

# Máster Universitario en Dianas Terapéuticas en Señalización Celular, Investigación y Desarrollo

Curso 2020-2021

Memoria de Trabajo Fin de Máster

## Identificación en biopsia líquida de biomarcadores exosomales derivados de "Fibroblastos Asociados a Cáncer" con valor diagnóstico en cáncer de colon

Manuel Collado Valero

# Identificación en biopsia líquida de biomarcadores exosomales derivados de “Fibroblastos Asociados a Cáncer” con valor diagnóstico en cáncer de colon

Manuel Collado-Valero<sup>1,2\*</sup>, Cristina Galindo-Pumariño<sup>2</sup> y Cristina Peña<sup>2</sup>

1 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2 Departamento de Oncología Médica, Hospital Universitario Ramón y Cajal, IRYCIS, CIBERONC, Universidad de Alcalá, 28034, Madrid

## Resumen

El cáncer colorrectal es la tercera forma de cáncer más diagnosticada en el mundo y la cuarta causa más común de muerte relacionada con el cáncer. Su desarrollo cursa desde un epitelio normal, pasando por lesiones benignas/premalignas (hiperplasia y adenoma) hasta una lesión maligna. En este tipo de cáncer, así como en otros tipos de tumores sólidos adquiere gran importancia el concepto de microambiente tumoral, en el que destacan, entre sus componentes principales, los fibroblastos asociados a cáncer (CAFs). Los CAFs participan en el desarrollo de la enfermedad en múltiples etapas, dirigiendo una comunicación cruzada con las células tumorales y otras células estromales mediante, entre otros elementos, la secreción de exosomas. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha identificado los elementos reguladores ARN no codificantes de pequeño tamaño (sncRNAs) empaquetados en exosomas derivados de CAFs, de forma que hipotetizamos que mediante biopsia líquida en sangre periférica es posible aislar dichos exosomas con un alto contenido en sncRNAs. En el actual trabajo describimos el valor diagnóstico de 4 sncRNAs mediante la cuantificación diferencial de los mismos en exosomas aislados de pacientes con cáncer de colon, adenomas, hiperplasias e individuos sanos. De esta manera, nuestro objetivo busca la identificación de nuevos biomarcadores con valor diagnóstico que puedan mejorar la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes con cáncer de colon, así como el diagnóstico precoz de patologías colónicas, incluyendo patologías benignas/premalignas y tumorales.

**Palabras clave:** cáncer colorrectal; microambiente tumoral; fibroblastos asociados a cáncer; exosomas; ARNs no codificantes de pequeño tamaño; biopsia líquida

**Recibido:** 23 de junio 2021

**Copyright:** © 2021 Manuel Collado Valero. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObrasDerivadas 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

\*E-mail: manualmansa98@gmail.com



## Introducción

El cáncer colorrectal (CCR) es la tercera forma de cáncer más diagnosticada en el mundo y la cuarta causa más común de muerte relacionada con el cáncer [1]. La progresión del CCR se desarrolla de forma progresiva desde un epitelio normal, pasando por un estado de pre-malignización (adenoma), y posteriormente a una lesión maligna, pudiendo después extenderse sistémicamente produciendo la metástasis [2,3].

Como ocurre con muchos tipos de cáncer, al principio la enfermedad cursa sin síntomas o molestias. Estos empiezan a aparecer cuando la enfermedad ya está más avanzada que, sin ser una sintomatología específica de este tipo de tumor, incluye la presencia de sangre en heces (pudiendo causar anemia), pérdida de peso involuntaria o malestar abdominal [2].

De forma general, la supervivencia a los 5 años en CCR se sitúa en torno al 65%, aunque varía entre el 90% de los carcinomas in situ y el 10-14% en el caso de que haya metástasis, indicando la importancia de la detección precoz del tumor [4-6]. Así, la identificación de biomarcadores podría servir como factor clave en el diagnóstico temprano de patologías colónicas pre-malignas o tumorales mediante campañas de screening poblacionales.

Por otro lado, el desarrollo de los tumores sólidos está íntimamente asociado al estado fisiológico de los distintos componentes del microambiente tumoral (TME o “tumoral microenvironment” por sus siglas en inglés), entre los que destacan la matriz extracelular, los fibroblastos, las células de los vasos sanguíneos y del sistema inmune. [7]. Durante el proceso tumoral, los fibroblastos asociados a tumor o CAFs (del inglés, “cancer associated fibroblasts”) participan en la progresión de la enfermedad mediante el remodelado y depósito de matriz extracelular [8]. En estado constante de activación promueven una conversación cruzada o “cross-talk” entre las células tumorales y el resto de las células estromales que conduce al crecimiento y progresión tumoral influyendo en el pronóstico de los pacientes [9,10].

Es importante tener en cuenta que los CAFs presentan una gran heterogeneidad de subpoblaciones [11] que interactúan con las células tumorales mediante la secreción de factores de crecimiento, citoquinas y vesículas extracelulares como los exosomas, potenciando directa o indirectamente el desarrollo tumoral [12,8] o incluso presentando propiedades inhibitorias [13-16].

En este contexto, las vesículas y factores solubles circulantes liberados por CAFs y otras células del TME pueden ser empleados como biomarcadores en oncología clínica mediante biopsia líquida en sangre [17]. Entre ellos destacan los exosomas, unas vesículas extracelulares de 40-100 nm que participan en procesos tanto fisiológicos como patológicos [18]. Son secretados por células tumorales y estromales, modificando diferentes funciones en las células receptoras y ejerciendo un papel importante en el desarrollo tumoral [19].

