



TESIS DOCTORAL

Estudio de microRNAs (miRNAs) vehiculados en vesículas extracelulares de orina, mediante secuenciación masiva, como posibles biomarcadores de riesgo tumoral en sujetos con pólipos colónicos y familiares de pacientes con cáncer colorrectal.

MARÍA MUÑOZ GARCÍA-BORRUEL

**PROGRAMA DE DOCTORADO BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR,
BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA.**

Conformidad de los directores: Esta tesis cuenta con la autorización de los codirectores y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura.

Fdo. Prof. Dr. D. Agustín Muñoz Sanz y Dr. D. Alberto Álvarez Barrientos

2023

AGRADECIMIENTOS.

Al director de la tesis, el Prof. Dr. D. Agustín Muñoz Sanz, por su implicación desde el primer hasta el último momento en este proyecto, por sus consejos siempre útiles y sabios y por su perseverancia a pesar de las dificultades en el camino. Gracias, papá, porque sin tu apoyo no hubiera podido terminar la tesis.

Al codirector, D. Alberto Álvarez Barrientos y al equipo del STAB, por su generosidad y sus ideas y porque gracias a ellos ha sido posible realizar esta investigación.

A mi tutora, Prof^a. Dra. D^a María Jesús Lorenzo Benayas, por su amabilidad y por estar siempre disponible para guiarme en el proceso burocrático.

A la Clínica El Arenal y al Hospital Universitario Virgen Macarena, en especial a mis compañeros de Digestivo, y a Sandra, enfermera y amiga, que colaboraron de forma desinteresada en la primera fase del estudio.

A los pacientes y controles que quisieron participar con entusiasmo en este proyecto.

A mi familia, en especial a mi madre María Jesús, por escucharme cada vez que he necesitado desahogarme y a Curro, mi compañero de vida, por su infinita paciencia y por estar siempre.

RESUMEN.

Introducción: Detectar biomarcadores diagnósticos precoces de CCR por métodos no invasivos puede mejorar la incidencia y la mortalidad. Los microRNAs y las microvesículas urinarias (MVU) pueden ser útiles como biomarcadores de patología colónica neoplásica (CCR) o preneoplásica.

Material y método: Estudio observacional analítico y prospectivo de muestras de orina de familiares de primer grado de pacientes con CCR (AF CCR) y un grupo control. Mediante citometría de flujo y secuenciación masiva con RT-PCR se estudiaron el perfil de las tetraspaninas y los microRNAs vehiculados por las MVU.

Resultados: Se incluyeron 46 sujetos (edad media $53,52 \pm 7,71$ años). El 69,39% presentaban AF CCR (grupo 1: 20 con pólipos hiperplásicos o sin pólipos y grupo 2: 11 con adenomas). Quince sujetos (grupo 3: controles) carecían de AF CCR ni presentaron pólipos. Se analizaron 18 muestras urinarias. Tres microRNA (miR-92a-3p, miR-141-3p y miR-30d-5p) se expresaron diferencialmente ($p < 0,05$) en los sujetos con AF CCR comparados con controles. El perfil de tetraspaninas CD9, CD63 y CD81 de sujetos AF CCR fue diferente al perfil de controles.

Conclusiones:

1. Tres miRNAs se expresan diferencialmente en las MVU de los sujetos AF CCR comparados con los controles.
2. La amplificación masiva RT-PCR es un método válido para el estudio de los microRNAs vehiculados por MVU. La orina puede ser un líquido biológico excelente para el análisis de biomarcadores.
3. El perfil de las tetraspaninas de los sujetos AF CCR es diferente a los controles. Esto permite hipotetizar que podrían servir de biomarcador de biomarcadores.

ABSTRACT.

Introduction: Detecting early diagnostic biomarkers of CRC by non-invasive methods can improve incidence and mortality. MicroRNAs and urinary microvesicles (UMV) may be helpful as biomarkers of colonic neoplastic (CRC) or preneoplastic pathology.

Material and Methods: Analytical and prospective observational study of urine samples from first-degree relatives of patients with CRC (FDR CRC) and a control group. Using flow cytometry and NSG RT-PCR, the profile of tetraspanins and microRNAs carried by the UMVs were studied.

Results: Forty-six subjects (mean age 53.52 ± 7.71 years) were included. 69.39% were FDR CRC (group 1: 20 with hyperplastic polyps or without polyps and group 2: 11 with adenomas). Fifteen subjects (group 3: controls) were not FDR CRC and had no polyps. Eighteen urinary samples were analyzed. Three microRNAs (miR-92a-3p, miR-141-3p, and miR-30d-5p) were differentially expressed ($p < 0.05$) in FDR CRC subjects compared to controls. In addition, the CD9, CD63, and CD81 tetraspanin profiles of FDR CRC subjects differed from those of controls.

Conclusions:

1. Three miRNAs are differentially expressed in the MVUs of FDR CRC subjects compared to controls.
2. NGS RT-PCR is a valid method for studying microRNAs carried by MVU. Urine can be an excellent biological fluid for biomarker analysis.
3. The tetraspanins profile of FDR CRC cases is different from controls. It allows us to hypothesize that they could be used as a biomarker of biomarkers.

ÍNDICE.

I. INTRODUCCIÓN.	9
I.1. Aspectos generales sobre el cáncer colorrectal.	9
I.1.1. El cáncer colorrectal (CCR) como problema de salud pública.	
I.1.2. Factores preventivos y de riesgo en el CCR.	
I.1.3. Los pólipos colónicos.	
I.1.4. Vigilancia pospolipectomía.	
I.2. El papel de los biomarcadores en la medicina del siglo XXI.	27
I.2.1. Concepto de biomarcador.	
I.3. Las microvesículas como vehículos de transporte molecular.	29
I.3.1. Definición y tipos de microvesículas.	
I.3.2. Exosomas: concepto, tamaño, densidad, contenido, fuentes de estudio y funciones.	
I.3.3. Aplicaciones clínicas del estudio de los exosomas.	
I.4. Los microRNAs como moléculas de información.	42
I.4.1. Los RNAs no codificados/ <i>non-coding RNA</i> (ncRNAs). Definición y tipos.	
I.4.2. MicroRNAs (miRNAs).	
I.4.3. Los miRNAs en la patogenia de los pólipos y el CCR. Su papel desregulador.	
I.4.4. Los microRNAs como biomarcadores diagnósticos del CCR a partir de diversas muestras clínicas.	
I.4.5. Los miRNAs como biomarcadores pronósticos evolutivos del CCR.	
I.4.6. Los miRNAs como biomarcadores de la respuesta terapéutica en el CCR.	
I.4.7. Los RNAs no codificados largos (lncRNAs) como biomarcadores del CCR.	
I.4.8. Los microRNAs en la etiología del CCR.	
I.4.8.1. Regulación de las células madre intestinales y de las células iniciadoras del CCR por los miRNA.	
I.4.8.2. Interacción de los microRNAs con los directores moleculares ya conocidos de CCR.	
I.4.8.3. El papel de miR-21 y miR-221/222 en la vía de señal pro inflamatoria.	
I.4.8.4. La familia oncomiR miR-17 y la modulación de la señal TG- beta.	
I.4.8.5. La familia miR-10 anti-oncomiR.	
I.4.8.6. La oncogénesis CCR y Let-7.	
I.4.8.7. La familia miR-15 anti-oncomiR.	
I.4.8.8. Efectos pleiotrópicos de la familia miR-200.	
I.4.9. Mecanismos implicados en la oncogénesis.	
I.4.9.1. Oncogenes.	

I.4.9.2. Vigilancia inmunológica.	
I.4.9.3. Alteración de la integridad celular.	
I.5. Exosomas y tumores gastroentéricos.	70
I.6. Exomas y cáncer colorrectal.	73
I.7. Estudio de los exosomas de la orina para la detección de biomarcadores del CCR.	77
I.7.1. La orina como fluido de interés analítico.	
I.7.1.2. Las vesículas extracelulares urinarias.	
I.7.3. La manipulación de la muestra de orina antes de la determinación del contenido exosómico.	
I.7.3.1. Recogida, almacenamiento y conservación.	
I.7.3.2. Separación	
II. OBJETIVOS.	85
III. MATERIAL Y MÉTODOS.	86
IV. RESULTADOS.	116
V. DISCUSIÓN.	129
VI. CONCLUSIONES.	146
VII. BIBLIOGRAFÍA.	147
VIII. ANEXOS	177

I. INTRODUCCIÓN.

I. Aspectos generales sobre el cáncer colorrectal.

I.1. El cáncer colorrectal como problema de salud pública.

El avance de la ciencia, el aumento en la calidad de vida poblacional y el creciente acceso al sistema sanitario ha logrado una importante mejora en el diagnóstico y tratamiento de muchas enfermedades. Sin embargo, la mortalidad asociada a cáncer ha aumentado un 40% en las últimas cuatro décadas. El cáncer colorrectal (CCR) era poco frecuente antes de 1950. Hoy es uno de los tumores predominantes en los países occidentales (incidencia anual mundial 10%, mortalidad global 9.4%) (Figura 1)¹. Es el tercer cáncer más frecuente en los sujetos varones tras los de pulmón y próstata.

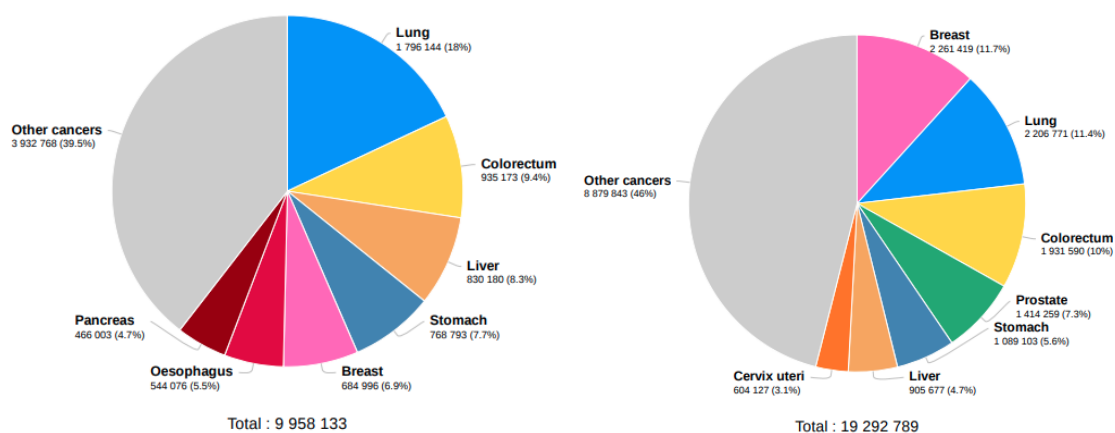


Figura 1. Tasas de incidencia y de mortalidad mundial de todos los tipos de cáncer.
Crédito: GLOBOCAN, 2020.

En las mujeres, es la segunda neoplasia, tras la de mama. Según algunos estudios, se espera que la carga global del CCR aumente el 60%, con más de 2.2 millones de casos nuevos y 1.1 millones de muertes calculadas hacia el año 2030². En España, en 2020, se registraron 38.791 casos nuevos y 15.778 fallecidos por CCR³.

Las razones posibles del incremento incluyen el progresivo envejecimiento de la población, los cambios en la dieta (aumento del consumo de alimentos procesados y de la carne roja), el consumo de alcohol y de tabaco, la obesidad y el sedentarismo. Existe, además, una gran variación geográfica: en los países desarrollados el CCR es el tumor más frecuente. La implantación de programas de cribado desde hace unos años también ha llevado a cambios en las tasas de incidencia y de mortalidad por CCR, con diferencia entre países, aunque su efecto será más acusado en los próximos años. La prevención y el diagnóstico del CCR requieren una gestión multidisciplinar (salud pública, atención primaria y diferentes especialidades: digestivo, cirugía, oncología, radiología y genética). En la gestión de los programas poblacionales de cribado de CCR deben coordinarse organismos encargados de la planificación sanitaria. Es importante identificar a los grupos de alto riesgo (los pacientes que han requerido resección de lesiones colorrectales o que presentan formas hereditarias de CCR) y ofrecerles un circuito adecuado para el seguimiento.

I.2. Factores preventivos y de riesgo en el CCR.

Existen factores de riesgo que pueden aumentar las probabilidades de desarrollar pólipos colónicos y/o CCR. Algunos no son modificables, como la edad (la incidencia del CCR se incrementa a partir de los 50 años) o el sexo (mayor frecuencia en los varones). En los últimos años se ha observado un aumento de cáncer de recto y de colon izquierdo en sujetos más jóvenes y, aunque las alteraciones genéticas, los factores ambientales, la obesidad y el estilo de vida pueden influir, se desconocen aún las causas exactas del incremento⁴. En los países occidentales se ha descrito un riesgo medio de CCR del 3-5%, siendo la mayoría de las veces tumores esporádicos. Pero el 15-20% de los pacientes diagnosticados de CCR presentan antecedentes familiares de CCR. El riesgo varía en función del número de familiares afectados, de la edad al diagnóstico y del grado de

parentesco. Además, el riesgo se duplica en los pacientes con antecedentes familiares de primer grado diagnosticados de CCR a los 50-70 años y se triplica si el diagnóstico se hace antes de los 50 años⁵. El 5-7% de los casos de CCR pertenece al subgrupo hereditario⁶.

Los síndromes hereditarios se clasifican en polipósicos y no polipósicos. En el primer grupo entran, entre otros, la poliposis adenomatosa familiar (PAF) clásica, la PAF atenuada, la asociada al gen *MUTYH*, el síndrome de poliposis serrada (SPS), el síndrome de Peutz-Jeghers, el síndrome de Cowden y la poliposis juvenil. Los no polipósicos son el síndrome de Lynch y el cáncer colorrectal familiar. Es esencial identificar a este grupo de alto riesgo para poder establecer una estrategia de prevención y de seguimiento que disminuya tanto la incidencia de CCR como la de otros tumores extracolónicos asociados.

Dentro de los CCR hereditarios destaca el síndrome de Lynch (mutación en un gen reparador del DNA: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* o *EPCAM*). Los errores de reparación durante la replicación producen un acúmulo de mutaciones en el DNA que ocurren en fragmentos de DNA de microsatélites con secuencia de nucleótidos repetitiva. Los microsatélites (MS) son pequeñas secuencias de DNA de 2 a 6 pares de bases repetidas de forma consecutiva. Su inestabilidad se puede identificar por PCR (*Polimerase Chain Reaction*), que compara el DNA normal con el tumoral en el mismo paciente. Los pacientes con síndrome de Lynch se identifican con criterios clínicos, como los de Ámsterdam y los de Bethesda.

En los últimos años se tiende a la realización de pruebas, sin restricciones sobre el material tumoral, a todos los pacientes diagnosticados antes de los 70 años mediante PCR e inmunohistoquímica por falta de expresión de proteínas reparadoras.

El segundo síndrome en frecuencia de CCR hereditario es la PAF. Se caracteriza por la

mutación del gen APC, que controla la actividad de la vía de señalización Wnt. La mayoría de los pacientes portadores de esta mutación desarrollan múltiples adenomas colorrectales (más de 100 en la forma de PAF clásica) y CCR en edad temprana.

Otro grupo para destacar es el SPS, una entidad descrita hace pocos años con una evidencia sustancial de un componente de etiología genética (una alta frecuencia de la mutación BRAF). La OMS establece unos criterios⁷ definitorios del síndrome: 1. Presencia de cinco o más pólipos serrados proximales al recto, todos iguales o mayores a 5 mm de tamaño, incluyendo que dos sean iguales o mayores a 10 mm. Y 2. Presencia de más de veinte pólipos serrados de cualquier tamaño distribuidos a lo largo del colon, estando al menos cinco proximales al recto.

Otro subgrupo de riesgo son los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII) con afectación colónica (colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn colónica), que suponen el 1% de los CCR descritos en la población occidental. El riesgo se incrementa con el tiempo de evolución de la enfermedad. Diversos estudios sugieren que la incidencia de CCR ha disminuido gracias a la disponibilidad terapéutica actual^{8,9} (control de la actividad inflamatoria del colon con los tratamientos inmunosupresores y los fármacos biológicos), además de la mejora en el seguimiento de los pacientes en las consultas monográficas.

La etiología del CCR es multifactorial. Hay evidencia actual a favor de que la modificación de diversos factores de riesgo puede reducir la probabilidad de padecer la enfermedad¹⁰. Diferentes intervenciones de prevención en la dieta o en el estilo de vida, así como la quimioprevención, pueden influir en las distintas etapas de desarrollo del CCR, tanto las previas a la aparición de los adenomas, que es la lesión precursora de la mayoría de los casos, como durante el crecimiento de éstos o en el proceso de

transformación a carcinoma¹¹. Se analizan a continuación los diferentes factores de riesgo y preventivos conocidos y modificables.

I.2.1 Dieta.

La ingesta excesiva de determinados componentes de la dieta puede contribuir a un incremento del riesgo de CCR, aunque se desconoce si el tipo de alimento participa de manera independiente en el riesgo o si guarda relación con el exceso de consumo. Los estudios publicados presentan limitaciones debido a que es muy difícil aislar los distintos componentes de la dieta. Se resumen en la tabla 1:

Grasas	No asociado a un aumento de riesgo de CCR ¹²⁻¹⁵
Carne roja y procesada	Aumenta el riesgo de CCR ¹⁶⁻¹⁸ Carne procesada: cancerígeno para los seres humanos” (Grupo 1) Carne roja: probablemente carcinogénico para los seres humanos (Grupo 2A)
Aves de corral	Riesgo marginal de CCR ¹⁷
Frutas y verduras	No claro efecto protector de CCR ¹⁹ Podría tener efecto protector sobre adenomas colorrectales ²⁰
Fibra	Efecto protector de CCR ¹⁷ No claro efecto protector sobre adenomas ²¹
Pescado	No clara asociación ¹⁷
Leche y productos lácteos	Efecto protector de CCR ¹⁷
Micronutrientes	
Vitamina D	Podría tener efecto protector ²²
Calcio	Efecto protector sobre CCR y adenomas ^{23,24}
Folato	No asociación ²⁵
Vitaminas grupo B	Posible efecto protector ^{25,26}
Antioxidantes	Aumento de mortalidad CCR ²⁷
Alimentos ultraprocesados	Aumento de riesgo CCR ²⁸

Tabla 1.

I.2.2 Hábitos de vida y consumo de tóxicos.

Por razones de brevedad, se resumen en la tabla 2 con las referencias bibliográficas.

Obesidad	Aumento de riesgo de CCR ^{29,30}
Síndrome metabólico	Aumento de riesgo de CCR ³¹
Diabetes mellitus	Aumento de riesgo de CCR ^{32,33,34}
Actividad física	Efecto protector ^{36,37}
Consumo de alcohol	Aumento de riesgo de CCR (dosis-respuesta) ^{17,38} Aumento de riesgo de adenomas y pólipos serrados ^{39,40}
Tabaquismo	Aumento de riesgo de CCR y pólipos colónicos ⁴¹

Tabla 2.

I.2.3 Quimioprevención.

Existen múltiples estudios que evalúan el potencial uso de diversos agentes en la quimioprevención. Se incluyen el ácido acetilsalicílico (AAS), antiinflamatorios no esteroideos (AINE), 5-aminosalicilatos (5-ASA), estatinas y ácido ursodesoxicólico (UDCA), así como vitaminas y micronutrientes (calcio, selenio, ácido fólico, etcétera)

—AAS y AINES: Diversos estudios han demostrado que los AINEs, incluido el AAS, inhiben la carcinogénesis colorrectal. Existen diferentes revisiones sistemáticas^{42,43} y ECAs que sugieren que el uso de AAS se asocia con una disminución de la incidencia de adenomas colónicos, CCR, CCR metastásico y mortalidad por CCR. El año 2016 la *US Preventive Services Task Force* (USPSTF)⁴⁴ actualizó la revisión sistemática en la que se analizaba el riesgo de incidencia y mortalidad por CCR y el uso de AAS en el contexto de ECA de prevención primaria y secundaria de enfermedad cardiovascular. En relación con la mortalidad⁴⁵ se asoció con una reducción de riesgo acumulativo de mortalidad por CCR a largo plazo en torno al 33 %.

La USPSTF recomienda el uso de AAS a dosis bajas para la prevención primaria de la enfermedad cardiovascular y del CCR en la población adulta entre 50 y 59 años con un

riesgo de enfermedad cardiovascular superior al 10%, una esperanza de vida superior a 10 años y que acepte tomar AAS a dosis bajas durante un período de, al menos, 10 años (grado de recomendación B)⁴⁶. Entre los individuos con neoplasia colorrectal previa, los AINE sin AAS son los agentes más eficaces para la prevención de la neoplasia metacrónica avanzada, mientras que el AAS a dosis bajas tiene el perfil de beneficio-riesgo más favorable.

—*Metformina*: Diversos metaanálisis⁴⁷ sugieren la asociación del uso de metformina en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 con una reducción de riesgo de adenomas y CCR.

—*Estatinas*: pueden proporcionar un efecto protector contra varios cánceres, pero los datos no son concluyentes⁴⁸.

I.2.7 El microbioma intestinal.

El intestino humano contiene más de 2000 especies microbianas⁴⁹ (arquea, virus, hongos y bacterias aerobias y anaerobias), entre las que destacan los filos *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (los dos últimos filos son el 90% de la microbiota de un individuo sano). La interacción entre el microbioma y el hospedador es muy dinámica. Se ve afectada por múltiples factores (edad, geografía, hábitos alimentarios y medicamentos). El microbioma intestinal tiene funciones muy relevantes, ya que se encarga de metabolizar ingredientes no digeribles de los alimentos, sintetiza nutrientes y vitaminas, modula la respuesta inmune y previene la colonización de las bacterias enteropatógenas⁵⁰. La disbiosis es una condición patológica que ocurre cuando se produce un desequilibrio en el perfil del microbioma normal y en sus funciones. Se asocia a una inflamación crónica y a la producción de metabolitos diversos, algunos con

potencial capacidad carcinógena. El papel de la disbiosis en la carcinogénesis intestinal aún no se conoce completamente.

Las bacterias proinflamatorias pueden inhibir o exacerbar la respuesta del huésped, provocando una apoptosis anormal, proliferación celular e inflamación⁵¹. Se han descrito diferencias entre el microbioma intestinal de los pacientes con CCR y los sujetos sanos. La secuenciación del 16sRNA ha mostrado un aumento de algunas bacterias proinflamatorias como *Fusobacterium* spp. y la disminución de otras con perfil protector como las bifidobacterias^{52,53} en pacientes con CCR. También se ha propuesto que la producción de algunos metabolitos bacterianos (toxinas) pueden dañar el DNA del huésped e inducir transformaciones celulares^{54,55,56}. Se desconoce hasta ahora si una bacteria, una comunidad microbiana o ambas, actuando de forma secuencial o sinérgica, son las responsables del desarrollo de CCR. Un conocimiento más profundo de esta materia es una herramienta fundamental de prevención, analizando el microbioma fecal de los individuos para predecir el riesgo de CCR⁵¹. En la tabla 3 se describen algunas de las bacterias más relevantes asociadas al proceso de carcinogénesis colorrectal:

<i>Fusobacterium</i> spp	Destaca <i>F. nucleatum</i> Efecto proliferativo e inmunosupresor (↑IL-6, IL-12, IL-17 y TNF-α ⁶¹)	Niveles aumentados en CCR y adenomas ^{57,58} CCR con peor pronóstico ^{59,60} Podría contribuir a la vía serrada ⁶²
<i>Bacteroides fragilis</i>	Liberan toxina BFT y ↑IL-8, puede eliminar la cadherina-E y alterar la homeostasis epitelial ⁶³	Su prevalencia en la flora normal produciría mayor riesgo de transformación neoplásica de los enterocitos ⁶⁴
<i>Escherichia coli</i>	Destacan los filogrupos B2 y D productores de bacteriocinas (colibactina) ^{65,66}	Frecuente en flora normal Asociada a CCR y EII ⁶⁵ Más frecuentes en CCR avanzados ⁶⁷
Microbioma oral	<i>Porphyromonas</i> , <i>Peptostreptococcus</i> y la especie <i>Parvimonas micra</i> . <i>Haemophilus</i> , <i>Parvimonas</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Alloprevotella</i> , <i>Lachnoanaerobaculum</i> , <i>Neisseria</i> y <i>Streptococcus</i> ^{68,69}	Bacterias más frecuentes en pacientes con CCR que en controles sanos ^{68,69}
Otras bacterias	<i>Streptococcus bovis/gallolyticus</i> ⁷⁰ <i>Salmonella</i> spp ⁷¹⁻⁷³	

Tabla 3.

—*El viroma y el micobioma*: El viroma y el micobioma intestinal —los componentes vírico y fúngico del microbioma— también se han relacionado con la aparición de CCR. En pacientes con CCR hay una mayor diversidad en los viromas de bacteriófagos (virus que infectan a las bacterias), asociado a una menor diversidad bacteriana y a un aumento de *inovirus* y *tunalikevirus*, cuyos huéspedes bacterianos están implicados en la carcinogénesis colorrectal (*B. fragilis* productora de *B. fragilis* Toxin/BTF, *F. nucleatum* y *E. coli* enterotoxígena)^{74,75}. También se han identificado distintos perfiles de microbioma fúngico en pacientes con CCR comparados con los controles y en los pacientes con CCR en estadio precoz y en estadio avanzado. Parece que existe una relación antagónica entre las bacterias y los hongos durante el desarrollo de CCR⁷⁶. Pero, respecto a la interacción entre el viroma, el micobioma, el bacterioma y el complejo proceso de la carcinogénesis colorrectal, los datos son aún limitados.

I.3. Los pólipos colónicos.

Un pólipo es un tumor que protruye desde la pared a la luz intestinal. Por su morfología, en general, son planos, sésiles o pediculados. Por su histología se clasifican en: adenomatosos (60-70%), hiperplásicos y serrados (10-30%) y un grupo heterogéneo (10-20%), que incluye pólipos inflamatorios, hamartomatosos, juveniles y otras lesiones no mucosas.

El adenoma colorrectal constituye una lesión premaligna con potencial de malignización a través de la "vía tradicional" de la carcinogénesis (Figura 2) asociada a la inestabilidad de los microsatélites (suponen el 70-80% de los CCR). El otro 20-30% corresponde a la "vía serrada", una secuencia de carcinogénesis descubierta en los últimos años, cuya lesión precursora es el pólipo serrado⁷⁷. Ambos procesos se desarrollan en los siguientes apartados. La mayoría de los pólipos colónicos son asintomáticos y se detectan en una

colonoscopia indicada por otro motivo. Los más frecuentes son los pólipos hiperplásicos y los adenomas tubulares de pequeño tamaño. Si producen manifestaciones clínicas o analíticas, sobre todo en el caso de los adenomas avanzados, lo más habitual es la anemia por pérdidas crónicas o la rectorragia. Los adenomas vellosos localizados en recto pueden liberar abundante cantidad de moco rico en potasio y pueden producir hipopotasemia y alcalosis metabólica.

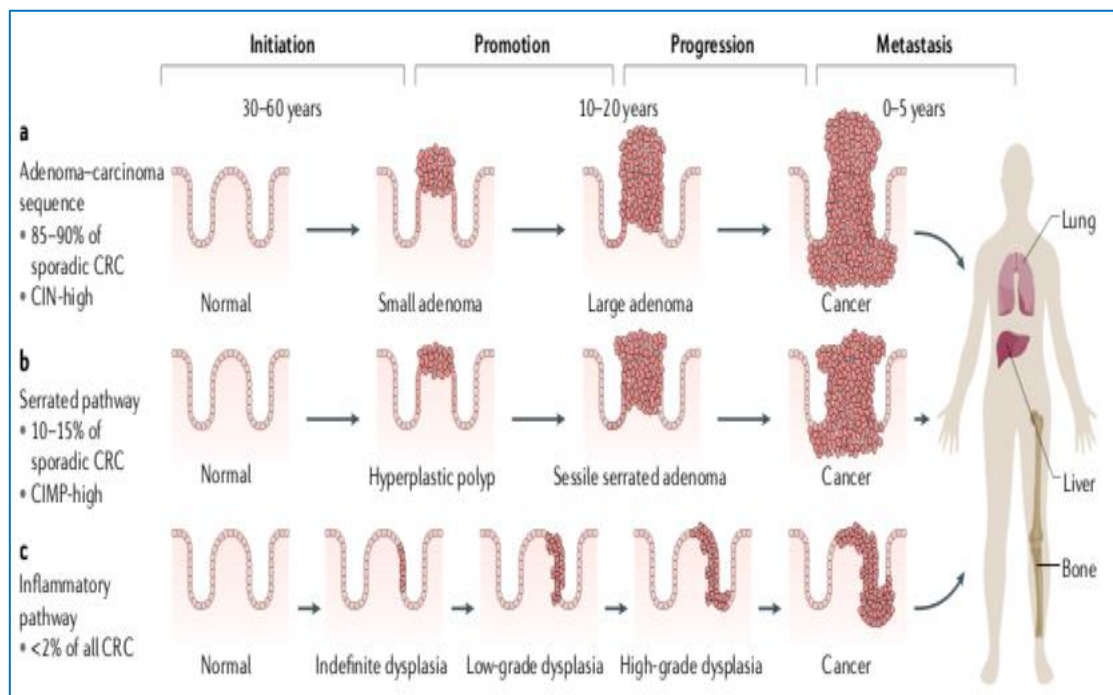


Figura 2. Vías de carcinogénesis colorrectal.

Crédito: Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019; 16, 713–732.

La prueba diagnóstica de elección para su diagnóstico es la colonoscopia, que permite determinar el tamaño, el número y la localización de las lesiones polipoideas. Además, en la colonoscopia se pueden obtener biopsias para el estudio histológico y realizar la resección endoscópica de los pólipos en la mayoría de las ocasiones.

I.3.1 Pólipo adenomatoso.

Es el tipo de pólipo más frecuente debido a la proliferación de células epiteliales

displásicas de la mucosa. Esto ocurre por la existencia de mutaciones en la vía del gen APC y la β -catenina⁷⁸. El riesgo de malignización de los adenomas depende de varios factores (tamaño, número de lesiones, grado de displasia y tipo de arquitectura). Un tamaño mayor de 10 mm acarrea un riesgo en torno a 2-3 veces superior de adenoma avanzado o CCR en el seguimiento, con leve incremento del riesgo si la lesión es superior a 20 mm^{79,80}. Por el número de lesiones, la existencia de más de cuatro adenomas se asocia con un mayor riesgo de CCR o adenoma avanzado⁸¹. Según la arquitectura glandular se clasifican, en tres tipos: los adenomas tubulares (85% de las lesiones adenomatosas y presentan menos de un 20% de componente vellosos), los adenomas tubulovelloso (10%) y los vellosos (5% restante y tienen más de un 80% de componente vellosos). La arquitectura vellosa o displasia de alto grado (DAG) muestra un leve aumento del riesgo de lesión colorrectal avanzada respecto a las lesiones predominantemente tubulares⁸². (Figura 3).

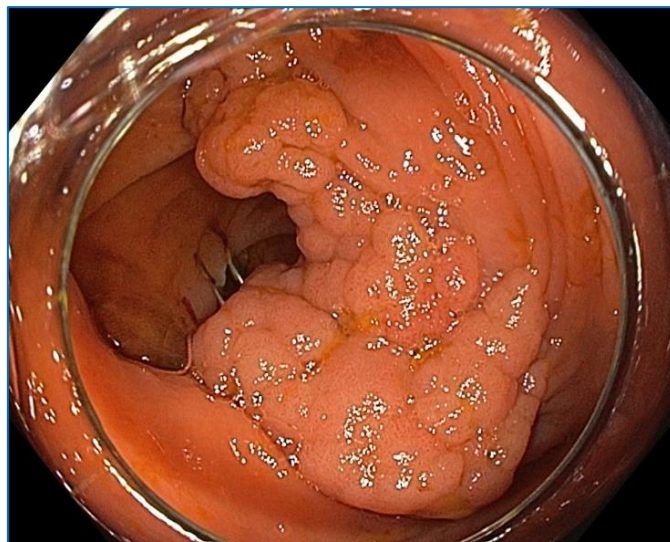


Figura 3. Imagen endoscópica de adenoma avanzado.

I.3.2. Lesión serrada.

Los pólipos serrados son un grupo heterogéneo de lesiones. Deben su descriptivo nombre

porque presentan una arquitectura en "dientes de sierra" en el epitelio de la cripta secundario a un acúmulo de colonocitos por inhibición de la apoptosis. Se clasifican en tres tipos: los pólipos hiperplásicos, el adenoma serrado sésil y el adenoma serrado tradicional. El riesgo de malignización depende de la histología, el número de pólipos, el tamaño mayor a 10 mm y la localización colónica proximal, siendo estas dos últimas variables las más relevantes.

a) *Pólipos hiperplásicos*: Representan el 80-90% de las lesiones serradas. Se originan por la apoptosis retrasada de las células epiteliales. No hay una verdadera hiperplasia. Se han identificado en estos pólipos mutaciones en genes reguladores del ciclo celular como K-ras o BRAF⁸³. En la endoscopia son lesiones poco elevadas o sésiles, con mucosa pálida, hipovasculares y, por lo general, menores de 5 mm. Tienen localización rectosigmoidea principalmente y suelen ser numerosos. Su principal característica histológica es la arquitectura serrada que forman las criptas y la ausencia de atipia citológica y arquitectural. El aserramiento solo alcanza la mitad superior de la cripta y las células epiteliales conforman una miscelánea de absortivas y otras caliciformes. Sus núcleos basales carecen de displasia. Según su patrón de crecimiento se clasifican en microvesicular, de células caliciformes y pobre en mucina. El subtipo microvesicular pueden presentar un potencial riesgo de malignización, aunque los datos actuales son controvertidos.

b) *Adenoma o pólipo serrado sésil*: Es la lesión preneoplásica clave en la vía serrada. Suponen el 15-20% de todos los pólipos serrados. Su morfología es plana o poco elevada, un tamaño superior a 5 mm (incluso 10), y se localizan en colon proximal (Figura 4).



Figura 4. Imagen endoscópica de un pólipo serrado.

Suelen estar tapizados por una capa de moco lo cual, junto a la localización en colon derecho, pueden hacer que pasen desapercibidas en una colonoscopia. Son adenomas con arquitectura serrada. Carecen de la atipia celular como hay en el resto de los adenomas. La displasia de la lesión reside en una arquitectura compleja y una proliferación anormal. Histológicamente es similar a un pólipo hiperplásico, pero su aserramiento es más prominente, alcanzando la base de las criptas (lo que genera una imagen de "T" invertida o de "L"). Nacen a partir de defectos en la reparación del DNA (inestabilidad de microsatélite)⁸⁴. A diferencia de los adenomas serrados tradicionales, estos pólipos no presentan displasia citológica, solo arquitectural, pero deben distinguirse los adenomas serrados sésiles con displasia de los que no la tienen, que, al igual que los adenomas convencionales, pueden ser de bajo y de alto grado.

c) *Adenoma serrado tradicional*: Es un pólipo poco frecuente (1-6 % de los casos). Suelen ser pediculados y localizados en el colon izquierdo. Muestran una displasia convencional (de bajo o alto grado), pero con arquitectura serrada. El riesgo de degeneración maligna se asemeja al de los adenomas convencionales. Su oncogénesis se relaciona más con el

gen K-ras que con el APC⁸³.

Aunque existe consenso entre los anatomopatólogos respecto a la clasificación de las lesiones serradas, es frecuente e inevitable la variabilidad interobservador. Con la evidencia actual, se consideran lesiones serradas avanzadas las mayores a 10 mm y/o displasia y, sin embargo, son lesiones no avanzadas los pólipos hiperplásicos menores a 10 mm y/o sin displasia.

I.3.3. Pólipo inflamatorio.

Se generan por una marcada respuesta inflamatoria en el estroma. Se asocian a la remodelación en la arquitectura de la mucosa colónica. En la endoscopia son lesiones sésiles, generalmente rojizas, solitarias o múltiples, de localización rectosigmoidea. No hay riesgo de malignización, pero su diagnóstico obliga a descartar patologías inflamatorias asociadas como la enfermedad inflamatoria intestinal, colitis infecciosas o diverticulosis colónica. Pueden asociarse a anastomosis colónicas o a la úlcera rectal solitaria⁸⁵.

I.3.4. Pólipo hamartomatoso.

El hamartoma es consecuencia de la proliferación de células maduras de la mucosa. En el colon, los pólipos hamartomatosos están compuestos por tejido epitelial y estromal⁸⁶. En la endoscopia son pediculados y rojizos, localizados en rectosigma. Pueden ser solitarios (pólipo juvenil) o numerosos (es frecuente encontrarlos en el síndrome de Peutz-Jeghers o en el síndrome de Poliposis Juvenil).

El diagnóstico histopatológico se fundamenta en la identificación de las criptas desordenadas, dilatadas y, especialmente, quísticas. El estroma tiene un infiltrado inflamatorio abundante con hemorragia y angiogénesis. El hallazgo de displasia en un pólipo juvenil es poco frecuente, salvo en el contexto de poliposis. El pólipo juvenil es

una lesión congénita (población pediátrica, excepcional en los adultos). Su principal manifestación es la rectorragia y una vez que se resecan, no precisan seguimiento.

I.3.5. Pólipos mesenquimales.

Son un grupo heterogéneo y forman parte de las lesiones subepiteliales. Los más frecuentes son el lipoma y el tumor del estroma gastrointestinal (GIST), Otros (leiomioma, neurofibroma, schwannoma, ganglioneuroma y tumor de células granulares) son anecdóticos. Es común la estirpe mesenquimal, pero difieren en las características endoscópicas, manifestaciones clínicas y lesiones histológicas.

I.4. Vigilancia pospolipectomía.

Los pacientes a quienes se les detectan pólipos colónicos tienen más riesgo de desarrollar otras lesiones polipoideas durante el periodo de seguimiento clínico, sobre todo en el caso de múltiples pólipos, cuando los pólipos son mayores a 10 mm o tienen un componente vellosos. Por ello, estos sujetos deben incluirse en un programa de vigilancia endoscópica periódica tras una colonoscopia basal que cumpla los criterios exigidos de calidad¹⁰. Se ha demostrado un riesgo absoluto del 2% de CCR a largo plazo para los pacientes pospolipectomía sin vigilancia, que oscila entre el 1,1% y el 2,9% según la estratificación del riesgo inicial⁸¹, riesgo confirmado en un estudio de vigilancia (riesgo de incidencia de CCR a los 10 años entre el 0,44% y el 1,24% y el riesgo de mortalidad entre el 0,03% y el 0,25%)⁸⁷. Además, la eficacia de la vigilancia para los pacientes con alto riesgo de CCR pareció ser inferior al 1%, mientras que fue ineficaz en los pacientes con un riesgo menor. Esta nueva evidencia respalda un enfoque actual conservador y selectivo para la vigilancia pospolipectomía.

La eficacia de la vigilancia pospolipectomía debe sopesarse con la seguridad y el gasto económico. La colonoscopia con fines diagnósticos presenta un riesgo muy bajo de

complicaciones (perforación 0,05%, sangrado 0,25% y mortalidad 0,003%)⁸⁸, aunque este riesgo aumenta en los pacientes de edad avanzada o con presencia de comorbilidades. La alta prevalencia de adenomas en la era de la colonoscopia de calidad y de la imagen de alta definición (hasta más del 70% de la población de cribado)⁸⁹ exige una política de vigilancia conservadora para evitar el uso inapropiado de los recursos⁹⁰.

Vigilancia según los grupos de riesgo.

Actualmente, según las guías de práctica clínica⁸¹, los pacientes que presentan 1-4 lesiones adenomatosas tubulares con displasia de bajo grado y menores a 10 mm no requieren vigilancia endoscópica. Otros sujetos que no requieren vigilancia endoscópica son a quienes se les detectan pólipos hiperplásicos menores a 10 mm en rectosigma y los pacientes con lesiones serradas sin displasia menores a 10 mm. Estos grupos deben volver al programa de cribado de CCR o deben realizarse una colonoscopia a los 10 años, si no existe un programa poblacional de cribado. Los pacientes con cinco o más lesiones adenomatosas tubulares con displasia de bajo grado menores a 10 mm, con displasia de alto grado o iguales o mayores a 10 mm, deberían realizarse colonoscopia de control a los 3 años, al igual que los sujetos que presenten al menos un pólipo serrado con displasia o mayor a 10 mm⁸¹.

Las recomendaciones de vigilancia se establecen tras la resección completa de lesiones colónicas⁹¹. En otro caso, se debe repetir la colonoscopia hasta dejar el colon libre de lesiones neoplásicas. En las lesiones sésiles o planas mayores a 20 mm que se resecan de forma fragmentada es recomendable una colonoscopia a los 3-6 meses y al año de confirmar la resección completa. Las personas con un riesgo elevado de CCR (más de diez adenomas colónicos, dos o más pólipos serrados mayores a 10 mm, cinco o más pólipos serrados proximales o más de diez de pólipos con más del 50% de lesiones

serradas o con criterios de síndrome de poliposis serrada), se deben derivar a una consulta especializada de Digestivo o a una de alto riesgo para un estudio individualizado⁸¹.

Vigilancia tras una primera colonoscopia de control.

Si no se encuentran lesiones adenomatosas en la primera colonoscopia de control, se recomienda una segunda a los 5 años. Si no se hallan adenomas, se recomienda volver al cribado poblacional de CCR. Si hay lesiones adenomatosas que requieran vigilancia en la primera colonoscopia o en las siguientes de revisión, se recomienda exploración endoscópica a los tres años (Figura 5).

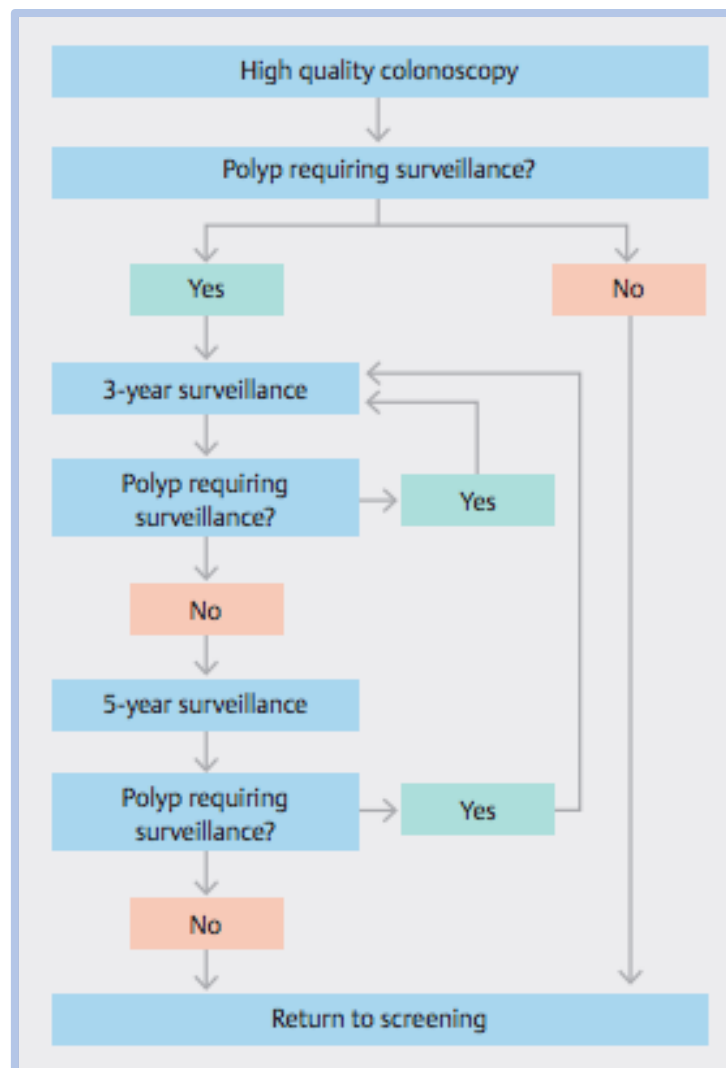


Figura 5. Algoritmo de seguimiento endoscópico tras polipectomía. Crédito: Hassan C, et al. *Endoscopy* 2020⁸¹.

Vigilancia en las personas con antecedentes familiares de CCR.

Quienes refieran una historia familiar de CCR, excluido un síndrome hereditario asociado a CCR, deben ser incorporados al programa poblacional de cribado si tienen un único familiar de primer grado. Si tienen dos familiares de primer grado con CCR se recomienda colonoscopia cada cinco años.

II. El papel de los biomarcadores en la medicina del siglo XXI.

II.1. Concepto de biomarcador.

Un biomarcador⁹² —o marcador biológico— es un parámetro bioquímico, molecular, genómico o celular que permite detectar de modo cualitativo y/o cuantitativo el estado de una función biológica normal o patológica. Se trata de una definición amplia, pero explicativa, que el diccionario de la lengua española sintetiza en sustancia que indica la presencia de material biológico de un proceso fisiológico, y que se emplea para diagnosticar una enfermedad. Por extensión, además del diagnóstico, el biomarcador también puede ser utilizado con intenciones pronósticas y terapéuticas. En el último supuesto los biomarcadores sirven para certificar la respuesta —o el fracaso— de una terapia determinada.

