidad de la reacción. El ADNc monocatenario resultante será adecuado para llevar a cabo la amplificación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

5.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) cuantitativa

Finalmente, para saber la expresión de la proteína de interés en este trabajo, se procederá con la amplificación del ADNc obtenido en el paso anterior. Se analizará el ARNm de los diferentes pacientes. Para ello, se cargará en una placa de 96 todos los componentes necesarios, de manera que en cada pocillo se añadirán los siguientes compuestos: los cebadores *forward* y *reverse* específicos para cada gen, el ADNc del paciente, la mezcla SYBR Green (que incluye ADN polimerasa Taq, nucleótidos,..) y agua.

Además del CBLL1 (gen que codifica para HAKAI), se emplearán dos genes constitutivos, GAPDH y RPL13A. En estos, el nivel de expresión no varía, permanece constante. Por esta razón, serán imprescindibles para la normalización de la RT-qPCR: un cambio en la expresión de GAPDH y RPL13A es indicativo de la presencia de contaminación u otro factor que intervenga en la expresión génica. De esta forma, se podrá asegurar con certeza que la técnica funciona correctamente. Por otra parte, en la placa de 96 pocillos, también se carga una columna con agua (en ausencia de ADNc), con el objetivo de tener un control negativo, en el

que la expresión sea nula. Todas las muestras se harán por duplicado, asegurándose que los resultados sean los correctos (Figura 5).

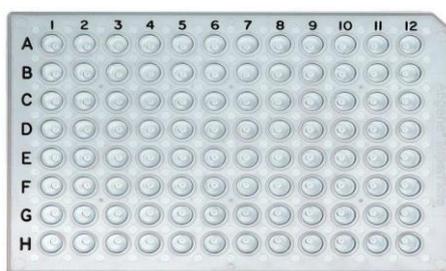


Figura 5. Placa de 96 pocillos. A y B: Filas cargadas con los cebadores de CBLL1; C y D: Filas cargadas con los cebadores de GAPDH; E y F: Filas cargadas con los cebadores de RPL13A; 1: Control negativo con agua; 2-12: Muestras de diferentes pacientes (ADNc).

Para el diseño de las parejas de cebadores de los tres genes (CBLL1, GAPDH y RPL13A) se empleará el programa Primer Select V7.1.0 (DNASTAR) (Tabla 3).

Tabla 3. Cebadores empleados en este trabajo.

GEN	CEBADOR DIRECTO (5' - 3')	CEBADOR INVERSO (5' - 3')
CBLL1	CGCAGACGAATTCCTATAAAGC	CCTTCTTCATCACCAGGTGG
RPL13A	CTCAAGGTGTTTGACGGCATCC	TACTTCCAGCCAACCTCGTGAG
GAPDH	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCA

Las reacciones de PCR con los cebadores descritos para cada uno de los genes de interés, se realizarán empleando un programa estándar de amplificación con un gradiente de temperatura (55-72°C) en el paso de hibridación (Tabla 4).

Tabla 4. Programa de PCR usado para la amplificación de los genes estudiados.

PASO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (t)	CICLOS
Activación de la ADN polimerasa	95 °C	10 min	-
Desnaturalización	94°C	10 s	40
Hibridación	55-72°C	30 s	
Elongación	72°C	1 min	
Elongación final	72°C	5 min	-

6. PLAN DE TRABAJO

El proyecto se desarrollará a lo largo de los meses de febrero, marzo, abril y principios de mayo. En la siguiente tabla, se recoge el cronograma con la secuencia de tareas programadas (Tabla 5).

Tabla 5. Cronograma del plan de trabajo. S: Semana; M: Muestras.

		FEBRERO				MARZO				ABRIL				MAYO	
		S. 1	S. 2	S. 3	S. 4	S. 1	S. 2	S. 3	S. 4	S. 1	S. 2	S. 3	S. 4	S.1	
S	M														
EXTRACCIÓN DE EXOSOMAS	1-5														
	6-10														
	11-15														
EXTRACCIÓN DE ARN	16-20														
TRANSCRIPCIÓN INVERSA	21-25														
	26-30														
PCR	31-35														
	36-40														
ANÁLISIS DE LOS DATOS OBTENIDOS	Todas las muestras														
REDACCIÓN	Todas las muestras														
PUBLICACIÓN DE LOS RESULTADOS	Todas las muestras														