Caracterizando el contenido de los exosomas de CAFs, nuestro grupo describió los elementos reguladores ARN no codificantes de pequeño tamaño (sncRNAs o “small non-coding RNAs” por sus siglas en inglés) empaquetados en exosomas derivados de CAFs, así como sus posibles dianas génicas y la desregulación de estas como marcadores pronósticos en pacientes con cáncer de colon [20,21]. Estos elementos reguladores, principalmente piRNAs y snRNAs (“PIWI interacting RNAs” y “small nuclear RNAs” por sus siglas en inglés) podrían facilitar una comunicación cruzada específica mediante la transferencia de exosomas entre diferentes células. Así, podrían comportarse como potentes biomarcadores en biopsia líquida con clara aplicación en oncología clínica. La biopsia líquida, principalmente sangre periférica, se postula como una nueva herramienta de detección precoz de la enfermedad y seguimiento de pacientes [22,23].

A pesar de la gran cantidad de información disponible sobre la relevancia del estroma tumoral en el desarrollo de resistencias a la terapia, no existen biomarcadores estromales empleados en clínica para el diagnóstico precoz de patologías colónicas. En el presente trabajo, describimos el valor diagnóstico de cuatro sncRNAs empaquetados en exosomas aislados de muestras de sangre periférica y previamente observados como sobre-representados en exosomas derivados de CAFs como biomarcadores potenciales de diagnóstico de patología colónica, incluyendo tumores, hiperplasias y adenomas. De estos cuatro sncRNAs, uno corresponde a un piRNA y los otros tres son snRNAs; sin embargo, su identificación concreta ha sido codificada debido a que se encuentran bajo valoración de protección mediante una solicitud de patente europea, dada su potencial aplicabilidad.

## Objetivos

Diversos trabajos de investigación han demostrado la implicación de los CAFs en el desarrollo del cáncer de colon. También se ha observado la importancia de la comunicación vía exosomas entre los CAFs y las células tumorales en el desarrollo tumoral. Por tanto, hipotetizamos que la caracterización molecular tanto de los CAFs como de sus exosomas derivados secretados puede ayudar a identificar nuevos biomarcadores con valor diagnóstico que puedan impulsar la mejora de la supervivencia y calidad de vida de los pacientes con cáncer de colon. Teniendo en cuenta estos estudios, planteamos los siguientes objetivos:

- Puesta a punto de la metodología de cuantificación de los sncRNAs de interés empaquetados en exosomas aislados de sangre periférica de pacientes con patología colónica, incluyendo hiperplasias, adenomas y tumores, e individuos sanos.
- Estudio de la distribución diferencial de sncRNAs en exosomas aislados de sangre periférica de pacientes con cáncer de colon, adenomas de colon, hiperplasias de colon e individuos sanos: determinación de su valor como biomarcador diagnóstico de patología colónica.

## Metodología

### Reclutamiento de pacientes y obtención y procesamiento de muestras de pacientes

Todos los pacientes firmaron de forma previa a la cirugía un consentimiento informado tras recibir una breve explicación sobre la naturaleza del estudio, el cual ha sido aprobado por el Comité de Ética del Hospital Ramón y Cajal. Los criterios de inclusión para los pacientes con cáncer de colon fueron: pacientes mayores de 18 años con diagnóstico reciente de cáncer de colon, en estadios I-IV de acuerdo a la clasificación TNM, que no habían recibido tratamiento antitumoral. Los criterios de inclusión para los pacientes con adenomas e hiperplasias fueron: pacientes mayores de 18 años sometidos a colonoscopia, que no habían recibido tratamiento contra el cáncer ni extirpación quirúrgica de un cáncer.

En los pacientes las muestras de sangre fueron recogidas antes de preparar el intestino para la colonoscopia en tubos Vacutainer SSTTM II Advance de tapón rojo (Becton Dickinson) y procesadas por la unidad de Biobanco del Hospital. En los individuos sanos, se recogieron y procesaron de la misma forma durante los procesos de donación de sangre en el banco de sangre de nuestro hospital. Tras centrifugación (2000 rpm durante 10 minutos), se obtuvo el suero que fue almacenado en alícuotas de 250 µL en tubos Eppendorf de 1,5 mL a -80°C hasta su empleo.

## Aislamiento de exosomas de muestras de suero sanguíneo y ARN total de exosomas

A partir de muestras de suero, los exosomas se obtuvieron mediante su precipitación empleando el protocolo de ExoQuick™ Exosome Precipitation Solution (System Bioscience) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

La extracción de RNA total presente en exosomas de muestras de sangre, rico en sncRNAs, fue realizada empleando el kit MirVana™ mirVana™ miRNA Isolation kit (Ambion), siguiendo las instrucciones del fabricante. En este protocolo, se emplea un control interno de extracción o “spike-in” UniSP2 como control de una correcta extracción de ARN, así como el carrier MS2 para mejorar la estabilidad del spike-in sin interferir en las aplicaciones posteriores. El ARN es almacenado en tubos Eppendorf de 1.5 mL en 40 µL de agua libre de nucleasas y almacenado a -20°C.

## Retrotranscripción y validación de los procesos de extracción y retrotranscripción mediante PCR en Tiempo Real

Tras obtener el ARN contenido en los exosomas, se procedió a su retrotranscripción a ADN complementario (ADNc) utilizando el kit *miRCURY LNA™ RT* (Qiagen), que emplea sondas LNA (“locked nucleic acid” por sus siglas en inglés) específicas. En el mix de retrotranscripción se incluyó un control interno correspondiente al ARN *cel-miR-39-3p* (Qiagen). Este control consiste en una versión sintética de un miRNA (del inglés, “micro RNA”) de secuencia conocida procedente de *C. elegans*. Este miRNA será detectado posteriormente por PCR en Tiempo Real, para comprobar la eficiencia de la retrotranscripción. El programa de temperaturas consistió en un ciclo de 30 minutos a 16°C, seguido de 30 minutos a 42°C y 5 minutos a 85°C. El ADNc obtenido se conservó a -20°C hasta su empleo.