Los biomarcadores se emplean para detectar recidivas de la enfermedad estudiada y para demostrar la resistencia farmacológica al tratamiento prescrito. La tecnología actual, a todos los niveles, se ha desarrollado hasta cotas impensables hace tan solo unos pocos años. La creciente disponibilidad tecnológica en el siglo XXI ha ampliado las posibilidades de uso de multitud de marcadores biológicos, empleados en investigación básica, aplicada y en medicina clínica asistencial. El resultado final del proceso se traduce en ofertar una mejor asistencia (en medicina clínica asistencial) y de ampliar el espectro de opciones (en investigación básica y aplicada).

Los biomarcadores pueden ser individuales y colectivos. Un buen ejemplo del primer grupo es el dímero D empleado para detectar estados de pro-coagulación y que es de gran utilidad práctica en la atención de los pacientes infectados por el SARS-CoV-2 (Covid-19); pero en la medicina actual, sobre todo en la disciplina de oncología y las

especialidades que asisten a pacientes tumorales, es cada vez más frecuente el uso juicioso de varios biomarcadores agrupados en paneles (por ejemplo, de algunos marcadores genómicos), es decir, de un conjunto de parámetros útiles para diagnosticar una enfermedad, aventurar su pronóstico o comprobar la eficacia terapéutica y, en ocasiones, la posible resistencia farmacológica al tratamiento. Con el tiempo, se han ido incrementando de forma casi exponencial los trabajos publicados sobre biomarcadores en la medicina de precisión. Aunque el papel de los microRNAs en el CCR se analizará en algunos de los párrafos siguientes (*Apartados IV.3 a IV.9*), no sobra adelantar que Ruiz-Bañobre y colaboradores publicaron una excelente revisión bibliográfica de 173 estudios en los que se exploró el valor de 148 biomarcadores⁹³. Según los autores del trabajo recopilatorio, solo dos biomarcadores moleculares destacaron con aplicación en medicina práctica. La diana son las mutaciones ras o RAS (KRAS y NRAS) que permiten detectar la falta de respuesta al tratamiento con determinados fármacos. El nombre de *ras* procede de *rats sarcoma* porque fueron aislados en ratas (rats) con sarcoma⁹⁴. La mutación *MSI-H* (son las siglas en inglés de *Micro-Satellite Instability-High*) ha permitido ensayar terapias con fármacos dirigidas a la muerte celular programada-1 (en inglés, *Anti-Programmed Cellular Death-1/APCD-1*)⁹⁵.

III. Las microvesículas como vehículos de transporte de los micro-RNAs.

III.1. Definición y tipos de microvesículas.

Las células se comunican entre ellas por interacción directa (*cell-to-cell*) o a través de factores (moléculas) solubles. El segundo mecanismo se realiza por medio de microvesículas extracelulares (en inglés, *Extracellular Vesicles*) que vehiculan y desplazan numerosas y variadas moléculas de una célula efectora (el lugar donde se forman) a otra receptora (el sitio donde actúan los componentes del cargamento vesicular). Esta forma de intercomunicación celular sucede en condiciones fisiológicas y patológicas^{96,97} siendo, hasta ahora, mejor conocidas las segundas que las primeras, aunque el campo fisiopatológico se va ampliando de forma espectacular en los últimos años. Valadi y colaboradores fueron los primeros en describir la existencia de RNA en las vesículas extracelulares, en 2007⁹⁸. Posteriormente se demostró la presencia de DNA mitocondrial, secuencias oncogénicas amplificadas, elementos transportables y DNA mitocondrial^{99,100,101}.

Las vesículas extracelulares, aunque son de diversos tamaños (Figura 6) y procedencia celular, a efectos prácticos se dividen de forma simplificada en tres categorías o clases: exosomas, ectosomas o vesículas extracelulares y cuerpos apoptóticos (Figura 6). Las tres clases de vesículas tienen en común su estructura externa, formada por una capa bilipídica que encierra una colección de moléculas (denominada carga, cargamento o *cargo*, en su denominación en inglés) de muy diverso rango, densidad, tamaño, origen y función. Acaso la mayor diferencia, a efectos prácticos, sea el tamaño y la densidad.

En cuanto al tamaño, es muy variable. No existe concordancia entre los numerosos autores hasta el punto de que, con un sentido pragmático, algunos investigadores consideran 200 nanómetros (nm) la línea divisoria. Un límite sin duda artificial, pero posiblemente útil. No obstante, se acepta mayoritariamente que los exosomas miden entre 30 y 150 nm de diámetro, los ectosomas miden entre 100 y 1000 nm y los cuerpos apoptóticos entre 50 y 5000 nm. Interesa, según los objetivos del presente trabajo, conocer en detalle los exosomas, pero es apropiado dedicar un breve comentario a los otros dos tipos de microvesículas, los ectosomas y los cuerpos apoptóticos. Se resume la excelente revisión de Kalra *et al*¹⁰² donde se trata con mayor detalle sobre los tres tipos de vesículas.

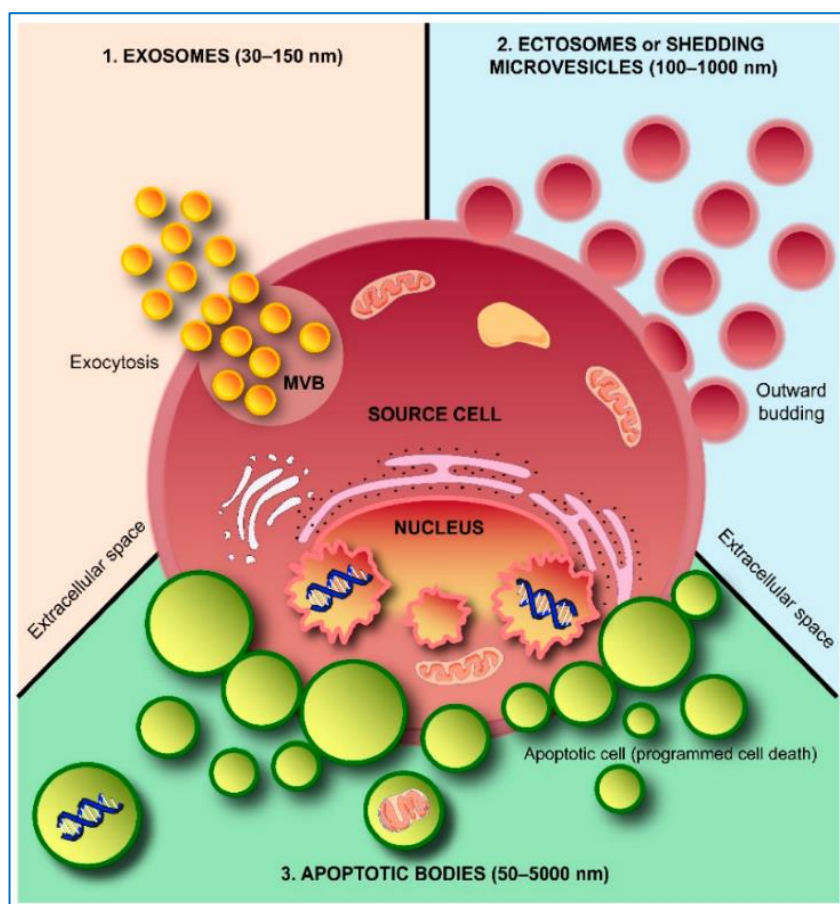


Figura 6. Tipos de vesículas extracelulares.
Crédito: Kalra, *et al*, 2016¹⁰².

—Ectosomas: Son vesículas que, en general, tienen un tamaño mayor que los exosomas y algo menor que los cuerpos apoptóticos. Los ectosomas son muy ubicuos. Se originan en la membrana plasmática por un mecanismo de protrusión o gemación (*budding*). No se conoce bien su composición, al menos tan bien como la de los exosomas, aunque se han descrito diversas proteínas estructurales (glicoproteínas, una matriz de metaloproteinasas, integrinas y otras^{103,104}). Una metaloproteinasa (MMT2) es un marcador de ectosomas. Un subtipo de ectosoma son los oncosomas que, hasta ahora, se han relacionado solo con el cáncer de próstata^{105,106}. Interesa resaltar que es muy difícil diferenciar los ectosomas de tamaño pequeño de los verdaderos endosomas, razón por la que se está imponiendo la denominación de microvesículas, si bien los exosomas son de origen endosómico mientras que los ectosomas o microvesículas extracelulares (MV) proceden, como está dicho, de la gemación de la membrana plasmática celular.

—Cuerpos apoptóticos: Son vesículas muy heterogéneas liberadas por las células en su proceso de aclaramiento celular. Como se ha dicho, tienen un tamaño grande, mayor que los ectosomas y los exosomas. Participan funcionalmente en el mecanismo fisiológico de la apoptosis celular, o muerte celular programada, conocido desde 1972¹⁰⁷ e implicado en la eliminación de las células envejecidas, dañadas o aberrantes y en aliviar los tejidos sanos de residuos celulares. Es un mecanismo de depuración o de eliminación de detritos, restos y basura biológica. Culmina su función favoreciendo la fagocitosis de estos restos por las células específicas (macrófagos). Tras esta breve referencia y en virtud de su importancia en relación con nuestro trabajo de investigación, procede comentar con mayor amplitud el tercer tipo de microvesículas: los exosomas.

III.2. Exosomas: concepto, tamaño, densidad, biogénesis, contenido, fuentes de estudio y funciones.

Los exosomas son microvesículas de tamaño nanométrico. Se componen de una bicapa lipídica esférica u ovalada que resguarda un contenido muy variado de moléculas proteicas, ácidos nucleicos y lípidos. Estas estructuras fueron descubiertas en el bienio 1985-1987 a raíz de dos trabajos sobre el metabolismo de la transferrina en los reticulocitos de ovejas y en la maduración de los reticulocitos¹⁰⁸. Tan solo una década más tarde se demostró su papel en la respuesta inmunológica¹⁰⁹ y, entre los años 2007 y 2012, su importantísimo papel en la comunicación intercelular^{110,111,112}.

El *tamaño* de los exosomas es muy variado. Depende de su sitio (celular) de origen y de la estructura de la capa bilipídica en la célula. Es oportuno decir que las microvesículas existen en los tres dominios (eucariota, procariota y arquea), aunque con denominación diferente, lo que hace pensar que son estructuras muy primitivas en la agenda de la evolución celular. No hay un acuerdo en la literatura respecto al tamaño definitorio. Diversas publicaciones consideran valores que ocupan un rango amplio, desde 20 nm hasta 200^{113,114,115,116}. En general, el tamaño más aceptado y predominante en la literatura consultada oscila entre 40 a 100/120 nm.

La *densidad* de los exosomas es de 1,13 a 1,19 g/ml¹¹⁷.

La *función* esencial es actuar como unidades o vehículos de comunicación entre las células. Acción que realizan mediante numerosas moléculas de información cuyo origen, estructura, características y función es muy distinta. Los exosomas pueden actuar de forma endocrina o paracrina (dos formas de comunicación intercelular) para afectar la función de las células. Se entiende la importancia de las proteínas de la propia membrana exosómica a la hora de su formación, salida al exterior de la célula original, adhesión a la

célula diana o receptora y endocitosis o internalización por otros mecanismos de las microvesículas en la célula diana. Por ejemplo, las anexinas (proteínas activadas por el calcio que modulan la actividad de la fosfolipasa A2) y flotilinas (proteínas implicadas en la formación de las balsas fosfolipídicas en la membrana celular) procedentes de la membrana endosómica son dos proteínas necesarias para el transporte y fusión de las vesículas exosómicas con la membrana celular. Las tetraspaninas Alix y TSG101 son necesarias para la adhesión de las exovesículas a la membrana de la célula diana. Por otra parte, el contenido (*cargo*) de la microvesícula exosómica es de extraordinaria importancia porque encierra en su interior la esencia molecular necesaria para ejercer la comunicación intercelular (de hecho, algunos autores denominan a los exosomas ‘comunicasomas’).

La *biogénesis o formación de los exosomas* (Figura 7) es un proceso complejo del que se conocen algunos pasos, mientras que otros aspectos están aún por dilucidar. Los mecanismos implicados en la fisiología de los exosomas son la fusión directa con la membrana celular de la célula receptora, la pinocitosis/fagocitosis y la unión ligando-receptor. A partir de los endosomas, se forman por vía endocítica celular mediante un proceso que sigue tres pasos: la invaginación de la membrana plasmática para formar las vesículas endocíticas, la formación de los cuerpos multivesiculares (en inglés, MVB) y la fusión de los MVB con la membrana plasmática y liberación del contenido. La ruta implicada mejor conocida es la denominada vía ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) (Figura 8). Existe una vía independiente de la ruta ESCRT que afecta a los microdominios glicoproteicos, hecho que se ha demostrado en células deplecionadas de los componentes de la maquinaria ESCRT. La esfingomielina se agrupa en pliegues lipídicos enriquecidos con colesterol y es convertida en ceramida por la acción de enzimas esfingomielinasas. Aunque hay muchas incógnitas pendientes de resolverse en este campo, es posible que ambas rutas no sean excluyentes, sino complementarias,

que actúan a la vez y de una forma coordinada dependiendo de las características físicas de las moléculas del cargo.

Sea como sea, tras la formación de las ILV (*Intraluminal Vesicles*) en las MVB (*Multivesicular Bodies*), hay un tráfico hacia la periferia citosólica y la fusión a la membrana plasmática (PM) que provoca la liberación extracelular de los exosomas (Figuras 7 y 8). Este proceso es muy complejo. Requiere la coordinación de cambios en el citoesqueleto, degradación enzimática local y activación de la maquinaria de fusión. En la fusión y liberación de los exosomas participan algunas GTPasas y las tetraspaninas. Las MVB también sirven como vehículos intermedios en la vía degradativa de los lisosomas. En este caso, las ILV encerradas en las MVB son degradadas en los lisosomas, un mecanismo importante para limitar la señal de factor de crecimiento activado^{118,119}.

El *contenido, cargamento o cargo* intravesicular es abundante en cuantía y muy variado en su composición y funciones. En general, el cargamento exosómico está formado por moléculas de DNA, RNA, RNA mensajero y micro-RNAs. Pero no hay solo componentes genómicos en el interior de los exosomas. También transportan lípidos y diversas proteínas. En cuanto a los exosomas de las células neoplásicas, son producidos o sintetizados por las células tumorales que los fabrican como vehículos de transmisión de numerosas moléculas necesarias para actuar a diferentes niveles en el complejo problema de la oncogénesis, sobre todo en el confuso e importante proceso de implantación tumoral a distancia (metástasis).

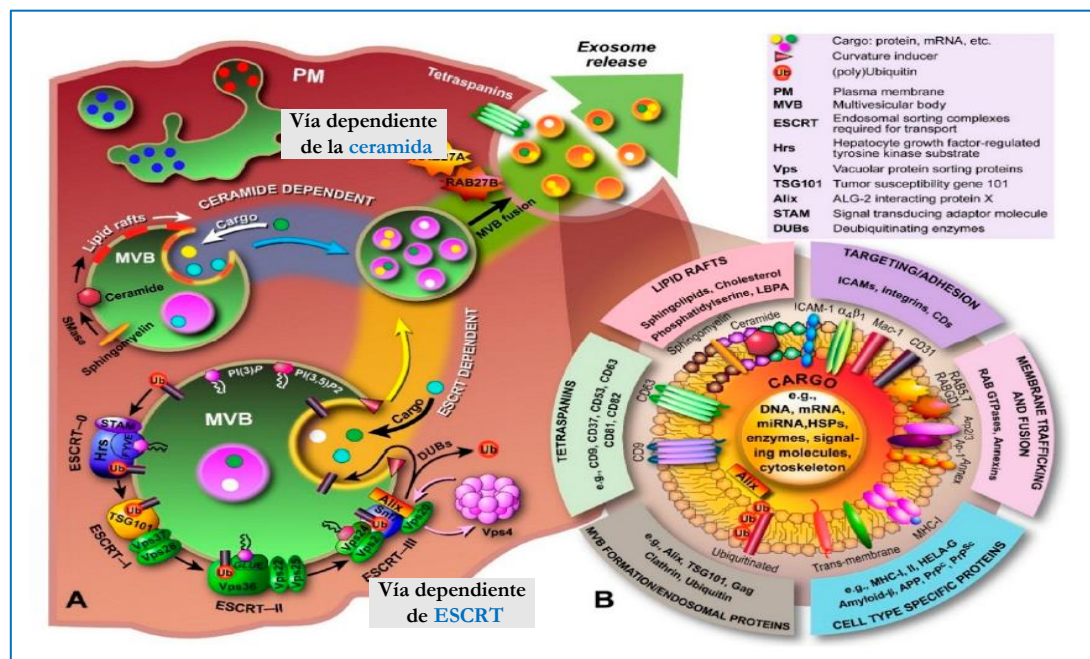
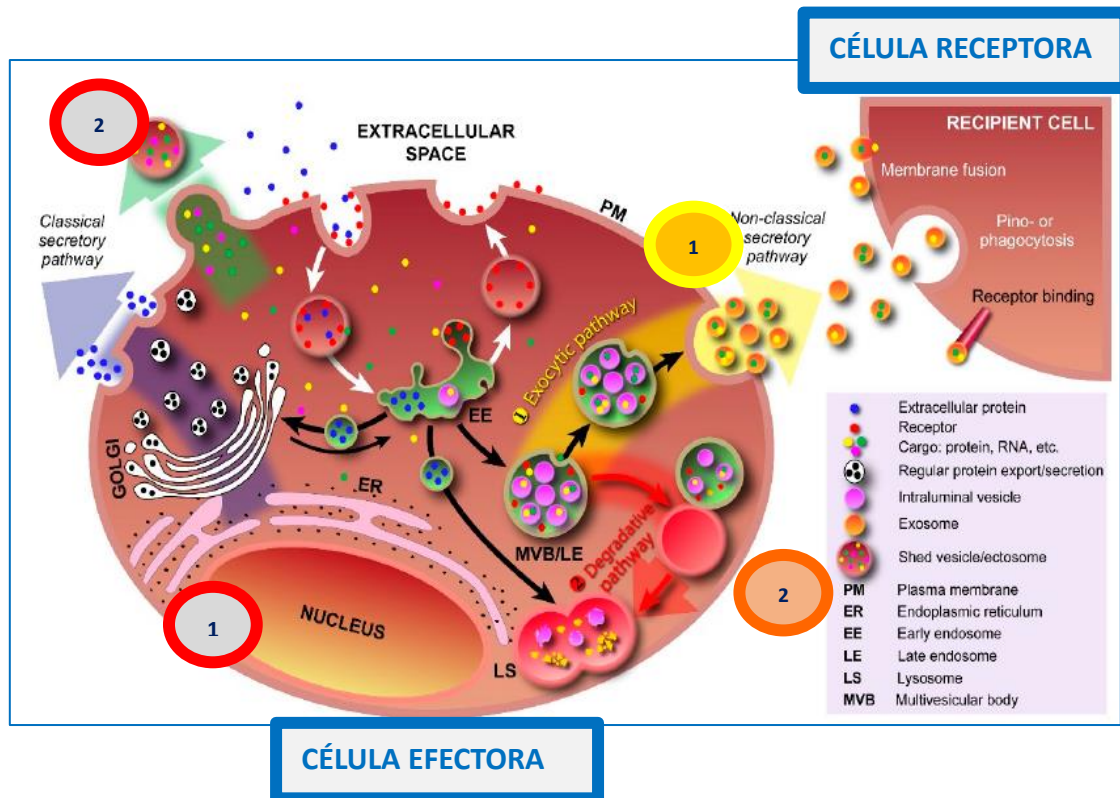


Figura 7. Rutas o vías implicadas en los tipos de vesículas.

Crédito: Kalra, *et al*, 2016¹⁰².

FIGURA 7 SUPERIOR: En la vía secretoria clásica, las vesículas y su carga de moléculas son empaquetadas en el aparato de Golgi (1, círculo rojo) de la célula efectora y transportan el material vesicular a la membrana plasmática, con la cual se funden las vesículas y son excretadas al espacio extracelular. Algunas vesículas (ectosomas) son expulsadas fuera de la célula por gemación. El cargo puede ser adquirido por la célula mediante un proceso de endocitosis (2, círculo rojo) mediado por receptores o por captación libre y formación de endosomas precoces (Early Endosomes/EE). El material

del cargo es reciclado en la membrana plasmática o secuestrado en vesículas intraluminales (Intraluminal Vesicles/ILV) de los cuerpos multivesiculares (Multivesicular Bodies/MVBs). Los exosomas se forman por gemación interna de la membrana del endosoma precoz y la formación de los MVBs. Siguiendo la vía exocítica (1, círculo amarillo), los MVBs se funden a la membrana plasmática y liberan los exosomas en el espacio extracelular. En la vía degradativa, los MVBs son aportados por los lisosomas para la degradación enzimática (2, círculo naranja).

FIGURA 7 INFERIOR. A (parte izquierda de la figura 7). La formación de los exosomas sigue la vía de la ceramida y/o una ruta dependiente de ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). La primera ruta (vía de la ceramida) (en la figura, arriba a la izquierda) se basa en la formación de balsas (rafts) lipídicas en las que la esfingomielina es convertida en ceramida por la acción de enzimas esfingomielinasas. Estos dominios enriquecidos con ceramida tienen desequilibrios estructurales entre pliegues (monoleaftles) que provocan que la membrana se doble o pliegue hacia adentro. Por su parte, en la ruta dependiente de ESCRT (en la figura, abajo izquierda), los componentes de esta maquinaria son reclutados secuencialmente de la membrana endosomal o endosómica, un proceso que comienza con Hrs (Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) y la unión al fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3-P) y el 3-5-bifosfato (PI-3-5-P2) a través de los dominios lipídicos de unión y a la proteína ubiquitinada (ESCRT-0). Los elementos ESCRT-I y ESCRT-II controlan o dirigen el florecimiento de las vesículas intermedias tardías (ILVs) durante el transporte del cargo a la luz, mientras que ESCRT-III es reclutado por la proteína Alix para completar el florecimiento y dirigir la escisión de la vesícula (formación espiral y eliminación). En este proceso, DUBs deubiquita la proteína y Vps4 (Vacuolar protein sorting proteins-4) recicla la maquinaria ESCRT. La nuevamente formada MVB es transportada a la membrana plasmática (PM) y, a través de la fusión, las ILV se liberan al ambiente extracelular. Son los exosomas.

B (parte derecha de la figura 7). El contenido o cargo luminal consiste en moléculas de mRNA, miRNA y fragmentos de gDNA, junto a numerosas proteínas de origen celular variado. Las proteínas están implicadas en la formación de las MVB (Multivesicular Bodies o cuerpos multivesiculares), tretraspaninas, transporte y fusión a la membrana, transmembrana, componentes del citoesqueleto y las proteínas citosólicas forman parte de los exosomas. Además de las funciones fisiológicas, algunas de estas moléculas están involucradas en procesos patológicos (Alzheimer, Parkinson, cáncer, encefalopatías espongiiformes transmisibles o enfermedad por priones y diversas patologías inflamatorias).

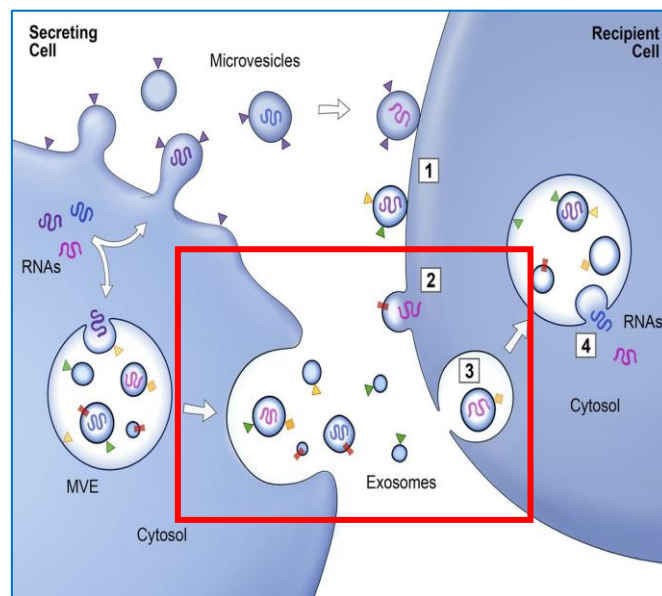


Figura 8. Transferencia de proteínas y RNA entre células a través de microvesículas.

Crédito: Raposo G., Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 2013; 200:373–383. doi: 10.1083/jcb.201211138.

Las proteínas asociadas a la membrana plasmática (PM), las proteínas transmembrana y los RNA se incorporan selectivamente a las vesículas intermedias (ILV) de los cuerpos multivesiculares (MVBs), o bien como multivesículas (MV) gemando de la membrana plasmática. Los MVBs se funden con la PM para liberar los exosomas en el medio extracelular. Las vesículas se funden directamente con la PM o son engullidas mediante endocitosis.

Posteriormente, se funden con la membrana de un compartimento endocítico. Ambas vías resultan en la liberación de proteínas y RNA en la membrana o el citosol de la célula diana o receptora. La vía es común para las vesículas exosomales y para las vesículas derivadas de la membrana plasmática.

La literatura internacional recoge la participación de los exosomas oncogénicos (oncosomas) en los procesos de invasión tumoral, angiogénesis o neoformación vascular, evasión del sistema inmune, resistencia a los quimioterápicos y apoptosis o muerte celular (Figura 9) (*Vide: Apartado VI. Exosomas y cáncer colorrectal*). Los componentes del cargamento exosómico están rodeados por la doble capa lipídica que permite su transporte a distancia como unidad de intercomunicación celular tras ser liberada al espacio extracelular. La capa lipídica tiene una composición diferente a la de la membrana plasmática de la célula original. El mayor componente del contenido intravesicular del exosoma está formado por proteínas citosólicas derivadas de la célula donadora o secretora. El espectro proteico es muy variado. Acoge a proteínas implicadas en la formación de las MVB, como Alix y TSG101, proteínas de transporte y fusión, como las anexinas, flotinas y GTPasas, proteínas implicadas en la adhesión (integrinas), tetraspaninas (CD9, CD63, CD81 y CD82), moléculas de presentación antigénica (moléculas de clase MHC), proteínas del *heat shock* (HSP70, HSP90) o estrés térmico y proteínas relacionadas con los lípidos^{120,121,122,123}.

Por otra parte, los exosomas son ricos en lípidos (ceramida, colesterol, esfingolípidos) y dominios resistentes al detergente (los pliegues lipídicos). En cuanto a los sacáridos, los exosomas contienen en su superficie externa polisacáridos y firmas de glicanos, en especial manosa, ácido siálico (alfa-2,3 y alfa 2,6) Y glicanos complejos ligados a polilactosamina. Finalmente, el *cargo* de los exosomas también transporta moléculas de RNAs (mRNA, miRNA y algunos RNAs no codificados/*non-coding-RNA*).

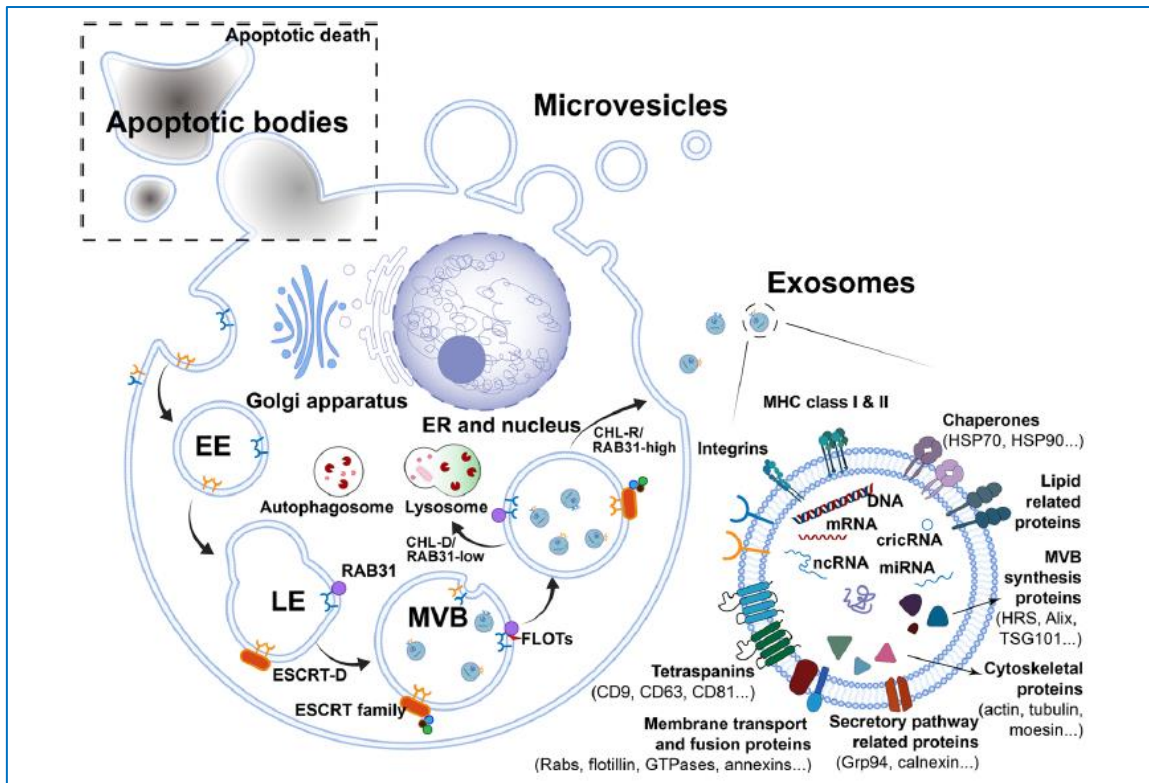


Figura 9. La biogénesis y composiciones de los exosomas.
Crédito: Modificado de Wu H, *et al. Molecular Cancer* 2021; 20:71.

El aparato de Golgi produce balsas lipídicas que facilitan la endocitosis (1). Los endosomas tempranos (Early Endosomes/EE) se forman tras la brotación hacia adentro de la membrana plasmática (PM) y pasan a endosomas tardíos (Late Endosomes/LE)(2) que se transforman en cuerpos multivesiculares (MVB) (3). La secreción o degradación está bajo control de la familia ESCRT y la vía RAB31 independiente de ESCRT. Los preexosomas ricos en colesterol (CHL-R) y en proteínas RAB31 serán secretados como exosomas, mientras que el colesterol deficientes (CHL-D) y bajo en RAB31 se degradan en los liposomas. Los exosomas contienen contenidos complejos como proteínas, mRNA, miRNAs, lRNA y DNA (4). Algunos biomarcadores de proteínas se utilizan para caracterizar exosomas.

Las funciones fisiológicas de los exosomas se resumen en el mantenimiento de la fisiología normal como la regeneración tisular tras un daño, la regeneración de hepatocitos, el transcriptoma de médula ósea hacia tejido pulmonar; por otra parte, tienen propiedades inmunomodulatorias entre las células dendríticas (CD) y los linfocitos B, así como en la activación de las células NK. También exhiben funciones antiinflamatorias con supresión de reacción de hipersensibilidad retardada (CD que expresan IL4/IL10), el tratamiento de enfermedades autoinmunes y el incremento de la fagocitosis de las células

apoptóticas (en sepsis). Finalmente, hay que señalar la función neurobiológica con comunicación entre las neuronas y la plasticidad de las sinapsis.

En cuanto a las *funciones patológicas*, los exosomas están involucrados en diversos cuadros clínicos y a distintos niveles. Por ejemplo, en el cáncer, uno de los campos de estudio más desarrollados (Figura 10), participan en el crecimiento y la diseminación de tumores (establecimiento de un nicho premetastásico para formar un microambiente apropiado, estimulación de factores angiogénicos que incrementan la angiogénesis, la densidad vascular y el depósito de una matriz extracelular). También lo hacen en la hipoxia (aumenta la secreción de exosomas, modulan el microambiente y favorecen la angiogénesis y producción de metástasis), en la modulación inmune antitumoral (transporte de antígenos tumorales MHCI, MHCII, estimulación de los linfocitos T citotóxicos y estimulación de otras CD) y en la modulación protumoral (efecto inmunosupresor, bloqueo de la maduración de las CD y macrófagos, supresión de NK y promueve la apoptosis de las células T)¹²⁴.

Las *fuentes de estudio* de los exosomas son múltiples líneas celulares *in vitro*: células nerviosas, fibroblastos, adipocitos, células del epitelio intestinal, líneas celulares tumorales (cáncer de colon, melanoma, neoplasia de próstata) y numerosos escenarios *in vivo*: líquidos biológicos (sangre, plasma, suero; líquido ascítico; líquido sinovial; líquido amniótico; leche materna; saliva) y orina.

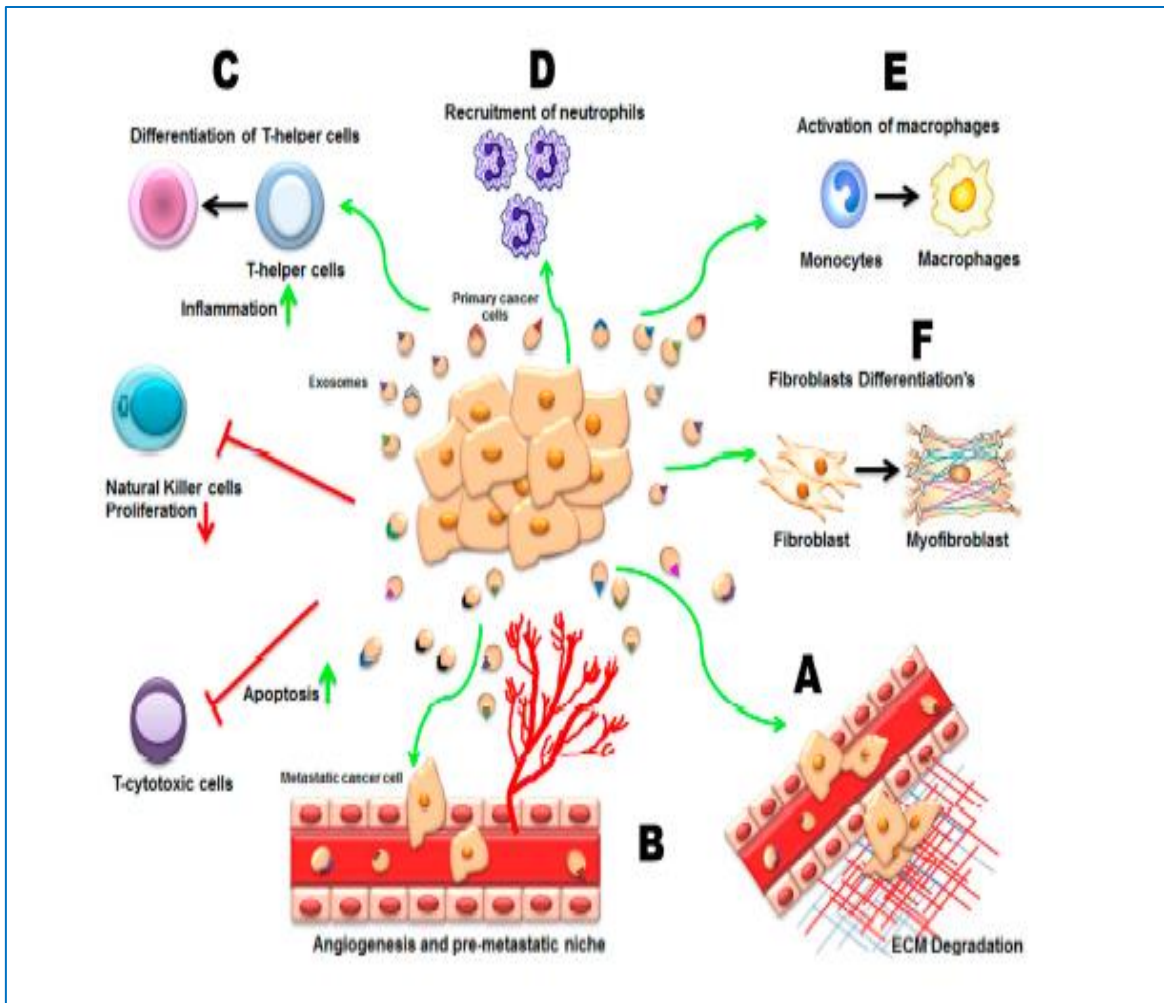


Figura 10. Funciones de los exosomas en la carcinogénesis.

Crédito: Rashed M, et al¹²⁴.

Los exosomas participan en el complejo proceso de la carcinogénesis de forma muy variada, con acciones estimuladoras y otras inhibitoras, pero todas dirigidas a lograr las mejores condiciones para la llegada, el asentamiento y el desarrollo de lesiones tumorales a distancia (metástasis). En cuanto a las primeras (flechas curvas en verde), facilitan la degradación del lecho tumoral (A) y la diferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos (F), o la activación de los macrófagos a partir de los monocitos (E), el reclutamiento de neutrófilos (D) y la diferenciación de los linfocitos T-helper o colaboradores en una línea proinflamatoria o Th1 (C) además de favorecer la angiogénesis y adecuación del nicho tisular premetastásico (B). Respecto a las acciones inhibitoras (líneas rectas truncadas, en rojo), frena la proliferación de los linfocitos NK o natural-killer a la vez que estimula o favorece la apoptosis de los linfocitos T citotóxicos, ambos implicados en la vigilancia inmunológica antitumoral.

II.3. Aplicaciones clínicas del estudio de los exosomas.

Los exosomas se están utilizando con una frecuencia creciente en la medicina asistencial (Tabla 4), aunque todavía está en los inicios y lejos de la generalización en su uso práctico.

En terapéutica de diferentes ramas médicas (neurología, reumatología, traumatología, inmunología, senescencia y vejez, oncología, cardiología, gastroenterología y

hepatología, obesidad y metabolismo, medicina regenerativa y enfermedades infecciosas), en calidad de agentes terapéuticos, en vacunaciones y como almacén biológico de biomarcadores.

Respecto a las vacunaciones, se trata de lograr vacunas preventivas cuyo origen procede de la oncología, unas vacunas diseñadas para evitar la infección por diversos patógenos y dotadas de distintas ventajas potenciales (conformación más estable de las proteínas, mejora de la distribución tisular, asociación más frecuente con las células presentadoras de antígenos, funcionamiento mediante un mecanismo natural, mejora la distribución tisular y la asociación más frecuente con las células presentadoras de antígenos), pero también con problemas asociados como la dificultad de obtener los exosomas apropiados y la presencia de antígenos extraños.

DISCIPLINA	CÉLULAS	COMENTARIOS
Neurología	Neuronas	Interés en la enfermedad de Alzheimer
Cardiología	Cardiomiocitos, células endoteliales, fibroblastos	Infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca
Endocrinología	Adipocitos, fibroblastos, macrófagos, monocitos, células endoteliales y madre	Obesidad, diabetes mellitus, trastornos metabólicos
Reumatología	Células sinoviales y células madre	Osteoartritis
Traumatología	Osteoblastos, células madre	Reparación ósea: fracturas
Enfermedades infecciosas	<ul style="list-style-type: none"> • Virus: el grupo herpes, VIH, SARS-CoV y SARS-CoV-2. • Bacterias: Numerosos bacilos Gramnegativos, <i>Leptospira</i> spp. • Hongos: <i>Cryptococcus neoformans</i> • Protozoos: <i>Leishmania donovani</i>, <i>Plasmodium</i> spp. 	Numerosas infecciones víricas, bacterianas, fúngicas y por protozoos
Digestivo (Hepatología)	Hepatocitos Fibroblastos Macrófagos Células estrelladas	Hepatitis víricas, hígado graso, hepatitis alcohólica, fibrosis y cirrosis hepática, hepatocarcinoma
Medicina regenerativa	Células madre mesenquimatosas	

Tabla 4. Algunos campos de investigación de los exosomas y microvesículas en diversas disciplinas.

IV. Los microRNAs como moléculas de información.

IV.1. Los RNAs no codificados/*non-coding RNAs* (ncRNAs). Definición y tipos.

En 1956, Crick y colaboradores establecieron el dogma científico de la existencia de una secuencia dinámica intracelular y universal¹²⁵, lo cual fue un novedoso concepto histórico en biología. Se propuso lo siguiente: el DNA nuclear de una célula fabrica fragmentos de RNA mucho más pequeños que el original los cuales salen del núcleo hacia el citoplasma donde, con la colaboración necesaria de los ribosomas, sintetizan proteínas a partir de una colección de 20 aminoácidos (la base química de la vida).

El entonces novedoso concepto de la secuencia *DNA-RNA-proteína* revolucionó la ciencia y ha dominado en los libros de biología durante toda la segunda mitad del siglo XX. Pero el enorme avance de las técnicas de estudios genómicos ha permitido en los últimos años establecer que los genes codificadores de las proteínas representan apenas el 2% del genoma humano total¹²⁶. En realidad, el 80% del genoma se transcribe de forma activa por medio de los RNAs no codificantes (*non-coding RNAs/ncRNAs*). Los ncRNAs son verdaderos vehículos de información intra y extracelular. Durante un tiempo se pensó que estos fragmentos genómicos formaban parte del ruido de fondo (artefacto de laboratorio) detectados en los análisis genéticos. Pero, en la actualidad, la comunidad científica acepta universalmente el papel relevante de los ncRNAs en numerosas y diversas funciones biológicas y patológicas.

Los ncRNAs se puede clasificar en dos grupos, dependiendo del tamaño de la secuencia de nucleótidos:

- Cortos (*small non-coding RNAs/sncRNAs*).

- Largos (*long non-coding RNAs/lncRNAs*).

La cifra discriminadora del tamaño que permite decir si un ncRNA es corto o largo está establecida en 200 nucleótidos (n). Los sncRNAs tienen menos de 200 n. Los lncRNA igualan o superan la cifra de 200 n. Pero no parece suficiente con esta clasificación tan simple. Los dos grupos de RNAs, por otra parte muy amplios, se pueden desglosar a su vez en varios subgrupos muy diferentes. Los sncRNA (<200 n) comprenden los microRNAs (miRNAs), los RNAs asociados a Piwi (en inglés, *piwi-interacting RNA/piRNAs*) y los RNAs cortos nucleolares (en inglés, *small nucleolar RNAs/snoRNAs*).

En el presente trabajo, interesa centrar la atención en el subgrupo de sncRNA y, sobre todo, en los denominados micro RNAs o, también, miRNAs o miRs. En adelante, cuando se haga referencia a un microARN, se mantendrán las siglas en inglés —miRNA— para homologarlas con lo expresado en la literatura internacional. Del mismo modo, diremos microRNAs cuando se trate de grupos o familias de microRNAs y miR para cada elemento individual de los microRNAs o miRNAs.

IV.2. MicroRNAs (miRNAs).

Un miRNA es un fragmento corto de RNA con un tamaño comprendido entre 18 y 25 nucleótidos; es decir, es aproximadamente la octava parte (1/8) de la cuantía de los nucleótidos que permite dividir a los RNAs no codificantes (ncRNAs) en cortos y largos.

Los miRNAs fueron descubiertos el año 1993^{127,128} como fragmentos genéticos reguladores transcripcionales negativos presentes en el gusano nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Figura 11), un excelente modelo natural para el estudio de la genética del desarrollo empleado en investigación desde los años setenta del pasado siglo.



Figura 11. *Caenorhabditis elegans*.
Crédito: WikimediaCommons.

Estos fragmentos genómicos han cobrado un gran protagonismo en la actualidad a raíz de demostrarse su asociación a determinados mecanismos implicados en la oncogénesis. Se sabe que, antes de formarse en el núcleo celular los miRNAs propiamente dichos, se produce una estructura previa genómica denominada miRNA prematuro o premaduración (en inglés, *premature-miRNA/pre-miRNA*) a partir del DNA original (Figura 12). El fragmento es mucho más pequeño que el DNA original, pero más largo (con más pares de bases o *pb*) que el miRNA. Tras su formación, pasa del núcleo al citoplasma y genera un miRNA maduro (*m-miRNA/miRNA*) que es el microRNA definitivo.