7. CUESTIONES ÉTICAS

Este estudio requiere la recogida de muestras de biopsias de tejido tumoral de pacientes afectados por cáncer de colon. Estas se obtendrán del Biobanco A Coruña y de los Biobancos nacionales autorizados, en caso de que el Biobanco de nuestro centro no dispusiera de todas las muestras necesarias para realizar la presente investigación. Nos comprometemos a cumplir todos los requisitos éticos y legales exigibles para este tipo de prácticas, tal y como establece la ley de Investigación Biomédica (LIBM) y la normativa que la complementa. Nos comprometemos a respetar las Normas de Buena Práctica Clínica, los principios éticos fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki y el Convenio de Oviedo, y los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación. El proyecto ha sido autorizado por el Comité de Ética (Código 2017/570) y siguiendo las pautas establecidas para las cesiones de muestras en la Ley Orgánica 15/1999, del 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal y en el Real Decreto 1720/2007, del 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, del 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal. Dado que las muestras se nos ceden de un modo no identificable, es decir, asociadas únicamente a datos genéricos (sexo, patología, peso, edad,...) que evitan que podamos conocer la identidad del donante, nos comprometemos a trabajar con el mismo nivel de protección de datos exigido por la normativa española.

8. APLICABILIDAD

La realización de los objetivos expuestos en este proyecto permitirá el diseño de un método no invasivo para llevar a cabo un diagnóstico precoz del cáncer mediante la extracción de exosomas de muestras obtenidas a partir de la metodología de la biopsia líquida.

9. PLAN PARA LA DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Se presentarán los resultados obtenidos en comunicaciones a congresos orales y tipo póster tanto a nivel nacional como ASEICA Educational Symposium, V Edition Biomedical Cancer Research Conference in Galicia como a nivel internacional (EACR, TEMTIA, ASEICA Congress, SEBMM... entre otros). Además se publicarán en revistas conocidas de gran impacto incluidas en JCR (Journal Citation Reports).

10. RECURSOS NECESARIOS

El grupo de investigación se encuentra ubicado en las instalaciones del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (Edificio Anexo al Materno Infantil), y tiene acceso a todas las áreas necesarias para el llevar a cabo los diferentes proyectos de investigación del grupo. Además del equipamiento básico de laboratorio, en el INIBIC contamos con diferentes servicios centrales:

- Área de cultivos celulares, que dispone de una serie de campanas de flujo laminar, estufas de cultivo, centrífugas, y microscopios invertidos.
- Área de citometría, que cuenta con un citómetro de flujo (Beckton Dickinson), analizador hematológico, y analizador de gases e iones.
- Área de histomorfología, equipada con un baño de parafina, una campana de extracción de gases, un criostato, una estación de bloques de parafina, un inclusor de parafina, microarrays de tejidos, y un microtomo.
- Área de microscopía, que dispone de un microscopio de contraste de fases, microscopio óptico y fluorescencia y el equipamiento informático y el software necesarios para el análisis de imágenes.
- Área de Genómica, con termocicladores convencionales y tecnología para la realización de PCR a tiempo real (Lightcycler 480II y Gene Amp PCR System 9700). Además, cuenta con un secuenciador automático 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem), secuenciador de nueva generación Ion Torrent 5S/XL, cabinas para la preparación de las reacciones y muestras para las PCR, aparatos para realizar electroforesis, centrífugas y ultracentrífugas.
- Área de proteómica, con un cromatógrafo de líquidos, sonicadores, transiluminadores, HPLC, equipos de electroforesis, espectrofotómetros y MALDI-TOF/TOF Analyzer, SNAP-ID (protein detection system).
- Unidad de Epidemiología y Bioestadística del CHUAC, que nos proporcionará asesoramiento en los pertinentes estudios estadísticos que sean necesarios para llevar a cabo este proyecto.

En las tablas 5 y 6 se incluye una estimación de la infraestructura y de los recursos necesarios para llevar a cabo este proyecto con su coste aproximado.

Tabla 5. Estimación de los Reactivos y material de plástico necesarios y coste aproximado.

REACTIVOS Y MATERIAL DE PLÁSTICO
Tubos Eppendorf
Placa de 96 pocillos
Tubos de microcentrifuga
Guantes
Papel parafilm
2-Mercaptoetanol
Etanol 100%
Mezcla SYBR green
Genes constitutivos GAPDH y RPL13A
Cebadores F y R para GAPDH
Cebadores F y R para RPL13A
Cebadores F y R para HAKAI
TOTAL: 3.000 euros

Tabla 6. Estimación de los Kits y técnicas de biología molecular necesarias y coste aproximado.