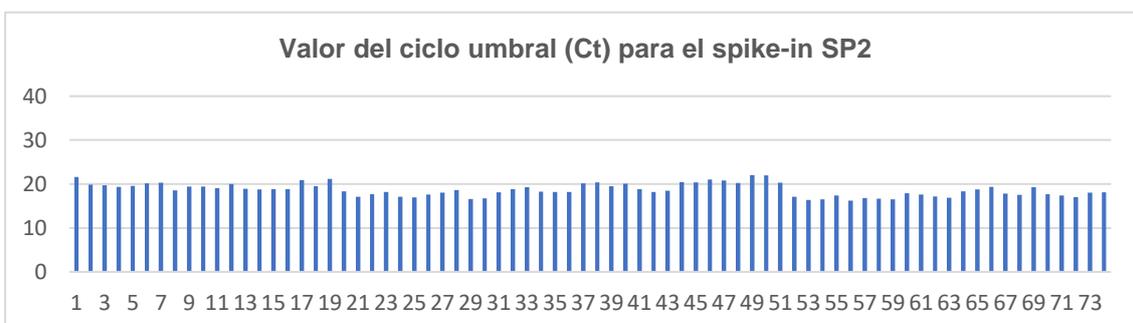
Para comprobar la eficiencia de los procesos de extracción y retrotranscripción del ARN, se realizó la PCR en Tiempo Real para las secuencias de UniSp2 y *cel-miR-39-3p* respectivamente, empleándose para ello los cebadores comerciales *miRCURY LNA miRNA* (Qiagen). El protocolo de PCR a seguir consistió en un ciclo de 2 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de amplificación de 10 segundos a 95°C y 1 minuto a 56°C, adquiriendo la señal de fluorescencia al final de cada ciclo. Se obtuvo la curva de *melting* del producto de PCR a 95°C, lo que indicaría si hay un único producto de PCR para cada cebador. Las reacciones de PCR se realizaron en un *Light-Cycler 480* (Roche) utilizando el reactivo *miRCURY LNA SYBR Green Master Mix* (Qiagen).

## Resultados

### Puesta a punto del análisis de cuantificación de los sncRNAs de interés empaquetados en exosomas

Para el proceso de normalización de los datos, se comprobó la empleabilidad de distintos sncRNAs que se mantuvieran estables en exosomas aislados de sangre periférica; así, se probaron algunos como miR-103a-3p, miR-191-5p y miR-30c-5p. Sin embargo, la dificultad de la búsqueda de un ARN que se mantenga estable en exosomas de individuos sanos, con lesiones benignas/premalignas o con tumor no permitió la obtención de resultados satisfactorios. Por ello, se empleó como ARN normalizador o “housekeeping” el control interno de extracción UniSp2, ya que se inocula en cantidades conocidas en todas las muestras durante la extracción de ARN total.

Así, en el proceso de validación del proceso de extracción mediante PCR en tiempo real, se realizó la PCR empleando un cebador comercial para el spike-in SP2. Los valores del ciclo umbral para SP2 se recogen en la figura 1.



**Figura 1.- Valoración del proceso de extracción mediante PCR en Tiempo Real para el control de extracción SP2.** Se recogen los valores del ciclo umbral (Ct) para SP2 en 74 muestras de pacientes independientemente de la serie a la que pertenezcan, lo que refleja su idoneidad como ARN normalizador.

## Datos descriptivos de las distintas series de pacientes y de los sncRNAs analizados

Para el análisis de detección de los sncRNAs de interés en muestras de biopsia líquida humana, se trabajó con una serie de 16 pacientes con cáncer de colon 6 hombres y 10 mujeres, de edades comprendidas entre los 58 y 86 años distribuidos en estadios I (12,5%), II (37,5%), y III (43,75%); se desconoce el estadio del tumor de un paciente. Un 37,5% de los pacientes presentaba localización del tumor en colon derecho, mientras que un 37,5% lo presentaba en el colon izquierdo. A un 25% de los pacientes se le detectó el tumor en la porción del colon transversal y/o no se especificó la lateralidad.

El grupo de pacientes con adenoma (n=8) está compuesto por 5 hombres y 3 mujeres de edades comprendidas entre los 61 y 74 años. El grupo de hiperplasia de colon (n=8) está compuesto por 2 hombres y 3 mujeres, de edades comprendidas entre los 59 y 72 años. Además, en el estudio se contó con muestras de sangre periférica de 15 individuos sanos o sin patologías digestivas conocidas.

En la tabla 1 se especifica el número de pacientes en los que fue posible la detección de los sncRNAs diana, así como datos generales de la cuantificación como la medida de posición central (mediana), así como de posición no central (percentil 33 y 66%), además de los valores máximos y mínimos para cada sncRNA.

	sncRNA1	sncRNA2	sncRNA3	sncRNA4
<b>N</b>	43	37	42	38
<b>Mediana</b>	6'54	1'34	8'71	1'99
<b>Mínimo</b>	-2'42	-4'66	0'075	-5'43
<b>Máximo</b>	11'56	6'81	13'22	7'29
<b>Percentil 33</b>	2'87	-0'61	4'17	0'84
<b>Percentil 66</b>	8'05	2'70	9'59	2'94