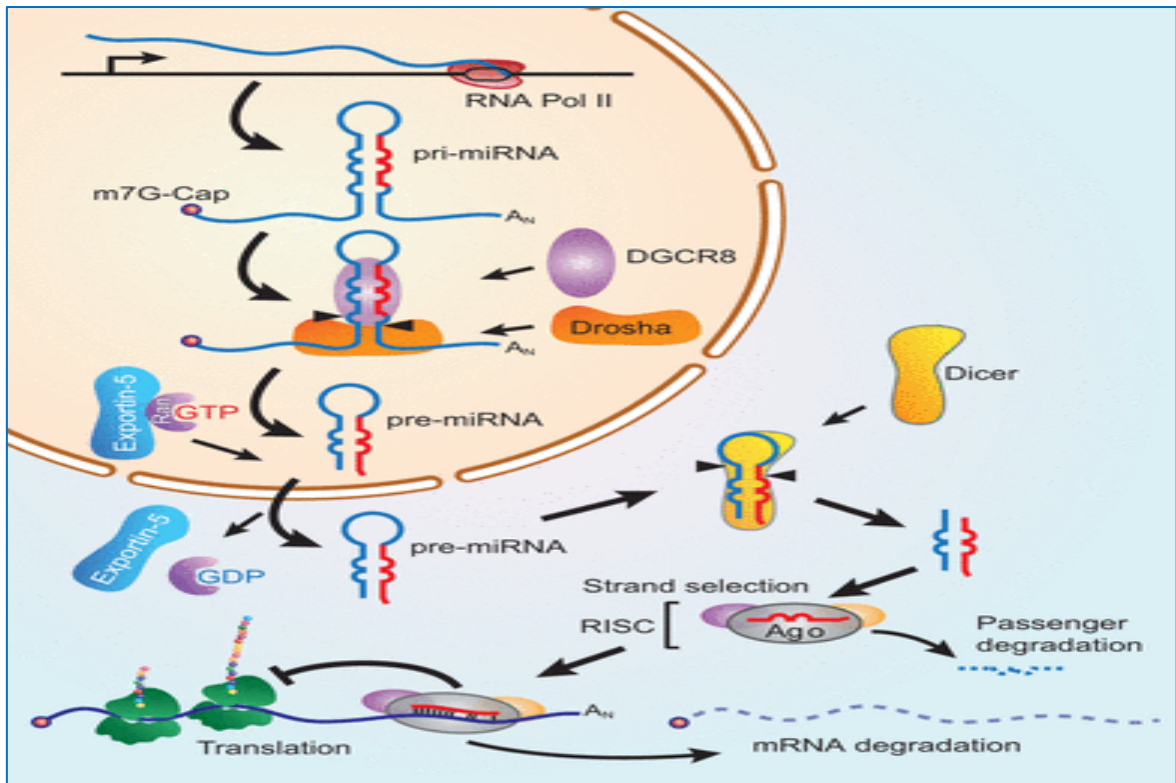


Figura 12. Formación y función de los miRNAs.

La formación de los miRNAs comienza con la transcripción de los RNAs mediada por la enzima RNA polimerasa II que es limitada y poliadenilada. Los miRNAs primarios (pri-miRNAs) son escindidos por un complejo microprocesador que consiste en la nucleasa Drosha (una enzima RNasa III) y la proteína de enlace al RNA DGCR8, para generar estructuras en forma de horquillas cortas de unos 60-90 nucleótidos (nt) denominados pre-miRNAs. Los pre-miRNAs son exportados desde el núcleo por la Ran/exportina-5 dependiente de GTP y luego son procesados en el citoplasma por Dicer, otra enzima RNnasa III nucleasa para generar miRNAs de doble cadena formados por 21-23 nt.

El miRNA funcionalmente competente (o definitivo) se une al RNA mensajero (mRNA) mediante un proceso catalizado por el denominado “complejo de silenciamiento inducido del RNA” (*RNA-Induced Silencing Complex/RISC*). El resultado final de este fenómeno biológico es que se degrada o bien se inhibe la traslación del mRNA para formar proteínas. En otras palabras, el miRNA es un vehículo portador de información nuclear al citoplasma: desde el DNA al RNA mensajero (mRNA), un paso esencial en el proceso de la síntesis de proteínas.

Por otra parte, en 2002 se demostró la implicación de los miRNAs (en adelante, como está dicho, cada miRNA individual se denominará miR seguido de un número decimal

único e identificativo) en la génesis del cáncer (tumorigénesis, oncogénesis). En concreto, nos referimos a dos tipos de miRNAs (miR-15 y miR-16). Ambos miRNAs están presentes en los sujetos afectados de leucemia linfocítica crónica. Tras los primeros estudios y otras publicaciones, la nómina de miRNAs y de neoplasias ha crecido de forma espectacular. Y no solo el número, sino también las diferentes funciones oncogénicas: dispersión, neovascularización, preparación del nicho metastásico, funciones inmunomoduladoras activando o reprimiendo algunos aspectos de la inmunidad innata y adquirida, resistencia tumoral a los quimioterápicos, etcétera.

IV.3. Los miRNAs en la patogenia de los pólipos y el CCR. Su papel desregulador.

Se han identificado miRNAs que parecen estar implicados en la patogenia oncogénica del CCR a diferentes niveles. Por un lado, participan en la secuencia tradicional desde el tejido normal al pólipo adenomatoso. También desde el adenoma al adenocarcinoma (Figura 13). En segundo lugar, están implicados en la denominada secuencia serrada: tejido normal a serrado y de aquí al cáncer. Sin duda, se trata de un capítulo muy complejo y de creciente peso en la literatura internacional, pero su complejidad debe ser asumida porque es necesario para entender la importancia de los miRNAs en la (tumor)génesis del CCR. Se analizan, por separado, la implicación de los miRNAs en ambas posibilidades evolutivas: la vía tradicional y la vía serrada.

Vía tradicional: La agrupación de varios miRNAs, como el *clúster* de miR-17-19a, miR-135b, miR-143 y miR-145, regula la vía de la catenina-WNT/ β . Esta es una ruta que está implicada en el inicio de la neoplasia colorrectal. Algunos genes asociados con las cascadas P13K/AKT y RAS-MAPK e implicados en dirigir la transición de adenoma precoz a adenoma avanzado están regulados por miRNAs específicos. En concreto, son los miR-143, miR-21 y miR-31 en RAS-MAPK, mientras que los miR-1, miR-2 y miR-

143 se relacionan con la cascada P13K/AKT. Por otra parte, la proteína supresora de tumores, p53, se inactiva o suprime por la acción de los miR-34a/b/c, miR-133a, miR-143 y miR-145 que intervienen en la evolución de adenoma avanzado a adenocarcinoma. Finalmente, los miR-21, miR-125 y miR-200 regulan la vía de TGF- β (*Factor de crecimiento transformante β*), un conocido factor que favorece el crecimiento tumoral.

Vía serrada: En cuanto a la vía serrada, los miRNAs también participan en esta etapa de la carcinogénesis. Por ejemplo, es conocida la participación de dos microRNAs (miR-21 y miR-181) en la génesis de los pólipos hiperplásicos y de los adenomas sésiles serrados ¹²⁹. Por su parte, los tumores que exhiben la mutación BRAF tienen una elevada expresión de miR-31-59. En la tabla 5 se resumen los microRNAs implicados en ambas vías.

VÍA ONCOGÉNICA	microRNAs	COMENTARIOS
Tradicional	Clúster miR-17-19a, miR-135b, miR-143 y miR-145. miR-143, miR-21 y miR-31 miR-1, miR-2 y miR-143 miR-34a/b/c, miR-133a, miR-143 y miR-145 miR-21, miR-125 y miR-200	Regulan la vía de la catenina-WNT/ β implicada en el inicio del CCR. Asociados a las cascadas P13K/AKT y RAS-MAPK. Dirigen la transición de adenoma precoz a adenoma avanzado. Se relacionan con la cascada P13K/AKT. Inhiben la proteína p53 (supresora) interviniendo en la evolución de adenoma avanzado a CCR. Regulan la vía de TGF- β que favorece el crecimiento tumoral.
Serrada	miR-21 y miR-181 miR-31-59	Génesis de los pólipos hiperplásicos y de los adenomas sésiles serrados. Participan asociados a la mutación BRAF.

Tabla 5. Micro-RNAs implicados en las vías tradicional y serrada de la oncogénesis colónica.

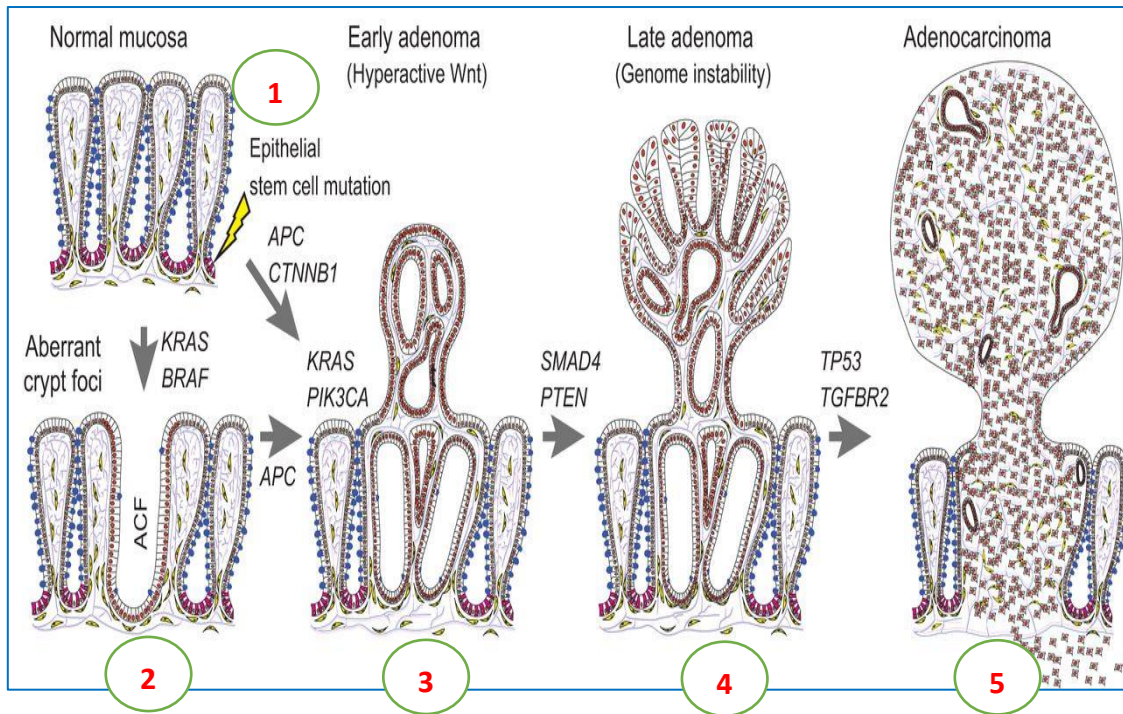


Figura 13. Oncogénesis en el cáncer colorrectal: de la mucosa normal al adenoma y al cáncer.

Crédito: Modificado de Strubberg y Madison, 2017¹⁶¹.

1. Se representa la mucosa colónica normal con las células globulosas (en azul) arriba a la izquierda. La formación del tumor comienza con la mutación de las células madre epiteliales (color magenta) situadas en el colon y en la mucosa rectal. Las mutaciones ocurren en los genes APC, KRAS o BRAF.
2. Las mutaciones BRAF o KRAS (en ausencia de mutaciones en la ruta Wnt) se asocian con la formación de focos crípticos aberrantes (en inglés, ACF).
3. La mayoría de los adenomas se asocian con mutaciones de los componentes de la ruta Wnt, como APC o CTNNB1, que resulta en hiperactivación de la señal Wnt en los adenomas precoces. La desregulación de la señal Wnt ocurre a menudo con mutaciones en KRAS, PIK3CA u otras mutaciones que llevan a la activación de la cascada PI3K-Akt.
4. Los adenomas progresan a adenomas avanzados con mutaciones adicionales (por ejemplo, SMAD4) y con frecuencia adquieren inestabilidad genómica.
5. Finalmente, las mutaciones TP53 y TGFBR2 se asocian con estadios finales de transformación celular y con características invasivas de los adenocarcinomas.

Siglas de los genes (original inglés): AKT, AKT serine/threonine kinase 1; APC, adenomatous polyposis coli or Wnt signaling pathway regulator; BRAF, B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase; KRAS, Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog or proto-oncogene and GTPase; PIK3CA, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha; SMAD4, Mothers against decapentaplegic homolog family member 4; TGFBR2, transforming growth factor beta receptor 2; TP53, tumor protein p53.

IV.4. Los miRNAs como biomarcadores diagnósticos del CCR a partir de diversas muestras clínicas.

Las propiedades de los miRNAs permite utilizarlos como buen material de estudio en el diagnóstico, pronóstico y en la respuesta terapéutica de determinadas patologías neoplásicas como el CCR y otras entidades nosológicas. Contribuyen algunas propiedades como la estabilidad y el tamaño. Los miRNAs son muy estables en diferentes condiciones experimentales. Por otra parte, su tamaño pequeño y su estructura les permite eludir la acción destructiva de la enzima ribonucleasa o RNA-asa presente en las células.

Los miRNAs puede ser extraídos de algunas muestras biológicas y clínicas con suma facilidad. Esto incluye muestras tisulares fijadas en parafina y numerosos líquidos biológicos: sangre total, plasma, suero, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo y heces. Además, y este hecho es de enorme interés práctico a la hora del estudio y análisis, los miRNAs son vehiculados por estructuras o partículas lipoproteicas de alta densidad (exosomas y ectosomas o microvesículas extracelulares). Finalmente, los miRNAs son excretados en el sistema circulatorio y digestivo y alcanzan tejidos a distancia del origen celular donde se forman (biogénesis) y excretan.

Las citadas cualidades bioquímicas y biofísicas permiten utilizar a los miRNAs como biomarcadores en muestras de fácil disponibilidad (sangre, fluidos, tejidos). En este sentido, el *Cancer Origin Test*, basado en la expresión de 64 miRNAs, fue el primer ensayo disponible para determinar el origen tumoral. El método tiene una sensibilidad (S) del 90% y una especificidad (E) del 99% para el cáncer metastásico de origen primitivo desconocido o incierto. La lista de microRNAs candidatos es enorme, pero aún no existe una aplicación clínica generalizada¹³⁰. Los miRNAs más citados en la literatura, hasta ahora, son miR-21, miR-29a, miR92a, miR-200c, miR-215 y miR-375.

Se expone en los párrafos que siguen una breve referencia al estudio de los miRNAs en relación con los tres tipos de muestras clínicas de estudio más habituales: sangre total y sus componentes (suero, plasma y células sanguíneas), heces y tejidos.

MicroRNAs en la sangre: Como está dicho previamente, algunos de los miRNAs mejor estudiados como posibles biomarcadores en muestras de sangre son los miR-21, miR-92a y miR-17-3p. En cuanto al primero (miR-21), como está dicho, es un miRNA oncogénico que permite el diagnóstico precoz del CCR debido a que se detecta en los estadios tempranos de la secuencia evolutiva adenoma-carcinoma¹³¹. Por otra parte, el miR-21 es uno de los miRNAs con mayor expresión en el CCR y, un hecho más que apoya su valor, se puede medir en los exosomas extraídos del plasma y del suero¹³¹.

Un dato de interés patogénico y práctico es que el miR-21 permite discriminar a los pacientes con CCR respecto a los controles sanos con una sensibilidad del 90% y una especificidad del mismo rango. También es posible su medición después del tratamiento quirúrgico del tumor a fin de comprobar la disminución de sus niveles tras la resección curativa, comparando los valores detectados con los obtenidos previos a la cirugía¹³².

Además del miR-21, hay otros dos miRNAs con importancia diagnóstica y evolutiva en relación con los pólipos y el CCR. Se trata de los miR-92a y miR-17-3p. Ambos permiten discriminar a los pacientes oncológicos de los controles sanos. La sensibilidad y la especificidad son menores que en el caso del miR-21 (S de 64% y 89% y E de 70% y 70%, respectivamente)¹³¹.

Conviene resaltar que el valor de algunos biomarcadores individuales aumenta notablemente cuando se determinan varios juntos o agrupados en los denominados paneles o clústeres diagnósticos. Sin embargo, no todo son buenas noticias en este campo. Restan aún numerosas incógnitas por resolver, una de las cuales es la gran variabilidad

de los resultados ofrecidos en la literatura debido a las diferentes metodologías de laboratorio, estandarización y homologación de las técnicas. No menos importancia tiene la experiencia del equipo analizador, el procesamiento y el tipo de muestras, el momento de ejecución de la técnica y algunos factores más asociados a los sujetos sometidos a estudio (edad, sexo, raza, etcétera).

MicroRNAs en las heces: En los últimos años se ha incorporado al estudio diagnóstico la búsqueda de algunos miRNAs en muestras de heces de los pacientes diagnosticados de pólipos hiperplásicos, adenomas y CCR. Hay numerosas publicaciones que demuestran el valor diagnóstico de dos miRNAs (miR-21 y miR-106a) en el despistaje de CCR¹³³. Por otra parte, un interesante trabajo de Wu y colaboradores¹³⁴ demostró el poder discriminativo del miR-92a para diferenciar a los sujetos sanos de los que tenían pólipos de bajo riesgo y a los que presentaban adenomas de bajo riesgo frente a los adenomas avanzados y CCR¹³⁴. Cabe decir lo mismo para el marcador miR-106a¹³⁵. Por tanto, la determinación de los miR-21 y miR-106a en las heces^{133,134,135} tiene aplicación diagnóstica útil en el despistaje de lesiones colónicas con potencial oncógeno. El estudio de los miRNAs es útil en la valoración de la transformación de un adenoma en CCR. Hasta ahora, el cribado de CCR de modo individual o en poblaciones se ha basado en pruebas a partir de las heces, mediante la determinación de la sangre oculta en las heces y por la más sofisticada y cara prueba de detección del DNA fecal. Las pruebas de sangre oculta se pueden realizar mediante la técnica de guayaco o por un método inmunohistoquímico (cuantitativo o cualitativo), siendo el segundo el de elección, por su mayor rentabilidad diagnóstica. La prueba de ADN fecal es una prueba prometedora. Ha evolucionado en los últimos años hasta disponer de *Cologuard*®.

El cribado de CCR también se basa en pruebas estructurales como la sigmoidoscopia y la colonoscopia. La prueba de sangre oculta en las heces, que es el método de cribado

poblacional implantado en España, es una prueba no invasiva, ampliamente disponible y de bajo coste, que presenta una sensibilidad adecuada para la detección de CCR aunque, desde el punto de vista negativo, ofrece tasas mucho más bajas de detección de adenomas. En cuanto a las colonoscopias, la capacidad diagnóstica del CCR y de las lesiones premalignas es alta, sobre todo si se cumplen en su ejecución los estándares de calidad. Sin embargo, son procedimientos invasivos que precisan sedación y una preparación previa, así como la participación de personal especializado, además del riesgo, aunque bajo, de aparición de complicaciones. Algunos marcadores tumorales sanguíneos como el Ca 19.9 y el CEA han sido estudiados en los últimos años. No han resultado válidos en el cribado de CCR ni de adenomas, aunque el CEA juega un papel relevante en el seguimiento del CCR como predictor de recidiva tumoral y también parece correlacionarse con el estadio del tumor, indicando un cáncer avanzado si se objetivan niveles por encima de 20 ng/dl¹³⁶. Todo esto acarrea un aumento nada desdeñable del gasto sanitario, amén de que el 9% de los CCRs se detectan en personas que han sido sometidas a endoscopia en los tres años previos al diagnóstico¹³⁶, razón por la que se recomienda hacer controles endoscópicos periódicos. Las heces contienen exfoliación de la mucosa intestinal, lo que permite buscar la presencia de miRNAs de forma fácil, asequible y barata en cuanto a la obtención y el procesamiento de la muestra. Ahmed y colaboradores¹³⁷, utilizando *microarrays* y PCR, encontraron una elevada expresión de 12 miRNAs (miR-7, miR-17, miR-20a, miR-21, miR-92a, miR-96, miR-106a, miR-134, miR-183, miR-196a, miR-199a-3p, miR-214) en las heces de los sujetos con CCR (Tabla 6). La expresión de los miRs es más intensa en los CCR metastásicos que en los adenomas.

Por otra parte, 8 miRNAs (miR-9, miR-29b, miR-127-5p, miR-138, miR-143, miR-146a, miR-222, miR-938) tienen una expresión disminuida en los pacientes con CCR, con un

incremento progresivo dependiendo del estadio de la clasificación internacional TNM. Un dato de mucho interés es que el patrón o perfil en las heces es muy similar al encontrado en el tejido colónico¹³⁷. Entre todos, el miR-20a parece el más útil como biomarcador en las heces de los pacientes con CCR. Pero su sensibilidad es solo del 55% en tanto que la especificidad es del 82%¹³⁸.

EXPRESIÓN	AL ALZA	A LA BAJA
<i>miRNAs</i>	<i>miR-7, miR-17, miR-20a, miR-21, miR-92a, miR-96, miR-106a, miR-134, miR-183, miR-196a, miR-199a-3p, miR-214</i>	<i>miR-9, miR-29b, miR-127-5p, miR-138, miR-143, miR-146a, miR-222, miR-938</i>

Tabla 6. Expresión de diferentes *miRs* en heces (*microarrays* y PCR) en sujetos con CCR. El *miR-20a* parece el más útil aun con baja sensibilidad.

La determinación de ciertos miRNAs en las muestras fecales puede servir como un dato analítico de interés para la indicación de la colonoscopia a los pacientes con riesgo elevado de CCR (cuando se detecten niveles elevados de miRNAs en las heces).

MicroRNAs en los tejidos: El perfil de miRNAs en tejido colónico obtenido por biopsia demuestra un incremento progresivo desde el tejido normal y el adenoma hasta el CCR. El perfil está definido por seis miRNAs (miR-18a, miR-18b, miR-431, miR-503, miR-1246 y miR-4417). Por otra parte, hay un perfil con descenso de los niveles de cinco miRNAs (miR-133a, miR-375, miR-378, miR-422 y miR-479) desde el tejido normal a los adenomas y el CCR¹³⁹. Tres miRNAs (miR-21, miR-29a y miR-135b) están hiperexpresados en los adenomas colorrectales en comparación con la mucosa colónica normal¹⁴⁰. Los miR-21 y miR-29a, junto al miR-92a están más elevados en los adenomas frente al tejido normal. Hay una relación positiva entre los tres miRNAs y el tamaño y número de los adenomas colorrectales¹³⁸. Los citados miRNAs deben de estar implicados en la transformación de la mucosa normal en adenoma y CCR.

Respecto al tejido fijado en parafina, existen diferencias en 99 miRNAs en varios grupos histopatológicos (tejido normal, pólipos hiperplásicos, adenomas tubulares, adenomas tubulovelloso o con alto grado de displasia y pólipos serrados)¹⁴¹, con las mayores diferencias en los adenomas tubulovelloso con displasia de alto grado y los restantes grupos.

En un estudio comparativo de 21 pacientes con CCR desarrollado a partir de adenomas previos, Bartley y colaboradores¹⁴² encontraron 866 miRNAs, de los cuales 230 estaban diferenciados significativamente. De ellos, 216 (94%) distinguen entre mucosa normal y adenocarcinoma, 144 (63%) son diferentes entre la mucosa normal y los adenomas con displasia de alto grado, 134 (58%) diferentes de la displasia de bajo grado, 99 (43%) con adenocarcinoma, 25 (11%) miRNAs diferentes entre la displasia de alto grado y el CCR y tan solo 3 (1,3%) diferencian las displasias de bajo y alto grado. Treinta y seis miRNAs tienen una diferente expresión en la secuencia total. En una línea similar, hay investigaciones en tejido normal, adenomas y CCR con 67 miRNAs, con cada vez más evidencias al respecto como muestra el trabajo de Liu *et al*¹⁴³.

IV.5. Los miRNAs como biomarcadores pronósticos evolutivos del CCR.

En el año 2007 se publicó un trabajo basado en chips o micromatriz (*microarray*) en el que se buscaron los niveles de expresión de 389 miRNAs de 84 pacientes diagnosticados de CCR y de un grupo control¹⁴⁴. Entre los 389, los autores identificaron y validaron 37 miRNAs con expresión diferente: algunos de esos son los miR-20a, miR-21, miR-106a, miR-181b y miR-203. Un dato para destacar en este trabajo es que miR-21 se asocia a un peor pronóstico (menor supervivencia) de los pacientes que lo expresaban, un hecho refrendado por trabajos posteriores^{144,145,146,147,148}.

Hay otros diversos miRNAs que muestran una hiperexpresión (exceso) o lo contrario, una hipoexpresión o regulación a la baja (defecto), pero miR-21 es el de mayor aplicación clínica¹³². Su valor discriminativo se incrementa al saber que el mismo miRNA aparece en los sujetos que tienen un CCR en estadio II, tal como sucede con otros miRNAs (miR-320 y miR-498). Este es un hecho de mucho interés porque se han desarrollado paneles que aglutinan diversos miRNAs pretendiendo afinar en el valor pronóstico a la hora de identificar a los sujetos en estadio II de CCR y con posibilidad de presentar recidivas tras un tratamiento resectivo.

IV.6. Los miRNAs como biomarcadores de la respuesta terapéutica en el CCR.

Han aparecido nuevos fármacos (anticuerpos monoclonales) dirigidos a dianas vasculares específicas: el factor de crecimiento endotelial o VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) y el factor de crecimiento epidérmico o EGF (*Epidermic Growth Factor*), aunque el pronóstico del CCR sigue siendo malo (supervivencia de 18-21 meses)¹⁴⁹. Por tal razón, la posibilidad de usar biomarcadores que permitan medir la respuesta terapéutica y la posibilidad de recidiva son aspectos de enorme interés, como es su papel en la detección de las resistencias farmacológicas.

En este sentido, diversos miRNAs (miR-10b, miR19b, miR-20a, miR-21, miR-23, miR-31, miR-34, miR129, miR140, miR145, miR192/-125, familia miR-200 y miR-497) se asocian a la resistencia al 5-FUO (5-fluorouracilo). También se ha descrito (*in vitro* y retrospectivos) resistencia a oxiliplatino (98) y a irinotecan^{150,151}. La importancia no es menor respecto a la respuesta a la terapia. Hasta ahora, la aplicación de los miRNAs al tratamiento de CCR se ha limitado a las líneas celulares^{151,152,153} y a los modelos animales¹⁵².

Las funciones de los miRNAs son muy complejas^{154,155}, pero desempeñan un importante papel en numerosos procesos fisiológicos y patológicos. Una de las claves es que un solo miRNA puede actuar sobre cientos de genes diana y, a la vez, el mismo miRNA puede ser la diana sobre la que actúan otros numerosos y diferentes miRNAs. Aun así, a pesar de las dificultades actuales, hay esperanza en esta opción terapéutica en el futuro.

IV.7. Los RNAs no codificados largos (lncRNAs) como biomarcadores del CCR.

Se han identificado cerca de diez mil lncRNA locus en el genoma humano¹⁵⁶. Todavía se desconocen muchos aspectos de la biología de los lncRNA, pero se empieza a entender su papel en la oncogénesis. Por ejemplo, en la desregulación de la expresión de lncRNA.

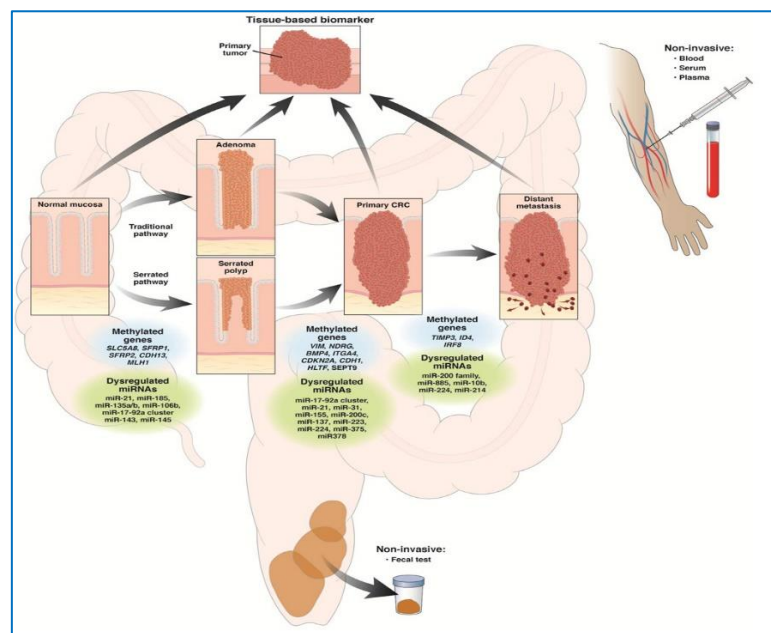


Figura 14. Cambios genéticos y epigenéticos en el cáncer colorrectal

En la figura se aprecian la vía tradicional (alteraciones y transiciones genéticas y epigenéticas en un pólipo adenomatoso) y la vía serrada (en un pólipo serrado). Las alteraciones genéticas y epigenéticas llevan al CCR primitivo y metastásico. Esta cascada de varios pasos es gobernada por las mutaciones genéticas y por las alteraciones epigenéticas, incluyendo metilación DNA y expresión desregulada de varios miRNAs. Las alteraciones moleculares durante cada paso del desarrollo del CCR se pueden medir en los tejidos (biomarcadores tisulares), en muestras de suero y plasma (biomarcadores sanguíneos) y en las heces (biomarcadores fecales). Todos tienen un potencial diagnóstico, pronóstico y predictivo en el CCR.

El miRNA denominado *Hox Transcript Antisense Intergenic RNA* (HOTAIR) mostró una alta expresión en correlación con las metástasis a distancia y peor pronóstico del CCR¹⁵⁷. El MALAT1 (*Metastasis-Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1*) es un biomarcador predictivo de metástasis en neoplasias de pulmón con capacidad pronóstica en los pacientes con CCR. Por otra parte, se han descrito lncRNAs en vesículas extracelulares obtenidas de suero y plasma¹⁵⁸, un hecho que apoya el uso de los exosomas para el estudio de los biomarcadores miRNAs en el CCR.

IV.8. Los microRNAs en la etiología del CCR.

Como está dicho, la mayor parte de los CCRs son esporádicos pero algunos pacientes portan mutaciones genéticas heredadas. Con arreglo al grado de invasión tisular, el CCR se clasifica en cinco estadios (estadiaje de 0 a IV):

- Estadio 0: Carcinoma *in situ*. Las células malignas no traspasan la parte superficial de la mucosa ni afectan a los ganglios linfáticos.
- Estadio I: se define por la invasión submucosa.
- Estadio II: hay penetración de la pared colónica externa.
- Estadio III: existe invasión ganglionar.
- Estadio IV: se demuestra la presencia de metástasis a distancia.

El proceso de formación tumoral puede durar en torno a veinte años. De aquí la importancia de la endoscopia diagnóstica con biopsia para hacer diagnósticos precoces en las primeras fases de la oncogénesis. Esto ha permitido disminuir las tasas de mortalidad en las últimas dos décadas en un tipo de cáncer que sigue siendo muy frecuente (estadísticas de 2020)¹⁵⁹.

Conviene distinguir los miRNAs con actividad oncogénica (miRNAs oncogénicos/oncomiRNAs) y los que tienen un efecto supresor de los tumores (miRNAs supresores de los miRNAs oncogénicos o anti-oncomRNAs). En los ratones existe el gen DICER1 necesario para el procesamiento de casi todos los miRNAs¹⁶⁰. Su inactivación es necesaria para el proceso de oncogénesis. En los humanos, el DICER1 también parece tener un papel supresor en las líneas celulares del CCR. Siguiendo la excelente revisión de Struberg y Madison¹⁶¹, comentaremos brevemente algunos de los más importantes aspectos de los miRNA en el proceso de oncogénesis en el CCR. Dada la gran complejidad del tema, trataremos de exponer de forma muy escueta los aspectos fundamentales de interés en relación con nuestro trabajo. Se divide la exposición en ocho apartados:

IV.8.1 Regulación de las células madre intestinales y de las células iniciadoras del CCR por los miRNA.

IV.8.2. Interacción de los microRNAs con los directores moleculares ya conocidos de CCR.

IV.8.3 El papel de miR-21 y miR-221/222 en la vía de señal proinflamatoria.

IV.8.4. La familia oncomiR miR-17 y la modulación de la señal TG- beta.

IV.8.5. La familia miR-10 anti-oncomiR.

IV.8.6. La tumorigénesis CCR y Let-7.

IV.8.7. La familia miR-15 anti-oncomiR.

IV.8.8. Efectos pleiotrópicos de los miRNAs miR-200.

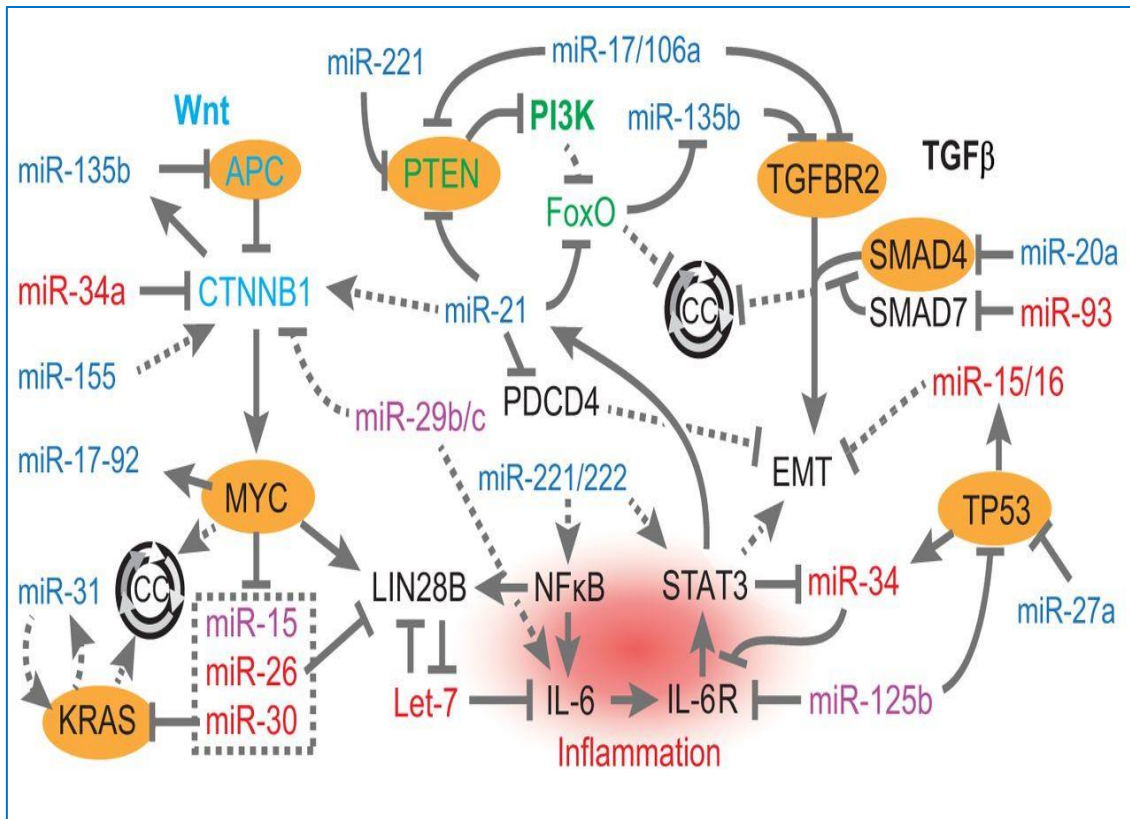


Figura 15. Genes que mutan con frecuencia en el CCR y sus relaciones con los miRNAs.

Crédito: Modificado de Strubberg y Madison, 2017¹⁶¹.

Los genes que mutan en el CCR regulan y son regulados, a su vez, por miRNAs. La ruta Wnt (en azul) se estimula por miR-135b, miR-21 y miR-155 y es inhibida por miR-34a y miR-29b/c. Al final de la cascada Wnt, MYC activa transcripcionalmente el locus miR-17-92, pero reprime la expresión de miR-15, miR-26 y miR-30. KRAS aumenta la expresión de miR-31. MYC y KRAS promueven la progresión del ciclo celular (CC).

1. En la ruta PI3K (en verde), que está negativamente regulada por PTEN, el miR-135b está aumentado por la inhibición de PI3K sobre los factores de transcripción de FoxO (FOXO1 y FOXO3A), que reprimen la progresión del ciclo celular. Los miR-221, miR-21 y miR-17/106 aumentan la activación de la señal de PI3K mediante la represión de los reguladores negativos de esta ruta. Los miRNAs también modulan las vías respiratorias mediadas por los factores de transcripción NFκB y STAT3 por inhibición directa de la IL-6 (vía miRNAs Let-7 que son inhibidos por LIN28B) o el receptor de IL-6 (vía miR-34 y miR-125b). Los miR-221/222 y miR-29b/c pueden aumentar también esta ruta a través de los efectos estimuladores indirectos sobre IL-6, NFκB y STAT3B.

2. La ruta TGF-β (en negro), que es importante en la represión de la proliferación celular y en la progresión del ciclo celular es antagonizada también por varios miRNAs (miR-17/106, miR-135b y miR-20a) a través de sus efectos sobre TGFBR2 y SMAD4. El miRNA miR-93 puede estimular la ruta TGF-β mediante la represión del inhibitorio SMAD7, aunque el efecto de miR-93 inhibitorio de la señal Wnt a través de la inhibición de SMAD7, que puede aumentar la acumulación nuclear de beta-catenina.

3. Finalmente, varios miRNAs tienen efectos sobre EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) en la tumorigénesis CCR con miR-15/16 y miR-34 (que son activados transcripcionalmente por TP53) inhibiendo el proceso, mientras que miR-21 aumenta EMT.

Siglas de los genes (original inglés): APC, adenomatous polyposis coli or WNT signaling pathway regulator; CTNNB1, β-catenin; MYC, v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog; KRAS, Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog or proto-oncogene and GTPase; PI3K, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG); PTEN, phosphatase and tensin

homolog; FoxO, forkhead box O1 and O3a (FOXO1 and FOXO3A); PDCD4, programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor); LIN28B, lineage-28 homolog B; NFkB, nuclear factor kappa B (NFkB1, NFkB2, REL, RELA, RELB); IL6, interleukin 6; IL6R, interleukin 6 receptor; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3; TGFBR2, transforming growth factor beta receptor 2; SMAD4, mothers against decapentaplegic homolog family member 4; SMAD7, mothers against decapentaplegic homolog family member 7; TP53, tumor protein p53.

IV.8.1. Regulación de las células madre intestinales y de las células iniciadoras del CCR por los miRNAs.

Al menos en el modelo animal (ratones), diversos miRNAs participan en la regulación de las células madre intestinales normales (CIN), encargadas del recambio continuo de la capa epitelial del intestino. Algo similar sucede en la piel humana de forma fisiológica. En el caso de los tumores, las células que inician el proceso se denominan, de forma convencional, células iniciadoras del tumor (CIT). Estas células suelen ser resistentes a la quimioterapia y sufren transformación de su origen epitelial a mesenquimal¹⁶². En el proceso están involucrados numerosos miRNAs (miR-34a, miR-106b, miR-140, miR-146a, miR-183, miR-200, miR-203, miR-215, miR-302b, miR-328, miR-363, miR-371 y miR-451), además de DICER.

Destacamos ahora los miR-200 y miR-203 por lo que se verá más adelante. La división celular puede hacerse de forma simétrica, con el nacimiento de dos células hijas, o de forma asimétrica lo que significa que una de las líneas celulares deriva hacia la diferenciación. Traducido a efectos prácticos, significa que carece de capacidad de iniciar la oncogénesis¹⁶³.

La diferenciación simétrica dará lugar a tumores que, en algún caso, serán resistentes al tratamiento. La vía asimétrica puede reducir a la primera población y facilitar los efectos beneficiosos del tratamiento al incrementar la susceptibilidad a algunos fármacos utilizados en la terapia del CCR¹⁶⁴. Por su parte, dos miRNAs (miR-215 y miR-192)

ejercen una acción represora en las células madre epiteliales con valores disminuidos en el CCR. Ambos son útiles como marcadores pronósticos^{165,166,167,168}.

El papel de los miRNA en el epitelio normal no oncogénico es menos conocido. Al parecer, miR-34a y Let-7 miRNA tienen un efecto represor en respuesta a señales inflamatorias¹⁶⁹. Let-7 es una gran familia de miRNAs con genes codificantes de miRNAs que mantienen la diferenciación y previenen la oncogénesis en múltiples tejidos^{170,171,172,173,174}. Este grupo de miRNAs se tendrá en cuenta en la presente investigación. Algunos reguladores de la biogénesis de miRNAs pueden modular la función de las células madre y la oncogénesis¹⁷⁵.

IV.8.2. Interacción de los microRNAs con los controladores moleculares ya conocidos de CCR.

Por estudios de secuenciación de genomas a gran escala, se han identificado controladores de CCR que detectan mutaciones frecuentes en los genes KRAS, BRAF y TP53, también presentes en otros tipos de cáncer (pulmón, páncreas y melanoma)^{176,177,178}. El dato clave es la hiperactivación de la ruta Wnt (una vía de señalización o transducción de señales intercelulares) causada por mutaciones en el gen APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) que codifica una proteína de función supresora tumoral. Se analizan a continuación, muy brevemente, las complejas interacciones de los miRNAs con los genes mutados en el CCR. En los siguientes párrafos se describen sus principales características resumidas al final de este apartado (Tabla 7).

Modulación de la señal Wnt por los miRNAs.

El 75% de todos los tumores tienen mutaciones inactivantes del gen APC, un gen supresor tumoral clave en el desarrollo del CCR. Es la aberración molecular más frecuente de la desregulación de la señal Wnt¹⁷⁹. El gen APC codifica una proteína que forma parte del

complejo de destrucción AXIN (complejo regulador de la vía Wnt), necesario para la fosforilación y degradación de β -catenina¹⁸⁰.

Otras mutaciones también activan la señal Wnt en el CCR^{181,182}. Por encima de Wnt, la familia miR-34 (miR-34a-b-c) reprime directamente numerosos efectores de señal Wnt. La transcripción de miR-34 se estimula directamente por TP53 o p53, una proteína supresora de tumores, como prueba de que puede reprimir la señal Wnt¹⁸³. Otros inhibidores de los ligandos Wnt incluyen miR-29b, miR-29c y miR-93¹⁸⁴.

El miR-21 también aumenta la activación transcripcional mediada por TCF 4/ β -catenina de los genes dianas endógenos y de los reportadores subrogados (el complejo β -catenina/TCF-4 es el interruptor que controla la proliferación frente a la diferenciación en las células epiteliales intestinales sanas y malignas). Su actividad coincide con y depende de la fosforilación de la β -catenina (una de las cuatro cateninas —alfa a delta— involucradas en la adhesión celular mediada por adherinas). El miRNA prooncogénico miR-155 puede aumentar la señal de Wnt/ β -catenina por acción directa e inhibidora sobre HGMB1, el cual es un factor que promueve la señal de Wnt^{185,186}. Los miRNAs que modulan la ruta Wnt merecen un especial escrutinio como dianas terapéuticas. Pero hay mutaciones en otros genes, como KRAS y BRAF, necesarias para este fenómeno, como prueba de que el abordaje de varias vías de señalización es de importancia terapéutica.

Modulación de las GTPasas cortas KRAS y BRAF por los miRNAs.

Las GTPasas (contracción de Guanosina trifosfatasa o trifosfatasa de guanosina) conforman una superfamilia enzimática (son más de 100 proteínas relacionadas en su estructura) con diversas funciones. Casi la mitad de los tumores CCR tiene mutaciones activantes de las GTPasas cortas KRAS y BRAF que activan la ruta de la quinasa MAP (MAPK) y estimulan la proliferación celular. Algunas neoplasias (pulmón y mama) han

permitido comprobar que los miRNAs de la familia Let-7 reprimen directamente el mRNA KRAS^{187,188,189}. KRAS no es una diana Let-7 en los estudios de CCR^{190,191,192}, sin embargo, el miR-31 parece un potente estimulador de KRAS en el CCR mediante la regulación negativa de RASA1, el cual inhibe la función KRAS^{193,194}. El gen RASA1 codifica la proteína p120-Ras GAP, activadora de la GTPasa, que regula la vía RAS/MAPK, la cual transmite señales del exterior al núcleo celular (Figura 15).

El oncogén BRAF muta con frecuencia en los tumores del colon proximal y está implicado en el control de la inestabilidad microsatélite (MSI) tumoral¹⁹⁵. La MSI está hipermutada, probablemente por la metilación o mutación de los genes que codifican las proteínas necesarias para la reparación del desajuste del DNA¹⁹⁶. BRAF es diana del oncogén miR-378 en el CCR. Con mayor frecuencia, la expresión elevada de miR-31 se asocia con mutaciones BRAF y un fenotipo agresivo de cáncer^{197,198}. No obstante, el conocimiento actual de la función molecular de miR-31 es limitado, aunque este oncomiR (un microRNA con potencialidad oncogénica) está activado en las etapas posteriores de la cascada KRAS-BRAF-MAPK¹⁹⁹ (Figura 15).

La familia anti oncomiR miR-34 y el TP53.

La familia miR-34 la forman los miR-34a, miR-34b y miR-34c. Regulan a los mRNA implicados en el ciclo celular¹⁹⁹, el crecimiento, el daño del DNA y la apoptosis²⁰⁰. Las interacciones se asocian a las propiedades supresoras y a su capacidad de inducir apoptosis y senescencia²⁰¹. Los locus miR-34a y miR-34b/c son dianas transcripcionales directas del supresor tumoral TP53^{202,203,204} cuyos niveles aumentan indirectamente por acción de miR-34. El *feedback* sobre TP53 se debe a varios mecanismos^{205,206}. El miR-34a es un agente clave en la represión de la migración tumoral, en la invasión y en las metástasis a través de la represión de la ruta IL-6/STAT3 (*Interleukin-6/ Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), una vía compleja que implica a IL-6, su

receptor (IL-6R), la enzima Janus-kinasa y el STAT3 (Figura 15). La deficiencia de miR-34a aumenta la oncogénesis de CCR cuando TP53 es haploinsuficiente (es decir, un único alelo es incapaz de producir proteína suficiente que garantice la función normal). La conexión de miR-34 con las moléculas proinflamatorias TNF- α e IL-6 resalta el papel clave de la inflamación, incrementando el riesgo y la progresión de CCR²⁰⁷.