KITS Y TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR
Kit ExoGAG
Kit total Exosome RNA and protein isolation
Kit NZY First-strand cDNA synthesis
TOTAL: 7.000 euros

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abella V, Valladares M, Rodríguez T, Haz M, Blanco M, Tarrío N, Iglesias P, Aparicio LA, Figueroa A. miR-203 regulates cell proliferation through its influence on Hakai expression. *PLoS ONE*. 2012;7(12): e52568. doi: 10.1371/journal.pone.0052568.
- Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(9):623-31. doi: 10.1038/nrc3820.
- Aparicio LA, Abella V, Valladares M, Figueroa A. Posttranscriptional regulation by RNA-binding proteins during epithelial-to-mesenchymal transition. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(23):4463-4477. doi: 10.1007 / s00018-013-1379-0.
- Aparicio LA, Blanco M, Castosa R, Concha A, Valladares M, Calvo, Figueroa A. Clinical Implications of Epithelial Cell Plasticity in Cancer Progression. *Cancer Lett*. 2015;366:1-10. doi: 10.1016 / j.canlet.2015.06.007.
- Aparicio LA, Castosa R, Haz-Conde M, et al. Role of the microtubule-targeting drug vinflunine on cell-cell adhesions in bladder epithelial tumour cells. *BMC Cancer*. 2014;14:507. doi: 10.1186 / 1471-2407-14-507.
- Aparicio LA, Valladares M, Blanco M, Alonso G, Figueroa A. Biological influence of Hakai in cancer: a 10-year review. *Cancer Metastasis Rev*. 2012;31(1-2):375-386. doi: 10.1007 / s10555-012-9348-x.
- Bardelli A, Pantel K. Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet). *Cancer Cell*. 2017;31(2):172-179. doi: 10.1016/j.ccell.2017.01.002.
- Castosa R, Martínez-Iglesias O, Roca-Lema D, et al. Hakai overexpression effectively induces tumour progression and metastasis in vivo. *SciRep*. 2018;8(1):3466. doi:10.1038/s41598-018-21808-w.
- Chin V, Lim C. Epithelial-mesenchymal plasticity-engaging stemness in an interplay of phenotypes. *Stem Cell Investig*. 2019;6:25. doi:10.21037/sci.2019.08.08.
- Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10(8):472-84. doi: 10.1038/nrclinonc.

- Díaz-Díaz A, Casas-Pais A, Castosa R, Calamia V, Martínez-Iglesias O, Roca-Lema D, Santamarina I, Valladares-Ayerbes M, Calvo L, Chantada V, Figueroa A. Proteomic Analysis of the E3 Ubiquitin-Ligase Hakai Highlights a Role in Plasticity of the Cytoskeleton Dynamics and in the Proteasome System. *Proteome Res.* 2017;16(8):2773-2788. doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00046.
- Díaz-Díaz A, Roca-Lema D, Casas-Pais A, Romay G, Colombo G, Concha A, Graña B, Figueroa A. Heat Shock Protein 90 Chaperone Regulates the E3 Ubiquitin-Ligase Hakai Protein Stability. *Cancers.* 2020;12(1):215. doi: 10.3390 / cancers12010215.
- Dogliotti I, Drandi D, Genuardi E, Ferrero S. New Molecular Technologies for Minimal Residual Disease Evaluation in B-Cell Lymphoid Malignancies. *J Clin Med.* 2018;7(9):288. doi:10.3390/jcm7090288.
- Dupre-Crochet S, Figueroa A, Hogan C, Ferber EC, Bialucha CU, Adams J, Richardson EC, Fujita Y. Casein kinase-1 is a novel negative regulator of E-cadherin-based cell-cell contacts. *Mol Cell Biol.* 2007;27(10): 3804-3816. doi: 10.1128 / MCB.01590-06.
- Figueroa A, Kotani H, Toda Y, et al. Novel Roles of Hakai in Cell Proliferation and Oncogenesis. Sommer T, ed. *Mol Cell Biol.* 2009a;20(15):3533-3542. doi: 10.1091 / mbc.E08-08-0845.
- Figueroa A, Fujita Y, Gorospe M. Hacking RNA: Hakai promotes tumorigenesis by enhancing the RNA-binding function of PSF. *Cell Cycle.* 2009b; 8(22):3648-3651. doi: 10.4161 / cc.8.22.9909.
- Fujita Y, Krause G, Scheffner M, Zechner D, Leddy H, Behrens J, et al. Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol.* 2002;4(3):222–231. doi: 10.1038 / ncb758.
- Gupta PB, et al. Phenotypic Plasticity: Driver of Cancer Initiation, Progression, and Therapy Resistance. *Cell Stem Cell.* 2019;24(1): 65-78. doi: 10.1016/j.stem.2018.11.011.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674. doi: 10.1016 / j.cell.2011.02.013.
- Heitzer E, Perakis S, Geigl JB, Speicher MR. The potential of liquid biopsies for the early detection of cancer. *NPJ Precis Oncol.* 2017;1(1):36. doi:10.1038/s41698-017-0039-5.