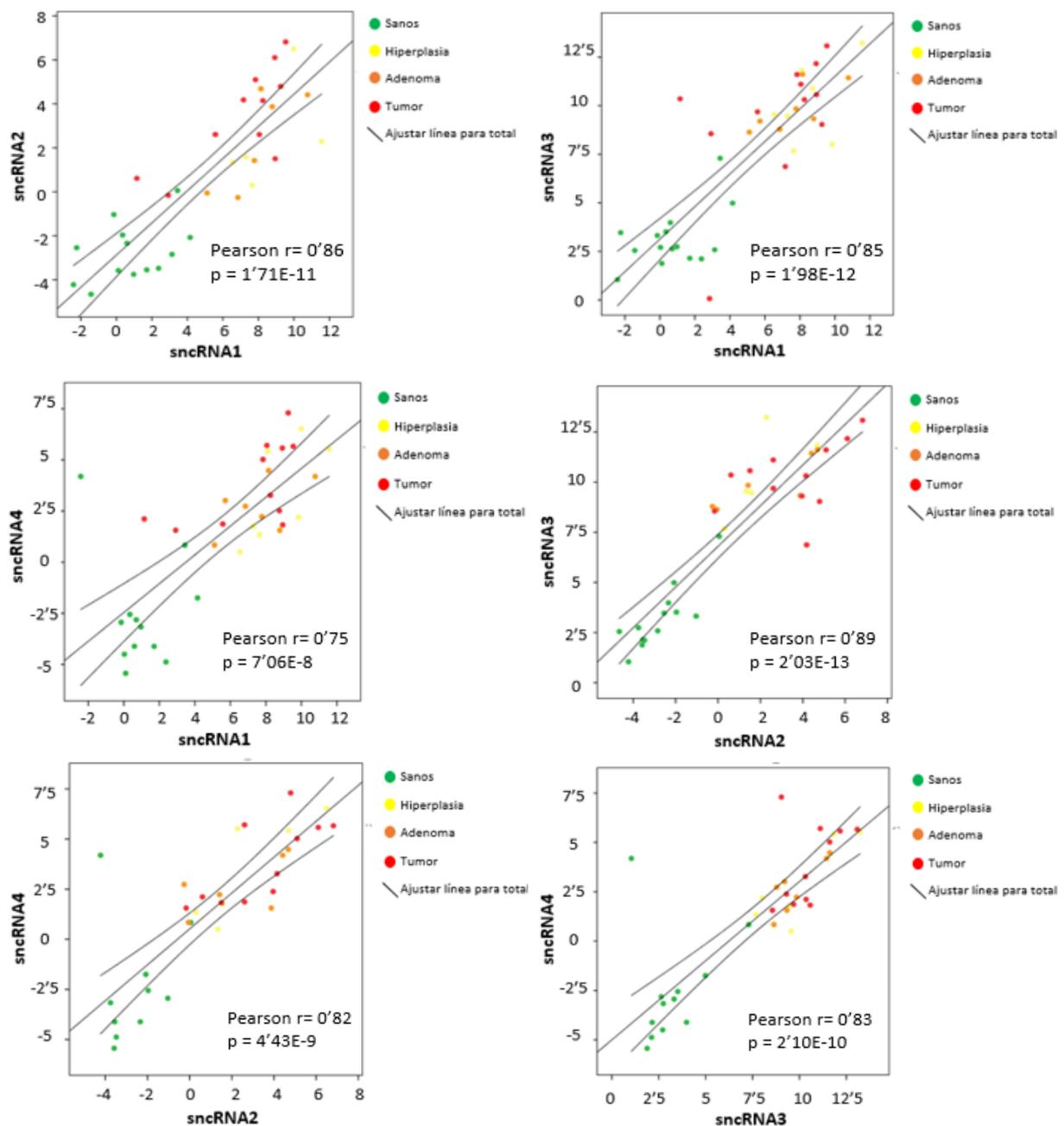
**Tabla 1.- Cuantificación de los niveles de sncRNAs 1-4 (en Log<sub>2</sub>) en exosomas aislados mediante biopsia líquida de sangre periférica de pacientes con cáncer de colon, con lesiones benignas/premalignas e individuos sanos.**

## Correlación entre sncRNAs

Como es esperable, el test de correlación de Pearson mostró correlación directa entre los niveles de los 4 marcadores analizados en los exosomas aislados de pacientes con cáncer de colon, pacientes con hiperplasia, adenoma e individuos sanos (Tabla 2, Figura 2).

		sncRNA1	sncRNA2	sncRNA3	sncRNA4
<b>sncRNA1</b>	<b>Test de Pearson</b>		0'86	0'85	0'75
	<b>Sig. (bilateral)</b>		1'71E-11	1'98E-12	7'06E-8
	<b>N</b>		36	41	37
<b>sncRNA2</b>	<b>Test de Pearson</b>			0'89	0'82
	<b>Sig. (bilateral)</b>			2'03E-13	4'43E-9
	<b>N</b>			36	33
<b>sncRNA3</b>	<b>Test de Pearson</b>				0'83
	<b>Sig. (bilateral)</b>				2'10E-10
	<b>N</b>				36