IV.8.3. El papel de los miR-21 y miR-221/222 en la vía de señal proinflamatoria.

El miR-21 es uno de los más prominentes oncomiR con propiedades pro oncogénicas a través de la represión de la diana PDCD4, un supresor tumoral proinflamatorio activado por apoptosis y requerido por la activación del factor nuclear NF-kB y de IL-6, y también relacionado con las prostaglandinas^{208,209,210}. Los niveles de la proteína PDCD4 disminuyen progresivamente durante el proceso de oncogénesis del tejido normal a adenocarcinoma^{211,212}. Su pérdida se asocia con una menor supervivencia¹⁸⁵, si bien hay más acciones del miR-21^{213,214}.

IV.8.4. La familia oncomiR miR-17 y la modulación de la señal TGF-beta.

La familia miR-17 la forman 8 miRNAs (miR-17, miR-18a/b, miR-20a/b, miR-93 y miR-106a/b). Tres de los cuales (miR-17, miR-18a y miR-20a) son transcritos del locus miRNA miR-17-92. El miR-17 promueve la oncogénesis al suprimir la apoptosis y la parada del ciclo celular, incrementar la migración y dirigir el crecimiento tumoral de líneas celulares de CCR²¹⁵. Otros miembros (miR-20a) son también moduladores que avivan la progresión del cáncer^{216,217,218} y promueven la progresión del ciclo celular en respuesta al TGF- β (*Transforming Grow Factor-Beta*), una molécula prometastásica (Figura 15).

El miR-106a/b también incrementa las metástasis y actúa sobre TGFBR2, el receptor celular del TGF- β (Figura 15). Está hiperexpresado en las líneas celulares metastásicas

de CCR, a la vez que promueve la migración de las células tumorales y la invasión *in vitro*²¹⁹. La represión de TGFBR2 puede ser importante para facilitar la proliferación celular precoz en la oncogénesis, para facilitar la transición de mesenquimal a epitelial (MET) y reprimir la migración y la invasión²¹⁹.

Hay que perfilar el papel de la familia miR-17 en el CCR, en particular miR-18a, elevado en el CCR²²⁰. La contribución de miR-18a al daño del DNA y a la apoptosis celular se debe a la inhibición directa de la enzima quinasa ATM (acrónimo de *Ataxia Telangiectasia Mutated*), requerida para iniciar la reparación del DNA siguiendo las roturas de la doble cadena²²⁰. En resumen, la familia miR-17 aviva las metástasis del CCR.

IV.8.5. La familia anti-oncomiR miR-10.

Esta familia la forman 3 miRNAs (miR-10a/b, miR-100 y miR-125a/b) con propiedades supresoras y función oncogénica²²¹ (al menos, en el modelo animal de ratones).

IV.8.6. La oncogénesis de CCR y la familia Let-7.

Let-7 es un gen común en los genomas del nematodo *Caenorhabditis elegans*, la mosca *Drosophila melanogaster* y los vertebrados. Esta familia Let-7 acoge 4 de los 15 miRNAs más abundantes en el intestino del ratón²²² (Figura 16).

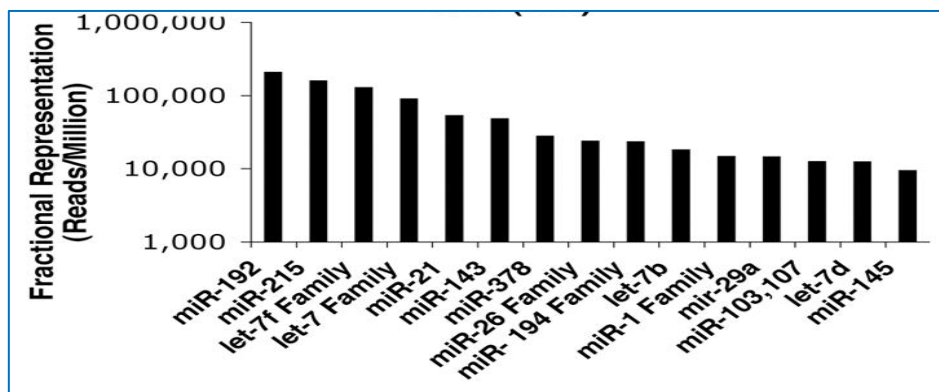


Figura 16. Familia Let-7.

Crédito: MacKenna LB, *et al. Gastroenterology*, 2010²²².

Let-7 se incluye entre los más importantes en la represión de la oncogénesis por su abundancia, función antiproliferativa y efectos pro diferenciación. El incremento de la función de los miRNAs Let-7 puede tener mucho valor en la prevención y el tratamiento del CCR.

IV.8.7. La familia anti oncomiR miR-15.

La familia incluye 5 miRNAs: miR-15, miR-16, miR-195, miR-424 y miR-497. Los miR-16 y 195 están disminuidos en el CCR comparado con el tejido normal^{223,224}. El locus miR-15a/miR-16-1 es inducido por TP53 en respuesta al daño del DNA. También es responsable de la represión directa del factor de transcripción prometastásico bHLH-ZIP AP-4 (o TFAP4, *Transcription Factor AP-4*) en las células del CCR (bHLH-AP4 son las siglas de *basic Helix-Loop-Helix-Zipper*, necesario para la unión al DNA y la oligomerización TFAP4 activa genes virales y celulares).

IV.8.8. Efectos pleiotrópicos de la familia miR-200.

Numerosas miRNAs tienen efectos pleiotrópicos o polifénicos, es decir, efectos fenotípicos o caracteres distintos a partir de un solo gen. No están plenamente comprendidos. La excepción a la regla es la familia miR-200, de importancia en el mantenimiento de la identidad epitelial y en la represión de EMT²²⁵ (recordamos que EMT son las siglas de *Epithelial-Mesenchymal Transition*). No obstante, esta familia puede promover metástasis a través del efecto sobre MET^{226,227}.

La familia miR-200 la forman 3 miRNAs: miR-200a/b/c, miR-141 y miR-429. Están localizados en dos agrupaciones de genes en el ratón y en el ser humano. Estos miRNAs reprimen a los factores de transcripción pro-mesénquima²²⁸.

Los miRNAs de la familia miR-200 están disminuidos en los tumores CCR por la ruta de la metilación funcionando con autonomía celular en el epitelio tumoral²²⁹. Hay estudios

que sugieren que algunos componentes (miR-200c y mi-141) participan en metástasis hepáticas de los CCR primitivos²³⁰

Familia de microRNAs	miRs individuales	Comentarios
	miR-29b, miR-29c y miR-93	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibidores de los ligandos Wnt.
	miR-31	<ul style="list-style-type: none"> • Modulación de las GTPasas: <ul style="list-style-type: none"> ➢ Estimulador de KRAS. ➢ Mutaciones de BRAF con fenotipo agresivo.
miR-34-anti-oncomiR	miR-34a/miR-34b/miR-34c	<ul style="list-style-type: none"> • Propiedades supresoras. • miR-34 es clave en la represión de la migración tumoral, invasión y metástasis. • Incremento de la progresión (a través de TNF-a e IL-6).
	miR-21 /mi-R221/miR-222	<ul style="list-style-type: none"> • Propiedades pro oncogénicas a través de la represión de PDCD4. • Otras.
miR-17-oncomiR	miR17/miR-18ab/miR-20ab/ miR 93/miR-106ab	<ul style="list-style-type: none"> • Promueve la oncogénesis. • Modulan la señal TFG-β.
miR-10-anti-oncomiR	miR-10ab/miR-100/miR-125ab	<ul style="list-style-type: none"> • Propiedades supresoras. • Función oncogénica (ratones).
Let-7	miR-192/miR-215/Familia miR-Let7f/Familia miR-Let-7/miR-21/miR-143/miR-378/Familia miR-26/Familia miR-194/miR-Let-7b/Familia miR-1/miR-29a/miR-103,107/ miR-Let-7d/miR-145	<ul style="list-style-type: none"> • Represión de la oncogénesis. • Función antiproliferativa. • Efectos prodiferenciación.
mir-15-anti-oncomiR	miR-15/miR-16/miR-195/ miR-424/ miR-497	<ul style="list-style-type: none"> • Disminuidos en el CCR (miR-16 y miR-195).
miR-200	200a-b/miR-141/miR429	<ul style="list-style-type: none"> • Efectos pleiotrópicos o polifénicos. • Promueven metástasis. • Reprimen factores de transcripción pro mesénquima.

Tabla 7. Los microRNAs en la etiología del CCR.
 Datos extraídos a partir de Struberg y Madison¹⁶¹ y de la literatura¹⁶²⁻²³¹.

En el CCR también pueden existir niveles elevados de miR-200 aunque, para complicar aún más el asunto, su procedencia puede ser de origen no tumoral²³¹.

IV.9. Mecanismos de los miRNAs en la oncogénesis.

Diversas familias de miRNAs están implicadas en la carcinogénesis del CCR. Su nivel de actuación es diferente: actúan como oncogenes, eluden la vigilancia inmune y alteran la integridad celular.

IV.9.1. Oncogenes: El papel oncogénico está bien demostrado en la familia miR-320 (miR-320a, mi-R320b, miR-320c y miR-320d). Inhiben el crecimiento celular de la línea SW480 cuyo gen diana CDK6 es esencial en la oncogénesis²³². CDK6 está expresado al alza en el paso de mucosa no neoplásica a adenoma y posterior carcinoma invasivo submucoso. La mutación del gen RAS es un paso esencial para el desarrollo de muchos tumores²³³.

El miR-145 promueve la diferenciación celular y suprime la transformación de las células con el gen KRAS mutado en el paso de adenoma a CCR²³⁴. El miR-31 disminuye la actividad de la proteína RASA1 (*RAS p21 GTPase activating protein 1*), que regula el crecimiento celular y en la diferenciación. Existe una correlación entre 23 miRNAs y la catenina Wnt/ β : 13 con una correlación positiva y 10 negativa, lo que indica que los miRNAs inician el proceso de la ruta mucosa no neoplásica-adenoma-CRC²³⁵.

IV.9.2. Vigilancia inmunológica: El miRNA-27a participa en la oncogénesis²³⁶. Las células tumorales estimulan la inmunidad innata y adaptativa, lo cual incluye la activación de las células T-citotóxicas²³⁷. El miR-27a está hiperexpresado en el adenoma. Sus niveles se incrementan en el CCR²³⁶. La diana del miR-27a es la calreticulina, una chaperona unida al calcio (una chaperona es una proteína que ayuda al plegamiento de otras proteínas). La calreticulina desempeña un papel en la respuesta inmune y también

facilita el pliegue de las moléculas MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de clase I (MHC-I) a la vez que influencia la presentación antigénica a las T-citotóxicas²³⁸.

IV.9.3. Alteración de la integridad celular: Los miRNAs también están implicados en el mantenimiento de la integridad celular. En concreto, miR-212 está aumentado en los adenomas y en el CCR respecto a su acción sobre la proteína de unión 1 (*Tight Junction Protein 1/TJP1*), que tiene un papel clave en el mantenimiento de la integridad celular²³⁹. La pérdida de la estructura lleva a la invasión de las células neoplásicas y metástasis tumorales^{239,240,241}. La proteína TJP1 es una diana directa del miR-212. La señal miR-212/TJP1 juega un papel importante en la transición de adenoma colorrectal a CCR²⁴². Finalmente, existe una relación entre miR-18a y CDC42, que es una proteína implicada en la regulación del ciclo celular. Esta proteína regula el remodelamiento del citoesqueleto, la progresión del ciclo celular, la proliferación celular, la supervivencia y la migración²⁴³. CDC42 está aumentada en numerosos tumores, incluido CCR²⁴⁴. Comparados con los controles normales, los sujetos con CCR expresan menos miR-18a²⁴⁵.

V. Exosomas y tumores gastroentéricos.

Los tumores del tracto digestivo, es decir, los que se originan o tienen su asiento anatómico en el esófago, el estómago, el intestino, el hígado, la vesícula y la vía biliar y el páncreas suponen una carga muy elevada en cuanto a morbilidad y mortalidad, tanto de las estadísticas globales como si se analizan por países o regiones. Cuatro de estos emplazamientos (colon, estómago, esófago e hígado) son el origen histopatológico de otras tantas neoplasias (cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de esófago y hepatocarcinoma o cáncer de hígado) bastante comunes. Juntas son los tumores más

frecuentes entre los diez primeros de la clasificación pues suman el 23,4% del total y causan el 30,9% de todas las muertes relacionadas con el cáncer a nivel mundial²⁴⁶.

Los miRNAs, como se expuso anteriormente (Apartado IV.2. *MicroRNAs*), son moléculas genómicas de comunicación intercelular que ejercen acciones fisiológicas, pero también están implicadas en la patogenia de numerosas enfermedades. Entre otras, destacan las neoplasias en las cuales los miRNAs, vehiculados por los exosomas originados en las células tumorales, participan en la oncogénesis. Recordamos que los exosomas transportan un rico y variado cargamento de moléculas (proteínas, lípidos, ácidos nucleicos) entre las que destacan para nuestra investigación los microRNAs generados en el núcleo celular a partir de los RNAs precursores los cuales, tras ser escindidos por acción enzimática, son exportados al citoplasma celular. De seguido, y tras una nueva escisión enzimática, se genera el miRNA definitivo.

En la actualidad, es incuestionable el papel protagónico de numerosos y diferentes micro-RNAs en la patogenia de los cuatro tumores digestivos citados más arriba. Algunos de los micro-RNAs más descritos en la literatura, en el campo oncológico, son los miR-9-59, miR-552, mir-217 y miR-433. Aunque muy relacionado con el cáncer gástrico, el miR-433. Su función principal es supresora, según muestra la base de datos NCBI²⁴⁶, también está implicado en la patogenia de, al menos, 19 tumores muy diferentes (gástrico, pulmonar, vejiga, renal, mamario, glioma, osteosarcoma, retinoblastoma, etcétera). Interesa resaltar que uno de estos tumores es el CCR²⁴⁶. En algunas neoplasias, la sobreexpresión del miR-433 puede reducir de forma significativa la tasa de supervivencia de las células tumorales colónicas y promover la apoptosis celular, debido a la acción supresora de MACC1 (*Metastasis Associated in Colon Cancer 1*)²⁴⁷.

El miR-433 no es el único microRNA relacionado con el CCR, ni la acción supresora es la única posible. Hay más miRNAs implicados en la patogenia del CCR con otras funciones de importancia. Por ejemplo, el mismo mir-433 también inhibe la progresión del CCR a través de HOXA1 (*homeobox A*)²⁴⁸, un factor de transcripción del DNA, y la proteína CREB1 codificada por el gen de su mismo nombre ²⁴⁹ a la vez que suprime la expresión de CyclinD1 y de la kinasa dependiente de ciclina (CDK4/*Cyclin-dependent kinase 4*)²⁵⁰. Entre los muchos genes dianas del miR-433, se encuentran los citados en relación con el CCR (MACC1, HOXA1, CyclinD1/CDK4, CREB1 y ANXA4) (Figuras 17 y 18).

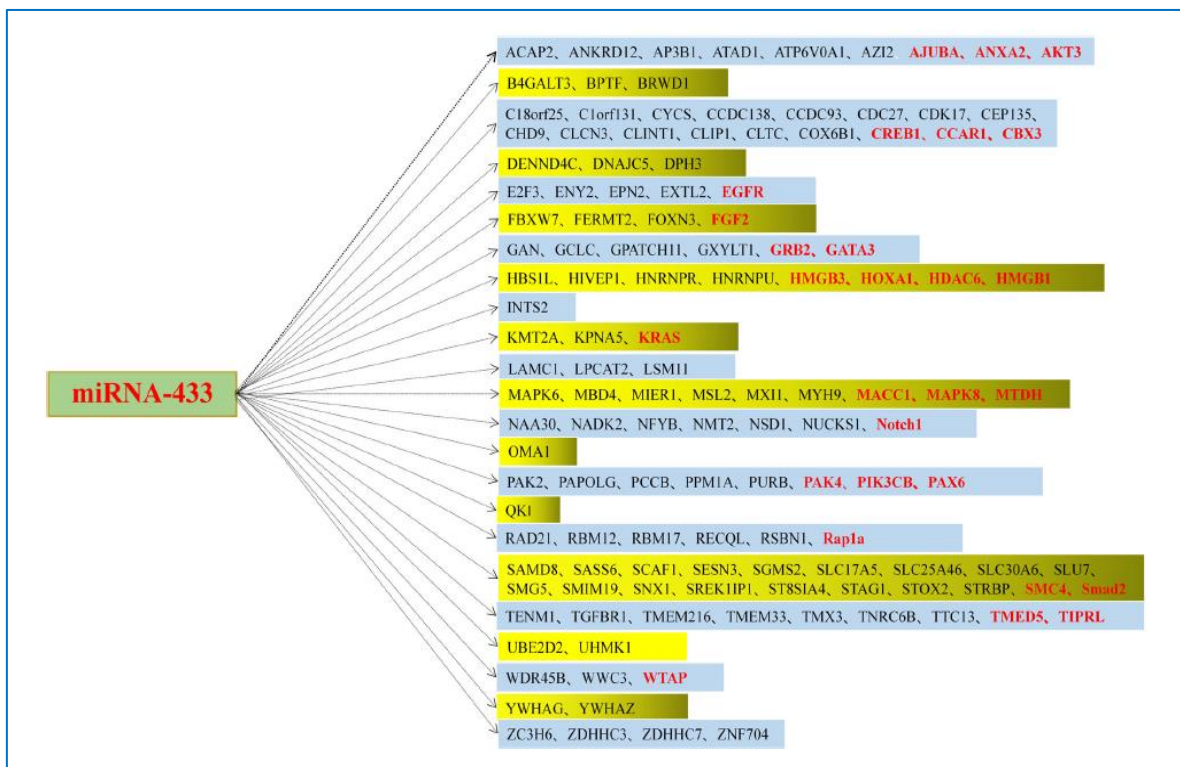


Figura 17: Genes dianas del miR-433.

En rojo, las dianas en los tumores relacionados cuya importancia está confirmada. Algunas (MACC1, HOXA1, etcétera) corresponden al CCR. Crédito: Tang J, *et al*, 2022²⁴⁶.

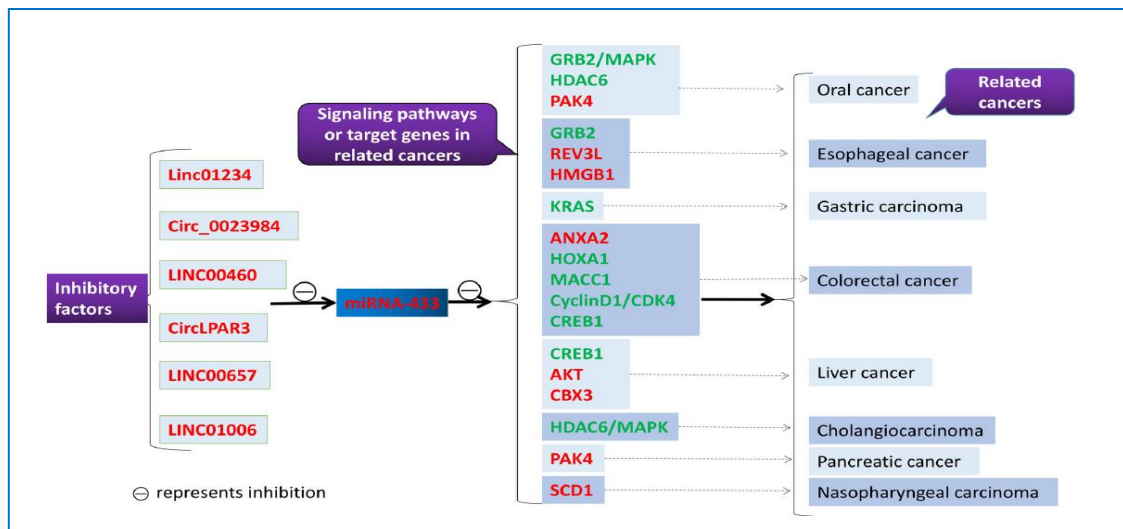


Figura 18. Factores inhibitorios “aguas arriba” (*upstream*) que atenúan el efecto inhibitorio del miRNA-433 en las vías de señalización “aguas abajo” (*downstream*) (los genes diana). Crédito: Tang J, Chen J, 2022²⁴⁶.

Se suprime la expresión del miRNA-433 con desarrollo del tumor (los genes inhibidores regulados por miR-433 están resaltados en rojo). El miRNA-433 puede atenuar el desarrollo del tumor por la inhibición directa de las vías de señalización “aguas abajo” o la expresión de los genes diana (los genes diana o las vías de señalización sobre las que actúa directamente miRNA-433 en verde).

Siguiendo el planteamiento expositivo de Yu y colaboradores²⁵¹, ligeramente modificado, se consideran ahora las funciones reguladoras de los miRNAs secretados en el cáncer en general y, más en concreto, en el colorrectal. Son tres: acción supresora, oncogénica y una combinación de funciones.

*Micro-RNAs con acción supresora: miR146, Let-7 y miR-198*²⁵¹.

Como se ha expuesto antes, existen publicaciones cada vez más abundantes que demuestran la intervención de los microRNAs en la patogénesis de numerosos tumores malignos (miR146, Let-7 y miR-198).

*MicroRNAs con acción oncogénica: miR-21*²⁵¹.

Los exosomas de las células de diversos cánceres pueden estar involucrados en la transmisión intercelular de miRNAs con capacidad oncogénica. Esto significa que un mismo exosoma puede transportar diferentes miRNAs con acciones diferentes, incluso

contrarias, sobre la misma célula receptora. Es decir, que la mezcla de miRNAs, no solo un miR, define el efecto inductor final vehiculado por el exosoma.

*La combinación de diferentes miRNAs.*²⁵¹

Los miR-21 (oncogénico) y miR-29a (supresor de tumores) vehiculados en el mismo exosoma se unen a los receptores de membrana de las células inmunes activando el Factor Nuclear- β , un aspecto bastante desconocido aunque se aclarará, probablemente, cuando los protocolos de aislamiento y de análisis de los exosomas y su cargamento estén más depurados que en la actualidad²⁵².

VI. Exomas y cáncer colorrectal.

Tras el somero análisis precedente sobre los tipos de RNA y, en especial, los micro-RNAs, y también sobre las estructuras intracelulares de rango microvesicular en que pueden ir vehiculados para ejecutar sus funciones a distancia (estimuladoras o represoras), conviene ligar ahora ambos aspectos como paso previo necesario que sirve de base teórica a nuestra investigación. En este sentido, se comentan algunos rasgos de la relación de los miRNAs exosómicos relacionados específicamente con el CCR.

Los exosomas del CCR participan en la transformación y proliferación celular y en la migración, invasión y metástasis. En cuanto a la primera, el primer mecanismo implicado es la transición de mesénquima a epitelio (*Epithelial-Mesenchymal Transition/EMT*) como se expuso anteriormente (*Apartado I.3. Los pólipos colónicos*). Algunos estudios demuestran que los exosomas tumorales desempeñan un papel en este proceso. Por otra parte, los estudios de microscopía electrónica evidencian que el miR-210 puede desencadenar el proceso EMT y contribuir al desarrollo de metástasis²⁵³.

Los exosomas del CCR pueden provocar cambios en el tejido mesenquimal, cuyas células adquieren una morfología atípica con proliferación incrementada, migración celular y aumento de la tasa de invasión. Equivale a un fenotipo transformado²⁵⁴. Igual ocurre cuando se inducen células colónicas normales CCD-18Co con exosomas de la línea CRC-HCT116 que incrementa su clonogenicidad²⁵⁵.

Tipo de microRNA²⁵⁶	DESCRIPCIÓN Y FUNCIÓN
miR-21	OncomiR elevado en los exosomas de las líneas celulares SW480 y WIDr. Potencial de inhibir la traslación de la proteína PDCD4 implicada en la apoptosis o muerte celular programada.
miR-145 miR-34a	Se asocian a resistencia al 5-FU, a través de la secreción vía exosómica en la línea celular DLD-1 CRC.
miR-200	Es un miRNA pleiotrópico. Su pérdida produce resistencia al 5-FU y podría conducir a un fenotipo migratorio agresivo (in vitro).
miR-210	Está sobre expresado en exosomas derivados de la línea celular HCT-8 y puede derivar en un fenotipo metastásico. miR-210 participa en el desarrollo en el proceso de la transición mesénquimo-epitelial.
miR-100	Está hiperexpresado en los exosomas derivados de líneas celulares mutantes KRAS. Se ha propuesto como un potencial biomarcador.
miR-192 miR-215	Ambos miRNAs están suprimidos en el CCR. miR-192 es capaz de inducir la parada del ciclo celular. Se sabe que ambos contribuyen directamente a la quimiorresistencia a fluoropirimidina y a los antifolatos.
miR-1229, miR-1224-5p, miR-223, Let-7a, miR-150, miR-21, miR18a	Todos estos están propuestos como biomarcadores para la detección del CRC.
miR-19a	Podría ser un biomarcador de recurrencia del CCR.

Tabla 8. Micro-RNAs derivados de exosomas en el CCR.
Modificado de Ruiz-López²⁵⁶.

En el modelo animal (células CT26, una línea celular de CRC inducido en ratones), los exosomas CCR promueven el crecimiento celular tumoral, modificando a los macrófagos,

y disminuyen la supervivencia de los ratones. Diversas proteínas exosómicas (Tspan8, VAULT, CD71, HSP70) facilitan el proceso de integración y de supervivencia celular. La sobreexpresión de Wntb5 se asocia con la agresividad del cáncer al estimular la migración y proliferación de las células A549^{257,258}. Los exosomas del CCR también pueden contribuir incrementando la apoptosis de las células T²⁵⁹ lo que permite eludir el sistema de vigilancia inmunológica antitumoral. Los exosomas también están implicados en la resistencia a los quimioterápicos usados en la terapia farmacológica del CCR^{260,261,262,263}.

Respecto a la migración, invasión y metástasis, lo que equivale a hablar de la preparación del nicho premetastásico, los exosomas parecen desempeñar un papel importante. Las proteasas contenidas en el cargo contribuyen a la degradación y remodelación de la matriz celular. Los componentes celulares implicados en la adaptación del nicho premetastásico son varios. Por ejemplo, el miR-21, citado en párrafos previos, promueve la invasión y las metástasis²⁵⁶ mediante la inhibición de la traslación de la proteína PDCD4²⁵⁷ (Tabla 8, fila uno) (*Programmed cell death protein 4*, una proteína de muerte celular programada codificada por el gen PDCD4 y diana del miR-21).

VII. Estudio de los exosomas de la orina para la detección de biomarcadores del CCR.

VII.1. La orina como fluido de interés analítico.

Recordamos que el estudio habitual de los exosomas y vesículas extracelulares en el laboratorio se suele realizar en muestras líquidas (fluidos), en muestras fecales o en tejidos a partir de biopsias. Respecto a las primeras, la mayor experiencia publicada, a mucha distancia de las otras, se ha adquirido con el estudio analítico de la sangre, el plasma y el suero. Hay menos experiencia con otros líquidos biológicos por la dificultad de obtención (líquido ascítico, cefalorraquídeo, líquido intraarticular, lavado broncoalveolar) o porque, siendo fácilmente asequibles (saliva y lágrimas), no hay homologación de la metodología. En este segundo grupo está la orina.

La orina es un fluido biológico cargado de productos metabólicos generados en el metabolismo de las proteínas. Es, dicho de un modo simple, agua con metabolitos de desecho. Desde la óptica práctica, la orina es una muestra muy cómoda y asequible para el investigador: permite su recogida fácil, repetir el estudio cuantas veces sea necesario, no requiere la realización de maniobras invasivas y es muy abundante y rica en subproductos metabólicos y en numerosas moléculas de interés diagnóstico. Además de las proteínas y otras moléculas, células y microorganismos, en la orina normal se excretan numerosos miRNAs procedentes de las células renales, uretrales y vesicales.

La determinación de los miRNAs urinarios permite conocer el estado de salud del sistema urinario excretor, desde el riñón hasta la vejiga. Pero, por su función excretora, la orina también recoge y elimina muchos y diferentes miRNAs procedentes de otros tejidos corporales a distancia, miRNAs que superan el filtro renal y son excretados en la orina

unidos a proteínas captadoras de RNA^{264,265}, o bien van vehiculados dentro de los exosomas²⁶⁴. La presencia de vesículas extracelulares (VEx) en la orina fue descrita por primera vez en 1986 por Wiggins y colaboradores mediante microscopía electrónica²⁶⁶. Hasta recientemente, la orina no ha sido muy utilizada para el análisis de los exosomas, aunque existen trabajos bien documentados al respecto, sobre todo a partir del desarrollo y la generalización de las técnicas de nueva secuenciación (NGS) y de la citometría de flujo. Estas disponibilidades diagnósticas han tenido que superar el reto del aislamiento de RNA total porque los micro-RNAs suponen solo una fracción pequeña (2%) del total.

VII.2. Las vesículas extracelulares urinarias.

Como en otros compartimentos tisulares y fluidos corporales, los exosomas y las VEx de la orina son un grupo heterogéneo de vesículas de membrana de tamaño nanométrico procedentes de las células que recubren el tracto urinario y urogenital²⁶⁷ con un cargamento de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos^{268,269}.

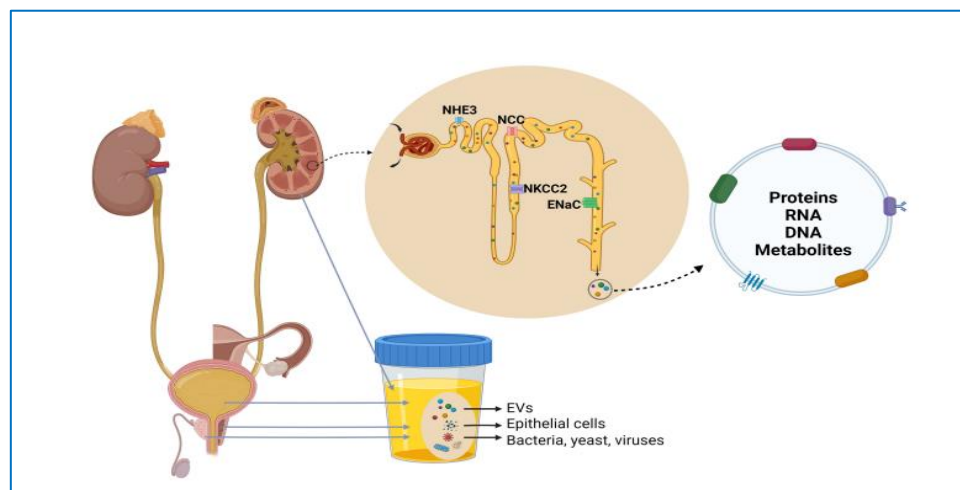


Figura 19: Origen y composición de los exosomas/vesículas extracelulares en la orina.

Crédito: Wu A, *et al*, 2022²⁷³.

Los exosomas proceden de las células del aparato genitourinario (riñones, uréteres y vejiga de ambos sexos, próstata de los varones y tracto uterovaginal de las mujeres). La orina también suele contener exosomas y vesículas de otros órganos y aparatos, además de células epiteliales, hongos, bacterias y virus. Los exosomas, cualquiera que sea su origen celular, portan un cargamento de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, como los microRNAs.

Además de las funciones fisiológicas, las VEx de la orina son vehículos que transportan información en el contexto de diversos estados patológicos subyacentes^{270,271}, tanto del riñón y el aparato nefrourológico excretor, como de entidades morbosas a distancia que afectan a otros órganos y aparatos²⁷² (Figura 19)²⁷³. Este hecho permite considerar a la orina como una muestra muy válida para el estudio de los exosomas relacionados con numerosas patologías, como el cáncer, en calidad de biomarcadores. Las vesículas extracelulares procedentes del riñón, la vejiga, la próstata en varones y el tracto urogenital en las mujeres conforman una población heterogénea que incluye cuerpos apoptóticos, exosomas y microvesículas²⁹², entre otras (Figura 20).

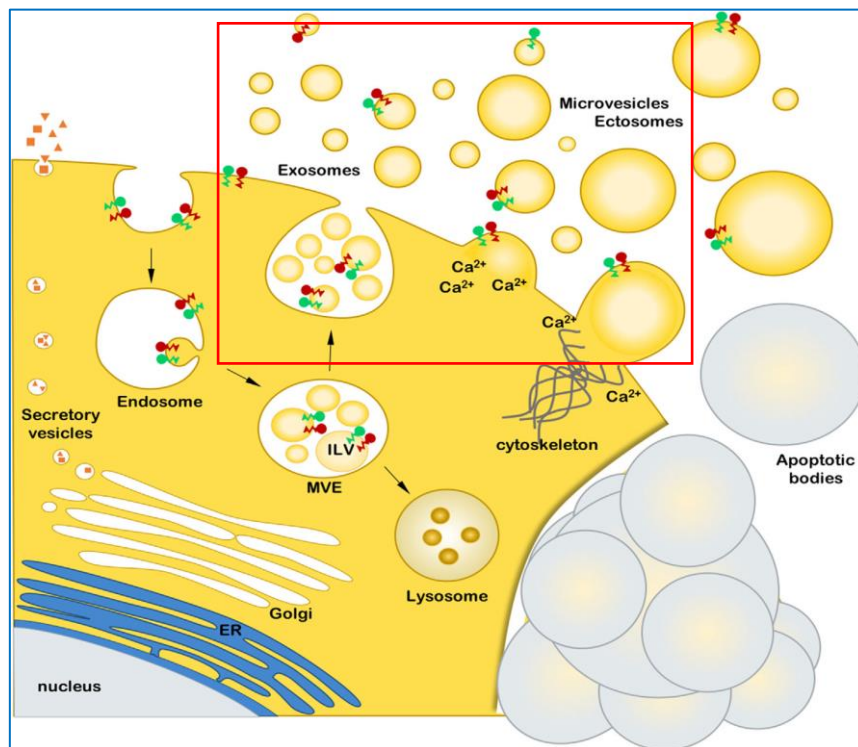


Figura 20. Biogénesis de las VEx urinarias (Exosomas y microvesículas en el recuadro rojo).
Crédito: Erdbrügger *et al*, 2022²⁹².

Se han descrito algunas intervenciones que pueden enriquecer dichas subpoblaciones, como por ejemplo, la realización de un tacto rectal que aumenta la cantidad de fluido prostático y esto conlleva a un aumento de la cantidad de VEx procedentes de las células epiteliales prostáticas²⁷⁴. Por lo tanto, es posible manipular la cantidad y composición de

las VEx y así facilitar la detección de sus diferentes subpoblaciones. Además, las VEx urinarias pueden proceder de células inmunitarias, levaduras, bacterias e incluso virus y en algunos estudios^{275,276} se sugiere que un subconjunto de VEx llega a la orina desde la circulación y contiene gran cantidad de proteínas asociadas a la inmunidad, aunque los mecanismos no han sido todavía aclarados.

La composición molecular de las VEx incluye, como se ha descrito previamente, metabolitos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Figura 21). El repositorio "Vesiclepedia" (<http://microvesicles.org>) actualmente contiene datos de 1.254 estudios, comprendiendo 27.646 entradas de mRNA, 10.520 entradas de miRNA, 34.9988 entradas de proteínas y 639 entradas de lípidos. Ochenta y nueve de estos 1.254 trabajos utilizan las muestras de orina para el estudio de las vesículas extracelulares.

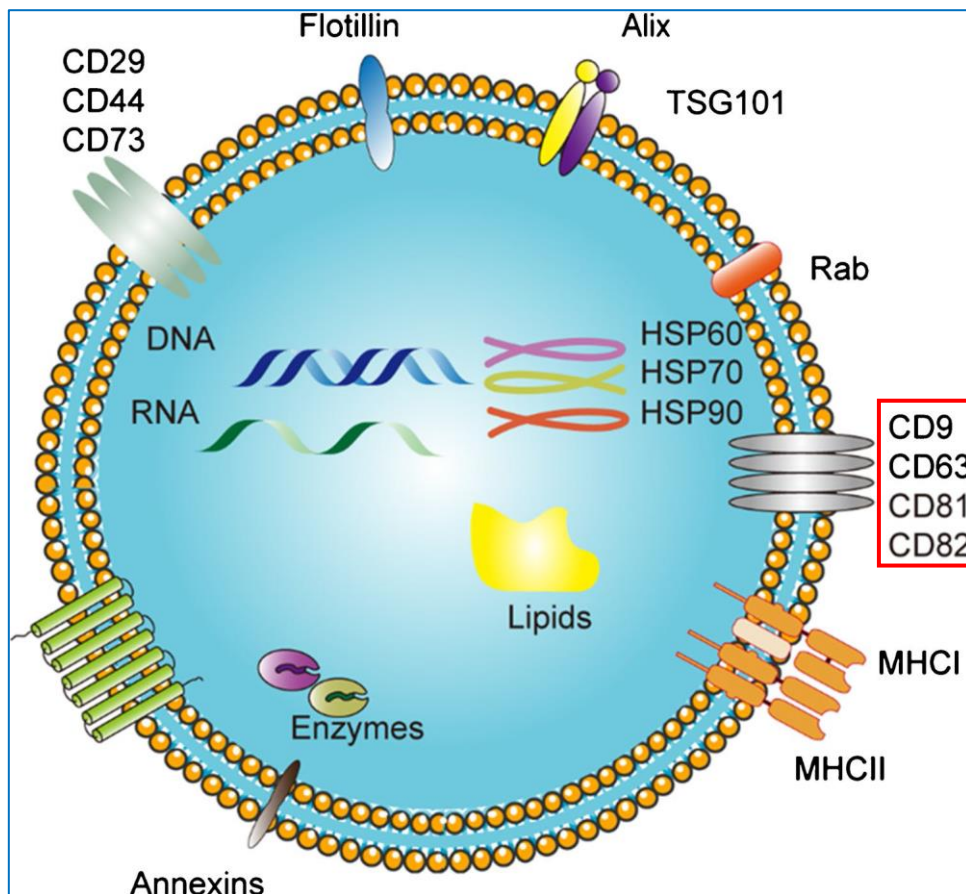


Figura 21. Cargo del exosoma. En el recuadro rojo, las tetraspaninas.
 Crédito: Modificado de Liu W· Ma Z, Kang X. *Anal Bioanal Chem* 2022; 414:7123–7141.

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios sobre RNA no codificante en VEx urinarias se han centrado en miRNAs, pero también se han detectado otras moléculas como RNA nucleares cortos (snRNAs), tRNAs, RNA nucleolares cortos y lncRNAs, tanto en VEx urinarias sedimentadas como en VEx urinarias enriquecidas mediante SEC (del inglés "size-exclusion chromatography"). Miranda *et al*²⁷⁷ demostraron más de 13.000 genes codificadores de proteínas, aunque los RNAs no codificantes fueron el cargo de ácido nucleico más predominante tras el estudio de secuenciación de VEx urinarias. En otros estudios más recientes^{278,279}, se ha demostrado que las VEx urinarias también son una fuente de nuevas especies de RNA como los RNA circulares (cRNAs). Un hecho para tener en cuenta es que el RNA se puede detectar en otras estructuras moleculares diferentes a las VEx, por lo que se recomienda demostrar que el RNA asociado a VEx resiste la degradación de las nucleasas y proteinasas^{280,281}.

Respecto al DNA, aún no está claro si está presente en la luz de las VEx urinarias aunque sí parece encontrarse en el exterior²⁸². El proteoma de las VEx urinarias es cuantioso y heterogéneo, se han descrito proteínas de transporte de membrana, proteínas motoras, del citoesqueleto y proteínas unidas al glicosilfosfatidilinositol²⁸³. Mediante la espectrometría de masas (EM) se han llegado a identificar más de 3.000 proteínas (en torno al 0,6-3% de las proteínas en orina están asociadas a VEx urinarias²⁸³). Hasta la actualidad se han publicado pocos trabajos focalizados en los lípidos y los diferentes metabolitos presentes en las VEx urinarias^{284,285,286}. Cabe destacar un estudio lipidómico de 2017²⁸⁶ que identificó más de 100 especies de lípidos en VEx urinarias por espectrometría de masas, siendo el colesterol y la fosfatidilserina los más abundantes. Las VEx urinarias tienen mayor contenido de colesterol que las VEx del plasma²⁸⁷. Respecto a los metabolitos, los más abundantes detectados fueron alanina, serina, creatinina, ornitina, L-cistationina y D-ribosa-5-fosfato²⁸⁸.

VII.3. La manipulación de la muestra de orina antes de la determinación del contenido exosómico.

En el estudio de los exosomas urinarios, un paso previo al análisis de los componentes exosómicos es la manipulación de las muestras de orina. Hasta la fecha, los trabajos que abarcan la recolección, el procesamiento y el almacenamiento de las muestras de orina para analizar las EV urinarias son muy limitados. Solo las guías de carácter general como la BRISQ (*Biospecimen Reporting for Improved Study Quality*) que incluyen urino análisis y estándares (ISO 20387:2018) están establecidas para las mejores prácticas en el biobanco de orina que recomiendan focalizar la atención en la validación y la consistencia del método, identificando los parámetros preanalíticos que a la investigación de VEx. En el apartado de *Material y métodos* se exponen los pasos seguidos en esta investigación. Ahora se comenta la metodología de forma muy resumida.

VII.3.1. Recogida, almacenamiento y conservación.

Siempre que los procedimientos de recolección y almacenamiento no estén establecidos, lo más recomendable es recoger toda la información preanalítica disponible en la base de conocimientos EV-TRACK (Guía MISEV2018)²⁸⁹.

—*Información sobre los pacientes*: las características demográficas y los parámetros clínicos deben registrarse para evitar sesgos e identificar factores de confusión y potenciales fuentes de variabilidad. Se deben incluir la edad, la raza, el sexo, la talla y el peso de los sujetos del estudio, así como la dieta, la cantidad de líquido ingerido, la hora de la recogida de la orina, medicación y algunos parámetros analíticos (muy importante es la función renal).

—*Recogida de la orina*: la realiza el propio sujeto tras recibir instrucciones claras y concisas acerca de la recogida. La orina se puede recolectar en un único episodio de micción o en varios durante un periodo fijo, que puede ser durante horas o a lo largo de un día (orina de 24 horas). La recogida de orina al azar se puede realizar en cualquier momento del día o estandarizarse a la primera o segunda orina de la mañana. La primera orina de la mañana está más concentrada, proporcionando una mayor cantidad de EV urinarias; sin embargo, algunos estudios no hallan diferencias relevantes^{283,290}.

—*Almacenamiento de la muestra*: Las muestras recientes son adecuadas para el estudio por ME. Con la conservación prolongada a -20°C se pierde el 50% de los exosomas, por lo que no es recomendable. A -80°C es mejor pues apenas se pierde el 14% de los exosomas y permite el análisis después de un tiempo prolongado con adecuadas condiciones de estabilidad.

—*Inhibidores de proteasas y fosfatasas*: Son necesarios para determinados procedimientos. Algunas proteínas urinarias se degradan en su ausencia, lo cual no ocurre en el análisis de ácidos nucleicos.

—*Descongelación de la muestra*: Es un aspecto menos estudiado, pero es interesante conocer si existen diferencias entre descongelar a la temperatura ambiente del laboratorio, a 4°C durante la noche anterior al análisis o descongelar con agua corriente.

—*Agitación*: Tras descongelar la muestra se recupera el 87% de los exosomas.

VII.3.2. Separación

Hay numerosos métodos, lo que prueba que no existen uno definitivo. Los métodos más utilizados son la ultracentrifugación, la filtración, la precipitación, la diálisis hidrostática, el atrapamiento acústico y la inmunocaptura.

II. OBJETIVOS.

El *objetivo principal* de esta investigación es establecer uno o varios microRNAs urinarios que puedan ser útiles como biomarcadores de patología colónica neoplásica (CCR) o preneoplásica.

Como *objetivo secundario* se pretende demostrar el valor práctico de la muestra de orina en el análisis de los exosomas de orina y del cargo intravesicular.

III. MATERIAL Y MÉTODOS.

III.1. Características generales de los sujetos analizados.

La presente investigación es un estudio de carácter observacional analítico y prospectivo.

III.1.1. Lugar y periodo de estudio.

El estudio clínico se ha realizado a pacientes atendidos en régimen ambulatorio en las consultas de Aparato Digestivo de la Clínica Arenal y del Hospital Universitario Virgen de Macarena, ambos de Sevilla.

El periodo de recogida de muestras clínicas comenzó en noviembre 2019 y se cerró en noviembre de 2020 (12 meses).

III.1.2. Población diana y sujetos controles.

El criterio único de selección fue de rango epidemiológico: una población diana (grupo estudio) y una población de control (grupo control).

—*Población estudio*: El criterio epidemiológico fue el parentesco de primer grado con pacientes diagnosticados de CCR. Se trata de una cohorte de personas de ambos sexos, en un rango de edad entre 18 y 70 años, programados para la realización de una colonoscopia. Esta cohorte se subdividió en dos: grupos 1 y 2.

—*Población control*: El criterio epidemiológico fue el cribado poblacional de CCR. Se trata de sujetos de la población general con una indicación médica de colonoscopia de cribado de CCR por ser personas de riesgo medio en virtud de su edad (45 a 70 años). Es el grupo 3.