- Husain H, Velculescu VE. Cancer DNA in the Circulation: The Liquid Biopsy. *JAMA*. 2017;318(13):1272-1274. doi:10.1001/jama.2017.12131.
- Liang X. EMT: new signals from the invasive front. *Oral Oncology*. 2011; 47(8):686-7. doi: 10.1016 / j.oraloncology.2011.04.016.
- Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, LeBleu VS, Mittendorf EA, Weitz J, Rahbari N et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*. 2015; 523(7559): 177-182. doi: 10.1038 / nature14581.
- Mukherjee M, Chow SY, Yusoff P, et al. Structure of a novel phosphotyrosine-binding domain in Hakai that targets E-cadherin. *EMBO Rep*. 2012;31(5):1308-1319. doi:10.1038/emboj.2011.496.
- Perez-Moreno M, Jamora C, Fuchs E. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell*. 2003;112(4):535-548. doi: 10.1016 / s0092-8674 (03) 00108-9.
- Roca-Lema D, Martinez-Iglesias O, Fernández de Ana-Portela C, Rodríguez-Blanco A, Valladares-Ayerbes M, Díaz-Díaz A, Casas-Pais A, Prego C, Figueroa A. In Vitro Anti-proliferative and Anti-invasive Effect of Polysaccharide-rich Extracts from *Trametes Versicolor* and *Grifola Frondosa* in Colon Cancer Cells. *Int J Med Sci*. 2019;16(2):231-240. doi:10.7150/ijms.28811.
- Rodríguez-Rigueiro T, Valladares-Ayerbes M, Haz-Conde M, Aparicio LA, Figueroa A. Hakai reduces cell-substratum adhesion and increases epithelial cell invasion. *BMC Cancer*. 2011;11:474. doi: 10.1186 / 1471-2407-11-474.
- Rodriguez-Rigueiro T, Valladares-Ayerbes M, Haz-CondeM, Blanco M, Aparicio G, Fernández-Puente P, Blanco FJ, Lorenzo MJ, Aparicio LA, Figueroa A. Novel procedure for protein extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Proteomics*. 2011;11(12):2555-2559. doi: 10.1002/pmic.201000809.
- Roy S, Saikia B. Cancer and cure: a critical analysis. *Indian J Cancer*. 2016;53(3):441–442. doi: 10.4103/0019-509X.200658.
- Sato Y, Matoba R, Kato K. Recent advances in liquid biopsy in precision oncology research. *Biol Pharm Bull*. 2019;42(3):337-342. doi: 10.1248 / bpb.b18-00804.

- Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(6):426-37. doi: 10.1038/nrc3066.
- Torrano V, Royo F, Peinado H, et al. Vesicle-MaNiA: extracellular vesicles in liquid biopsy and cancer. *Curr Opin Pharmacol*. 2016;29:47-53. doi:10.1016/j.coph.2016.06.003.
- Tian X, Liu Z, Niu B, et al. E-Cadherin/ β -Catenin Complex and the Epithelial Barrier. *JBiomed Biotechnol*. 2011;2011:567305. doi: 10.1155 / 2011/567305.
- Van der Horst G, Bos L, Van der Pluijm G. Epithelial plasticity, cancer stem cells, and the tumor-supportive stroma in bladder carcinoma. *Mol Cancer Res*. 2012;10(8):995-1009. doi: 10.1158 / 1541-7786.MCR-12-0274.
- Wu J, Hu S, Zhang L, et al. Tumor circulome in the liquid biopsies for cancer diagnosis and prognosis. *Theranostics*. 2020;10(10):4544–4556. doi:10.7150/thno.40532
- Wyatt AW, Gleave ME. Targeting the adaptive molecular landscape of castration-resistant prostate cancer. *EMBO Mol Med*. 2015;7(7):878-894. doi:10.15252/emmm.20130370.
- Yang J, Antin P, Berx G, Blanpain C, Brabletz T, Bronner M, Campbell K, et al. Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020. doi: 10.1038 / s41580-020-0237-9.