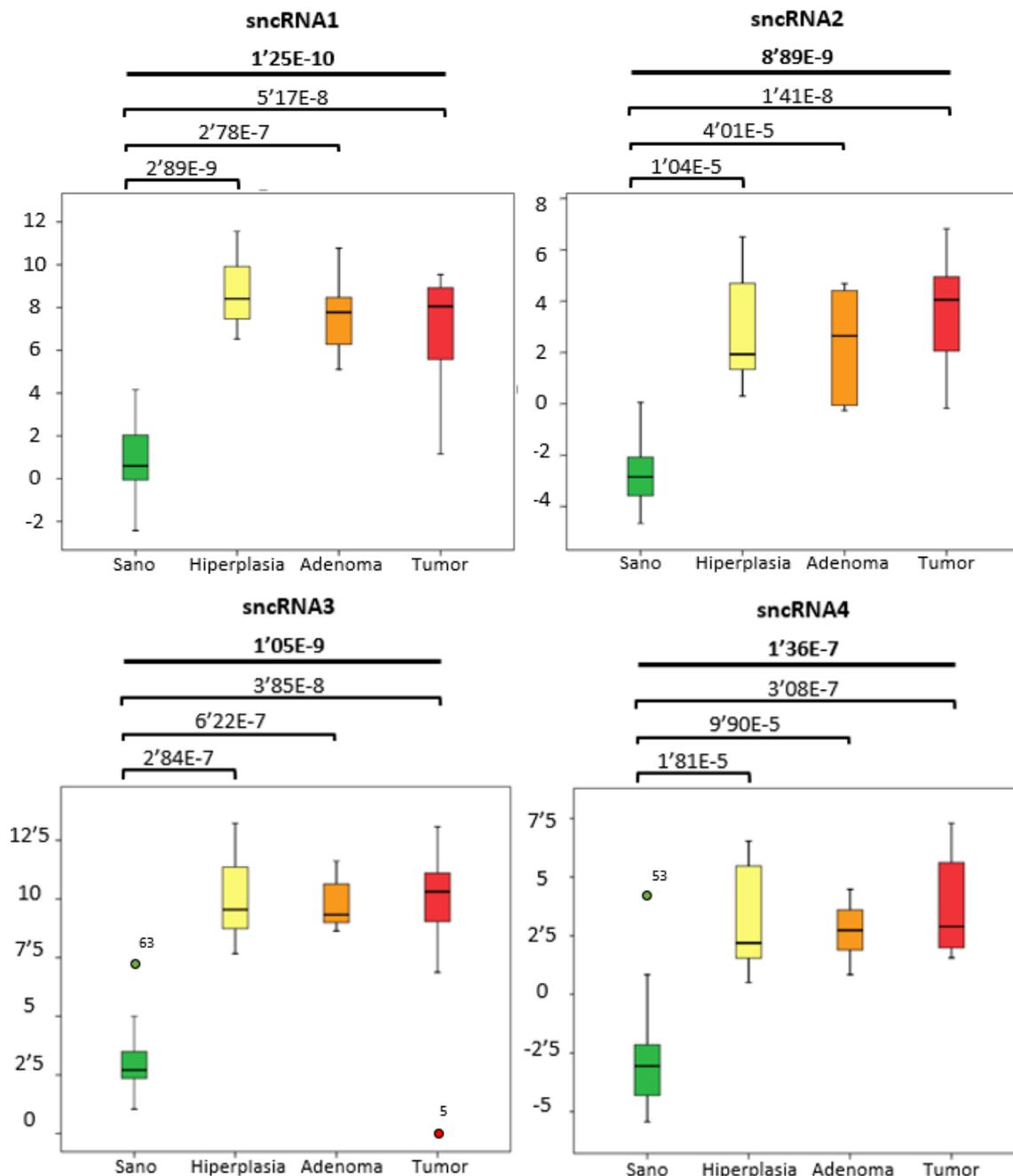
**Tabla 2.- Correlación entre sncRNAs.** Se indica para cada comparación el valor de Correlación de Pearson, el valor de significación (Sig.) y el número de muestras comparadas en cada emparejamiento (N). La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).



**Figura 2.- Representación gráfica de la correlación entre sncRNAs.** Se muestran las correlaciones dos a dos entre sncRNAs. Cada punto corresponde a un individuo sano (verde), con hiperplasia (amarillo), con adenoma (naranja) o con cáncer de colon (rojo). Valores positivos del coeficiente “r” de Pearson indican una correlación positiva.

### **Expresión diferencial de sncRNAs en exosomas aislados mediante biopsia líquida de sangre periférica de pacientes con cáncer de colon, adenomas de colon, hiperplasias de colon e individuos sanos**

Se midieron los niveles de los 4 sncRNAs en el suero de los pacientes previamente descritos para comprobar su representación diferencial en exosomas aislados de sangre periférica. Como se observa en la Figura 2, el test de ANOVA muestra diferencias significativas en la distribución de los 4 sncRNAs entre los distintos grupos de pacientes. Además, el test de Bonferroni en el que se analizan las relaciones entre grupos dos a dos, demostró que los niveles de los 4 sncRNAs analizados se encontraban diferencialmente representados en los exosomas aislados de sangre periférica de los individuos sanos respecto de los exosomas de los individuos con cáncer de colon, adenomas o hiperplasias (Figura 3). Sin embargo, no hay diferencias estadísticamente significativas en los niveles de los sncRNAs entre los individuos con lesiones diferentes en el colon.



**Figura 3.- Niveles de los sncRNAs 1-4 en los exosomas aislados de sangre periférica para los grupos de estudio de colon.** Se muestran los grupos sanos (verde), hiperplasia (amarillo), adenoma (naranja) y cáncer de colon (rojo). En la gráfica se muestra el p-valor del test ANOVA para cada biomarcador, así como la significancia entre sanos y el resto de grupos (test Bonferroni).

### **Niveles de sncRNAs en exosomas aislados de sangre periférica como biomarcadores diagnósticos de cáncer de colon**

La cuantificación de los niveles de los 4 sncRNAs en exosomas aislados de las distintas series de pacientes, así como de individuos sanos se agruparon por terciles según los niveles de representación de cada uno de ellos (33% y 66%) para obtener tres grupos con el mismo número de individuos y determinar el valor diagnóstico de los marcadores analizados para cáncer de colon o las patologías incluidas en el estudio. De este modo, los pacientes del primer tercil se incluyeron en el grupo de “niveles bajos” de representación de un determinado sncRNA, los pacientes en el segundo tercil se situaron en el grupo de “niveles medios” y los pacientes del último tercil en el grupo de “niveles altos”.