Todas las colonoscopias (estudio y control) fueron solicitadas por los médicos asistenciales como práctica habitual protocolizada por los sistemas sanitarios.

III.1.3. Distribución de los grupos.

La distribución de las cohortes por grupos fue la siguiente:

—Grupo 1: Veinte (20) individuos con antecedentes familiares (AF) de primer grado de CCR con pólipos hiperplásicos o ausencia de pólipos en la colonoscopia.

—Grupo 2: Once (11) individuos con AF de primer grado de CCR y con pólipos adenomatosos en la colonoscopia.

—Grupo 3: Quince (15) individuos sin AF de CCR con colonoscopia solicitada por cribado por edad y sin pólipos colónicos. Grupo control.

Por tanto, el estudio inicial de 46 sujetos (20+11+15), con una muestra de orina por sujeto, supondrían 46 muestras para el análisis. Por razones insalvables ajenas a la investigación (falta de surtido de algunos de los kits empleados) en el contexto de la situación pandémica, el estudio final se realizó sobre 18 muestras. El hecho supuso un serio contratiempo que no impidió seguir adelante con la investigación porque se estimó que el número de muestras sería suficiente como prueba de concepto, es decir, la implementación resumida o incompleta de un método con el propósito de verificar que es susceptible de ser explotado de una manera útil. En nuestro caso, el estudio de los exosomas en la orina.

III.1.4. Criterios de inclusión y de exclusión.

Los criterios de inclusión y de exclusión del estudio fueron los siguientes:

Criterios de inclusión:

—Personas de ambos sexos mayores de 18 años.

- Existencia de antecedentes familiares de primer grado de CCR.
- Personas de ambos sexos diagnosticadas de pólipos colónicos (adenomas, hiperplásicos).
- Personas (ambos sexos) sin pólipos colónicos con colonoscopia de cribado.

Criterios de exclusión:

- Edad menor de 18 años o mayor de 70 años.
- Existencia solo de antecedentes familiares de segundo o tercer grado de CCR.
- Personas con hallazgos endoscópicos de otras lesiones relevantes en la mucosa: colitis infecciosa, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis isquémica.
- Pacientes a los que se les detecta CCR en la colonoscopia.

III.1.5. Recogida de datos.

Se recogieron los datos demográficos (edad, sexo, nacionalidad) y bioantropométricos así como la presencia de comorbilidades relevantes. Se realizó una anamnesis detallada para la búsqueda activa de factores de riesgo de cáncer (consumo de tabaco, consumo habitual de alcohol y de carnes rojas). De forma concomitante, se procedió a la búsqueda de factores protectores (realización de ejercicio físico regular, consumo de frutas, verduras y fibra). También se indagó en el consumo de fármacos antiagregantes, diuréticos, de antiinflamatorios no esteroideos y de otros antecedentes familiares oncológicos respecto a neoplasias diferentes al cáncer colorrectal (anexo I).

III.1.6. Colonoscopias.

Para la limpieza colónica los pacientes recibieron las instrucciones de preparación evacuante oral de bajo volumen, dieta sin residuos desde dos días antes y dieta líquida el día anterior a la colonoscopia.

Las colonoscopias fueron realizadas por endoscopistas con amplia experiencia en la técnica. Los procedimientos se realizaron bajo sedación profunda administrada por un anestesista o, en su defecto, con sedación superficial administrada por el gastroenterólogo endoscopista. En el informe del procedimiento se recogieron datos como la intubación cecal y la calidad de la preparación intestinal medida mediante la escala numérica de Boston (anexo II).

Se describieron las lesiones polipoideas según la práctica habitual (morfología, número, tamaño y localización), la técnica de resección (pinza, asa fría, asa de diatermia, inyección submucosa de solución salina o coloide) y se anotó la presencia de otras lesiones colónicas.

Los pólipos resecados fueron remitidos al servicio de Anatomía Patológica de cada centro. Las muestras seleccionadas fueron identificadas mediante un código numérico. Junto con los datos de cada paciente fueron archivadas con las medidas de seguridad adecuadas en cumplimiento con la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos.

III.1.7. Obtención de muestras biológicas para el laboratorio.

El mismo día de la colonoscopia se extrajo una muestra entre 10-20 cc de orina recogida en un frasco estéril. Las muestras se mantuvieron en el refrigerador a 4°C y, antes de las 24 h, fueron congeladas a -80°C hasta el momento del estudio en el laboratorio de referencia.

III.1.8. Aspectos éticos.

Todos los sujetos incluidos en el estudio fueron informados de forma verbal y con una hoja informativa (anexo III) entregada en la primera consulta de contacto/selección. Tras la lectura del documento, la confirmación de haber entendido el objetivo de la investigación y la aceptación de la participación en el estudio, los participantes firmaron

el consentimiento informado (anexo IV) ajustado al estudio para la cesión de los datos personales y de las muestras biológicas anonimizadas.

El estudio fue revisado por el Comité de Ética de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario de Badajoz/HUBA (<http://areasaludbadajoz.com/index.php/calidad-y-seguridad/comisiones-a-s-badajoz/216-comite-etico-de-investigacion-clinica>).

El HUBA es el centro hospitalario referente de la Universidad de Extremadura para las investigaciones de su área de influencia, que incluye el laboratorio donde se han realizado los estudios analíticos de la investigación.

La autorización fue aprobada con fecha del día 19 de junio de 2019 (anexo V).

III.1.9 Análisis estadístico.

Las variables cualitativas se presentaron mediante tablas de frecuencias. Las variables cuantitativas se resumieron en su media y desviación estándar (DE) o su mediana y rango intercuartílico (RIC) para variables que no siguieron una distribución normal.

Se evaluó la asociación entre variables cualitativas con la prueba de χ^2 o prueba exacta de Fisher, en el caso de que más de un 25% de los esperados fueran menores de 5. Para variables cuantitativas, la comparación de medias entre dos grupos independientes, en el caso que la variable cuantitativa se ajustara a una distribución normal, se empleó la prueba de la T de Student. Para comparar medias de más de dos grupos, se empleó ANOVA. Para las variables cuantitativas que no se ajustaron a una distribución normal se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

El paquete informático utilizado para el análisis fue IBM SPSS© para Mac, versión

20.0.0. El análisis estadístico de los miRNAs se detalla en el apartado III. 2.4 *Aislamiento de RNA total C. Análisis bioinformático.*

III.2. Metodología diagnóstica.

El estudio analítico definitivo ha sido realizado en el laboratorio del Servicio de Técnicas Aplicadas a la Biociencia (STAB) de la Universidad de Extremadura (UEX), sito en el Campus Universitario de Badajoz (Avenida de la Ciencia s/n, DP: 06006).

Las muestras de orina de los pacientes fueron almacenadas en el laboratorio a -80°C hasta su procesamiento.

III.2.1. Enriquecimiento de las vesículas extracelulares de las muestras de orina.

Las muestras fueron descongeladas lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente, se centrifugaron a 4.000 g durante 30 minutos y se recogió el sobrenadante. Después se filtró a través de filtros de 0,22 µm (*Sartorius*). Los exosomas se enriquecieron mediante el uso del kit de precipitación de exosomas de Immunostep (Spain). Para ello se añadieron 40 µL del reactivo *Exosome Isolation*, se incubaron toda la noche a 4°C y se centrifugó a 10.000 g durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 400 µL de PBS filtrado. Finalmente, se distribuyeron en partes alícuotas que se congelaron a -80°C. Las alícuotas se utilizaron para la caracterización por citometría de flujo y para el aislamiento de los miRNAs.

III.2.2. Análisis por citometría de flujo (CDF).

La CDF es una técnica analítica que permite conocer múltiples características celulares simultáneamente y recoger información de miles de células en pocos segundos. Como obtiene la información de forma individual, se pueden conocer las diferentes

subpoblaciones que aparecen en función de las características estudiadas. Es decir, se puede saber el porcentaje de células vivas presentes en una población celular determinada, y de esas células vivas, se puede conocer el fenotipo para varias moléculas de modo simultáneo. Para obtener dicha información se utilizan citómetros de flujo (CF). Los CF son aparatos que constan de 3 partes: una parte fluídica, una óptica y otra electrónica:

—La *parte fluídica* se encarga de conducir las células alineadas por un punto de análisis, usando el principio de flujo laminar.

—La *parte óptica* recoge las señales luminosas producidas por las células al atravesar una fuente de luz.

—La *parte electrónica* transforma la información luminosa en pulsos eléctricos los cuales son transformados en información digital que analiza un ordenador.

Las células han de estar en suspensión mediante una presión positiva, una bomba peristáltica o una jeringuilla. Se toman las células en su medio y se hacen pasar por un embudo. Al embudo llega también un fluido envolvente con una presión distinta (mayor) a la del medio rico en células. El efecto de la disminución del calibre y de la presión diferencial es que las células circulen alineadas y en fila india en el fluido interno, un fenómeno denominado enfoque hidrodinámico.

Se usaron anticuerpos frente a las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81 (*MiltenyiBiotech*) conjugados con PerCP, FITC y APC, respectivamente. Los anticuerpos estaban filtrados por 0,1 μm (*Sartorius*). Todos los líquidos utilizados en el análisis por CDF fueron filtrados por 0,1 μm incluido el fluido envolvente del CF.

Se utilizaron patrones de VEx (*MerckMillipore* e *Immunostep*) como controles de detección en el citómetro de flujo y tinción con carboxifluoresceína succinimidyl ester (CFSE) (*LifeTechnologies*) para analizar la calidad de la preparación de las VEx.

En 10 microlitros (μl) de muestra se añadieron 2 μl de cada anticuerpo y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se añadieron 400 μl de PBS filtrado por 0,1 μm y se analizaron en un citómetro de flujo *Cytoflex S* con configuración Violet-SSC para detectar nanopartículas de hasta 80 μm . La adquisición y el análisis de las muestras fue realizado con el programa *CytExpert* de Beckmancoulter. Se adquirieron un mínimo de 10.000 eventos por muestra. Se analizaron también las VEx sin teñir y el PBS filtrado solo para establecer los niveles basales de fluorescencia y el grado de ruido del sistema. Para el análisis se contabilizaron sólo las VEx cuya fluorescencia sobrepasaba los niveles establecidos por los controles.

Si la calidad de la muestra no era buena, demostrada por tinción con CFSE y un porcentaje de positividad mayor del 50%, se desechaba y se volvía a preparar.

III.2.3. Secuenciación de miRNAs.

Otras alícuotas de las VEx fueron utilizadas para la extracción de microRNAs y su secuenciación masiva, mediante el sistema S5-XL Ion-Torrent de LifeTechnologies (*Thermofisher*). La extracción se realizó utilizando el kit *E.Z.N.A.[®] Total RNA Kit II* (*Omega Biotek*).

III.2.4. Aislamiento de RNA total.

El *E.Z.N.A.[®] Total RNA Kit II* (revisión del fabricante *Omega Biotek*, de noviembre 2022) está diseñado para aislar RNA celular total de tejidos ricos en grasas, como los tejidos adiposo y cerebral. Sin embargo, el kit también puede utilizarse para el aislamiento de ARN total de otro tipo de tejidos, incluyendo células eucariotas cultivadas, tejidos animales o bacterias.

El RNA purificado mediante el método *E.Z.N.A.*[®] *Total RNA* está listo para aplicaciones como RT-PCR*, Northern blotting, purificación de RNA poli A+ (RNAm), protección contra nucleasas y traducción *in vitro*. El método utiliza las propiedades de unión reversible de la matriz *HiBind*[®], un nuevo material a base de sílice. Combinando la alta eficiencia de lisis del reactivo *RNA-Solv*[®] con la tecnología *HiBind*[®] de OBI, este kit puede extraer RNA celular total de todo tipo de tejidos animales o humanos. Un sistema tampón de alta sal específicamente formulado permite que más de 100 µg de moléculas de RNA mayores de 200 bases se unan a la matriz.

Las células (o tejidos) se homogeneizan primero con el reactivo *RNA-Solv*[®] que inactiva las enzimas RNAsas. Tras añadir cloroformo, la mezcla se separa en fase acuosa y orgánica mediante centrifugación. La fase acuosa, que contiene el RNA, se ajusta con etanol y se aplica a la *HiBind*[®] *RNA Mini Column* a la que se une el RNA total, mientras que los restos celulares y otros contaminantes se lavan. El RNA de alta calidad se eluye en agua libre de nucleasas.

Capacidad de unión.

Cada mini columna de *RNA HiBind*[®] puede unir aproximadamente 100 µg de RNA. No se recomienda utilizar más de 1×10^7 células (o 30 mg de tejido). En la presente investigación, no más de 100 mL de orina de partida.

Preparación de los reactivos.

Se debe diluir el tampón de lavado de RNA II con etanol al 100% y conservar a temperatura ambiente.

Añadir 20 µL de 2-mercaptoetanol por 1 mL de reactivo *RNA-Solv*[®].

Centrifugation Protocols

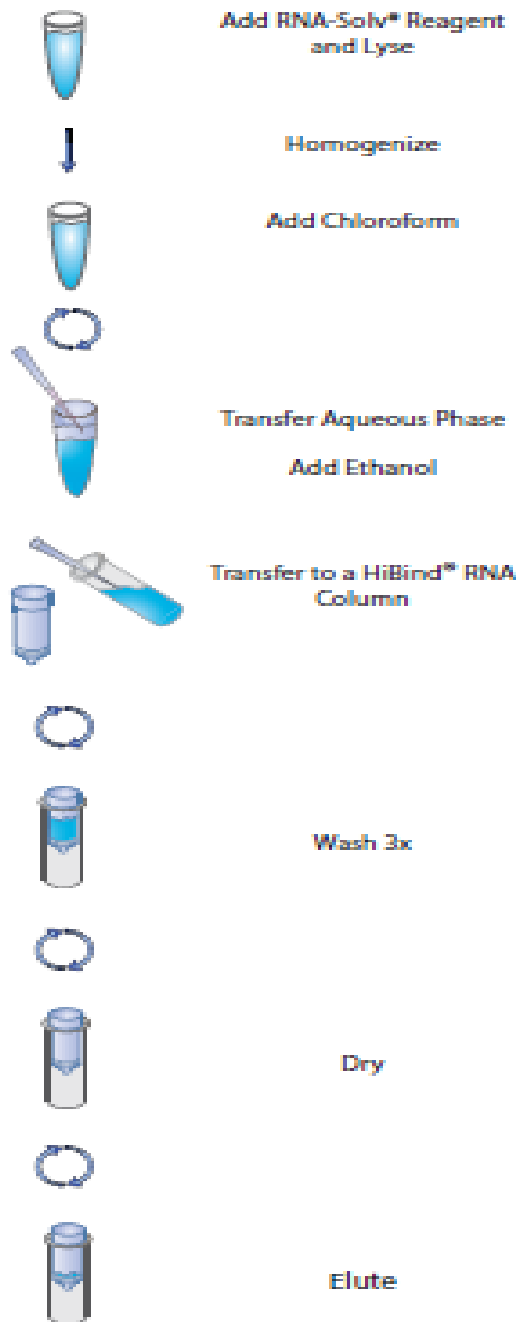


Figura 22.

Evitar la contaminación: Es imprescindible usar siempre guantes para trabajar con RNA a efectos de minimizar la contaminación por las RNAsas. Del mismo modo se deben

utilizar únicamente puntas de pipeta de plástico desechables limpias y libres de RNasa para trabajar con los reactivos suministrados.

Cuantificación del RNA con el espectrofotómetro Nanodrop (ThermoFisher).

Para determinar la concentración y pureza del RNA se debe medir la absorbancia (A) a 260 nm y 280 nm (espectrofotómetro). Una unidad de D.O. medida a 260 nm corresponde a 40 µg de RNA por mL. El agua libre de nucleasas es ligeramente ácida y puede disminuir las relaciones A260/A280. Hay que utilizar el tampón TE para diluir el RNA antes del análisis espectrofotométrico.

La relación A260/A280 de los ácidos nucleicos puros es de 2,0, mientras que para las proteínas puras es de aproximadamente 0,6. Por lo tanto, la relación es de 1,8. Una relación de 1,8-2,0 corresponde al 90-100% de ácido nucleico puro. El fenol tiene una absorbancia máxima a 275 nm y puede interferir con las lecturas del DNA o de RNA. La purificación basada en la columna de *E.Z.N.A.[®] Total RNA Kit II* elimina la contaminación por fenol y evita el problema de interferencia.

Se cuantificó el RNA con el equipo Bioanalyzer de *Agilent* que permite saber la cantidad y la calidad del RNA mediante un sistema de electroforesis microfluídica. Este equipo es el único que permite conocer la integridad del RNA mediante el cálculo del valor del parámetro RIN (*RNA Integrity Number*). Este valor se obtiene mediante una ecuación en la que se relaciona la cantidad de RNA ribosómico frente al RNA mensajero. Se considera que la integridad del RNA es buena cuando el parámetro RIN es mayor de 8.

Realización de las librerías de secuenciación.

Se utilizó el kit QiaSeq miRNA library de *Qiagen*. El kit consiste en:

—Ligar el adaptador al extremo 3'. Se utiliza 1 ng de RNA total en 5 µL, se diluye 1/10 el adaptador 3'. Incubar 1 hora a 28°C, seguido de 20 minutos a 65°C y mantener, al menos durante 5 minutos a 4°C.

Component	Volume/reaction
Nuclease-free Water	Variable
QIAseq miRNA NGS 3' Adapter*	1 µl
QIAseq miRNA NGS RI	1 µl
QIAseq miRNA NGS 3' Ligase	1 µl
QIAseq miRNA NGS 3' Buffer	2 µl
2x miRNA Ligation Activator	10 µl
Template RNA (added in step 5)	Variable ^{††}
Total volume	20 µl

—Ligar el adaptador al extremo 5'. Se diluye el adaptador 5' 1/10. Sobre los 20 µL obtenidos en el paso 1, se añaden los 20 µL de la siguiente mezcla:

Template RNA input (total RNA)	Adapter dilution
500 ng	Use undiluted
100 ng	Use undiluted
10 ng	Dilute 1:2.5
1 ng	Dilute 1:5
Serum/Plasma	Dilute 1:2.5

—Los 40 µL de reacción finales, se incuban 30 minutos' a 28°C, seguido de 20 minutos a 65°C y se mantienen, al menos, durante 5 minutos a 4°C.

—Síntesis del cDNA. En este paso, el reactivo de RT-“primers” tiene que diluirse igual que los adaptadores. A los 40 µL de la reacción del paso 2 hay que añadir 2 µL del reactivo Qiaseq miRNA NGS RT “initiator”. Se incuba de la siguiente forma:

Time	Temperature
2 min	75°C
2 min	70°C
2 min	65°C
2 min	60°C
2 min	55°C
5 min	37°C
5 min	25°C
∞*	4°C

Mientras se realiza la incubación, hay que preparar la mezcla de reacción para la transcriptasa reversa. Está compuesta por:

QIAseq miRNA NGS RT Primer*	2 µl
Nuclease-free Water	2 µl
QIAseq miRNA NGS RT Buffer	12 µl
QIAseq miRNA NGS RI	1 µl
QIAseq miRNA NGS RT Enzyme	1 µl

Los 18 µL de esta mezcla se unen a los 42 µL del paso 3 y se incuban 1 hora a 50°C, 15 minutos a 70°C y, al menos, otros 5 a 4°C. Mientras se realiza esta reacción hay que preparar las bolitas magnéticas con las que se limpia el cDNA. Para ello, hay que retirar el tampón de dilución de las bolas y añadir el tampón de unión del kit.

—Limpiar el cDNA: a los 60 µL obtenidos en el paso 3, se añaden 143 µL de las bolas preparadas y se incuban durante 5 minutos. Se ponen los tubos en la placa magnética 4 minutos y se retira el sobrenadante. Se añaden 500 µL de etanol al 80% y se retiran al cabo de 10 minutos. Repetir el lavado con 200 µL de etanol al 80%. No deben quedar restos de etanol en la preparación. Se añaden 17 µL de agua libre de nucleasas y se

resuspenden las bolas. Se incuban 2 minutos a RT y vuelven a la placa magnética durante 2 minutos más. Después se transfieren 15 μ L a un tubo nuevo.

— Unión de los códigos de barras. A los 15 μ L del paso 4 se le añaden:

Component	Volume/reaction
Product from "Protocol: cDNA Cleanup"	15 μ l
QIAseq miRNA NGS Library Buffer	16 μ l
HotStarTaq DNA Polymerase	3 μ l
QMI TF IP1 through IP12 (Index Primer)*	2 μ l
QMI TF Lib Rev Primer	2 μ l
Nuclease-free Water	42 μ l
Total volume	80 μl

Se pone la mezcla en un termociclador con el siguiente programa:

Step	Time	Temperature
Hold	15 min	95°C
3-step cycling (see Table 14 for no. of cycles)		
Denaturation	15 s	95°C
Annealing	30 s	60°C
Extension	15 s	72°C
Hold	2 min	72°C
Hold	∞^*	4°C

El número de ciclos es 22. Sobre los 80 μ L se añaden 75 μ L de las bolas preparadas anteriormente. Se mezclan bien y se incuban 5 minutos a RT, antes de ponerlo en el imán. El sobrenadante se recoge y se pone en un tubo limpio al que se añaden otros 130 μ L de bolas. Se mezclan bien y se incuban 5 minutos a RT, después se ponen en el imán. Se desecha el sobrenadante y las bolas se lavan dos veces con 200 μ L de etanol al 80%. No deben quedar restos de etanol. Se diluyen las bolas con 17 μ L de agua libre de nucleasas, se incuban 2 minutos y se ponen en el imán. Se recupera el sobrenadante y se pasa a un tubo limpio.

La librería obtenida debe cuantificarse utilizando el kit High Sensitivity DNA del Bioanalyzer (*Agilent*), delimitando la región de 180 pb. La librería de cada muestra hay que ponerla a una concentración de 25 pM. Se realiza el *pool* de las librerías que se vayan a secuenciar en la misma carrera.

La secuenciación masiva se realizó con la plataforma Ion-Torrent de *ThermoFisher*. Esta técnica de secuenciación se basa en la tecnología de los semiconductores mediante los cuales se puede medir los cambios de pH generados con la liberación del ion de hidrógeno liberado en la adición de un dNTP a un polímero de DNA. Al medir simultáneamente millones de variaciones de pH se puede determinar la secuencia de cada fragmento ya que se conoce el nucleótido que se ha unido en cada momento.

Al tratarse de una herramienta muy potente se pueden multiplexar varias muestras distintas. Para ello, junto con los adaptadores hay que incluir un oligonucleótido llamado *Barcode* (código de barras) con una secuencia distinta para cada muestra que permite identificar cada fragmento como propios de una misma muestra. Actualmente existen hasta 384 combinaciones distintas de códigos.

El uso de esta plataforma conlleva dos pasos: la carga de las librerías y su lectura.

A) La carga de las librerías en el chip de secuenciación (Templado o realización de plantillas).

Las hebras de cada fragmento se separan por calor a 95°C y se hace una emulsión en las que cada uno de los fragmentos se unen a una nano-esfera. Esta unión específica se produce porque la superficie de las nano-esferas está cubierta por unos oligonucleótidos cuya secuencia es complementaria a uno de los adaptadores ligados a los fragmentos, consiguiendo así la hibridación de cada fragmento con una de las nano-esferas.

A continuación, se desarrolla una reacción de PCR en cada una de las burbujas generadas durante la emulsión, motivo por el que se denomina PCR de emulsión. Con ello se consigue la clonación del fragmento unido cubriendo toda la superficie de la nano-esfera. Mediante un paso posterior de enriquecimiento por bolas magnéticas se consigue eliminar la mayor parte de las nano-esferas que no tuviera unido ningún fragmento.

Una vez conseguido el *pool* de nano-esferas en cuyas superficies están unidos cada uno de los fragmentos de DNA clonados, son cargadas en un *chip*. Las nano-esferas están en una solución tamponada en la que se incluyen unos cebadores que hibridan con el segundo adaptador ligado a cada fragmento y que va a servir de punto de inicio para que la polimerasa, también presente en esta solución, continúe la elongación del fragmento.

Los *chips* utilizados en esta técnica tienen unos nano-pocillos en los que se depositaran una de las nano-esferas anteriormente preparadas. Bajo los nano-pocillos se encuentran los sensores que captarán cada uno de los pulsos eléctricos causados por las variaciones de pH ocurridas durante el proceso de secuenciación. Este proceso se realiza de forma automática con el equipo *Ion-Chef*.

B) La lectura en el equipo Ion S5-XL.

En este último paso tiene lugar la secuenciación de cada fragmento de DNA que compone la librería. En este caso el equipo mediante su sistema de fluídica baña a todos los nano-pocillos del *chip* con una solución tamponada en la que se incluye un desoxinucleotido determinado. De esta manera, la polimerasa presente en cada nano-pocillo comenzará la elongación del fragmento a partir del extremo 3' libre del cebador hibridado con el segundo adaptador. Lo primero que se lee es una secuencia conocida que sirve al equipo para calibrar la señal en cada carrera. A continuación, lee la secuencia código (*Barcode*) específica de cada muestra, para así quedar asignado cada pocillo a una de las muestras

que se están secuenciando en la carrera. Seguido de esta secuencia, se empieza a leer la secuencia del fragmento en sí.

La calidad de la carga del chip fue del 89% de media y el número de lecturas fue de 65 millones de pb de media.

El programa *Ionreporter*[®] (*Thermofisher*) realiza el ensamblaje de los fragmentos producidos y crea ficheros con formato BAM que se pueden leer y analizar en otros programas bioinformáticos de análisis de secuencias.

C) Análisis Bioinformático.

El análisis de los datos se realizó de la siguiente forma: Se usó la librería QuasR (v 1.36.0) de *R-Bioconductor* para alinear mediante *Rbowtie* (v 1.36.0) (con parámetros especialmente dirigidos para miRNAs. Es importante destacar que se debe configurar maxHits=50 o similar, para alinear también las lecturas que coincidan perfectamente con el genoma varias veces. Esto es necesario porque los miRNAs están codificados por múltiples genes. Las lecturas de dichos miRNAs no se alinearían y, por lo tanto, su expresión se subestimaría si se usa el maxHits=1 predeterminado.

Se ha usado también la librería "limma" de *Bioconductor* (v 3.52.1) para normalizar las cuentas tras su conversión a escala logarítmica (logaritmos naturales) mediante el método "quantile" y también para calcular la expresión diferencial.

El genoma de referencia es: *Bsgenome.Hsapiens.UCSC.hg38.masked* accesible en: <https://bioconductor.org/packages/release/data/annotation/html/BSgenome.Hsapiens.UCSC.hg38.masked.html>). Y la base de datos de los miRNAs es: miRBase v22, genome-build-id: GRCh38, genome-build-accession: NCBI_Assembly:GCA_000001405.15

Procesamiento de las muestras para el análisis de la expresión de miRNAs mediante RT-PCR.

Una vez determinada la concentración de RNA y su calidad mediante el equipo *Bioanalyzer (Agilent)*, se pasó al estudio de la expresión de los miRNAs seleccionados tras el análisis de los datos obtenidos por la secuenciación masiva, mediante ensayos con sondas *Taqman*[®].

Determinación de miRNA mediante el ensayo Taqman[®].

Se utilizó el Kit de síntesis de *cDNA TaqMan*[®] Advanced miRNA (*Thermofisher*). Los ensayos *TaqMan*[®] Advanced miRNA Assays son conjuntos de cebadores y sondas pre-formulados que están diseñados para el análisis de los niveles de expresión de miRNA con el equipo QuantStudio 6 de PCR en tiempo real de *Applied Biosystems*[™]. Los ensayos pueden detectar y cuantificar la forma madura del miARN a partir de 1-10 ng de RNA total de tejido o 2 µL de RNA total de suero, plasma y orina. El kit de síntesis de cDNA de miRNA *TaqMan*[®] Advanced es necesario para preparar la plantilla del cDNA que se utiliza con el *TaqMan*[®] Advanced miRNA Assays.

El kit permite el análisis de:

- Múltiples miRNAs a partir de una única muestra amplificada.
- Muestras de cantidad limitada, como suero, plasma u otros fluidos biológicos, entre ellos, la orina.

Se describen aquí los procedimientos para preparar plantillas de cDNA a partir de miRNA seguidos de la amplificación por PCR de la plantilla de cDNA y el posterior análisis de datos. En la primera etapa del flujo de trabajo, los miRNAs maduros de RNA total se modifican mediante:

—La extensión del extremo 3' del transcrito maduro mediante la adición de poli(A), y a continuación,

—Alargando el extremo 5', mediante la ligadura del adaptador.

Luego, los miRNA modificados se someten a transcripción inversa universal y amplificación para aumentar uniformemente la cantidad de cDNA para todos los miRNA (reacción miR-Amp).

Controles endógenos.

Un control endógeno muestra una expresión génica que es relativamente constante y moderadamente abundante en todos los tejidos, tipos de células y protocolos de tratamiento. La normalización a genes de control endógenos es actualmente el método más preciso para corregir los posibles sesgos causados por:

—Recogida de muestras.

—Variación en la cantidad de material de partida.

—Eficacia de la transcripción inversa (RT).

—Preparación y calidad del ácido nucleico (RNA/DNA).

Ningún control puede actuar como control endógeno universal para todas las condiciones experimentales, razón por la que se recomienda verificar el control endógeno elegido o el conjunto de controles para el tejido, la célula o el tratamiento de la muestra.

En la tabla 9 que sigue se exponen los ensayos *TaqMan Advanced miRNA* disponibles dirigidos a miRNA con niveles de expresión relativamente constantes en muchos tipos de muestras diferentes. De esta tabla 9 hemos escogido los miRNAs hsa-miR-186-5p y hsa-miR-191-5p, como controles endógenos, ya que en la secuenciación masiva realizada eran los miRNAs con menos cambios de expresión detectados entre grupos.

Assay name ^[1]	Assay ID	Target Sequence
hsa-miR-361-5p	478056_mir	5' -UUAUCAGAAUCUCCAGGGGUAC-3'
hsa-miR-186-5p	477940_mir	5' -CAAAGAAUUCUCCUUUUGGGCU-3'
hsa-miR-26a-5p	477995_mir	5' -UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU-3'
hsa-miR-191-5p	477952_mir	5' -CAACGGAAUCCAAAAGCAGCUG-3'
hsa-miR-451a	478107_mir	5' -AAACCGUUACCAUUACUGAGUU-3'
hsa-miR-423-5p	478090_mir	5' -UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU-3'
hsa-miR-320a	478594_mir	5' -AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA-3'

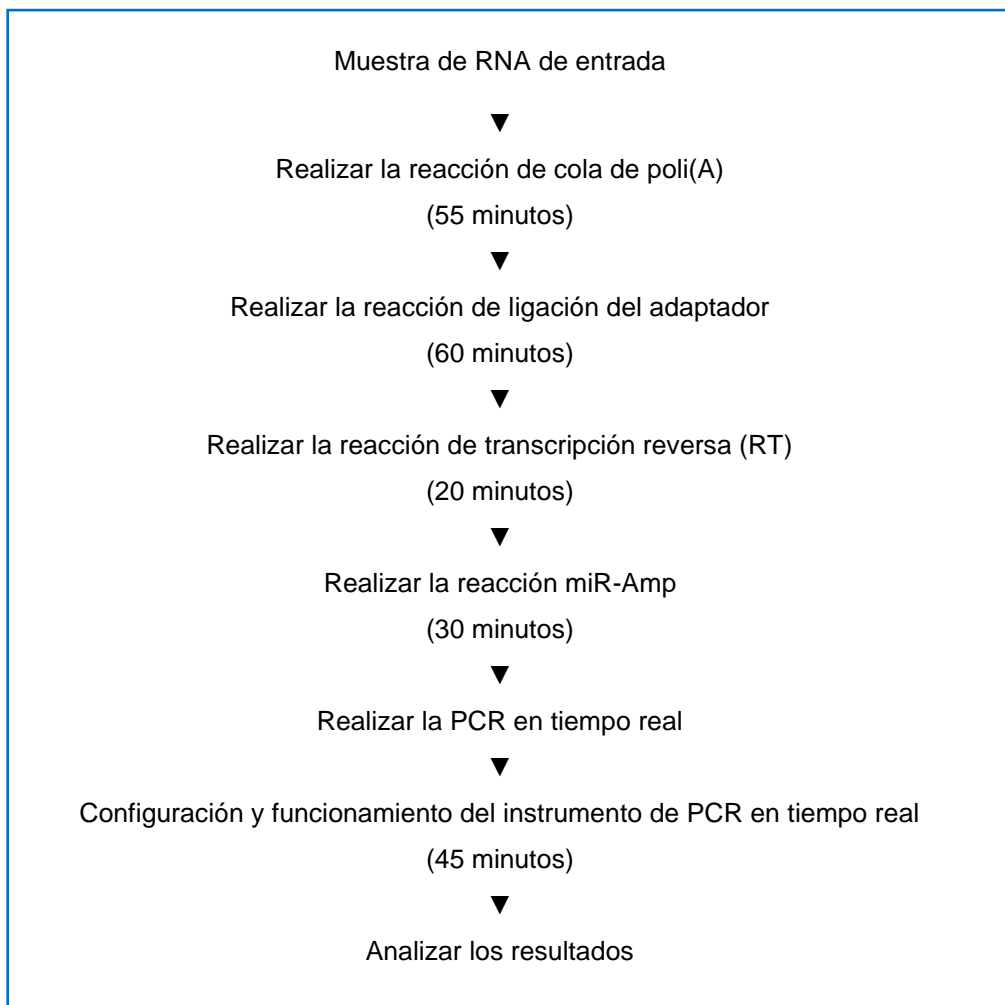
^[1] TaqMan[®] Advanced miRNA Assays do not detect snRNAs or snoRNAs. Do not use snRNAs and snoRNAs as endogenous controls for these assays.

Tabla 9.

Flujo de trabajo.

El flujo de trabajo realizado se sintetiza en el esquema siguiente y desarrolla más adelante:

Preparar las plantillas de cDNA.



Directrices del procedimiento.

Se han tenido en cuenta las siguientes normas para la preparación de las plantillas de cDNA:

- Máximas condiciones de asepsia y cuidado para trabajar con muestras de RNA.
- Guardar los ensayos *TaqMan® Advanced miRNA Assays* hasta estar listos para su uso.
- Calcular el número de reacciones necesarias.
- Escalar los componentes de la reacción en función de los volúmenes de reacción única y, a continuación, incluir un 10% de exceso.
- Preparar las muestras utilizando un método de aislamiento de RNA total que preserve los RNA pequeños.
- Para muestras de fluidos (sangre, suero, plasma u orina) se utilizan 2 µL de eluyente de la muestra (procedente del procedimiento de aislamiento de la muestra) por cada reacción.
- Para una transcripción inversa óptima, el RNA de entrada debe estar:
 - Libre de inhibidores de la transcripción inversa (RT) y de la PCR.
 - Disuelto en un tampón compatible con la PCR.
 - Libre de actividad RNasa.
 - RNA total no desnaturalizado (no aplicable a plantillas bicatenario).

Para realizar la reacción de cola de poli(A).

—Descongelar las muestras y los reactivos de síntesis de cDNA en hielo, agitar suavemente para mezclar bien y, a continuación, centrifugar brevemente el contenido y eliminando las burbujas de aire. El reactivo PEG 8000 al 50% debe estar a temperatura ambiente para la reacción de ligación del adaptador.

—En un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, preparar suficiente *Poly(A) Reaction Mix* para el número necesario de reacciones, de acuerdo con la siguiente tabla (Tabla 10):

Component	1 Rxn	4 Rxns ^[1]	10 Rxns ^[1]
10X Poly(A) Buffer	0.5 μ L	2.2 μ L	5.5 μ L
ATP	0.5 μ L	2.2 μ L	5.5 μ L
Poly(A) Enzyme	0.3 μ L	1.3 μ L	3.3 μ L
RNase-free water	1.7 μ L	7.5 μ L	18.7 μ L
Total Poly(A) Reaction Mix volume	3.0 μL	13.2 μL	33 μL

^[1] Volumes include 10% overage.

Tabla 10.

—Agitar en vórtex la mezcla de reacción de poli(A) para mezclar bien el contenido y, a continuación, centrifugar brevemente el contenido y eliminar las burbujas de aire.

—Añadir 2 μ L de muestra a cada pocillo de una placa de reacción o a cada tubo de reacción y, a continuación, transferir 3 μ L de *Poly(A) Reaction Mix* a cada pocillo o tubo.

—Sellar la placa o los tubos de reacción y, a continuación, agitar brevemente en vórtex para mezclar bien el contenido.

—Centrifugar brevemente la placa o los tubos de reacción para centrifugar el contenido y eliminar las burbujas de aire.

—Colocar la placa o los tubos de reacción en un termociclador y, a continuación, incubar utilizando la siguientes ajustes y ciclos estándar:

Step	Temperature	Time
Polyadenylation	37°C	45 minutes
Stop reaction	65°C	10 minutes
Hold	4°C	Hold

—Proceder inmediatamente a la reacción de ligación del adaptador (sección siguiente).

Realizar la reacción de ligación del adaptador.

—En un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, preparar suficiente Mezcla de Reacción de Ligación para el número necesario de reacciones de acuerdo con tabla 11:

Component	1 Rxn	4 Rxns ^[1]	10 Rxns ^[1]
5X DNA Ligase Buffer	3 µL	13.2 µL	33 µL
50% PEG 8000 ^[2]	4.5 µL	19.8 µL	49.5 µL
25X Ligation Adaptor	0.6 µL	2.6 µL	6.6 µL
RNA Ligase	1.5 µL	6.6 µL	16.5 µL
RNase-free water	0.4 µL	1.8 µL	4.4 µL
Total Ligation Reaction Mix volume	10 µL	44 µL	110 µL

^[1] Volumes include 10% overage.

^[2] 50% PEG 8000 is very viscous, follow the important statement below to ensure accurate pipetting.

Tabla 11.

—Agitar la mezcla de reacción de ligación en vórtex para mezclar bien el contenido y, a continuación, centrifugar brevemente y eliminar las burbujas de aire.

—Transferir 10 µL de la mezcla de reacción de ligación a cada pocillo de la placa de reacción o cada tubo de reacción que contenga el producto de reacción de cola de poli(A). El volumen total debe ser de 15 µL por pocillo o tubo.

—Sellar la placa o los tubos de reacción y agitar brevemente en vórtex o agitar (1.900 rpm durante 1 minuto con un *Eppendorf™ MixMate™*) para mezclar bien el contenido. Es muy importante observar si hay un movimiento giratorio de la reacción de ligación del adaptador para asegurar una mezcla adecuada, necesaria para una ligadura eficiente.

—Centrifugar brevemente la placa o los tubos de reacción para centrifugar el contenido.

—Colocar la placa o los tubos de reacción en un termociclador y, a continuación, incubar utilizando los siguientes ajustes y el ciclo estándar siguientes ajustes y ciclos estándar:

Step	Temperature	Time
Ligation	16°C	60 minutes
Hold	4°C	Hold

—Proceder inmediatamente a la reacción de transcripción inversa (RT) (sección siguiente).

Realizar la reacción de transcripción inversa (RT).

—En un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, preparar suficiente mezcla de reacción RT para el número necesario de reacciones de acuerdo con la tabla 12:

Component	1 Rxn	4 Rxns ^[1]	10 Rxns ^[1]
5X RT Buffer	6 µL	26.4 µL	66 µL
dNTP Mix (25 mM each)	1.2 µL	5.3 µL	13.2 µL
20X Universal RT Primer	1.5 µL	6.6 µL	16.5 µL
10X RT Enzyme Mix	3 µL	13.2 µL	33 µL
RNase-free water	3.3 µL	14.5 µL	36.3 µL
Total RT Reaction Mix volume	15 µL	66 µL	165 µL

^[1] Volumes include 10% overage.

Tabla 12.

—Agitar en vórtex la mezcla de reacción RT para mezclar bien el contenido y, a continuación, centrifugar brevemente el contenido y eliminar las burbujas de aire.

—Transferir 15 µL de la mezcla de reacción RT a cada pocillo de la placa de reacción o a cada tubo de reacción que contenga el producto de la reacción de ligación del adaptador. El volumen total debe ser de 30 µL por pocillo o tubo.

—Sellar la placa (o tubos) de reacción y agitar brevemente en vórtex para mezclar bien.

—Centrifugar brevemente la placa o los tubos de reacción para centrifugar el contenido.

—Colocar la placa (tubos) de reacción en un termociclador. Incubar utilizando los siguientes ajustes y ciclos estándar:

Step	Temperature	Time
Reverse transcription	42°C	15 minutes
Stop reaction	85°C	5 minutes
Hold	4°C	Hold

—Proceder a la reacción miR-Amp (sección siguiente).

Realizar la reacción miR-Amp.

—En un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, preparar suficiente *miR-Amp Reaction Mix* para un número necesario de reacciones de acuerdo con la tabla 13:

Component	1 Rxn	4 Rxns ^[1]	10 Rxns ^[1]
2X miR-Amp Master Mix	25 µL	110 µL	275 µL
20X miR-Amp Primer Mix	2.5 µL	11 µL	27.5 µL
RNase-free water	17.5 µL	77 µL	192.5 µL
Total miR-Amp Reaction Mix volume	45 µL	198 µL	495 µL

^[1] Volumes include 10% overage.

Tabla 13.

—Agitar en vórtex la mezcla de reacción miR-Amp para mezclar bien el contenido y, a continuación centrifugar brevemente el contenido y eliminar las burbujas de aire.

—Transferir 45 µL de la mezcla de reacción miR-Amp a cada pocillo de una nueva placa de reacción o tubo de reacción.

—Añadir 5 µL del producto de reacción RT a cada pocillo o a cada tubo de reacción. El volumen total debe ser de 50 µL por pocillo o tubo.

- Sellar la placa (tubos) y agitar brevemente en vórtex para mezclar bien el contenido.
- Centrifugar brevemente la placa o los tubos de reacción para centrifugar el contenido.
- Colocar la placa o los tubos de reacción en un termociclador e incubar con los siguientes ajustes, velocidad de rampa MAX y ciclado estándar:

Step	Temperature	Time	Cycles
Enzyme activation	95°C	5 minutes	1
Denature	95°C	3 seconds	14
Anneal/Extend	60°C	30 seconds	
Stop reaction	99°C	10 minutes	1
Hold	4°C	Hold	1

- Realizar la PCR en tiempo real (sección siguiente).

Preparación de la placa de reacción PCR.

Para este cometido, como requisitos previos se debe tener en cuenta lo siguiente:

- Preparar la mezcla de reacción de PCR en tiempo real antes de transferirla a la placa de reacción para el termociclado y el análisis de fluorescencia.
- Calcular el número de reacciones necesarias. Escalar los componentes de la reacción basándose en los volúmenes de reacción única y, a continuación, incluir un 10% de exceso.
- Se puede almacenar el producto de la reacción miR-Amp sin diluir a -20°C durante un máximo de 2 meses.
- Mantener los ensayos protegidos de la luz y almacenados a -20°C hasta que estén listos para su uso. La exposición excesiva a la luz puede afectar a la sonda fluorescente.

Procedimiento:

—Descongelar los ensayos en hielo, agitar suavemente para mezclar bien y, a continuación, centrifugar brevemente el contenido y eliminar las burbujas de aire.

—Preparar una dilución 1:10 de la plantilla de cDNA. Por ejemplo, añadir 5 µL del producto de la reacción miR-Amp a 45 µL de tampón TE 0,1X.

—Agitar suavemente el frasco de *TaqMan® Fast Advanced Master Mix* para mezclar bien el contenido. No invertir el frasco.

—En un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, preparar una cantidad de *PCR Reaction Mix* para el número necesario de reacciones, de acuerdo con la tabla 14:

Component	1 Rxn	4 Rxns ^[1]
TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2X)	10 µL	44.0 µL
TaqMan® Advanced miRNA Assay (20X)	1 µL	4.4 µL
RNase-free water	4 µL	17.6 µL
Total PCR Reaction Mix volume	15 µL	66 µL

^[1] Volumes include 10% overage.

Tabla 14.

—Agitar la *PCR Reaction Mix* en vórtex para mezclar bien el contenido y, a continuación, centrifugar brevemente el contenido y eliminar las burbujas de aire.

—Transferir 15 µL de la *PCR Reaction Mix* a cada pocillo de una placa de reacción PCR.

—Añadir 5 µL del molde de cADN diluido a cada pocillo de reacción de la placa. El volumen total debe ser de 20 µL por pocillo de reacción.

—Sellar la placa de reacción con una tapa adhesiva y, a continuación, agitar brevemente en vórtex para mezclar bien el contenido.

—Centrifugar brevemente la placa de reacción para agitar el contenido.

Configuración y funcionamiento del instrumento de la PCR en tiempo real.