En concordancia con los resultados obtenidos por el test de ANOVA, mediante el test de  $\chi^2$  comprobamos que los individuos incluidos en grupos de niveles “bajos”, “medios” y “altos” para cada uno de los sncRNAs se asociaban directamente con la presencia de patología ya sea tumoral o benigna/premaligna e independientemente del sncRNA analizado (tabla 3).

sncRNA1				
	Bajo	Medio	Alto	Total
Sano	12	3	0	15
Hiperplasia	0	3	5	8
Adenoma	0	4	3	7
Tumor	2	5	6	13
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>43</b>
Significancia del test $\chi^2= 1'80E-4$				

sncRNA2				
	Bajo	Medio	Alto	Total
Sano	12	1	0	13
Hiperplasia	0	4	2	6
Adenoma	0	3	3	6
Tumor	0	5	7	12
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>37</b>
Significancia del test $\chi^2= 5'55E-6$				

sncRNA3				
	Bajo	Medio	Alto	Total
Sano	13	3	0	15
Hiperplasia	0	4	3	7
Adenoma	0	4	3	7
Tumor	1	4	8	12
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>42</b>
Significancia del test $\chi^2= 1'18E-5$				

sncRNA4				
	Bajo	Medio	Alto	Total
Sano	11	0	1	12
Hiperplasia	1	3	3	7
Adenoma	0	4	3	7
Tumor	0	6	6	12
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>38</b>
Significancia del test $\chi^2= 3'72E-5$				

**Tabla 3.- Tablas de contingencia individuales para los 4 sncRNAs.** Para cada uno de ellos, se muestra la distribución del número de pacientes correspondientes en los grupos de cuantificación bajo-medio-alto al aplicar los terciles. En cada caso, se indica el valor de significancia del test  $\chi^2$ .

A su vez, se comprobó un comportamiento matemático similar de los pacientes con niveles medios o altos de cada sncRNA en relación a su asociación con la presencia de patologías (tabla 3). Por tanto, estos pacientes se agruparon en un mismo grupo, resultando en la comparación de “niveles bajos” y “medios-altos”. Desde esta nueva aproximación, se puede cuantificar el número de sncRNAs que un paciente presenta con “niveles medios-altos”, siendo este valor de 0 en aquellos pacientes donde todos los sncRNAs se encuentran en “niveles bajos”, y de 1-4 en función de si tienen 1, 2, 3 o 4 de los sncRNAs analizados con valores medios-altos. Así, se observó una fuerte asociación entre el número de sncRNAs medios-altos y la presencia de alguna patología mediante el test estadístico  $\chi^2$  (Tabla 4).

Número de sncRNAs con niveles medios-altos en grupos de pacientes						
	0	1	2	3	4	Total
Sano	7	1	1	1	0	10
Hiperplasia	0	0	0	1	4	5
Adenoma	0	0	0	0	6	6
Tumor	0	0	0	1	9	10
<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>19</b>	<b>31</b>

**Tabla 4.- Conjunto total de sncRNAs medios-altos en los grupos de estudio en colon.** Se muestra para cada serie de pacientes la distribución de individuos en los grupos con 0 a 4 sncRNAs medios o altos. Los pacientes con tumores se distribuyen en su mayoría en el grupo de 4 sncRNAs medios o altos, mientras que los individuos sanos se agrupan en su mayoría en el grupo de 0 sncRNAs elevados. Valor de significancia del test  $\chi^2= 3'6E-3$ .

El conjunto de estos datos indica claramente el uso potencial de estos 4 sncRNAs analizados en biopsia líquida de sangre periférica como biomarcadores diagnósticos de patología colónica.

## Discusión

Tal y como se ha comentado previamente, los tumores presentan una gran heterogeneidad intratumoral, lo que, sin duda, dificulta la fiel representación de la complejidad del tumor mediante biopsia tisular [24]. En este contexto, la biopsia líquida a partir de fluidos biológicos se posiciona como un nuevo método de detección precoz. Se emplea para obtener compuestos como células tumorales circulantes (CTCs), ADN libre circulante, ADN libre circulante que deriva del tumor, ARN libre circulante (incluyendo ARN no codificante), exosomas y otras vesículas extracelulares circulantes [22,23]. En estudios previos del grupo, se identificó una serie de sncRNAs, que incluyen principalmente piRNAs y snRNAs, sobrerrepresentados en exosomas derivados de CAFs respecto de exosomas derivados de fibroblastos normales (NFs) [20]. Consideramos que estos sncRNAs, al ser transportados en exosomas secretados por CAFs, podrían ser detectados en exosomas aislados de sangre periférica de pacientes mediante biopsia líquida.

Trabajando en esta hipótesis, en el presente trabajo, hemos estudiado los niveles detectables de los sncRNAs de interés en una serie de pacientes con cáncer de colon, en pacientes con adenoma o hiperplasia de colon y en individuos sanos. Los resultados de nuestro estudio muestran niveles elevados de los sncRNAs 1-4 en pacientes con cáncer de colon respecto a los individuos sanos. Curiosamente, los mismos sncRNAs también presentan niveles elevados en exosomas aislados de sangre periférica de pacientes con lesiones benignas/premalignas (adenoma e hiperplasia) respecto a los niveles encontrados en individuos sin ninguna patología digestiva diagnosticada. Por todo ello, el perfil de expresión de estos 4 sncRNAs no solo podría ser utilizado como biomarcador para el diagnóstico de cáncer de colon, sino también en la detección de alteraciones previas al desarrollo del tumor. Apoyando el papel de los elementos reguladores estudiados y de forma similar, otros autores también describieron niveles desregulados de piRNAs en muestras de sangre de pacientes con CCR en comparación con individuos sanos [25].

En base a los resultados, la detección conjunta de los sncRNAs estudiados aumenta el potencial diagnóstico. Así, los pacientes con cáncer de colon presentaban valores más elevados de los sncRNAs analizados de forma conjunta, lo que indicaría una alta sensibilidad en el diagnóstico del cáncer de colon (baja tasa de falsos negativos, equivalente a una alta tasa de verdaderos positivos). Por otra parte, los pacientes sanos presentaban valores muy bajos de los sncRNAs analizados y tratados de forma conjunta, revelando también una alta especificidad (baja tasa de falsos positivos). En cuanto a las lesiones benignas/premalignas (hiperplasias y adenomas), las muestras analizadas mostraron también valores altos de los sncRNAs en conjunto, indicando la elevada sensibilidad del estudio en patologías de colon potencialmente tumorales y el posible uso potencial del análisis de estos sncRNAs como biomarcadores diagnósticos para alteraciones pretumorales mediante biopsia líquida, lo que mejoraría la sensibilidad de las herramientas actuales de *screening* como el test de sangre oculta en heces que solo detectarían entre el 30 y 50% de estas patologías [26].

A pesar de que hay un gran número de evidencias que destacan la importancia del microambiente tumoral en el desarrollo tumoral y de los CAFs en concreto, las alteraciones en estas células no son consideradas en el momento del diagnóstico o en la toma de decisiones clínicas asociadas a los tratamientos y seguimientos de los pacientes oncológicos. Nuestros datos resaltan la identificación de nuevos biomarcadores derivados de los fibroblastos asociados a tumores con claro valor diagnóstico para diferentes patologías colónicas. Consideramos interesante la posibilidad de validar nuestros resultados en series de pacientes más largas, así como de extrapolarlos a otros tumores digestivos. En definitiva, nuestros resultados enfatizan los esfuerzos en curso para descifrar los biomarcadores derivados de los fibroblastos asociados a tumores con el fin de poder realizar diagnósticos tempranos, lo que conduce a optimizar las estrategias terapéuticas en la práctica clínica y así aumentar la supervivencia y calidad de vida de los pacientes con cáncer de colon.

## Agradecimientos

Muchas gracias a mi familia, amigos (tanto almanseños como cosladeños), a Patri y a mi grupo de investigación, en especial a mi tutora, la doctora Cristina Peña y a la inminente doctora Cristina Galindo por su inestimable ayuda en todo momento.

## Referencias

1. Ting, W., Lu, Y.A., Ho, W., Cheewakriangkrai, C., Chang, H. and C. Lin. 2020. Machine learning in prediction of second primary cancer and recurrence in colorectal cancer. *International Journal of Medical Sciences*, 17(3):280-291. <https://doi.org/10.7150/ijms.37134>
2. Aecc.es. 2021. Anatomía de colon: ¿Qué es el cáncer de colon?. [online] Available at: <<https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-colon/que-es-cancer-colon>> [Accessed 17 June 2021]
3. Carvalho, B., Sillars-Hardebol, A. H., Postma, C., Mongera, S., Droste, J. T. S., Obulkasim, A., Van De Wiel, M., Van Criekinge, W., Ylstra, B., Fijneman, R. J. A., and G.A. Meijer. 2012. Colorectal adenoma to carcinoma progression is accompanied by changes in gene expression associated with ageing, chromosomal instability, and fatty acid metabolism. *Cellular Oncology*, 35(1):53–63. <https://doi.org/10.1007/s13402-011-0065-1>
4. National Cancer Institute. 2021. Colon Cancer Treatment (PDQ®)–Patient Version. [online] Available at: <<https://www.cancer.gov/types/colorectal/patient/colon-treatment-pdq>> [Accessed 17 June 2021]
5. Siskova, A., Cervena, K., Kral, J., Hucl, T., Vodicka, P., and V. Vymetalkova. 2020. Colorectal Adenomas-Genetics and Searching for New Molecular Screening Biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9):3260. <https://doi.org/10.3390/ijms21093260>
6. Uddin, S., Siveen, K. S., Raza, A., Ahmed, E. I., Khan, A. Q., Prabhu, K. S., Kuttikrishnan, S., Mateo, J. M., Zayed, H., Rasul, K., Azizi, F., Dermime, S., and M. Steinhoff. 2019. The role of