Se debe consultar la guía del usuario del instrumento correspondiente para obtener las instrucciones detalladas para programar las condiciones de termociclado o para ejecutar la placa. Los siguientes perfiles térmicos están optimizados para su uso con *TaqMan® Fast Advanced Master Mix* y pueden utilizarse con placas de reacción *Fast* o *Standard* y con las configuraciones de bloque de instrumentos correspondientes:

- Cargar la placa de reacción en el instrumento de PCR en tiempo real.
- Configurar los ajustes del experimento y las condiciones de termociclado de la PCR para el instrumento en uso.
- Seleccionar el modo de ciclado rápido para todos los instrumentos según se indica en las dos tablas siguientes (Tablas 15 y 16):

Step	Temperature	Time	Cycles
Enzyme activation	95°C	20 seconds	1
Denature	95°C	1 second	40
Anneal / Extend	60°C	20 seconds	

Tabla 15

Step	Temperature	Time	Cycles
Enzyme activation	95°C	20 seconds	1
Denature	95°C	3 seconds	40
Anneal / Extend	60°C	30 seconds	

Tabla 16

- Ajustar el volumen de reacción apropiado para la placa de reacción.
- Iniciar la ejecución.

Análisis de los resultados.

Para obtener información detallada sobre el análisis de los datos se debe consultar la documentación adecuada para el instrumento en uso. Utilizar el método de curva estándar o el método de cuantificación relativa ($\Delta\Delta\text{Ct}$) para analizar los resultados. Las directrices generales para el análisis incluyen:

- Ver el gráfico de amplificación; luego, si fuera necesario:
- Ajustar los valores de línea base y umbral (se recomienda un valor umbral de 0,1).
- Eliminar los valores atípicos del análisis.
- En la tabla de pocillos o en la tabla de resultados, visualizar los valores de Ct para cada pocillo y para cada grupo de réplicas.

Los datos generados con los ensayos *TaqMan® Advanced miRNA Assays* se analizaron utilizando el módulo de análisis de real-time PCR de Applied Biosystems thermofisher.com/us/en/home/cloud.html.

IV. RESULTADOS.

IV.1. Datos sociodemográficos de los sujetos analizados.

Antecedentes familiares de CRC. Se incluyeron 46 personas en el estudio, de los cuales 31 (69,39%) presentaban antecedentes familiares de primer grado de CCR. Veinte (43,47%) tenían pólipos hiperplásicos o no se encontraron pólipos en la colonoscopia (grupo 1). Once (23,91%) tenían adenomas en el estudio endoscópico (grupo 2). El resto, 15 sujetos (32,60%) controles, carecían de antecedentes de primer grado de CCR, ni presentaron pólipos en la colonoscopia.

Distribución por sexo. El 65,2% de los sujetos (n=30) fueron hombres y el 34,8% (n=16) fueron mujeres. La edad media general fue de $53,52 \pm 7,71$ años, siendo mayor en el grupo control ($57 \pm 2,23$ años; $p < 0,05$) respecto a los otros dos grupos.

Hábitos de vida: dieta, ejercicio y consumo de tóxicos. El 43,5% de los pacientes (n=20) refería actividad física regular, el 71,1% consumían de forma diaria fibra, vegetales o fruta y el 45,7% consumían carne roja, la gran mayoría menos de 3 veces en semana. Nueve (19,6%) eran fumadores y 11 (23,9%) consumían alcohol de forma regular.

Uso de fármacos. La mayoría (73,9%) negó el uso de antiagregantes o AINES. Ninguno tenía prescrito algún tipo de fármaco diurético.

Antecedentes de otros tumores. Se registraron antecedentes familiares de otros tumores, destacando antecedentes de primer grado de cáncer gástrico en un sujeto del grupo 3 y de segundo grado en un paciente del grupo 1.

Colonoscopias y anatomía patológica de las lesiones polipoideas. Todas las colonoscopias fueron completas cumpliendo los estándares de calidad. La preparación fue adecuada (Boston \geq 6) en 43 pacientes (93,48%). Respecto a la histología de los adenomas, solo uno fue un adenoma avanzado (lesión con displasia de alto grado).

IV.2. Análisis de las tetraspaninas.

En las tablas 17, 18 y 19 se exponen los valores de las tetraspaninas CD9, CD81 y CD63 de los grupos 1 (pólipos hiperplásicos o sin pólipos), 2 (adenomas) y 3 (controles) expresados como porcentajes (%) de positividad.

<u>Grupo 1</u>	<u>CD9</u>	<u>CD81</u>	<u>CD63</u>
2	37,11	62,46	42,12
10	42,33	71,21	38,39
14	32,77	51,38	39,21
20	33,89	69,28	38,33
11	38,12	63,44	41,28
15	49,27	67,22	47,93
16	45,62	58,11	35,27
<i>Media</i>	<i>39,87</i>	<i>66,30</i>	<i>40,36</i>
<i>DE</i>	<i>6,11</i>	<i>6,87</i>	<i>4,01</i>

Tabla 17. Tetraspaninas grupo 1 (pólipos hiperplásicos o sin pólipos)

<u>Grupo 2</u>	<u>CD9</u>	<u>CD81</u>	<u>CD63</u>
303	60,66	71,84	90,39
304	55,36	75,26	95,66
9	63,57	77,93	98,96
4	51,37	89,95	91,28
<i>Media</i>	<i>57,44</i>	<i>78,75</i>	<i>94,07</i>
<i>DE</i>	<i>5,44</i>	<i>7,87</i>	<i>3,99</i>

Tabla 18. Tetraspaninas del grupo 2 (adenomas)

<u>Grupo 3</u>	<u>CD9</u>	<u>CD81</u>	<u>CD63</u>
1	85,4	82,06	85,40
3	89,07	74,12	96,25
5	83,88	83,30	89,98
13	89,37	86,37	92,38
18	70,09	70,01	74,28
<i>Media</i>	<i>83,56</i>	<i>66,48</i>	<i>87,66</i>
<i>DE</i>	<i>7,89</i>	<i>6,83</i>	<i>8,45</i>

Tabla 19. Tetraspaninas grupo 3 (controles)

—CD9: Sus valores eran más bajos en ambos grupos con antecedentes familiares de CCR respecto a los controles: en el grupo 1 (pólipos hiperplásicos) comparado con el grupo 3

(39,87±6,11 vs 83,56±7,89, p<0,05) y en el grupo 2 (adenomas) comparado con el grupo 3 (57,74±5,44 vs 83,56±7,89, p<0,05)

—CD81: Se encontraron hallazgos similares a CD9 con niveles de positividad más bajos tanto en grupo 1 como en grupo 2, comparados con los controles (63,30±6,87 y 78,75±7,87 vs 79,17±6,83, p<0,05)

—CD63: El grupo 1 presentó niveles más bajos comparado con los controles (40,36±4,01 vs 87,66±48,44, p<0,05) y el grupo 2 niveles más altos comparado con los controles (94,07±3,99 vs 87,66±48,44), pero sin hallar diferencias estadísticamente significativas.

En las páginas que siguen se muestran los histogramas mono paramétricos de la determinación de las tetraspaninas CD9, CD81 y CD63 por citometría de flujo. Previamente, se muestra la distribución normal de las vesículas extracelulares en la orina (color violeta) mediante Cytoflex (Figura 23, izquierda) y un control de calidad de la preparación de VEx, midiendo el porcentaje de eventos CFSE+ (Figura 23, derecha). De seguido se exponen los histogramas mono paramétricos de las tetraspaninas CD9, CD81 y CD63 determinadas en el grupo 3 (controles) (Figura 24), las mismas tetraspaninas del grupo 1 (pólipos hiperplásicos, en la figura 25) y, finalmente, las del grupo 2 (adenomas, en la figura 26).

Distribución en una preparación típica de las vesículas extracelulares en la orina

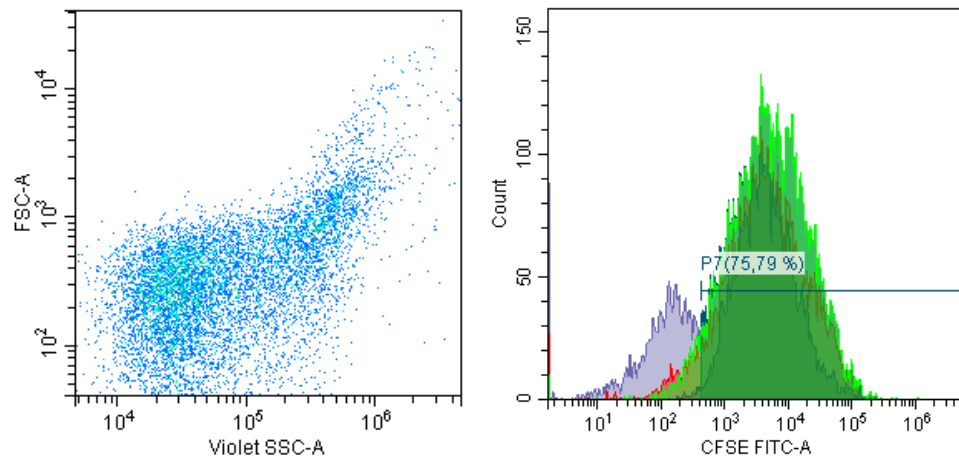


Figura 23. Izquierda. Distribución de v-SSC y FSC de una preparación típica de VEx de orina, analizados en un Cytoflex S (Beckman Coulter). Derecha. Control de calidad de la preparación de VEx, midiendo el porcentaje de eventos CFSE+. El porcentaje es del 75,79%, por lo que la muestra es aceptable

Tetraspaninas en una muestra del grupo 3 o control

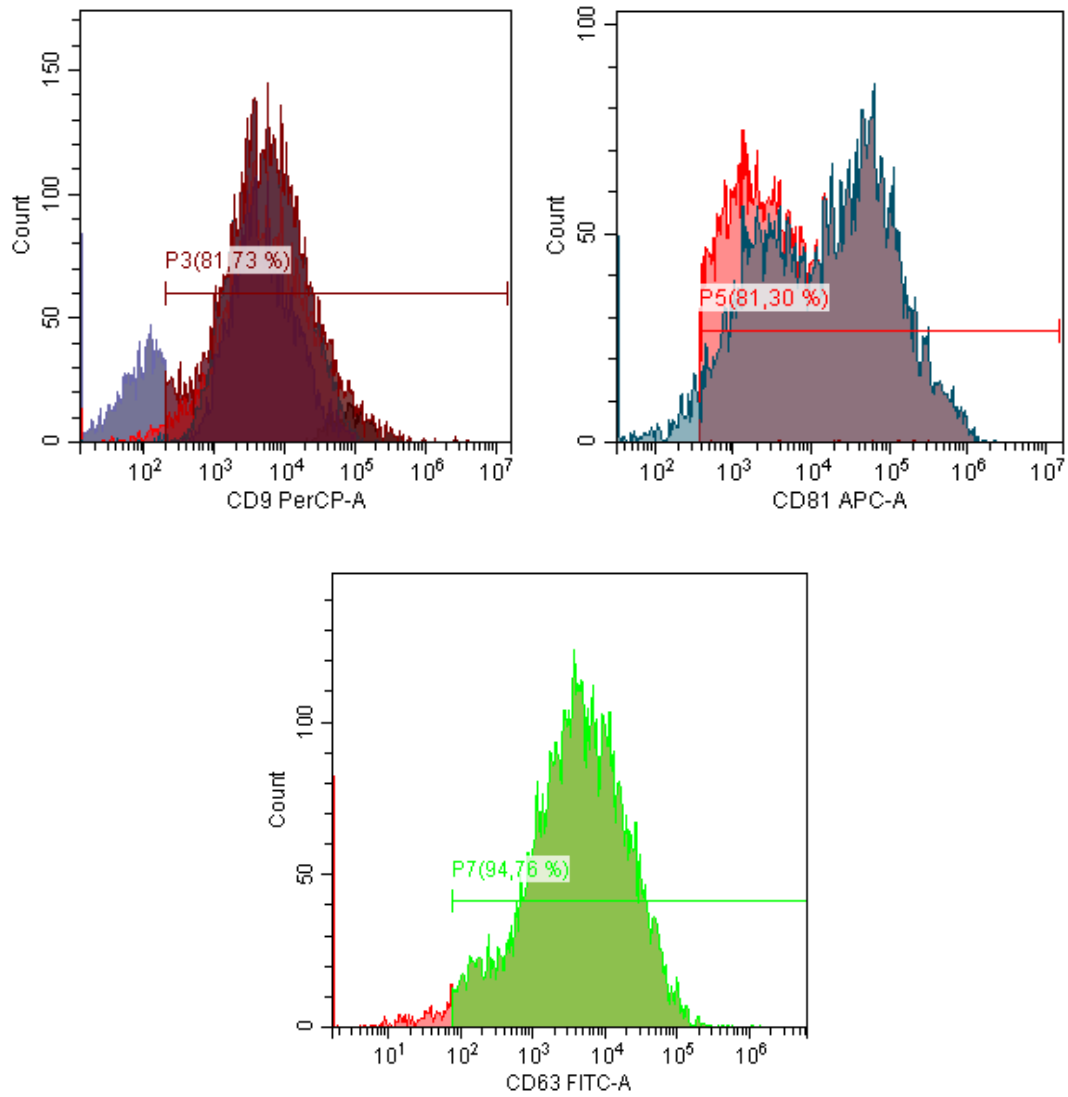


Figura 24. Medida de la detección de las tetraspaninas CD9, CD81 y CD63 mediante CDF en una muestra del grupo control.

Tetraspaninas en una muestra del grupo 1 o pólipos hiperplásicos

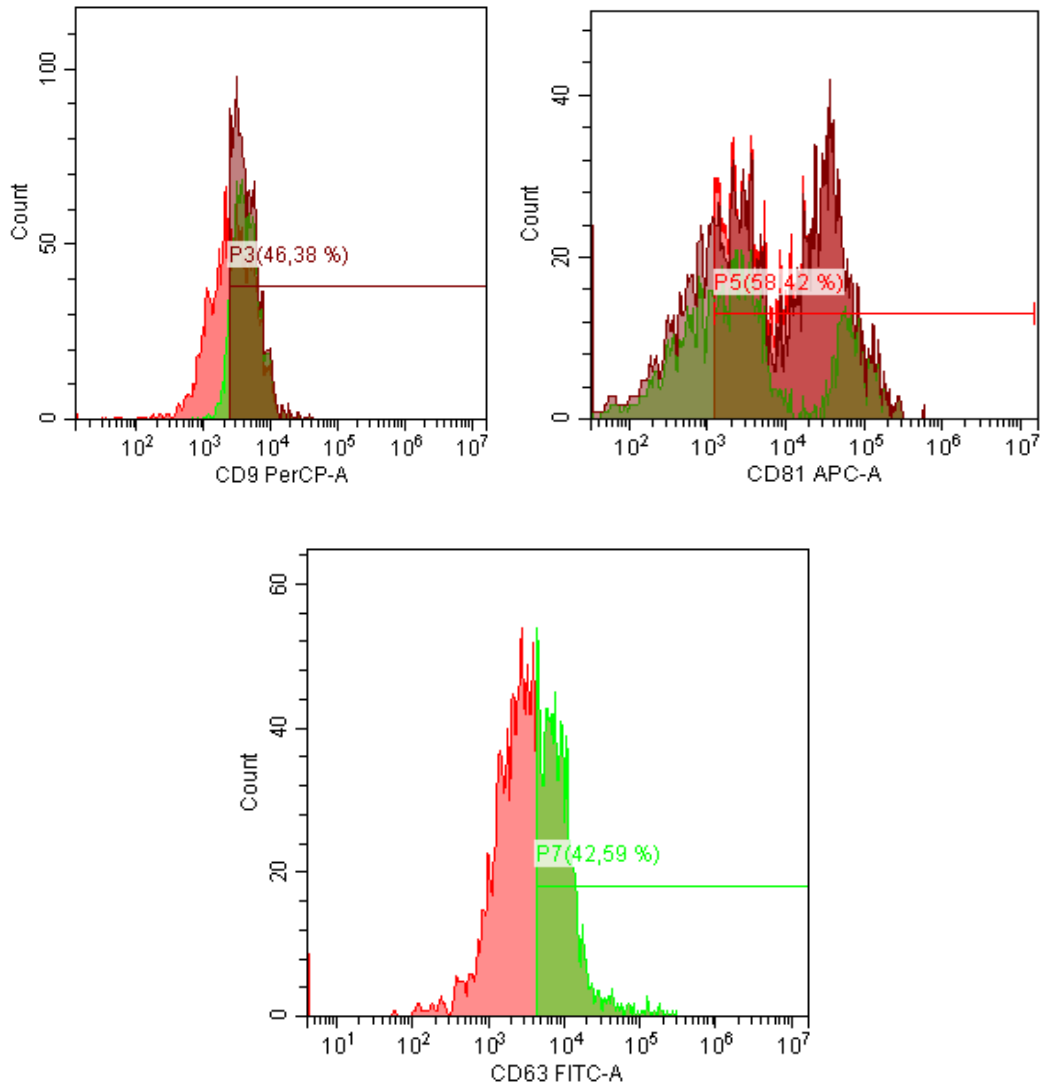


Figura 25. Medida de la detección de la tetraspanina CD9, CD81 y CD63 mediante CDF en una muestra del grupo de pólipos hiperplásicos.

Tetraspaninas en una muestra del grupo 2 o adenomas

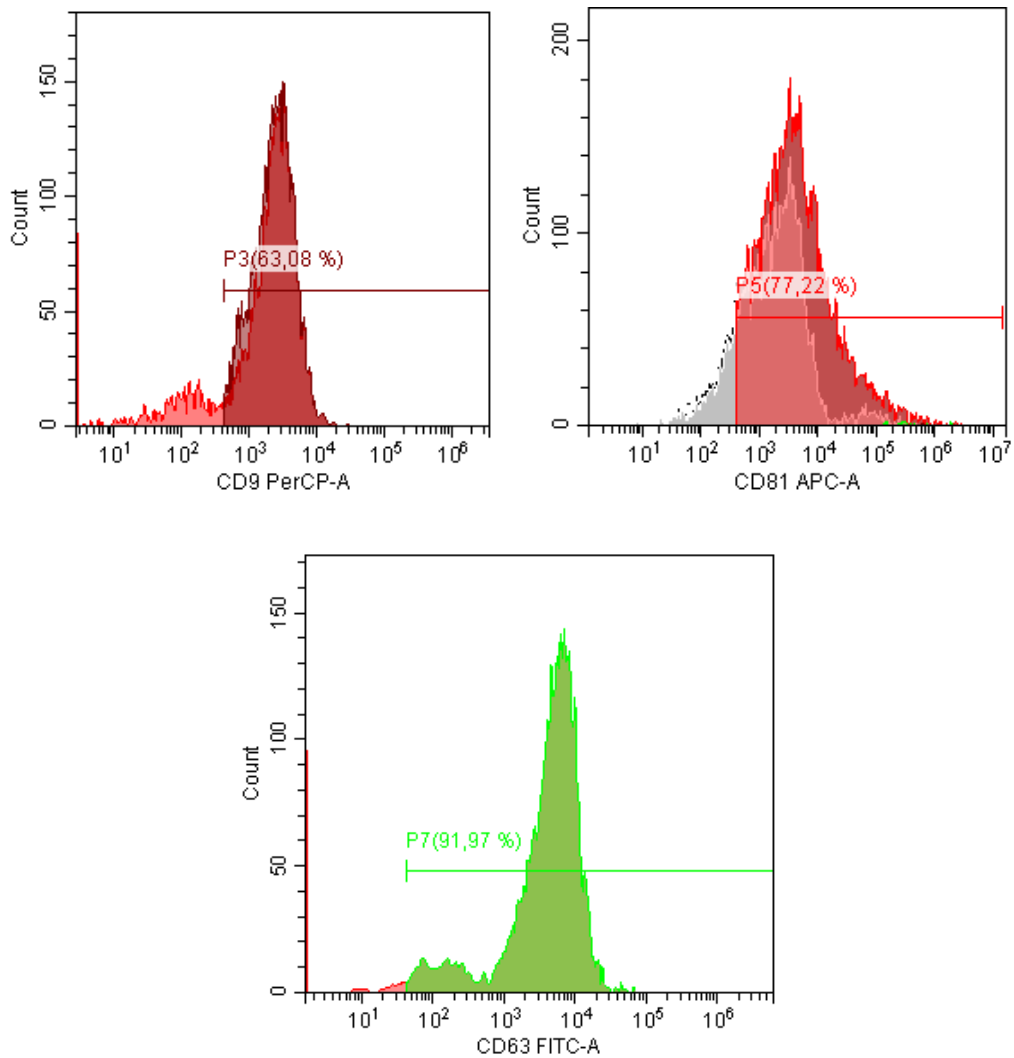


Figura 26. Medida de la detección de las tetraspaninas CD9, CD81 y CD63 mediante CDF en una muestra del grupo de adenomas.

IV.3. Análisis comparativo de los microRNAs en los exosomas de la orina.

Tras la secuenciación masiva de los numerosos miRNAs extraídos de los exosomas presentes en las muestras de orina, se seleccionaron nueve que mostraron un perfil común (firma o signatura) en los diferentes grupos analizados. Fueron los siguientes:

- hsa-miR-92a-3p
- hsa-miR-200a-3p
- hsa-miR-141-3p
- hsa-miR-203a-3p
- hsa-miR-375-3p
- hsa-miR-10a-5p
- hsa-miR-30d-5p
- hsa-miR-888-5p
- hsa-let-7b-5p

A continuación, se realizó el estudio comparativo entre el grupo 1 (pólipos hiperplásicos o sin pólipos) *versus* el 3 (controles) y el grupo 2 (adenomas) *versus* el 3 (controles).

IV.3.1. Grupo 1 *versus* grupo 3 (Tabla 20).

La comparación entre el grupo 1 (pólipos hiperplásicos o sin pólipos) y el grupo 3 (controles) permitió detectar 7 miRNAs diferencialmente expresados (los que están situados por encima de la línea horizontal en el gráfico de volcán representado en la figura 27) con distintos grados de significación estadística: hsa-miR-141-3p ($p=0,04$), hsa-let-7b-5p ($p=0,11$), hsa-miR-10a-5p ($p=0,12$), hsa-miR-200a-3p ($p=0,10$) y hsa-miR-375-3p ($p=0,22$), hsa-miR-203a-3p ($p=0,011$) y hsa-miR-888-5p ($p=0,18$). Solo fue estadísticamente significativo ($p<0,05$) hsa-miR-141-3p.

El hsa-miR-10a-5p mostró una expresión elevada mientras que el resto (hsa-miR-141-3p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-200a-3p y hsa-miR-375-3p, hsa-miR-203a-3p y hsa-miR-888-5p) mostró una expresión disminuida.

hsa-miR-141-3p	0,04	Expresión disminuida
hsa-let-7b-5p	0,11	Expresión disminuida
hsa-miR-10a-5p	0,12	Expresión elevada
hsa-miR-200a-3p	0,10	Expresión disminuida
hsa-miR-203a-3p	0,11	Expresión disminuida
hsa-miR-888-5p	0,18	Expresión disminuida

Tabla 20. Grupo 1 (pólipos hiperplásicos o sin pólipos) y el grupo 3 (controles).

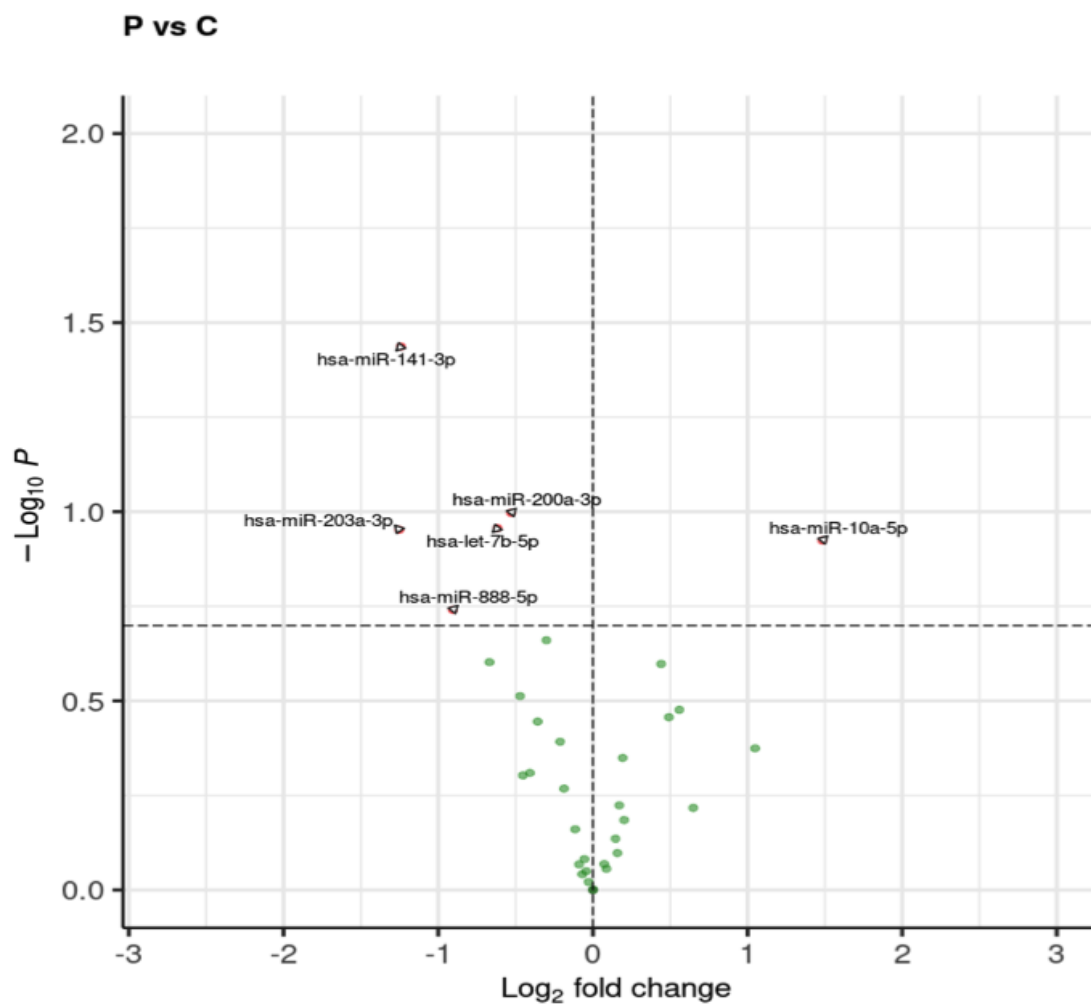


Figura 27. Gráfico de volcán que ilustra los miRNAs del grupo 1 (pólipos hiperplásicos) comparado con el grupo 3 (controles). A la izquierda de la raya discontinua vertical indican expresión a la baja y a la derecha sobreexpresión.

IV.3.2. Grupo 2 *versus* grupo 3 (Tabla 21).

La comparación entre el grupo 2 (adenomas) y el 3 (controles) permitió detectar 4 miRNAs diferencialmente expresados (los que se muestran por encima de la línea horizontal en el gráfico de volcán representado en la figura 28) con distintos grados de significación estadística: hsa-miR-30d-5p ($p=0,04$), hsa-miR-375-3p ($p=0,08$), hsa-miR-92a-3p ($p=0,10$) y hsa-miR-200a-3p ($p=0,11$). Sólo el miRNA hsa-miR-30d-5p resultó estadísticamente significativo ($p<0,05$) con una expresión elevada. El resto mostró una expresión disminuida y sin significación estadística.

hsa-miR-30d-5p	0,04	Expresión elevada
hsa-miR-375-3p	0,08	Expresión disminuida
hsa-miR-92a-3p	0,10	Expresión disminuida
hsa-miR-200a-3p	0,11	Expresión disminuida

Tabla 21. Grupo 2 (adenomas) *versus* el grupo 3 (controles).

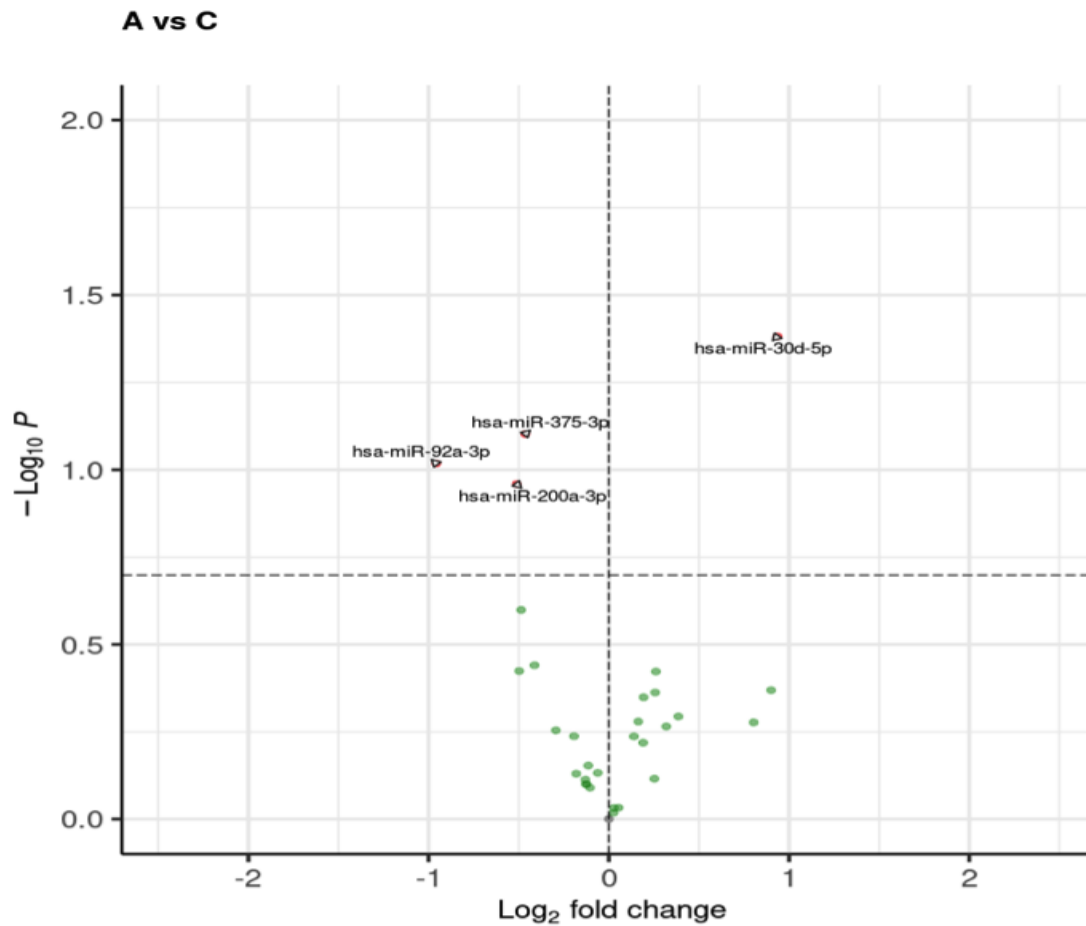


Figura 28. Gráfico de volcán que ilustra los miRNAs del grupo 2 (adenomas) comparado con el grupo 3 (controles). ajustada). A la izquierda de la raya discontinua vertical indican expresión a la baja y a la derecha sobreexpresión.

V. DISCUSIÓN.

El CCR ocupa la tercera posición de incidencia de cáncer general. Respecto a la mortalidad, sigue siendo la tercera causa de muerte por cáncer tanto en las mujeres como en los hombres¹. Gracias al avance en los métodos de diagnóstico precoz y a la implantación de los programas de cribado poblacional en muchos países, la incidencia del CCR esporádico y la mortalidad correspondiente han disminuido en la última década. Sin embargo, en algunas partes del mundo, debido a los factores relacionados con los hábitos de vida y la dieta, así como a la falta de recursos en los sistemas sanitarios, el CCR sigue siendo un importante problema de salud pública.

La mayoría de los CCR se desarrollan a partir de una lesión precursora neoplásica comenzando con una cripta aberrante que evoluciona a una lesión polipoidea y, tras 10 o 15 años, se desarrolla el CCR. La célula inicial es una célula madre cancerosa en la base de las criptas que, tras una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas que activan oncogenes e inactivan genes supresores de tumores, llevará al inicio y mantenimiento del cáncer colorrectal²⁹³.

Un área de gran interés para mejorar la prevención y el desarrollo de tratamientos eficaces frente al CCR es la investigación en los mecanismos que regulan el crecimiento de las células madre cancerosas. Encontrar biomarcadores⁹² asociados al desarrollo y mantenimiento del tumor es la tendencia actual en la medicina asistencial y en la investigación básica y aplicada. Durante el tiempo de desarrollo y ejecución del presente estudio se han publicado varios trabajos que van en esta línea²⁹⁴.

También existen factores genéticos que predisponen a CCR en determinados sujetos. Un grupo de riesgo que destaca es el de los familiares de primer grado de los pacientes con

CCR. El riesgo depende de diversas circunstancias: la edad al diagnóstico del caso índice, el grado de parentesco, el sexo y el número de familiares afectados⁵. Por todo esto, en nuestra investigación se eligió a este grupo epidemiológico como población diana, haciendo la modificación necesaria en el proyecto inicial como se describió anteriormente. Recientemente se han publicado varios trabajos^{293,294} que describen perfiles de miRNA o *clústeres* en estadios precoces de CCR o en pacientes jóvenes (menores de 50 años)²⁹⁴. Nuestra intención al inicio del trabajo fue la detección de biomarcadores relacionados con estadios precoces o tempranos de la oncogénesis colorrectal, es decir, en etapas preneoplásicas como los adenomas colónicos. Por tal motivo seleccionamos sujetos con riesgo aumentado de CCR por ser individuos con familiares de primer grado a quienes se les había diagnosticado CCR. El bajo número de muestras ha impedido la obtención de resultados consistentes pero, como contrapartida, el trabajo puede servir para demostrar la utilidad de las muestras de orina en la búsqueda de biomarcadores oncológicos, al menos en determinadas patologías, un hecho que, sin ser novedoso, está escasamente reflejado en la literatura donde dominan de forma incuestionables los análisis en muestras de suero, plasma y tejidos. Por otra parte, y de forma paralela, el estudio permite plantear la posibilidad de usar nuevos marcadores biológicos. Nos referimos a las tetraspaninas. De confirmarse este hecho, las técnicas diagnósticas serían más rápidas, más sencillas y reproducibles y con un coste menor comparado con la detección de microRNAs. En los párrafos que siguen se exponen con mayor detalle los datos que pueden sostener esta hipótesis. Nos referimos a los exosomas, los microRNAs y las tetraspaninas.

Como se expuso antes, los exosomas y las microvesículas (MV) son estructuras celulares implicadas en la comunicación intercelular^{110,111,112} en condiciones fisiológicas y patológicas^{96,97}. Además de la estructura, aspecto y tamaño de los

exosomas/microvesículas, cuyo rango en la literatura es bastante amplio^{113,114,115,116}, un aspecto común entre ambas nanoestructuras es su función como vehículos transportadores de una carga (el cargamento o cargo) variada de moléculas muy distintas en su origen celular, estructura molecular, características físicas y actividades funcionales.

Un hecho de gran interés —en la actualidad todavía incipiente, aunque con muy alta probabilidad se desarrollará en el inmediato futuro— es la función desempeñada por algunas de las proteínas que componen las membranas de las microvesículas, cuya composición y función es distinta a la de las proteínas que forman la membrana plasmática de la célula original. En cuanto a la función, va mucho más allá de la simple contribución a la estructura física de la membrana, es decir, como componente más del andamio molecular. Nos referimos a la intervención de las proteínas de membrana en la génesis o formación de los exosomas, a su papel en la regulación de la salida al espacio exterior (extracelular) desde la célula original, a la unión posterior de las distintas moléculas del cargamento exosómico a la membrana de la célula receptora y, por fin, a los mecanismos intervinientes en la entrada de dichas moléculas en la célula receptora por endocitosis o mediante la internalización por otras vías (pinocitosis/fagocitosis y la unión ligando-receptor).

Sirvan de ejemplos la participación de determinadas proteínas en la formación de los cuerpos multivesiculares o MVB; por ejemplo, la proteína Alix y la proteína TSG101; las proteínas de transporte y fusión (anexinas, flotinas y GTPasas); las proteínas implicadas en la adhesión (integrinas); las tetraspaninas (CD9, CD63, CD81 y CD82); las moléculas de presentación antigénica (de la clase MHC/*Major Histocompatibility Complex*); las proteínas del *heat shock* (HSP70, HSP90) o de estrés térmico; y, finalmente, las proteínas relacionadas con los lípidos^{120,121,122,123}.

En la presente investigación sólo interesa destacar la participación de las tetraspaninas como marcadores exosómicos utilizados habitualmente en la citometría de flujo para identificar las VEx. Este aspecto se volverá a tratar más adelante referido a su posible importancia más allá de la simple identificación de biomarcadores urinarios de los sujetos con sospecha de patología colónica, sea de rango pre neoplásico o tumoral.

Pero antes, y ésta puede ser una prueba de la complejidad de las referidas nanoestructuras, conviene decir que existen otras moléculas de gran importancia en el contenido (o *cargo*) de la microvesícula exosómica, más allá de las referidas en el párrafo anterior. Nos referimos, de forma muy breve y sólo a título informativo, a los lípidos (ceramida, colesterol, esfingolípidos), los sacáridos (polisacáridos y signaturas de glicanos, como manosa y ácido siálico alfa-2,3 y alfa 2,6) y a los ácidos nucleicos. Respecto a los últimos (DNA, RNA, mRNA, RNAs no codificados o ncRNAs y los microRNAs), centramos el análisis en la fracción de los miRNAs. Se debe enfatizar su importancia por cuanto los miRNAs son el texto subgenómico que sirve como mensaje molecular intravesicular o exosómico. Un producto intermediario ineludible para que ocurra la comunicación entre las células dando sentido a la denominación de ‘comunicasomas’ referida en la literatura. Esta es una función obligada en condiciones fisiológicas, pero también en situaciones patológicas en muy diferentes campos de la clínica (cardiovascular, endocrinometabólica, neurológica, osteoarticular, inmunológica, medicina regenerativa, senescencia, enfermedades infecciosas, patología digestiva y, sobre todo, oncológica). Pero su ámbito de aplicación es muy amplio, pues abarca la terapéutica (los exosomas como vehículos de fármacos dirigidos a dianas concretas o específicas), la prevención (vacunas) y, el que más nos interesa en este trabajo, como biomarcadores diagnósticos, evolutivos y de respuesta a la terapia.

Hasta ahora, en el campo oncológico es donde más se ha desarrollado el estudio de los exosomas/microvesículas extracelulares. La razón es simple: estas nanoestructuras participan en el desarrollo, crecimiento y la diseminación a distancia de algunos tumores cuya incidencia, gravedad y mortalidad no es desdeñable (por ejemplo, los cánceres de pulmón, colon, mama, páncreas, próstata y el hepatocarcinoma). Todas las etapas de la oncogénesis son importantes y están muy estrechamente relacionadas, aunque tal vez convenga poner el foco en la última y más peligrosa por cuanto supone la diseminación a distancia del tumor original. Un hecho que complica el diagnóstico, la evolución, el tratamiento y el pronóstico.

En este sentido, los exosomas/microvesículas extracelulares participan en el establecimiento del nicho pre metastásico para generar el microambiente apropiado, participan en la estimulación de determinados factores angiogénicos necesarios para la formación de nuevos vasos sanguíneos (neovascularización), la densidad vascular y también la formación y depositación o acumulación de la matriz extracelular (ECM). De igual modo, las nanoestructuras están relacionadas con la hipoxia que aumenta la secreción de exosomas, modula el microambiente y favorece la angiogénesis y la producción de metástasis. Interviene en la modulación del sistema inmune con una acción antitumoral como el transporte de antígenos tumorales MHC I y MHC II (histocompatibilidad), la estimulación de los linfocitos T citotóxicos y la estimulación de las células dendríticas presentadoras de antígenos. Y también en la modulación protumoral (efecto inmunosupresor, bloqueo de la maduración de las CD y macrófagos, supresión de NK y promueven la apoptosis de las células T)¹²⁴.

En cuanto al estudio de los exosomas/microvesículas, aunque no existe una homologación de una única técnica aceptada internacionalmente entre las diversas metodologías utilizadas, cabe la esperanza de estar cada vez más cerca de la futura homologación intra

e inter laboratorios. La discrepancia existente en la actualidad ayuda a explicar las diferencias y, a veces, la escasa firmeza y dificultad de reproducción de los resultados. Lo cual es un inconveniente que no ayuda a las nuevas investigaciones al complicar de forma notable la interpretación y la obtención de conclusiones irrefutables. En esta línea de razonamiento, y más allá de la metodología específica empleada para el análisis, también se debe resaltar el tipo de las muestras analizadas: muestras de diversos fluidos (biopsias líquidas) y de tejidos (biopsias de tejidos normal y neoplásico). Respecto a otros fluidos, son bastante menos utilizadas las muestras de saliva, líquido cefalorraquídeo, aspirado bronquial, líquido sinovial y la orina.

En el examen de este asunto, no se pueden pasar por alto las diferencias existentes en el modo de obtención de las muestras (invasivas o no invasivas) y las esperables molestias para el sujeto estudiado (venopunción, punción articular, punción lumbar, fibrobroncoscopia, colonoscopia), sin despreciar los riesgos asociados a cada técnica en particular, por raros o poco frecuentes que sean, desde la infección articular hasta la perforación intestinal. Y, por supuesto, tampoco la disparidad de los resultados obtenidos por los diferentes métodos de análisis debido a la preparación de las muestras, la concentración y el número de exosomas detectados, la capacidad de detección de la técnica, así como su sensibilidad y, por fin, la interpretación de los resultados. Finalmente, se debe considerar el coste económico de la prueba.

Todo lo anterior contribuye a la hora de buscar formas de detección de los exosomas/microvesículas que sean eficaces, cómodas para el paciente y para el investigador, baratas, rápidas de ejecutar y fáciles de repetir, si llegara el caso, por el mismo grupo investigador y por terceros. Por tanto, es muy apropiado analizar el papel de la orina. Las razones, recordamos, son: la facilidad de obtención sin inconvenientes para el sujeto, la sencillez del almacenaje y conservación, la relativa facilidad del

procesamiento y la relativa abundancia de exosomas/microvesículas en las muestras, sin interferencia de artefactos como, por ejemplo, la glicoproteína de Tamm-Horsfall (THP) o uromodulina excretada fisiológicamente en cantidad de 50-100 mg/día. Debido a su importancia, y por haber sido el tipo de muestra utilizada de forma consciente en nuestro trabajo, tal vez sea adecuado decir algo más al respecto.

Los exosomas y las vesículas extracelulares de la orina, procedentes de las células que recubren el tracto urinario y urogenital²⁶⁷ con su cargo^{268,269} portan la información dirigida a otras células^{270,271,272} y se pueden detectar en la orina del sujeto²⁷³. Por otra parte, la orina también contiene vesículas de otros órganos y aparatos, normales o dañados, además de células epiteliales, hongos, bacterias y virus^{275,276}. Ese es un hecho importante porque pueden conducir a interpretaciones erróneas a la hora del análisis exosómico de la orina. Sirvan de ejemplos diversos virus muy comunes en la patología humana (sarampión, gripe, VIH-1, SARS-CoV-2 y otros coronavirus, adenovirus, rotavirus) con similar tamaño nanométrico (80-120 nm) y una nanoestructura muy parecida a la de los exosomas urinarios (material genómico, por norma RNA, envuelto por una capa bilipídica). Otro inconveniente en el estudio de los exosomas urinarios es que existen algunos tipos de RNAs asociados a otras estructuras lo que obliga a demostrar la resistencia a la degradación por las nucleasas y proteinasas de los miRNAs vehiculados por los exosomas/microvesículas de la orina^{280,281}.

También es muy interesante saber que el proteoma de las VEx urinarias es muy cuantioso y heterogéneo (proteínas de transporte de membrana, proteínas motoras, del citoesqueleto y proteínas unidas al glicosilfosfatidilinositol)²⁸³. La espectrometría de masas identifica más de 3.000 proteínas (aproximadamente el 0,6-3% de las proteínas en orina están asociadas a VEx urinarias)²⁸³. Respecto a los lípidos y metabolitos, hay muy pocos trabajos publicados^{284,285,286}. Un estudio de 2017²⁸⁶ identificó más de 100 especies de

lípidos en VEx urinarias por espectrometría de masas (sobre todo el colesterol y la fosfatidilserina). Se cree que las VEx urinarias son más abundantes en colesterol que las del plasma²⁸⁷. Respecto a los metabolitos, los más abundantes detectados fueron alanina, serina, creatinina, ornitina, L-cistationina y D-ribosa-5-fosfato²⁸⁸.

Del mismo modo, los RNAs no codificantes que transcriben el 80% del genoma son vehículos de información intra y extracelular desempeñando numerosas y diversas funciones biológicas y patológicas. Los sncRNAs (small-ncRNAs) se caracterizan por tener menos de 200 nucleótidos (n). Por su parte, los lncRNA igualan o superan la cifra de 200 n. Los sncRNAs agrupan a los microRNAs (miRNAs), los RNAs asociados a Piwi (en inglés, *piwi-interacting RNA/piRNAs*) y los RNAs cortos nucleolares (en inglés, *small nucleolar RNAs/snoRNAs*).