- extracellular vesicles as modulators of the tumor microenvironment, metastasis and drug resistance in colorectal cancer. In *Cancers* (Vol. 11, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers11060746>
7. Roma-Rodrigues, C., Mendes, R., Baptista, P.V. and A.R. Fernandes. 2019. Targeting tumor microenvironment for cancer therapy. *International journal of molecular sciences*, 20(4):840. <https://doi.org/10.3390/ijms20040840>
  8. Kobayashi, H., Enomoto, A., Woods, S. L., Burt, A. D., Takahashi, M., and D.L. Worthley. 2019. Cancer-associated fibroblasts in gastrointestinal cancer. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 16(5):282–295. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0115-0>
  9. Orimo, A. and R.A. Weinberg. 2006. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 5(15):1597-1601. <https://doi.org/10.4161/cc.5.15.3112>
  10. Gout, S. and J. Huot. 2008. Role of cancer microenvironment in metastasis: focus on colon cancer. *Cancer microenvironment: official journal of the International Cancer Microenvironment Society*, 1(1):69-83. <https://doi.org/10.1007/s12307-008-0007-2>
  11. Huelsken, J. and D. Hanahan. 2018. A subset of cancer-associated fibroblasts determines therapy resistance. *Cell*, 172(4):643-644. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.028>
  12. Kalluri, R. 2016. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 16(9):582–598. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.73>
  13. Rhim, A.D., Oberstein, P.E., Thomas, D.H., Mirek, E.T., Palermo, C.F., Sastra, S.A., Dekleva, E.N., Saunders, T., Becerra, C.P., Tattersall, I.W., Westphalen, C.B., Kitajewski, J., Fernandez-Barrena, M., Fernandez-Zapico, M., Iacobuzio-Donahue, C., Olive, K.P., and B.Z. Stanger. 2014. Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer cell*, 25(6):735-747. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.021>
  14. Özdemir, B., C., Pentcheva-Hoang, T., Carstens, J.L., Zheng, X., Wu, C., Simpson, T.R., Laklai, H., Sugimoto, H., Kahlert, C., Novitskiy, S.V., De Jesus-Acosta, A., Sharma, P., Heidari, P., Mahmood, U., Chin, L., Moses, H.L., Weaver, V.M., Maitra, A., Allison, J.P., Lebleu, V.S. and R. Kalluri. 2014. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer cell*, 25(6):719-734. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.005>
  15. Öhlund, D., Handly-Santana, A., Biffi, G., Elyada, E., Almeida, A.S., Ponz-Sarvise, M., Corbo, V., Oni, T.E., Hearn, S.A., Lee, E.J., Chio, I.I.C., Hwang, C., Tiriác, H., Baker, L.A., Engle, D.D., Feig, C., Kultti, A., Egeblad, M., Fearon, D.T., Crawford, J.M., Clevers, H., Park, Y. and D.A. Tuveson. 2017. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *The Journal of experimental medicine*, 214(3):579-596. <https://doi.org/10.1084/jem.20162024>
  16. Costa, A., Kieffer, Y., Scholer-Dahirel, A., Pelon, F., Bourachot, B., Cardon, M., Sirven, P., Magagna, I., Fuhrmann, L., Bernard, C., Bonneau, C., Kondratova, M., Kuperstein, I., Zinovyev, A., Givel, A.M., Parrini, M.C., Soumelis, V., Vincent-Salomon, A. and F. Mechita-Grigoriou. 2018. Fibroblast heterogeneity and immunosuppressive environment in human breast cancer. *Cancer cell*, 33(3):463-479.e10. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.01.011>
  17. Herrera, M., Galindo-Pumariño, C., García-Barberán, V. and C. Peña. 2019. A snapshot of the tumor microenvironment in colorectal cancer: The Liquid Biopsy. *International journal of molecular sciences*, 20(23):6016. <https://doi.org/10.3390/ijms202360>
  18. Raposo, G. and W. Stoorvogel. 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of cell biology*, 200(4):373-383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
  19. Nogués, L., Benito-Martín, A., Hergueta-Redondo, M. and H. Peinado. 2018. The influence of tumour-derived extracellular vesicles on local and distal metastatic dissemination. *Molecular aspects of medicine*, 60:15-26. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.11.012>
  20. Herrera, M., Llorens, C., Rodríguez, M., Herrera, A., Ramos, R., Gil, B., Candia, A., Larriba, M.J., Garre, P., Earl, J., Rodríguez-Garrote, M., Caldés, T., Bonilla, F., Carrato, A., García-Barberán, V. and C. Peña. 2018. Differential distribution and enrichment of non-coding RNAs in exosomes from normal and Cancer-associated fibroblasts in colorectal cancer. *Molecular cancer*, 17(1): 114. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0863-4>.
  21. Herrera, M., Berral-González, A., López-Cade, I., Galindo-Pumariño, C., Bueno-Fortes, S., Martín-Merino, M., Carrato, A., Ocaña, A., De la Pinta, C., López-Alfonso, A., Peña, C., García-Barberán, V. and J. De las Rivas. 2021. Cancer-associated fibroblast-derived gene

- signatures determine prognosis in colon cancer patients. *Molecular Cancer*. 20(1):73. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01367-x>
22. Cheung, AH., Chow, C. and K.F. To. 2018. Latest development of liquid biopsy. *Journal of Thoracic Disease*, 10(Suppl 14):S1645-S1651. <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.04.68>.
  23. Yamada, T., Matsuda, A., Koizumi, M., Shinji, S., Takahashi, G., Iwai, T., Takeda, K., Ueda, K., Yokoyama, Y., Hara, K., Hotta, M., Matsumoto, S. and H. Yoshida. 2019. Liquid Biopsy for the Management of Patients with Colorectal Cancer. *Digestion*. 99(1):39-45. <https://doi.org/10.1159/000494411>.
  24. Crowley, E., Di Nicolantonio, F., Loupakis, F., and A. Bardelli. 2013. Liquid biopsy: Monitoring cancer-genetics in the blood. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10(8):472–484. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.110>
  25. Vychytilova-Faltejskova, P., Stitkovicova, K., Radova, L., Sachlova, M., Kosarova, Z., Slaba, K., Kala, Z., Svoboda, M., Kiss, I., Vyzula, R., Cho, W. C., and O. Slaby. 2018. Circulating PIWI-interacting RNAs piR-5937 and piR-28876 are promising diagnostic biomarkers of colon cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 27(9):1019–1028. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-18-0318>
  26. Schreuders, E. H., Ruco, A., Rabeneck, L., Schoen, R. E., Sung, J. J. Y., Young, G. P., and E.J. Kuipers. 2015. Colorectal cancer screening: A global overview of existing programmes. *Gut*, 64(10):1637–1649. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-309086>