En la presente investigación analizamos los microRNAs (miRNAs o miRs) de los exosomas de orina cuya función es regular la transcripción genómica. Están implicados, entre otras funciones, en la oncogénesis, un hecho conocido desde el año 2002. Un aspecto que conviene destacar es el papel de algunos miRNAs en la patogenia de los pólipos, adenomas y el cáncer colorrectal. Para ello, pueden participar en la secuencia tradicional desde el tejido normal al pólipo adenomatoso, pero también desde el adenoma al adenocarcinoma. Además, participan en la secuencia serrada: tejido normal a serrado y de éste al CCR. En cuanto a los miRNAs de la vía tradicional, destaca el clúster o agrupación de cuatro miRNAs: miR-17-19a, miR-135b, miR-143 y miR-145 implicados en la vía reguladora catenina-catenina-WNT/ β necesaria para el inicio de la neoplasia. Pero hay otros miRNAs implicados: los miR-143, miR-21 y miR-31 y los miR-1, miR-2 y miR-143, relacionados con las vías RAS-MAPK y P13K/AKT, respectivamente. Además, los miR-34a/b/c, miR-133a, miR-143 y miR-145 intervienen en la evolución de

adenoma avanzado a CCR, así como los miR-21, miR-125 y miR-200 favorecen el crecimiento tumoral mediante la regulación de la vía del TGF- β (*Factor de crecimiento transformante* β). Respecto a la vía serrada, al menos dos microRNAs (miR-21 y miR-181) participan en la génesis de los pólipos hiperplásicos y de los adenomas sésiles serrados¹²⁹ mientras que los tumores con la mutación BRAF muestran una expresión elevada del miR-31-5p.

Es cada vez más abundante la literatura sobre los miRNAs detectados en diversos tipos de muestras biológicas, tanto líquidas como sólidas. Por ejemplo, en la sangre, los miR-21, miR-92a y miR-17-3p¹³¹; en los tejidos, un incremento de 6 miRNAs de tejido normal a CCR: miR-18a, miR-18b, miR-431, miR-503, miR-1246 y miR-4417 y un descenso de otros 5 miRNAs: miR-133a, miR-375, miR-378, miR-422 y miR-479¹³⁹ con 3 miRNAs: miR-21, miR-29a y miR-135b sobre expresados en los adenomas frente al tejido colónico normal¹⁴⁰); y, por fin, en las heces, los miR-21 y miR-106a¹³³, miR-92a¹³⁴ y miR-106a¹³⁵. Respecto a las heces, que ofrecen un perfil de miRNAs muy parecido al del tejido colónico, Ahmed *et al*¹³⁷ propusieron un panel o clúster de 12 miRNAs (miR-7, miR-17, miR-20a, miR-21, miR-92a, miR-96, miR-106a, miR-134, miR-183, miR-196a, miR-199a-3p, miR-214) con expresión elevada en el CCR¹³⁷, sobre todo en el CCR metastásico, comparado con los adenomas. Los mismos autores describieron 8 miRNAs (miR-9, miR-29b, miR-127-5p, miR-138, miR-143, miR-146a, miR-222, miR-938) que muestran una expresión menor en los pacientes con CCR y un incremento progresivo, dependiendo del estadio de la clasificación internacional TNM. Probablemente, el miR-20a es el mejor biomarcador del CCR en las heces, si bien su sensibilidad es baja (55%), aunque mejora la especificidad (82%)¹³⁸.

En virtud de los inconvenientes señalados antes, el presente estudio no permite averiguar si determinados miRNAs pueden tener, con potencia estadística, un valor diagnóstico en los sujetos familiares de pacientes diagnosticados de CCR y con pólipos hiperplásicos o adenomas colorrectales, pero sí permite resaltar tres aspectos que podrían ser de interés:

- 1) La validez de la orina como un método diagnóstico adecuado para el estudio de los exosomas y de los miRNAs vehiculados por estos en la orina.
- 2) Buscar si existe alguna firma o perfil de un miR individual o de un clúster o agrupación de miRNAs destacado en los sujetos con alteraciones histopatológicas (pólipos hiperplásicos y adenomas) que los diferencie de los controles sanos.
- Y 3) Finalmente, con el nuevo planteamiento y como hipótesis por comprobar, el estudio ofrece la posibilidad de estudiar si las tetraspaninas, aunque son proteínas exosómicas utilizadas en la citometría de flujo en calidad de marcadores de membrana de los exosomas, pudieran tener alguna trascendencia diagnóstica complementando o sustituyendo a la determinación de los miRNAs. Es decir, si, supuestamente, sería suficiente detectar el perfil de las tetraspaninas, el tipo de exosomas presentes en la orina, en lugar de los miRNAs, lo cual requiere más tiempo, personal, recursos materiales y un mayor gasto económico al implicar tecnología genómica en lugar de la más versátil, barata y rápida citometría de flujo.

En los siguientes párrafos y centrados en la presente investigación, se analizan, en primer lugar, los miRNAs detectado en las muestras de orina para, a continuación, discutir los resultados de las tetraspaninas, adelantando ya, que serían necesarios más análisis y muestras para establecer la presunción en hecho.

MicroRNAs: En cuanto a los miRNAs detectados destaca el perfil o signatura definida por un clúster de 9 miRNAs (hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-375-3p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-888-5p y hsa-let-7b-5p). Para ver si existen diferencias entre los grupos seleccionados, el estudio

comparativo mostró lo siguiente: la comparación entre el grupo 1 (pólipos hiperplásicos o sin pólipos) y el grupo 3 (controles) permitió detectar 7 miRNAs (hsa-miR-141-3p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-10a-5), hsa-miR-200a-3p y hsa-miR-375-3p, hsa-miR-203a-3p y hsa-miR-888-5p) con diferentes grados de significación estadística (Tabla 20). Solo es significativo el hsa-miR-141-3p ($p=0,04$). Por su parte, el hsa-miR-10a-5p mostró una expresión elevada mientras que el resto (hsa-miR-141-3p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-200a-3p y hsa-miR-375-3p, hsa-miR-203a-3p y hsa-miR-888-5p) mostró una expresión disminuida.

El miR-141-3p es codificado por el gen MIR141 (microRNA141) localizado en el cromosoma 12p13.31 ([MIR141 Gene-GeneCards](#)), pertenece a la familia precursora mir-8/mir-141/mir-200 microRNA y consta de 22 nucleótidos ([rnacentral.org](#)). Está ampliamente distribuido en el espacio intracelular (sobre todo, el núcleo) y extracelular (exosomas). Entre sus vías relacionadas están los receptores de membrana y ECM y la vía de diferenciación endodérmica. Según la base de datos MalaCard, el miR-141-3p se asocia con 81 enfermedades en humanos entre las cuales, en segundo lugar, se encuentra el CCR en el que se correlaciona inversamente con los niveles de proteína Smad1(SIP1) y con la migración celular y la invasión de las células del CRC²⁹⁶. Además, SIP1 se identificó como un objetivo funcional del miR-141. Por tanto, según concluyen los autores, miR-141 regula SIP1 para inhibir la migración e invasión de las células del CCR. Por otra parte, el miR-141 y SIP1 podrían ser dianas terapéuticas candidatas en el CCR y, además, el miR-141-3p también está relacionado con el colangiocarcinoma y en el carcinoma renal no papilar, entre otras muchas patologías tumorales y no tumorales (MalaCard).

Respecto a la comparación entre el grupo 2 (adenomas) y el grupo 3 (control) (Tabla 21) permitió detectar cuatro miRNAs con diferentes grados de significación estadística (hsa-

miR-30d-5p, hsa-miR-375-3p, hsa-miR-92a-3p y hsa-miR-200a-3p), pero sólo el hsa-miR-30d-5p muestra una expresión elevada ($p=0,04$), mientras que los hsa-miR-375-3p, hsa-miR-92a-3p y hsa-miR-200a-3p se expresan a la baja sin significación estadística ($p>0.05$). El miR-30d-5p sobre expresado en las muestras del grupo 2 (adenomas), es un miRNA de 22 nucleótidos (rnacentral.org) cuyo gen se localiza en el cromosoma 8 humano. Fue identificado en ratones (cromosoma 15) en 2002 junto a otros 145 miRNAs²⁹⁵, aunque también lo portan los peces, las aves, los reptiles y los mamíferos. El miR-30d se halla en el espacio extracelular y sus dianas son más de 1600 proteínas y más de 350 lncRNAs (rnacentral.org).

Según recoge la base de datos MalaCards (MalaCards) la familia de genes MIR30D que codifica los miRNAs 30d se asocia a diversas neoplasias (pulmón, carcinoma anaplásico de tiroides, carcinoma escamoso oral, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloblástica aguda y enfermedades diversas (lupus eritematoso, enfermedad de Duchenne, esquizofrenia, colangitis, enfermedad hepática alcohólica y enfermedades respiratorias), sumando un total de 24 enfermedades humanas. No hemos encontrado relación con la patología colónica, sean pólipos hiperplásicos, adenomas o CCR (mirbase.org).

En resumen, y dicho es con las reservas obligadas, el perfil de los miRNAs detectado en nuestro estudio no permite asegurar ninguna signatura o firma individual o colectiva (clúster) definitoria de lesión colónica, aunque al menos dos miRNAs (miR-92a-3p y miR-30d-5p) muestran sobreexpresión mientras que el miR-141-3p se expresa a la baja. Este dato está en línea con diversos trabajos de la literatura internacional que definen o tratan de definir perfiles o firmas de miRNAs diagnósticos, en especial de CCR, aunque, no se refieren a lesiones con potencial maligno ni a familiares de sujetos con CCR. Por ejemplo, Qin et al., de 2021²⁹⁷ describen un modelo de 4 pares de miRNAs (miR-

1246/miR-451a; miR-1246/miR-4514; miR-654-5p/miR-575; miR-4299/ miR-575). El modelo de predicción, según los autores, es robusto contra las perturbaciones de las muestras con buen rendimiento para el CCR, el CCR sensible a la quimio o radioterapia y prometedor para otros tipos de cáncer y otras enfermedades no neoplásicas.

En una publicación algo más reciente (2022) Nakamura *et al.*²⁹⁴ aportan un interesante trabajo en el que encuentran un perfil de miRNAs definido en un grupo muy interesante de pacientes con CCR: se trata de los sujetos con neoplasia de comienzo antes de la edad de cincuenta años (*Early-onset colorectal cancer/EOCRC*). El clúster de miRNAs que permite hacer un diagnóstico precoz de CCR en estos sujetos en la cohorte de entrenamiento lo integran cuatro miRNAs (miR-193a-5p, miR-210, miR-513a-5p and miR-628-3p) con un AUC de 0,92 (95% CI=0.85-0.96). El panel se confirmó en la cohorte de validación, mostró robustez ($p < 0,001$) en el diagnóstico precoz de EOCRC y, además, fueron específicos del tumor como mostró una menor expresión tras el tratamiento quirúrgico. Es decir, pueden ser útiles en el control de la respuesta al tratamiento.

Estos estudios, como otros^{298,299} ponen el foco en el CCR, es decir, en la neoplasia establecida y, por otra parte, trabajan con muestras de suero o plasma. Además, y ésta es una norma generalizada, son bastante infrecuentes las series de adenomas salvo cuando entran en el grupo comparativo²⁹⁷. En cualquier caso, aunque nuestra limitada experiencia no permite extraer conclusiones generalizables, el bajo número de muestras es un hecho bastante común en literatura internacional. Por tanto, consideramos que un estudio con un número de pacientes/muestras más amplio tal vez permita definir miRNAs aislados o agrupados en clústeres varios miRNAs con expresión aumentada en las lesiones colónicas pre o neoplásicas.

Tetraspaninas: Como paso previo al análisis de las tetraspaninas, conviene recordar que la membrana plasmática celular (MP) es una capa bilipídica donde las proteínas están embebidas o encajadas. Algunas zonas de la MP ricas en esfingolípidos, colesterol y proteínas ancladas a GPI (glicosilfosfatidilinositol) y resistentes a Tritón-X 100 (agente humectante tensioactivo no iónico) a bajas temperaturas permitieron definir las denominadas balsas lipídicas. Esto hizo pensar en la existencia de otras regiones especializadas en la MP (los llamados microdominios) especializados en funciones diferentes. Uno de estos son los TEMs (*Tetraspanin Enriched Microdomains*), la denominación anglosajona de los microdominios enriquecidos en tetraspaninas.

Las tetraspaninas son proteínas de membrana con una estructura común, altamente conservada. Conforman la denominada superfamilia de las proteínas de transmembrana 4 (*Transmembrane Protein 4 Super Family*, o TM4SF). Se llaman así por estar formadas por cuatro hélices alfa transmembrana y dos dominios o bucles extracelulares (uno corto o EC1, también llamado *Small Extracellular Domaine o Loop*, SED/SEL, y otro largo (EC2 o *Large Extracellular Domaine o Loop*, LED/LEL). Las TM4SF han sido descritas en los tres dominios del árbol de la vida (al menos en algunas amebas, hongos, insectos, gusanos y mamíferos).

Hay descritas al menos 34 tetraspaninas en mamíferos, 33 de las cuales se han detectado en los seres humanos³⁰⁰. Las funciones de las tetraspaninas son complejas y no conocidas totalmente. Pero se sabe que participan de forma activa en la localización y el tráfico de diversas proteínas de membrana e intracitosólicas, un trabajo que hacen a través de los TEMs. Por ejemplo, desempeñan un papel clave en la regulación de la entrada, ensamblaje y transferencia entre células del virus del sida (VIH-1), en especial las tetraspaninas CD81 y CD63³⁰¹. Es decir, pueden participar en la adhesión, migración, protrusión y cambios en la morfología celular.

Por otra parte, el papel de las tetraspaninas en la vía endosómica es indiscutible. Recordamos que la ruta endosómica es el proceso por el que se forman las microvesículas, los exosomas, ectosomas y cuerpos apoptóticos. La secuencia seguida por el sistema endolisosomal es la siguiente: formación de endosomas tempranos, endosomas de reciclaje, endosomas tardíos, cuerpos multivesiculares, fagolisosomas y, finalmente, exosomas/microvesículas. En esta secuencia juegan un papel primordial determinadas enzimas GTPasas ancladas a la cara citosólica de la MP y denominadas Rab. Como también se explicó anteriormente, la vía metabólica del complejo ESCRT y posiblemente otras vías están implicadas en la fase final del proceso.

Las membranas endosómicas (endomembranas) son ricas en tetraspaninas. En especial CD9, CD63 y CD81. Más en concreto, las membranas de los exosomas son más abundantes en CD9, CD63, CD37, CD81 y CD82, en tanto que las microvesículas extracelulares tienen, sobre todo, abundancia en CD9 y CD81. Las tetraspaninas son marcadores de las vesículas extracelulares, un hecho crucial para su detección en el laboratorio. Además, parece que también intervienen en la formación del cargo intravesicular, lo que permite pensar que —en la intercomunicación celular— estas proteínas desempeñan un papel más activo de lo que se podía suponer. Por ejemplo, el bloqueo de CD9 en las células de melanoma demuestra que la ruta de formación de vesículas está ligada al control de calidad de las mitocondrias, lo cual afecta al metabolismo celular y al crecimiento. CD9 regula la secreción y el cargo de las vesículas extracelulares en las células del melanoma humano³⁰².

A la luz de lo dicho, parece obvio pensar que las tetraspaninas no solo conforman la estructura de la membrana vesicular, sino que desempeñan una función activa: participan en la génesis, distribución, transporte y eliminación del contenido y, por consiguiente, de los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos del cargo (en especial y en cuanto a lo que nos

interesa, de los miRNAs). Para incentivar más el interés que generan estas proteínas, se sugiere que también pueden participar en el proceso metastásico de algunos tumores mostrando una acción estimuladora o supresora de la neoplasia, según sean las circunstancias celulares. Es evidente que los marcadores de los exosomas y microvesículas extracelulares son, o pueden ser, algo más que simples señales de identidad citofluorométrica.

De vuelta a nuestra investigación respecto a las tetraspaninas analizadas (CD9, CD81 y CD63), detectamos un nivel mayor de CD9 en los controles respecto a los grupos con patología subyacente. La proporción de CD81 y de CD63 es menor en el grupo 1 (pólipos hiperplásicos) respecto a los grupos 2 (adenomas) y 3 (controles), los cuales (2 y 3) presentan niveles similares. Un estudio con un mayor número de muestras tal vez podría definir un perfil diferencial propio de tetraspaninas en las VEx/exosomas de orina para los distintos estadios de patología colorrectal.

Este trabajo presenta, a nuestro juicio, las siguientes limitaciones: 1. Es un estudio de sólo dos centros con poca heterogeneidad sociodemográfica. 2. El número de muestras es escaso. Pero, como fortaleza del estudio, resaltamos que las muestras de orina permiten una amplia disponibilidad, buena conservación y una fácil manipulación en el laboratorio. En esta línea de razonamientos, la determinación de las tetraspaninas urinarias pudiera servir de biomarcadores de patología colónica subyacente. En tal caso, tal vez no sería necesario realizar el estudio de los miRNAs en exosomas urinarios, sino detectar por citofluorometría de flujo los exosomas en la orina. Su perfil proteico de membrana no sólo serviría como un marcador citofluorométrico, sino que sería un biomarcador *per se*. Un interés mayor aún tendría si se demostrara correlación con algún tipo particular de micro RNA o con alguna agrupación (clúster) de ellos, como empieza a describirse en el

CCR. En tal caso, la(s) tetraspanina(s) se podrían(n) considerar biomarcador(es) de biomarcadores.

VI. CONCLUSIONES.

Con arreglo al objetivo principal (establecer uno o varios microRNAs urinarios que puedan ser útiles como biomarcadores de patología colónica neoplásica o preneoplásica) y secundario (demostrar el valor práctico de la muestra de orina en el análisis de los exosomas de orina y del cargo intravesicular) propuestos en la investigación desarrollada en esta tesis doctoral, se extraen las siguientes conclusiones:

1. Al menos tres microRNAs (miR-92a-3p, miR-141-3p y miR-30d-5p) se expresan diferencialmente en las vesículas extracelulares de los familiares de primer grado de los pacientes con cáncer colorrectal comparados con el grupo control. Además, existen diferencias entre ambos grupos patológicos.
2. El ensayo de determinación de los miRNAs mediante secuenciación masiva, con la técnica de RT-PCR, se muestra muy efectivo.
3. El perfil de expresión de las tetraspaninas (CD9, CD63 y CD81) detectados por citometría de flujo en los familiares de primer grado de los pacientes con cáncer colorrectal es diferente al grupo control.
4. Usando la citometría de flujo, que permite una detección rápida y eficiente, se propone que alguna de estas moléculas marcadoras de vesículas extracelulares podría ser también un biomarcador (biomarcador de biomarcadores).
5. La orina es un líquido biológico excelente para el estudio de biomarcadores.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

1. Global Cancer Observatory. GLOBOCAN. 2020. Disponible en: <http://gco.iarc.fr>. [consultado 12 octubre 2022].
2. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017; 66: 683–91.
3. Asociación Española Contra el Cáncer. Observatorio. 2018 Disponible en: <http://observatorio.aecc.es/#observatorio> [consultado 12 mayo 2021].
4. Kasi PM, Shahjehan F, Cochuyt JJ, Li Z, Colibaseanu DT, Merchea A. Rising proportion of young individuals with rectal and colon cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2019; 18: e87–95.
5. Schoen RE, Razzak A, Yu KJ, Berndt SI, Firl K, Riley TL. Incidence and mortality of colorectal cancer in individuals with a family history of colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2015; 149 (6): 1438-1445.
6. Syngal S, Brand RE, Church JM, Giardiello FM, Hampel HL, Burt RW. American College of Gastroenterology. ACG clinical guideline: Genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *Am J Gastroenterol*. 2015; 110 (2): 223-62; quiz 263.
7. Mankaney G, Roupheal C, Burke CA. Serrated Polyposis Syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2020; 18 (4): 777-779.
8. Jess T, Simonsen J, Jørgensen KT, Pedersen BV, Nielsen NM, Frisch M. Decreasing risk of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease over 30 years. *Gastroenterology*. 2012; 143 (2): 375-81.e1; quiz e13-4.
9. Castaño-Milla C, Chaparro M, Gisbert JP. Systematic review with meta-analysis: the declining risk of colorectal cancer in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014; 39(7): 645-59.
10. Cubiella J, Marzo-Castillejo M, Mascort-Roca JJ, Amador-Romero FJ, Bellas-Beceiro B, Clofent-Vilaplana J, *et al*. Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria y Asociación Española de Gastroenterología. Clinical practice guideline. Diagnosis and prevention of colorectal cancer. 2018 Update. *Gastroenterol Hepatol*. 2018; 41(9): 585-596.

11. Giovannucci E. Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* 2002; 31(4): 925-43.
12. Liu L, Zhuang W, Wang RQ, Mukherjee R, Xiao SM, Chen Z, *et al.* Is dietary fat associated with the risk of colorectal cancer? A meta-analysis of 13 prospective cohort studies. *Eur J Nutr.* 2011; 50(3): 173-84.
13. Beresford SA, Johnson KC, Ritenbaugh C, Lasser NL, Snetselaar LG, Black HR. Low-fat dietary pattern and risk of colorectal cancer: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial. *JAMA.* 2006; 295(6): 643-54.
14. Schatzkin A, Lanza E, Corle D, Lance P, Iber F, Caan B, *et al.* Polyp Prevention Trial Study Group. *N Engl J Med.* 2000; 342(16): 1149-55.
15. Lanza E, Yu B, Murphy G, Albert PS, Caan B, Marshall JR, *et al.* Polyp Prevention Trial Study Group. The polyp prevention trial continued follow-up study: no effect of a low-fat, high-fiber, high-fruit, and vegetable diet on adenoma recurrence eight years after randomization. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(9): 1745-52
16. The International Agency for Research on Cancer (IARC). Evaluation of consumption of red meat and processed meat. IARC Monographs 2015; 114.
17. Vieira AR, Abar L, Chan DSM, Vingeliene S, Polemiti E, Stevens C, *et al.* Foods and beverages and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies, an update of the evidence of the WCRF-AICR Continuous Update Project. *Ann Oncol.* 2017; 28(8): 1788-1802.
18. Bouvard V, Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, Ghissassi FE, Benbrahim-Tallaa L, *et al.* International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol.* 2015; 16 (16): 1599-600.
19. Leenders M, Siersema PD, Overvad K, Tjønneland A, Olsen A, Boutron-Ruault MC, *et al.* Subtypes of fruit and vegetables, variety in consumption and risk of colon and rectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer.* 2015; 137(11): 2705-14.
20. Ben Q, Zhong J, Liu J, Wang L, Sun Y, Yv L, *et al.* Association Between Consumption of Fruits and Vegetables and Risk of Colorectal Adenoma: A PRISMA-Compliant Meta-Analysis of Observational Studies. *Medicine (Baltimore).* 2015; 94(42): e1599.

21. Yao Y, Suo T, Andersson R, Cao Y, Wang C, Lu J, *et al.* Dietary fibre for the prevention of recurrent colorectal adenomas and carcinomas. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017; 1(1): CD003430.
22. IARC. Vitamin D and Cancer. IARC Working Group Reports Vol.5, International Agency for research on Cancer, Lyon, 25 November 2008.
23. Keum N, Lee DH, Greenwood DC, Zhang X, Giovannucci EL. Calcium intake and colorectal adenoma risk: dose-response meta-analysis of prospective observational studies. *Int J Cancer.* 2015;136(7): 1680-7.
24. Veettil SK, Ching SM, Lim KG, Saokaew S, Phisalprapa P, Chaiyakunapruk N. Effects of calcium on the incidence of recurrent colorectal adenomas: A systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis of randomized controlled trials. *Medicine (Baltimore).* 2017; 96(32): e7661.
25. Larsson SC, Orsini N, Wolk A. Vitamin B6 and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA.* 2010; 303(11): 1077-83.
26. Liu Y, Yu QY, Zhu ZL, Tang PY, Li K. Vitamin B2 intake and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis of observational studies. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015; 16(3): 909-13.
27. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012; (3): CD007176.
28. Wang L, Du M, Wang K, Khandpur KS, Rossato SL, Drouin-Chartier JP, *et al.* Association of ultra-processed food consumption with colorectal cancer risk among men and women: results from three prospective US cohort studies. *BMJ* 2022; 378: e068921.
29. Martinez-Useros J, Garcia-Foncillas J. Obesity and colorectal cancer: molecular features of adipose tissue. *J Transl Med.* 2016; 14:21.
30. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K; International Agency for Research on Cancer Handbook Working Group. Body Fatness and Cancer. Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med.* 2016; 375(8): 794-8.
31. Esposito K, Chiodini P, Colao A, Lenzi A, Giugliano D. Metabolic syndrome and risk of cancer: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care.* 2012; 35(11): 2402-11.

32. De Bruijn KM, Arends LR, Hansen BE, Leeftang S, Ruiter R, van Eijck CH. Systematic review and meta-analysis of the association between diabetes mellitus and incidence and mortality in breast and colorectal cancer. *Br J Surg.* 2013; 100(11): 1421-9.
33. Guraya SY. Association of type 2 diabetes mellitus and the risk of colorectal cancer: A meta-analysis and systematic review. *World J Gastroenterol.* 2015; 21(19): 6026-31.
34. Luo S, Li JY, Zhao LN, Yu T, Zhong W, Xia ZS, *et al.* Diabetes mellitus increases the risk of colorectal neoplasia: An updated meta-analysis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2016; 40(1): 110-23.
35. Yuhara H, Steinmaus C, Cohen SE, Corley DA, Tei Y, Buffler PA. Is diabetes mellitus an independent risk factor for colon cancer and rectal cancer? *Am J Gastroenterol.* 2011; 106(11): 1911-21.
36. Boyle T, Keegel T, Bull F, Heyworth J, Fritschi L. Physical activity and risks of proximal and distal colon cancers: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2012; 104(20): 1548-61.
37. Moore SC, Lee IM, Weiderpass E, Campbell PT, Sampson JN, Kitahara CM, *et al.* Association of Leisure-Time Physical Activity With Risk of 26 Types of Cancer in 1.44 Million Adults. *JAMA Intern Med.* 2016; 176(6): 816-25.
38. Bagnardi V, Rota M, Botteri E, Tramacere I, Islami F, Fedirko V, *et al.* Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis. *Br J Cancer.* 2015; 112(3): 580-93.
39. Zhu JZ, Wang YM, Zhou QY, Zhu KF, Yu CH, Li YM. Systematic review with meta-analysis: alcohol consumption and the risk of colorectal adenoma. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014; 40(4): 325-37.
40. Ben Q, Wang L, Liu J, Qian A, Wang Q, Yuan Y. Alcohol drinking and the risk of colorectal adenoma: a dose-response meta-analysis. *Eur J Cancer Prev.* 2015; 24(4): 286-95.
41. Ordóñez-Mena JM, Schöttker B, Mons U, Jenab M, Freisling H, Bueno-de-Mesquita B, *et al.* Consortium on Health and Ageing: Network of Cohorts in Europe and the United States (CHANCES). Quantification of the smoking-associated cancer risk with rate advancement periods: meta-analysis of individual participant data from cohorts of the CHANCES consortium. *BMC Med.* 2016; 14: 62.

42. Bosetti C, Rosato V, Gallus S, Cuzick J, La Vecchia C. Aspirin and cancer risk: a quantitative review to 2011. *Ann Oncol.* 2012; 23 (6): 1403-15.
43. Cole BF, Logan RF, Halabi S, Benamouzig R, Sandler RS, Grainge MJ, *et al.* Aspirin for the chemoprevention of colorectal adenomas: meta-analysis of the randomized trials. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101(4): 256-66.
44. Chubak J, Kamineni A, Buist DSM, Anderson ML, Whitlock EP. Aspirin Use for the Prevention of Colorectal Cancer: An Updated Systematic Evidence Review for the U.S. Preventive Services Task Force [Internet]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2015 Sep. Report No.: 15-05228-EF-1.
45. Chubak J, Whitlock EP, Williams SB, Kamineni A, Burda BU, Buist DS, *et al.* Aspirin for the Prevention of Cancer Incidence and Mortality: Systematic Evidence Reviews for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2016; 164 (12): 814-25.
46. Bibbins-Domingo K; U.S. Preventive Services Task Force. Aspirin Use for the Primary Prevention of Cardiovascular Disease and Colorectal Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *Ann Intern Med.* 2016; 164 (12): 836-45.
47. Jung YS, Park CH, Eun CS, Park DI, Han DS. Metformin use and the risk of colorectal adenoma: A systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2017; 32 (5): 957-965.
48. Bonovas S, Filioussi K, Flordellis CS, Sitaras NM. Statins and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis of 18 studies involving more than 1.5 million patients. *J Clin Oncol.* 2007; 25 (23): 3462-8.
49. Almeida A, Mitchell AL, Boland M, Forster SC, Gloor GB, Tarkowska A, *et al.* A new genomic blueprint of the human gut microbiota. *Nature.* 2019; 568 (7753): 499-504.
50. Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R. Defining the human microbiome. *Nutr Rev.* 2012; 70 Suppl 1(Suppl 1): S38-44.
51. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodríguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017; 18 (1): 197.
52. Wu N, Yang X, Zhang R, Li J, Xiao X, Hu Y, *et al.* Dysbiosis signature of fecal microbiota in colorectal cancer patients. *Microb Ecol.* 2013; 66 (2): 462-70.

53. Wang T, Cai G, Qiu Y, Fei N, Zhang M, Pang X, *et al.* Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J.* 2012; 6 (2): 320-9.
54. Zackular JP, Baxter NT, Iverson KD, Sadler WD, Petrosino JF, Chen GY, *et al.* The gut microbiome modulates colon tumorigenesis. *mBio.* 2013; 4 (6): e00692-13.
55. Borges-Canha M, Portela-Cidade JP, Dinis-Ribeiro M, Leite-Moreira AF, Pimentel-Nunes P. Role of colonic microbiota in colorectal carcinogenesis: a systematic review. *Rev Esp Enferm Dig.* 2015; 107 (11): 659-71.
56. Candela M, Turrone S, Biagi E, Carbonero F, Rampelli S, Fiorentini C, *et al.* Inflammation and colorectal cancer, when microbiota-host mutualism breaks. *World J Gastroenterol.* 2014; 20 (4): 908-22.
57. Kostic AD, Chun E, Robertson L, Glickman JN, Gallini CA, Michaud M, *et al.* *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe.* 2013; 14 (2): 207-15.
58. Li YY, Ge QX, Cao J, Zhou YJ, Du YL, Shen B, *et al.* Association of *Fusobacterium nucleatum* infection with colorectal cancer in Chinese patients. *World J Gastroenterol.* 2016; 22(11): 3227-33.
59. Flanagan L, Schmid J, Ebert M, Soucek P, Kunicka T, Liska V, *et al.* *Fusobacterium nucleatum* associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014; 33: 1381–90.
60. Mima K, Nishihara R, Qian ZR, Cao Y, Sukawa Y, Nowak JA, *et al.* *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut.* 2016; 65: 1973–1980.
61. McCoy AN, Araújo-Pérez F, Azcárate-Peril A, Yeh JJ, Sandler RS, Keku TO. *Fusobacterium* is associated with colorectal adenomas. *PLoS One.* 2013; 8(1): e53653.
62. Song M, Chan AT, Sun J. Influence of the Gut Microbiome, Diet, and Environment on Risk of Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2020; 158(2): 322-340.
63. Sears CL, Geis AL, Housseau F. *Bacteroides fragilis* subverts mucosal biology: from symbiont to colon carcinogenesis. *J Clin Invest.* 2014; 124(10): 4166-72.
64. Boleij A, Hechenbleikner EM, Goodwin AC, Badani R, Stein EM, Lazarev MG, *et al.* The *Bacteroides fragilis* toxin gene is prevalent in the colon mucosa of colorectal cancer patients. *Clin Infect Dis.* 2015; 60(2): 208-15.

65. Bonnet M, Buc E, Sauvanet P, Darcha C, Dubois D, Pereira B, *et al.* Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk. *Clin Cancer Res.* 2014; 20(4): 859-67.
66. Kohoutova D, Smajs D, Moravkova P, Cyrany J, Moravkova M, Forstlova M, *et al.* *Escherichia coli* strains of phylogenetic group B2 and D and bacteriocin production are associated with advanced colorectal neoplasia. *BMC Infect Dis.* 2014;14: 733.
67. Prorok-Hamon M, Friswell MK, Alswied A, Roberts CL, Song F, Flanagan PK, *et al.* Colonic mucosa-associated diffusely adherent afaC+ *Escherichia coli* expressing IpfA and pks are increased in inflammatory bowel disease and colon cancer. *Gut.* 2014; 63 (5): 761-70.
68. Yang Y, Cai Q, Shu XO, Steinwandel MD, Blot WJ, Zheng W, *et al.* Prospective study of oral microbiome and colorectal cancer risk in low-income and African American populations. *Int J Cancer.* 2019; 144(10): 2381-2389.
69. Flemer B, Warren RD, Barrett MP, Cisek K, Das A, Jeffery IB, *et al.* The oral microbiota in colorectal cancer is distinctive and predictive. *Gut.* 2018; 67(8): 1454-1463.
70. Abdulmir AS, Hafidh RR, Abu Bakar F. The association of *Streptococcus bovis/galloyticus* with colorectal tumors: the nature and the underlying mechanisms of its etiological role. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011; 30: 11.
71. Ternhag A, Törner A, Svensson A, Ekdahl K, Giesecke J. Short- and long-term effects of bacterial gastrointestinal infections. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14(1): 143-8.
72. Jess T, Simonsen J, Nielsen NM, Jørgensen KT, Bager P, Ethelberg S, *et al.* Enteric *Salmonella* or *Campylobacter* infections and the risk of inflammatory bowel disease. *Gut.* 2011; 60(3): 318-24.
73. Kato I, Boleij A, Kortman GA, Roelofs R, Djuric Z, Severson RK, *et al.* Partial associations of dietary iron, smoking and intestinal bacteria with colorectal cancer risk. *Nutr Cancer.* 2013; 65(2): 169-77.
74. Nakatsu G, Zhou H, Wu WKK, Wong SH, Coker OO, Dai Z, *et al.* Alterations in Enteric Virome Are Associated With Colorectal Cancer and Survival Outcomes. *Gastroenterology.* 2018; 155(2): 529-541.e5.
75. Coker OO, Nakatsu G, Dai RZ, Wu WKK, Wong SH, Ng SC, *et al.* Enteric fungal microbiota dysbiosis and ecological alterations in colorectal cancer. *Gut.* 2019; 68(4): 654-662.

76. Malik A, Sharma D, Malireddi RKS, Guy CS, Chang TC, Olsen SR, *et al.* SYK-CARD9 Signaling Axis Promotes Gut Fungi-Mediated Inflammasome Activation to Restrict Colitis and Colon Cancer. *Immunity*. 2018; 49(3): 515-530.e5.
77. Leggett B, Whitehall V. Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*. 2010; 138: 2088-100).
78. Hamilton SR, Nakamura SI, Bosman. Carcinoma of the colon and rectum. En: Bosman FT, Carneiro F; Hruban RH, Theise ND. *WHO Classification of tumours of the digestive system*. IARC: Lyon, 2010.
79. Jover R, Bretthauer M, Dekker E, Holme Ø, Kaminski MF, Løberg M, *et al.* Rationale and design of the European Polyp Surveillance (EPoS) trials. *Endoscopy*. 2016; 48(6): 571-8.
80. Atkin W, Wooldrage K, Brenner A, Martin J, Shah U, Perera S, *et al.* Adenoma surveillance and colorectal cancer incidence: a retrospective, multicentre, cohort study. *Lancet Oncol*. 2017; 18(6): 823-834.
81. Hassan C, Antonelli G, Dumonceau JM, Regula J, Bretthauer M, Chaussade S, *et al.* Post-polypectomy colonoscopy surveillance: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline - Update 2020. *Endoscopy*. 2020; 52(8): 687-700.
82. Gupta S, Jacobs ET, Baron JA, Lieberman DA, Murphy G, Ladabaum U, *et al.* Risk stratification of individuals with low-risk colorectal adenomas using clinical characteristics: a pooled analysis. *Gut*. 2017; 66(3): 446-453.
83. Yang S, Farraye FA, Mack C, Posnik O, O'Brien MJ. BRAF and KRAS Mutations in hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colorectum: relationship to histology and CpG island methylation status. *Am J Surg Pathol*. 2004; 28(11): 1452-9.
84. Aust DE, Baretton GB. Members of the Working Group GI-Pathology of the German Society of Pathology. Serrated polyps of the colon and rectum (hyperplastic polyps, sessile serrated adenomas, traditional serrated adenomas, and mixed polyps)-proposal for diagnostic criteria. *Virchows Arch*. 2010; 457(3): 291-7.
85. Arévalo F, Aguilar R, Ramos C, Arias J, Castillo S, Monge E. Polipos inflamatorios de colon: reporte de casos y revisión de literatura [Inflammatory polyps of the colon an evaluation]. *Rev Gastroenterol Peru*. 2009; 29(1): 40-3.
86. Hornick JL, Odze RD. Chapter 19. Polyps of the Large Intestine. En: Odze RD, Goldblum JR: *Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract, and Pancreas*, 2nd ed. Elsevier: Philadelphia 2009).

87. Lee JK, Jensen CD, Levin TR, Doubeni CA, Zauber AG, Chubak J, *et al.* Long-term Risk of Colorectal Cancer and Related Death After Adenoma Removal in a Large, Community-based Population. *Gastroenterology*. 2020;158 (4): 884-894.e5.
88. Reumkens A, Rondagh EJ, Bakker CM, Winkens B, Masclee AA, Sanduleanu S. Post-Colonoscopy Complications: A Systematic Review, Time Trends, and Meta-Analysis of Population-Based Studies. *Am J Gastroenterol*. 2016;111 (8): 1092-101.
89. Rex DK, Repici A, Gross SA, Hassan C, Ponugoti PL, Garcia JR, *et al.* High-definition colonoscopy versus Endocuff versus EndoRings versus full-spectrum endoscopy for adenoma detection at colonoscopy: a multicenter randomized trial. *Gastrointest Endosc*. 2018; 88(2): 335-344.e2.
90. Joseph GN, Heidarnejad F, Sherer EA. Evaluating the Cost-Effective Use of Follow-Up Colonoscopy Based on Screening Findings and Age. *Comput Math Methods Med*. 2019; 2019: 2476565.
91. McFerran E, O'Mahony JF, Fallis R, McVicar D, Zauber AG, Kee F. Evaluation of the Effectiveness and Cost-Effectiveness of Personalized Surveillance After Colorectal Adenomatous Polypectomy. *Epidemiol Rev*. 2017; 39(1): 148-160.
92. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol&Ther* 2000; 69: 89-95.
93. Ruiz-Bañobre J, Raju Kandimalla R, Goel A. Predictive Biomarkers in Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review. *JCO Precision Oncology*, 2019: DOI <https://doi.org/10.1200/PO.18.00260>.
94. Santos E, Tronick SR, Aaronson SA, Pulciani S, Barbacid M. T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes. *Nature*, 1982; 298 (5872): 343.
95. Braun MS, Richman SD, Quirke P, *et al*: Predictive biomarkers of chemotherapy efficacy in colorectal cancer: Results from the UK MRC FOCUS trial. *J Clin Oncol*, 26:2690-2698, 2008.
96. Balaj L, Lessard R, Dai L, Cho Y-J, Pomeroy S, Breakefield X, Skog J. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nature Communications*. 2011; 2. 180. 10.1038/ncomms1180.
97. Cossetti C, Iraci N, Mercer TR, Leonardi T, Alpi E, Drago D, *et al.* Extracellular vesicles from neural stem cells transfer IFN- γ via Ifngr1 to activate Stat1 signaling

- in target cells. *Mol Cell*. 2014 Oct 23;56(2):193-204. doi: 10.1016/j.molcel.2014.08.020.
- 98.** Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Jun;9(6):654-9. doi: 10.1038/ncb1596.
- 99.** Kahlert C, Melo SA, Protopopov A, Tang J, Seth S, Koch M, *et al*. Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *J Biol Chem*. 2014 Feb 14;289(7):3869-75. doi: 10.1074/jbc.C113.532267.
- 100.** Thakur BK, Zhang H, Becker A, Matei I, Huang Y, Costa-Silva B, *et al*. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res*. 2014 Jun;24(6):766-9. doi: 10.1038/cr.2014.44.
- 101.** Lee TH, Chennakrishnaiah S, Audemard E, Montermini L, Meehan B, Rak J. Oncogenic *ras*-driven cancer cell vesiculation leads to emission of double-stranded DNA capable of interacting with target cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 451:295–301. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.109m.
- 102.** Kalra H, Drummen GPC, Mathivanan S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(2): 170. Published online 2016 Feb 6. doi:10.3390/ijms17020170.
- 103.** Mezouar S, Darbousset R, Dignat-George F, Panicot-Dubois L, Dubois C. Inhibition of platelet activation prevents the P-selectin and integrin-dependent accumulation of cancer cell microparticles and reduces tumor growth and metastasis *in vivo*. *Int J Cancer*., 2015; 136:462–475. doi: 10.1002/ijc.28997.
- 104.** Pluskota E, Woody NM, Szpak D, Ballantyne CM, Soloviev DA, Simon DI, Plow EF. Expression, activation, and function of integrin α M β 2 (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. *Blood*., 2008; 112:2327–2335. doi: 10.1182/blood-2007-12-127183.
- 105.** Minciacchi VR, You S, Spinelli C, Morley S, Zandian M, Aspuria PJ, *et al*. Large oncosomes contain distinct protein cargo and represent a separate functional class of tumor-derived extracellular vesicles. *Oncotarget*., 2015; 6:11327–11341. doi: 10.18632/oncotarget.
- 106.** Di Vizio D, Morello M, Dudley AC, Schow PW, Adam RM, Morley S, *et al*. Large oncosomes in human prostate cancer tissues and in the circulation of mice with

- metastatic disease. *Am J Pathol.*, 2012; 181:1573–1584. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.07.030.
- 107.**Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.*1972; 26:239–257. doi: 10.1038/bjc.1972.33.
- 108.**Pan B-T, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes *in vitro*: Selective externalization of the receptor. *Cell.*, 1983; 33:967–978. doi: 10.1016/0092-8674(83)90040-5.
- 109.**Raposo G, Nijman HV, Stoorvogel W, Liejndekker R, Harding CV, Meliee CJ, Geuze HJ. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med.* 1996, 183, 1161–1172.
- 110.**Admyre C., Johansson S.M., Paulie S., Gabrielsson S. Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT. *Eur. J. Immunol.* 2006; 36:1772–1781. doi: 10.1002/eji.200535615.
- 111.**Simhadri VR, Reiners KS, Hansen HP, Topolar D, Simhadri VL, Nohroudi K, *et al.* Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function. *PLoS One.* 2008;3(10): e3377. doi: 10.1371/journal.pone.0003377.
- 112.**Gu Y, Rosenblatt J. New emerging roles for epithelial cell extrusion. *Curr Opin Cell Biol.* 2012; 24(6):865-70. doi: 10.1016/j.ceb.2012.09.003.
- 113.**Demory Beckler M, Higginbotham JN, Franklin JL, Ham AJ, Halvey PJ, Imasuen IE, *et al.* Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS. *Mol Cell Proteomics.* 2013 Feb;12(2):343-55. doi: 10.1074/mcp.M112.022806.
- 114.**Chiba M, Kimura M, Asari S. Exosomes secreted from human colorectal cancer cell lines contain mRNAs, microRNAs and natural antisense RNAs, that can transfer into the human hepatoma HepG2 and lung cancer A549 cell lines. *Oncol Rep.* 2012;28(5):1551-1558. doi:10.3892/or.2012.1967.
- 115.**Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, Mathivanan S. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics.* 2009 Jun;6(3):267-83. doi: 10.1586/epr.09.17.
- 116.**Choi DS, Kim DK, Kim YK, Gho YS. Proteomics of extracellular vesicles: Exosomes and ectosomes. *Mass Spectrom Rev.* 2015 Jul-Aug;34(4):474-90. doi: 10.1002/mas.21420.

117. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol.* 2002 Aug;2(8):569-79. doi: 10.1038/nri855.
118. Miller K, Beardmore J, Kanety H, Schlessinger J, Hopkins CR. Localization of the epidermal growth factor (EGF) receptor within the endosome of EGF-stimulated epidermoid carcinoma (A431) cells. *J Cell Biol.* 1986 Feb; 102(2):500-9.
119. Sorkin A, Goh LK. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp Cell Res.* 2009 Feb 15; 315(4):683-96.
120. Théry C., Ostrowski M., Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9: 581–593. doi: 10.1038/nri2567/131-133.
121. Conde-Vancells J., Rodriguez-Suarez E., Embade N., Gil D., Matthiesen R., Valle M., et al. Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *J. Proteome Res.* 2008; 7:5157–5166. doi: 10.1021/pr8004887.
122. Subra C, Grand D, Laulagnier K, Stella A, Lambeau G, Paillasse M, et al. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J Lipid Res.*, 2010; 51:2105–2120. doi: 10.1194/jlr.M003657.
123. Mathivanan S, Lim JW, Tauro BJ, Ji H, Moritz RL, Simpson RJ. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. *Mol Cell Proteom.*, 2010; 9:197–208. doi: 10.1074/mcp.M900152-MCP200.
124. Rashed M, Bayraktar E, K Helal G, Abd-Ellah MF, Amero P, Chavez-Reyes A, Rodriguez-Aguayo C. Exosomes: From Garbage Bins to Promising Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci.* 2017 Mar 2;18(3):538. doi: 10.3390/ijms18030538.
125. Crick FH, Barnett L, Brenner S, Watts-Tobin RJ. General nature of the genetic code for proteins. *Nature*, 1961; 192:1227–1232.
126. Consortium EP. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 2012; 489:57–74.
127. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993; 75:843–854.
128. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 1993; 75:855–862.

129. Schmitz KJ, Hey S, Schinwald A, Wohlschlaeger J, Baba HA, Worm K, Schmid KW. Differential expression of microRNA 181b and microRNA 21 in hyperplastic polyps and sessile serrated adenomas of the colon. *Virchows Arch*, 2009; 455:49–54.
130. Cekaite L, Eide PW, Lind G, Skotheim RI, Lothe RA. MicroRNAs as growth regulators, their function and biomarker status in colorectal cancer. *Oncotarget*, 2015; 7: 64766505.
131. Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J, *et al.* Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*, 2009; 58:1375–1381.
132. Toiyama Y, Takahashi M, Hur K, Nagasaka T, Tanaka K, Inoue Y, *et al.* Serum miR-21 as a diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2013; 105:849–859.
133. Link A, Balaguer F, Shen Y, Nagasaka T, Lozano JJ, Boland CR, *et al.* Fecal microRNAs as novel biomarkers for colon cancer screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010; 19:1766-74.
134. Wu CW, Ng SS, Dong YJ, Ng SC, Leung WW, Lee CW, *et al.* Detection of miR-92a and miR-21 in stool samples as potential screening biomarkers for colorectal cancer and polyps. *Gut*, 2012; 61:739–745.
135. Koga Y, Yamazaki N, Yamamoto Y, Yamamoto S, Saito N, Kakugawa Y, *et al.* Fecal miR-106a is a useful marker for colorectal cancer patients with false negative results in immunochemical fecal occult blood test. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013; 22:1844–1852.
136. Hermida Lazcano I, Sánchez Tejero E, Nerín Sánchez C, Cordero Bernabé R, Mora Escudero I, Pinar Sánchez J. Marcadores Tumorales. *Rev Clin Med Fam*. 2016; 9 (1): 31-42.
137. Ahmed FE, Ahmed NC, Vos PW, Bonnerup C, Atkins JN, Casey M, *et al.* Diagnostic microRNA markers to screen for sporadic human colon cancer in stool: I. Proof of principle. *Cancer Genomics Proteomics*. 2013; 10:93-113.
138. Yau TO, Wu CW, Tang CM, Chen Y, Fang J, Dong Y, *et al.* MicroRNA-20a in human faeces as a non-invasive biomarker for colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016; 7:1559-68.
139. Nagy ZB, Wichmann B, Kalmár A, Galamb O, Barták BK, Spisák S, *et al.* Colorectal adenoma and carcinoma specific miRNA profiles in biopsy and their expression in plasma specimens. *Clin Epigenetic*. 2017; 9:22.

140. Uratani R, Toiyama Y, Kitajima T, Kawamura M, Hiro J, Kobayashi M, *et al.* Diagnostic potential of cell-free and exosomal microRNAs in the identification of patients with high-risk colorectal adenomas. *PLoS One*. 2016; 11: e0160722.
141. Tsikitis VL, Potter A, Mori M, Buckmeier JA, Preece CR, Harrington CA, *et al.* MicroRNA signatures of colonic polyps on screening and histology. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2016; 9:942-9.
142. Bartley AN, Yao H, Barkoh BA, Ivan C, Mishra BM, Rashid A, *et al.* Complex patterns of altered microRNA expression during the adenoma-adenocarcinoma sequence for microsatellite-stable colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2011; 17:7283-93.
143. Liu G, Li B. Role of miRNA in transformation from normal to colorectal adenoma and cancer. *J Can Res Ther*. 2019; 15: 278-285.
144. Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, Ju J. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin embedded samples. *RNA*. 2007; 13:1668–1674.
145. Shibuya H, Iinuma H, Shimada R, Horiuchi A, Watanabe T. Clinicopathological and prognostic value of microRNA-21 and microRNA-155 in colorectal cancer. *Oncology*. 2010; 79:313–320.
146. Kjaer-Frifeldt S, Hansen TF, Nielsen BS, Joergensen S, Lindebjerg J, Soerensen FB, *et al.* Danish Colorectal Cancer G. The prognostic importance of miR-21 in stage II colon cancer: a population-based study. *Br J Cancer*. 2012; 107:1169–1174.
147. Kulda V, Pesta M, Topolcan O, Liska V, Treska V, Sutnar A, *et al.* Relevance of miR-21 and miR-143 expression in tissue samples of colorectal carcinoma and its liver metastases. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010; 200:154–160.
148. Bovell LC, Shanmugam C, Putcha BD, Katkoori VR, Zhang B, Bae S, *et al.* The prognostic value of microRNAs varies with patient race/ethnicity and stage of colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2013; 19:3955–3965.
149. Poston GJ, Figueras J, Giuliante F, Nuzzo G, Sobrero AF, Gigot JF, *et al.* Urgent need for a new staging system in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008; 26:4828–4833.
150. Faltejiskova P, Besse A, Sevcikova S, Kubickova L, Svoboda M, Smarda J, Kiss I, Vyzula R, Slaby O. Clinical correlations of miR-21 expression in colorectal cancer patients and effects of its inhibition on DLD1 colon cancer cells. *Int J Colorectal Dis*. 2012; 27:1401–1408.

- 151.**Bitarte N, Bandres E, Boni V, Zarate R, Rodriguez J, Gonzalez-Huarriz M, *et al.* MicroRNA-451 is involved in the self-renewal, tumorigenicity, and chemoresistance of colorectal cancer stem cells. *Stem Cells*. 2011; 29:1661– 1671.
- 152.**Tadano T, Kakuta Y, Hamada S, Shimodaira Y, Kuroha M, Kawakami Y, *et al.* MicroRNA-320 family is downregulated in colorectal adenoma and affects tumor proliferation by targeting CDK6. *World J Gastrointest Oncol*. 2016; 8:532-42.
- 153.**Chen T, Cai SL, Li J, Qi ZP, Li XQ, Ye LC, *et al.* Mecp2-mediated epigenetic silencing of miR-137 contributes to colorectal adenoma-carcinoma sequence and tumor progression via relieving the suppression of c-met. *Sci Rep*. 2017; 7:44543.
- 154.**Meng LH, Zhang H, Hayward L, Takemura H, Shao RG, Pommier Y. Tetrandrine induces early G1 arrest in human colon carcinoma cells by down-regulating the activity and inducing the degradation of G1-S-specific cyclin-dependent kinases and by inducing p53 and p21Cip1. *Cancer Res*. 2004; 64:9086-92.
- 155.**Sun D, Yu F, Ma Y, Zhao R, Chen X, Zhu J, *et al.* MicroRNA-31 activates the RAS pathway and functions as an oncogenic microRNA in human colorectal cancer by repressing RAS p21 GTPase activating protein 1 (RASA1). *J Biol Chem*. 2013; 288:9508-18.
- 156.**Consortium EP. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 2012; 489:57–74.
- 157.**Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*. 2010; 464:1071–1076.
- 158.**Kogure T, Yan IK, Lin WL, Patel T. Extracellular Vesicle-Mediated Transfer of a Novel Long Noncoding RNA TUC339: A Mechanism of Intercellular Signaling in Human Hepatocellular Cancer. *Genes Cancer*. 2013; 4:261–272.
- 159.**Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, Fedewa SA, Butterly LF, *et al.* Colorectal cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020 May;70(3):145-164. doi: 10.3322/caac.21601.
- 160.**Lambertz I, Nittner D, Mestdagh P, Denecker G, Vandesompele J, Dyer MA, Marine JC. Monoallelic but not biallelic loss of Dicer1 promotes tumorigenesis in vivo. *Cell Death Differ*. 2010 Apr;17(4):633-41. doi: 10.1038/cdd.2009.202.
- 161.**Struberg AM, Madison BB. MicroRNAs in the etiology of colorectal cancer: pathways and clinical implications. *Dis Model Mech*. 2017; 10(3): 197-214.

162. Singh A and Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, 2010; 29, 4741-4751.
163. Meacham CE and Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*, 2013; 501, 328-337.
164. Hwang W-L, Jiang J-K, Yang S-H, Huang T-S, Lan H-Y, Teng H.-W, *et al.* MicroRNA-146a directs the symmetric division of Snail-dominant colorectal cancer stem cells. *Nat Cell Biol*, 2014; 16: 268-280. doi:10.1038/ncb2910.
165. Karaayvaz M, Pal T, Song B, Zhang C, Georgakopoulos P, Mehmood S, *et al.* Prognostic significance of miR-215 in colon cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 2011; 10: 340-347.
166. Faltejskova P, Svoboda M, Srutova K, Mlcochova J, Besse A, Nekvindova J, *et al.* Identification and functional screening of microRNAs highly deregulated in colorectal cancer. *J Cell Mol. Med*, 2012; 16: 2655-2666.
167. Chiang Y, Song Y, Wang Z, Liu Z, Gao P, Liang J, *et al.* microRNA-192, -194 and -215 are frequently downregulated in colorectal cancer. *Exp Ther Med*. 2012; 3, 560-566.
168. Li Q, Zou C, Zou C, Han Z, Xiao H, Wei H, *et al.* MicroRNA-25 functions as a potential tumor suppressor in colon cancer by targeting Smad7. *Cancer Lett*, 2013a; 335: 168-174.
169. Bu P, Wang L, Chen KY, Srinivasan T, Murthy PK, Tung KL, *et al.* A miR-34a-Numb Feedforward Loop Triggered by Inflammation Regulates Asymmetric Stem Cell Division in Intestine and Colon Cancer. *Cell Stem Cell*. 2016 Feb 4;18(2):189-202. doi: 10.1016/j.stem.2016.01.006.
170. Kamanu TKK, Radovanovic A, Archer JA. C, Bajic VB. Exploration of miRNA families for hypotheses generation. *Sci Rep*, 2013; 3: 2940. doi:10.1038/srep02940.
171. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, *et al.* Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*, 2014; 64, 3753-3756.
172. Johnson CD, Esquela-Kersche A, Stefani G, Byrom M, Kelnar K, Ovcharenko D, *et al.* The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res*, 2007; 67: 7713-7722.
173. Shell S, Park S-M, Radjabi AR, Schickel R, Kistner EO, Jewell DA, *et al.* Let-7 expression defines two differentiation stages of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007; 104: 11400-11405.

- 174.**Boyernas B, Park S-M, Shomron N, Hedegaard MM, Vinther J, Andersen JS, *et al.* Identification of let-7-regulated oncofetal genes. *Cancer Res*, 2008; 68: 2587-2591.doi:10.1158/0008-5472.
- 175.**Viswanathan SR, Powers JT, Einhorn W, Hoshida Y, Ng TL, Toffanin S, *et al.* Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nat Genet*, 2009; 41: 843-848.
- 176.**Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch AM, Gingras MC, *et al.* Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*. 2016 Mar 3;531(7592):47-52. doi: 10.1038/nature16965.
- 177.**Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012 Jul 18;487(7407):330-7. doi: 10.1038/nature11252.
- 178.**Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, Evans P, Bacchicocchi A, McCusker JP, *et al.* Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet*. 2012 Sep;44(9):1006-14. doi: 10.1038/ng.2359.
- 179.**Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, *et al.* The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015 Nov;21(11):1350-6. doi: 10.1038/nm.3967.
- 180.**MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*. 2009 Jul;17(1):9-26. doi: 10.1016/j.devcel.2009.06.016.
- 181.**Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, Schuebel KE, Markowitz SD, Chen WD, *et al.* Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet*. 2004 Apr;36(4):417-22. doi: 10.1038/ng1330.
- 182.**Koo B-K, Spit M, Jordens I, Low TY, Stange DE, Van de Wetering M. Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature*. 2012 Aug 30;488(7413):665-9. doi: 10.1038/nature11308.
- 183.**Kim NH, Kim HS, Kim NG, Lee I, Choi HS, Li XY, *et al.* p53 and microRNA-34 are suppressors of canonical Wnt signaling. *Sci Signal*. 2011 Nov 1;4(197):ra71. doi: 10.1126/scisignal.2001744.
- 184.**Subramanian M, Rao SR, Thacker P, Chatterjee S, Karunakaran D. MiR-29b downregulates canonical Wnt signaling by suppressing coactivators of beta-catenin in human colorectal cancer cells. *J Cell Biochem*. 2014 Nov;115(11):1974-84. doi: 10.1002/jcb.24869.

- 185.**Ito M, Mitsuhashi K, Igarashi H, Nosho K, Naito T, Yoshii S, *et al.* MicroRNA-31 expression in relation to BRAF mutation, CpG island methylation and colorectal continuum in serrated lesions. *Int J Cancer*. 2014 Dec 1;135(11):2507-15. doi: 10.1002/ijc.28920.
- 186.**Wan YC, Li T, Han YD, Zhang HY, Lin H, Zhang B. MicroRNA-155 enhances the activation of Wnt/beta-catenin signaling in colorectal carcinoma by suppressing HMG-box transcription factor 1. *Mol Med Rep*. 2016 Mar;13(3):2221-8. doi: 10.3892/mmr.2016.4788.
- 187.**Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, *et al.* RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005 Mar 11;120(5):635-47. doi: 10.1016/j.cell.2005.01.014.
- 188.**Esquela-Kerscher A, Trang P, Wiggins JF, Patrawala L, Cheng A, Ford L, *ET AL.* The let-7 microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer. *Cell Cycle*. 2008 Mar 15;7(6):759-64. doi: 10.4161/cc.7.6.5834.
- 189.**Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell*, 2009 Nov 13;139(4):693-706. doi: 10.1016/j.cell.2009.10.014.
- 190.**King CE, Wang L, Winograd R, Madison BB, Mongroo PS, Johnstone CN, Rustgi AK. LIN28B fosters colon cancer migration, invasion, and transformation through let-7-dependent and -independent mechanisms. *Oncogene*. 2011 Oct 6;30(40):4185-93. doi: 10.1038/onc.2011.131.
- 191.**Madison BB, Liu Q, Zhong X, Hahn CM, Lin N, Emmett MJ, *et al.* LIN28B promotes growth and tumorigenesis of the intestinal epithelium via Let-7. *Genes Dev*. 2013 Oct 15;27(20):2233-45. doi: 10.1101/gad.224659.113.
- 192.**Madison BB, Jeganathan AN, Mizuno R, Winslow MM, Castells A, Cuatrecasas M, Rustgi AK. Let 7 Represses Carcinogenesis and a Stem Cell Phenotype in the Intestine via Regulation of Hmga2. *PLoS Genet*. 2015 Aug 5;11(8):e1005408. doi: 10.1371/journal.pgen.1005408.
- 193.**Kent OA, Mendell JT, Rottapel R. Transcriptional Regulation of miR-31 by Oncogenic KRAS Mediates Metastatic Phenotypes by Repressing RASA1. *Mol Cancer Res*. 2016 Mar;14(3):267-77. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0456.
- 194.**Sun D, Yu F, Ma Y, Zhao R, Chen X, Zhu J, *et al.* MicroRNA-31 activates the RAS pathway and functions as an oncogenic MicroRNA in human colorectal cancer by

- repressing RAS p21 GTPase activating protein 1 (RASA1). *Biol Chem*. 2013 Mar 29;288(13):9508-18. doi: 10.1074/jbc.M112.367763.
- 195.**Domingo E, Espín E, Armengol M, Oliveira C, Pinto M, Duval A, *et al*. Activated BRAF targets proximal colon tumors with mismatch repair deficiency and MLH1 inactivation. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004 Feb; 39(2):138-42. doi: 10.1002/gcc.10310.
- 196.**Richman S. Deficient mismatch repair: Read all about it (Review). *Int J Oncol*. 2015 Oct;47(4):1189-202. doi: 10.3892/ijo.2015.3119.
- 197.**Nosho K, Igarashi H, Nojima M, Ito M, Maruyama R, Yoshii S, *et al*. Association of microRNA-31 with BRAF mutation, colorectal cancer survival and serrated pathway. *Carcinogenesis*. 2014 Apr;35(4):776-83. doi: 10.1093/carcin/bgt374.
- 198.**Ito M, Mitsuhashi K, Igarashi H, Nosho K, Naito T, Yoshii S, *et al*. MicroRNA-31 expression in relation to BRAF mutation, CpG island methylation and colorectal continuum in serrated lesions. *Int J Cancer*. 2014 Dec 1;135(11):2507-15. doi: 10.1002/ijc.28920.
- 199.**Takeda Y, Venkitaraman AR. Micro(mi) RNA-34a targets protein phosphatase (PP)1 γ to regulate DNA damage tolerance. *Cell Cycle*. 2015;14(24):3830-41. doi: 10.1080/15384101.2015.1064202.
- 200.**Ebner OA, Selbach M. Quantitative proteomic analysis of gene regulation by miR-34a and miR-34c. *PLoS One*. 2014 Mar 17;9(3):e92166. doi: 10.1371/journal.pone.0092166.
- 201.**Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Sep 25;104(39):15472-7. doi: 10.1073/pnas.0707351104.
- 202.**He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, *et al*. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*. 2007 Jun 28;447(7148):1130-4. doi: 10.1038/nature05939.
- 203.**Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E, Spector Y, Rosenfeld N, Moskovits N, *et al*. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell*. 2007 Jun 8;26(5):731-43. doi: 10.1016/j.molcel.2007.05.017.
- 204.**Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, Lodygin D, Epanchintsev A, Menssen A, *et al*. Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel

- sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle*. 2007 Jul 1;6(13):1586-93. doi: 10.4161/cc.6.13.4436.
- 205.**Okada N, Lin CP, Ribeiro MC, Biton A, Lai G, He X, *et al.* A positive feedback between p53 and miR-34 miRNAs mediates tumor suppression. *Genes Dev*. 2014 Mar 1;28(5):438-50. doi: 10.1101/gad.233585.113.
- 206.**Rokavec M, Öner MG, Li H, Jackstadt R, Jiang L, Lodygin D, *et al.* IL-6R/STAT3/miR-34a feedback loop promotes EMT-mediated colorectal cancer invasion and metastasis. *Clin Invest*. 2014 Apr;124(4):1853-67. doi: 10.1172/JCI73531.
- 207.**Lasry A, Zinger A, Ben-Neriah Y. Inflammatory networks underlying colorectal cancer. *Nat Immunol*. 2016 Mar;17(3):230-40. doi: 10.1038/ni.3384.
- 208.**Buchanan FG, DuBois RN. Connecting COX-2 and Wnt in cancer. *Cancer Cell*. 2006 Jan;9(1):6-8. doi: 10.1016/j.ccr.2005.12.029.
- 209.**Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, *et al.* Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res*. 1995 Sep 1;55(17):3785-9.
- 210.**Peacock O, Lee AC, Cameron F, Tarbox R, Vafadar-Isfahani N, Tufarelli C, Lund JN. Inflammation and MiR-21 pathways functionally interact to downregulate PDCD4 in colorectal cancer. *PLoS One*. 2014 Oct 13;9(10):e110267. doi: 10.1371/journal.pone.0110267.
- 211.**Ma G, Zhang H, Dong M, Zheng X, Ozaki I, Matsushashi S, Guo K. Downregulation of programmed cell death 4 (PDCD4) in tumorigenesis and progression of human digestive tract cancers. *Tumour Biol*. 2013 Dec;34(6):3879-85. doi: 10.1007/s13277-013-0975-9.
- 212.**Mudduluru G, Medved F, Grobholz R, Jost C, Gruber A, Leupold JH, *et al.* Loss of programmed cell death 4 expression marks adenoma-carcinoma transition, correlates inversely with phosphorylated protein kinase B, and is an independent prognostic factor in resected colorectal cancer. *Cancer*. 2007 Oct 15;110(8):1697-707. doi: 10.1002/cncr.22983.
- 213.**Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*. 1999 Jul;11(1):115-22. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80086-2.

214. Shi C, Yang Y, Xia Y, Okugawa Y, Yang J, Liang Y, *et al.* Novel evidence for an oncogenic role of microRNA-21 in colitis-associated colorectal cancer. *Gut*. 2016 Sep;65(9):1470-81. doi: 10.1136/gutjnl-2014-308455.
215. Ma Y, Zhang P, Wang F, Zhang H, Yang Y, Shi C, *et al.* Elevated oncofoetal miR-17-5p expression regulates colorectal cancer progression by repressing its target gene P130. *Nat Commun*. 2012;3: 1291. doi: 10.1038/ncomms2276.
216. Sokolova V, Fiorino A, Zoni E, Crippa E, Reid JF, Gariboldi M, Pierotti MA. The Effects of miR-20a on p21: Two Mechanisms Blocking Growth Arrest in TGF- β -Responsive Colon Carcinoma. *J Cell Physiol*, 2015; 230: 3105-3114. <https://doi.org/10.1002/jcp.25051>.
217. Xu T, Jing C, Shi Y, Miao R, Peng L, Kong S, *et al.* microRNA-20a enhances the epithelial-to-mesenchymal transition of colorectal cancer cells by modulating matrix metalloproteinases. *Exp Ther Med*, 2015 Aug;10(2):683-688. doi: 10.3892/etm.2015.2538.
218. Cheng D, Zhao S, Tang H, Zhang D, Sun H, Yu F, *et al.* MicroRNA-20a-5p promotes colorectal cancer invasion and metastasis by downregulating Smad4. *Oncotarget*, 2016 Jul 19;7(29):45199-45213. doi: 10.18632/oncotarget.9900.
219. Feng B, Dong TT, Wang ML, Wang LL, Zhou HM, *et al.* Colorectal Cancer Migration and Invasion Initiated by microRNA-106a. *PLOS ONE* 2012; 7(8): 10.1371/annotation/cbf27742-b6c5-4e1a-a7a1-c8141415b2d8.
220. Song L, Lin C, Wu Z, Gong H, Zeng Y, Wu J, *et al.* miR-18a Impairs DNA Damage Response through Downregulation of Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) Kinase. *PLoS ONE*, 2011; 6(9): e25454. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025454>.
221. Nishida N, Yokobori T, Mimori K, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, *et al.* MicroRNA miR-125b is a prognostic marker in human colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2011 May;38(5):1437-43. doi: 10.3892/ijo.2011.969.
222. McKenna LB, Schug J, Vourekas A, McKenna JB, Bramswig NC, Friedman JR, *et al.* MicroRNAs control intestinal epithelial differentiation, architecture, and barrier function. *Gastroenterology*. 2010 Nov;139(5):1654-64, 1664.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2010.07.040.
223. Wang X, Wang J, Ma H, Zhang J, Zhou X. Downregulation of miR-195 correlates with lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Med Oncol*. 2012 Jun;29(2):919-27. doi: 10.1007/s12032-011-9880-5.

224. Xiao X, Huang Ch, Zhao Ch, Gou X, Senavirathna LK, Hinsdale M, *et al.* Regulation of myofibroblast differentiation by miR-424 during epithelial-to-mesenchymal transition. *Arch Biochem Bioph.* 2015; 566: 49-57. ISSN 0003-9861, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.12.007>.
225. Zaravinos A. The Regulatory Role of MicroRNAs in EMT and Cancer. *J Oncol.* 2015;2015: 865816. doi: 10.1155/2015/865816.
226. Korpál M, Ell BJ, Buffa FM, Ibrahim T, Blanco MA, Celià-Terrassa T, *et al.* Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization. *Nat Med.* 2011 Aug 7;17(9):1101-8. doi: 10.1038/nm.2401.
227. Diepenbruck M, Christofori G. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe? *Curr Opin Cell Biol.* 2016 Dec;43:7-13. doi: 10.1016/j.ceb.2016.06.002.
228. Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev.* 2008 Apr 1; 22(7):894-907. doi: 10.1101/gad.1640608.
229. Davalos V, Moutinho C, Villanueva A, Boque R, Silva P, Carneiro F, Esteller M. Dynamic epigenetic regulation of the microRNA-200 family mediates epithelial and mesenchymal transitions in human tumorigenesis. *Oncogene.* 2012 Apr 19;31(16):2062-74. doi: 10.1038/onc.2011.383.
230. Hur K, Toiyama Y, Takahashi M, Balaguer F, Nagasaka T, Koike J, *et al.* MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis. *Gut.* 2013 Sep;62(9):1315-26. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301846.
231. Toiyama Y, Okugawa Y, Goel A. DNA methylation and microRNA biomarkers for noninvasive detection of gastric and colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Dec 5;455(1-2):43-57. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.001.
232. Meng LH, Zhang H, Hayward L, Takemura H, Shao RG, Pommier Y. Tetrandrine induces early G1 arrest in human colon carcinoma cells by down-regulating the activity and inducing the degradation of G1-S-specific cyclin-dependent kinases and by inducing p53 and p21Cip1. *Cancer Res.* 2004 Dec 15;64(24):9086-92. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0313.
233. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, *et al.* Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1988 Sep 1;319(9):525-32. doi: 10.1056/NEJM198809013190901.

- 234.**Le Rolle AF, Chiu TK, Zeng Z, Shia J, Weiser MR, Paty PB, Chiu VK. Oncogenic KRAS activates an embryonic stem cell-like program in human colon cancer initiation. *Oncotarget*. 2016 Jan 19;7(3):2159-74.
- 235.**Bartley AN, Yao H, Barkoh BA, Ivan C, Mishra BM, Rashid A, *et al.* Complex patterns of altered MicroRNA expression during the adenoma-adenocarcinoma sequence for microsatellite-stable colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2011 Dec 1;17(23):7283-93. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1452.
- 236.**Colangelo T, Polcaro G, Ziccardi P, Muccillo L, Galgani M, Pucci B, *et al.* The miR-27a-calreticulin axis affects drug-induced immunogenic cell death in human colorectal cancer cells. *Cell Death Dis*. 2016 Feb 25;7(2): e2108. doi: 10.1038/cddis.2016.29.
- 237.**Pernot S, Terme M, Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Tartour E, Taieb J. Colorectal cancer, and immunity: what we know and perspectives. *World J Gastroenterol*. 2014 Apr 14;20(14):3738-50. doi: 10.3748/wjg.v20.i14.3738.
- 238.**Raghavan M, Wijeyesakere SJ, Peters LR, Del Cid N. Calreticulin in the immune system: ins and outs. *Trends Immunol*. 2013 Jan;34(1):13-21. doi:0.1016/j.it.2012.08.002.
- 239.**Martin TA, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG. Loss of tight junction plaque molecules in breast cancer tissues is associated with a poor prognosis in patients with breast cancer. *Eur J Cancer*, 2004 Dec;40(18):2717-25. doi: 10.1016/j.ejca.2004.08.008.
- 240.**Jiang WG, Ablin RJ, Kynaston HG, Mason MD. The prostate transglutaminase (TGase-4, TGaseP) regulates the interaction of prostate cancer and vascular endothelial cells, a potential role for the ROCK pathway. *Microvasc Res*, 2009 Mar;77(2):150-7. doi: 10.1016/j.mvr.2008.09.010.
- 241.**Zhou W, Fong MY, Min Y, Somlo G, Liu L, Palomares MR, *et al.* Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell*, 2014 Apr 14;25(4):501-15. doi: 10.1016/j.ccr.2014.03.007.
- 242.**Yin Y, Song M, Gu B, Qi X, Hu Y, Feng Y, *et al.* Systematic analysis of key miRNAs and related signaling pathways in colorectal tumorigenesis. *Gene*, 2016 Mar 10;578(2):177-84. doi: 10.1016/j.gene.2015.12.015.
- 243.**Reymond N, Im JH, Garg R, Vega FM, Borda d'Agua B, Riou P, *et al.* Cdc42 promotes transendothelial migration of cancer cells through β 1 integrin. *J Cell Biol*, 2012 Nov 12;199(4):653-68. doi: 10.1083/jcb.201205169.

244. Gómez Del Pulgar T, Valdés-Mora F, Bandrés E, Pérez-Palacios R, Espina C, Cejas P, *et al.* Cdc42 is highly expressed in colorectal adenocarcinoma and downregulates ID4 through an epigenetic mechanism. *Int J Oncol*, 2008 Jul;33(1):185-93.
245. Humphreys KJ, McKinnon RA, Michael MZ. miR-18a inhibits CDC42 and plays a tumor suppressor role in colorectal cancer cells. *PLoS One*, 2014 Nov 7;9(11):e112288. doi: 10.1371/journal.pone.0112288.
246. Tang J, Chen J, Wang Y, Zhou Sh. The role of MiRNA-433 in malignant tumors of digestive tract as tumor suppressor. *Cancer Reports*, 2022;5: e1694. <https://doi.org/10.1002/cnr2.1694>.
247. Li J, Mao X, Wang X, Miao G, Li J. miR-433 reduces cell viability and promotes cell apoptosis by regulating MACC1 in colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2017;13(1):81-88.
248. Li H, Li J, Yang T, Lin S, Li H. MicroRNA-433 represses proliferation and invasion of colon cancer cells by targeting Homeobox A1. *Oncol Res*. 2018;26(2):315-322.
249. Yan L, You WQ, Sheng NQ, Gong JF, Hu LH, Tan GV, *et al.* A CREB1/miR-433 reciprocal feedback loop modulates proliferation and metastasis in colorectal cancer. *Aging (Albany NY)*. 2018;10(12):3774-3793.
250. Zhang J, Zhang L, Zhang T, Dong XM, Zhu Y, Chen LH. Reduced miR-433 expression is associated with advanced stages and early relapse of colorectal cancer and restored miR-433 expression suppresses the migration, invasion and proliferation of tumor cells in vitro and in nude mice. *Oncol Lett*. 2018;15(5):7579-7588.
251. Yu X, Odenthal M, Fries JWU. Exosomes as miRNA Carriers: Formation-Function-Future. *Int Mol Sci*. 2016; 17: 2028; doi:10.3390/ijms17122028.
252. Lin M, Zhou Ch, He S, Yu H, Guo T, Ye J, *et al.* The research advances of exosomes in esophageal cancer. *Biomark Med*. 2019; 13(8): 685–695. DOI: 10.2217/bmm-2018-0314.
253. Bigagli E, Luceri C, Guasti D, Cinci L. Exosomes secreted from human colon cancer cells influence the adhesion of neighboring metastatic cells: Role of microRNA-210. *Cancer Biol Ther*. 2016 Oct 2;17(10):1062-1069. doi: 10.1080/15384047.2016.1219815.
254. Mulvey HE, Chang A, Adler J, Del Tatto M, Perez K, Quesenberry PJ, Chatterjee D. Extracellular vesicle-mediated phenotype switching in malignant and non-malignant colon cells. *BMC Cancer*. 2015 Aug 1;15:571. doi: 10.1186/s12885-015-1568-3.

255. Asangani IA, Harms PW, Dodson L, Pandhi M, Kunju LP, Maher CA, *et al.* Genetic and epigenetic loss of microRNA-31 leads to feed-forward expression of EZH2 in melanoma. *Oncotarget*. 2012 Sep;3(9):1011-25. doi: 10.18632/oncotarget.622.
256. Ruiz-López L, Blancas I, Garrido JM, Mut-Salud N, Moya-Jódar M, Osuna A, Rodríguez-Serrano F. The role of exosomes on colorectal cancer: A review. *J Gastroenterol Hepatol*. 2018 Apr;33(4):792-799. doi: 10.1111/jgh.14049.
257. Nazarenko I, Rana S, Baumann A, McAlear J, Hellwig A, Trendelenburg M, *et al.* Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer Res*. 2010 Feb 15;70(4):1668-78. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2470.
258. Harada T, Yamamoto H, Kishida S, Kishida M, Awada C, Takao T, Kikuchi A. Wnt5b-associated exosomes promote cancer cell migration and proliferation. *Cancer Sci*. 2017 Jan;108(1):42-52. doi: 10.1111/cas.13109.
259. Huber V, Fais S, Iero M, Lugini L, Canese P, Squarcina P, *et al.* Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology*. 2005 Jun;128(7):1796-804. doi: 10.1053/j.gastro.2005.03.045.
260. Akao Y, Khoo F, Kumazaki M, Shinohara H, Miki K, Yamada N. Extracellular disposal of tumor-suppressor miRs-145 and -34a via microvesicles and 5-FU resistance of human colon cancer cells. *Int J Mol Sci*. 2014 Jan 20;15(1):1392-401. doi: 10.3390/ijms15011392.
261. Villagrasa A, Álvarez PJ, Osuna A, *et al.* Exosomes Derived from Breast Cancer Cells, Small Trojan Horses? *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2014; 19: 303–313. <https://doi.org/10.1007/s10911-015-9332-5>.
262. Ju J. Implications of miRNAs in Colorectal Cancer Chemoresistance. *Int Drug Discov*. 2011 Feb-Mar; 2011:2063.
263. Hu Y, Yan C, Mu L, Huang K, Li X, Tao D, *et al.* Fibroblast-Derived Exosomes Contribute to Chemoresistance through Priming Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer. *PLoS One*. 2015 May 4;10(5):e0125625. doi: 10.1371/journal.pone.0125625.
264. Pritchard CC, Kroh E, Wood B, Arroyo JD, Dougherty KJ, Miyaji MM, *et al.* Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012 Mar;5(3):492-497. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0370. Epub 2011 Dec 12.

265. Vickers KC, Remaley AT. Lipid-based carriers of microRNAs and intercellular communication. *Curr Opin Lipidol.* 2012 Apr;23(2):91-7. doi: 10.1097/MOL.0b013e328350a425.
266. Wiggins RC, Glatfelter A, Kshirsagar B, Brukman J. Procoagulant activity in normal human urine associated with subcellular particles. *Kidney International* 1986; 2: 591–597.
267. Spanu S, van Roeyen CR, Denecke B, Floege J, Muhlfeld AS. Urinary exosomes: a novel means to non-invasively assess changes in renal gene and protein expression. *PloS One* (2014) 9(10):e109631. doi: 10.1371/ journal.pone.0109631.
268. Williams C, Rodriguez-Barrueco R, Silva JM, Zhang WJ, Hearn S, Elemento O, *et al.* Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res.* 2014; 24(6):766–9. doi: 10.1038/cr.2014.44.
269. Ramachandran S, Palanisamy V. Horizontal transfer of RNAs: exosomes as mediators of intercellular communication. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2012);3 (2):286–93. doi: 10.1002/wrna.115.
270. Salih M, Zietse R, Hoorn EJ. Urinary extracellular vesicles and the kidney: biomarkers and beyond. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014; 306(11):F1251–9. doi: 10.1152/ajprenal.00128.2014.
271. McKiernan J, Donovan MJ, Margolis E, Partin A, Carter B, Brown G, *et al.* A prospective adaptive utility trial to validate performance of a novel urine exosome gene expression assay to predict high-grade prostate cancer in patients with prostate-specific antigen 2-10ng/ml at initial biopsy. *Eur Urol.* 2018;74(6):731– 8. doi: 10.1016/j.eururo.2018.08.019.
272. Barros ER, Carvajal CA. Urinary exosomes and their cargo: Potential biomarkers for mineralocorticoid arterial hypertension? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017; 8:230. doi: 10.3389/fendo.2017.00230.
273. Wu A, Wolley MJ, Fenton RA, Stowasser M. Using human urinary extracellular vesicles to study physiological and pathophysiological states and regulation of the sodium chloride cotransporter. *Front Endocrinol.* 2022; 13:981317. doi: 10.3389/fendo.2022.981317.
274. Hendriks RJ, Dijkstra S, Jannink SA, Steffens MG, van Oort IM, Mulders PF, Schalken JA. Comparative analysis of prostate cancer specific biomarkers PCA3 and ERG in whole urine, urinary sediments, and exosomes. *Clin Chem Laborat Med* 2016; 3: 483–492

275. Hiemstra, T. F., Charles, P. D., Gracia, T., Hester, S. S., Gatto, L., Al-Lamki, R., *et al.* Human urinary exosomes as innate immune effectors. *Journal of the American Society of Nephrology* 2014; 9, 2017–2027.
276. van Dongen HM, Masoumi N, Witwer KW, Pegtel DM. Extracellular vesicles exploit viral entry routes for cargo delivery. *Microbiol Molec Biol Rev* 2016; 2, 369–386
277. Miranda KC, Bond DT, Levin JZ, Adiconis X, Sivachenko A, Russ C, *et al.* Massively parallel sequencing of human urinary exosome/microvesicle RNA reveals a predominance of non-coding RNA. *PLoS One* 2014; 5, E96094
278. Barreiro K, Huber TB, Holthofer H. Isolating urinary extracellular vesicles as biomarkers for diabetic disease. *Meth Mol Biol* 2020, 175–188.
279. Everaert C, Helsmoortel H, Decock A, Hulstaert E, Van Paemel R, Verniers K. Performance assessment of total RNA sequencing of human biofluids and extracellular vesicles. *Scientific Reports* 2019, 1:17574.
280. Veziroglu EM, Mias GI. Characterizing extracellular vesicles and their diverse RNA contents. *Frontiers in Genetics* 2020, 700.
281. Mateescu B, Kowal EJ, van Balkom BW, Bartel S, Bhattacharyya, SN, Buzas EI, *et al.* Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA - an ISEV position paper. *J Extracell Ves* 2017; 1: 1286095.
282. Bryzgunova OE, Zaripov MM, Skvortsova TE, Lekchnov EA, Grigor'eva AE, Zaporozhchenko IA., *et al.* Comparative study of extracellular vesicles from the urine of healthy individuals and prostate cancer patients. *PLoS One* 2016; 6, E0157566.
283. Zhou H, Yuen PS, Pisitkun T, Gonzales PA, Yasuda H, Dear JW, *et al.* Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Kidney Int.* 2006; 69(8):1471–6. doi: 10.1038/ sj.ki.5000273.
284. Clos-Garcia M, Loizaga-Iriarte A, Zuniga-Garcia P, Sanchez-Mosquera P, Cortazar AR, Gonzalez E, *et al.* Metabolic alterations in urine extracellular vesicles are associated to prostate cancer pathogenesis and progression. *J Extracel Ves* 2018; 1, 1470442.
285. Del Boccio P, Raimondo F, Pieragostino D, Morosi L, Cozzi G, Sacchetta P, *et al.* A hyphenated microLC-Q-TOF-MS platform for exosomal lipidomics investigations: Application to RCC urinary exosomes. *Electrophoresis* 2012; 4: 689–696.

- 286.** Skotland T, Ekroos K, Kauhanen D, Simolin H, Seierstad T, Berg V, *et al.* Molecular lipid species in urinary exosomes as potential prostate cancer biomarkers. *Eur J Cancer* 2017; 122–132
- 287.** Skotland T, Hessvik NP, Sandvig K, Llorente A. Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology. *J Lip Res* 2019; 1, 9–18.
- 288.** Puhka M, Takatalo M, Nordberg ME, Valkonen S, Nandania J, Aatone M, *et al.* Metabolomic profiling of extracellular vesicles and alternative normalization methods reveal enriched metabolites and strategies to study prostate cancer-related changes. *Theranostics* 2017; 16: 3824–3841.
- 289.** Thery C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the international society for extracellular vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018; 7(1):1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.
- 290.** Øverbye A, Skotland T, Koehler CJ, Thied B, Seierstad T, Berge V, *et al.* Identification of prostate cancer biomarkers in urinary exosomes. *Oncotarget* 2015; 30:30357–30376.
- 291.** Gonzales P, Pisitkun T, Knepper MA. Urinary exosomes: is there a future. *Nephrol Dial Transplant*. 2008; 23: 1799–180.
- 292.** Erdbrügger U, Blijdorp Ch J, Bijnsdorp IV, Borràs FE, Burger D, Bussolati B, *et al.* Urinary extracellular vesicles: A position paper by the Urine Task Force of the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Ves* 2021; 10: e12093.
- 293.** Nassar D, Blanpain C. Cancer stem cells: basic concepts and therapeutic implications. *Ann Rev Pathol* 2016; 11: 47–76.
- 294.** Nakamura K, Hernández G, Sharma GG, *et al.* A Liquid Biopsy Signature for the Detection of Patients with Early-Onset Colorectal Cancer. *Gastroenterology* DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2022.06.089>.
- 295.** Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 2002; 12:735-739.
- 296.** Hu M, XiaMG, Chen X, Lin Z, Xu Y, Ma Y, Su L. MicroRNA-141 regulates Smad interacting protein 1 (SIP1) and inhibits migration and invasion of colorectal cancer cells. *Digestive diseases and sciences* 2010; 55: 2365–2372.

- 297.**Qin D, Guo Q, Wei R, Liu S, Zhu S, Zhang S and Min L. Predict Colon Cancer by Pairing Plasma miRNAs: Establishment of a Normalizer-Free, Cross-Platform Model. *Front Oncol* 2021; 11:561763. doi: 10.3389/fonc.2021.561763.
- 298.**Wang W, Qu A, Liu W, et al. Circulating miR-210 as a diagnostic and prognostic biomarker for colorectal cancer. *Eur J Cancer Care (Engl)* 2017;26. Mosakhani N, Sarhadi VK, Borze I, et al. MicroRNA profiling differentiates colorectal cancer according to KRAS status. *Genes Chromosomes Cancer* 2012; 51:1-9.
- 299.**Li W, Chang J, Tong D, et al. Differential microRNA expression profiling in primary tumors and matched liver metastasis of patients with colorectal cancer. *Oncotarget* 2017; 8:35783-35791.
- 300.**Suárez Montero H. *Papel de las tetraspaninas en la internalización y el tráfico de moléculas asociadas en modelos tumorales y de infección viral*. Tesis doctoral. Dir: María Yáñez Mó. Universidad Autónoma de Madrid, 2019.
- 301.**Suárez H, Rocha-Perugini V, Álvarez S and Yáñez-Mó M. Tetraspanins, Another Piece in the HIV-1 Replication Puzzle. *Front Immunol* 2018; 9:1811. doi: 10.3389/fimmu.2018.01811.
- 302.**Suárez H, Andreu Z, Mazzeo C, Toribio V, Pérez-Rivera A.E, López-Martín S, *et al.* CD9 inhibition reveals a functional connection of extracellular vesicle secretion with mitophagy in melanoma cells. *J Extracell Ves* 2021;10(7), e12082 <http://doi.org/10.1002/jev2.12082>.

IX. ANEXOS.









Anexo I. Hoja de recogida de datos.

HOJA RECOGIDA DE DATOS



- Código:
 - Edad:
 - Sexo:
 - Nacionalidad:
 - Comorbilidades:
 - Fumador: SI / NO
 - Bebedor: SI / NO
 - Consumidor de carne roja: SI / NO núm días/semana:
 - Consumidor de fibra, vegetales o fruta: SI / NO
 - Ejercicio físico regular: SI / NO
 - Antiagregantes/AINES: SI / NO
 - AF CCR:
 - Otros AF de cáncer:
 - Colonoscopia:
 - Completa/Incompleta
 - Calidad preparación: Boston
 - Número de pólipos:
 - Otros hallazgos:
 - Anatomía Patológica:
-

Anexo II. Escala limpieza intestinal de Boston.

ELCB		3	2	1	0
3 = Excelente					
2 = Buena					
1 = Mala					
0 = Inadecuada					
CI	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CT	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CD	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ELCB = <input type="checkbox"/>					

Anexo III. Hoja informativa para el paciente.

INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE

PROYECTO: *ESTUDIO DE MICRO-RNAs (mi-RNAs) VEHICULADOS EN VESÍCULAS EXTRACELULARES DE ORINA MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA, COMO POSIBLES BIOMARCADORES DE RIESGO TUMORAL EN SUJETOS CON PÓLIPOS COLÓNICOS Y FAMILIARES DE PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL.*

Paciente:

Paciente ID#:

Centro:

Centro ID#:

Investigador:

POR FAVOR, LEA DETENIDAMENTE LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN ESTE DOCUMENTO Y ASEGÚRESE QUE ENTIENDE ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN. SI ESTÁ DE ACUERDO EN PARTICIPAR EN EL ESTUDIO, FIRME ESTE DOCUMENTO. POR SU FIRMA RECONOCE QUE HA SIDO INFORMADO DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL PROYECTO, DE SUS REQUISITOS Y DE SUS RIESGOS, SI LOS HUBIERA, Y DE QUE ACEPTA LIBREMENTE PARTICIPAR EN ÉL. UNA COPIA DEL PRESENTE DOCUMENTO LE SERÁ ENTREGADA Y DEBERÁ GUARDARLA.

OBJETO DEL ESTUDIO.

Ha sido invitado/a a participar en un estudio de investigación no invasivo dirigido a evaluar el posible riesgo asociado a tener pólipos intestinales para desarrollar un carcinoma de colon (CCR) por su condición de familiar de primer grado de un paciente ya diagnosticado de CCR o, en su caso, por el hecho de tener los pólipos.

PROCEDIMIENTOS Y DURACIÓN DEL ESTUDIO.

El único procedimiento al que será sometido/a será la obtención de una muestra de sangre y una muestra de orina. La duración del proyecto será de dos años, durante los cuales usted nos autoriza a realizar la toma de muestras. Las muestras anonimizadas que cede serán utilizadas exclusivamente con finalidad de investigación sin ánimo de lucro.

RESULTADOS DEL ESTUDIO.

Al finalizar el estudio se le informará del resultado global del mismo si usted lo desea, pero NO de su resultado personal, que se tratará con total confidencialidad de acuerdo con la Declaración de Helsinki y la Ley 14/2007, de Investigación biomédica.

RIESGOS DERIVADOS DE LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO.

Los riesgos asociados a la toma de muestras de sangre son mínimos (los propios de una extracción/pinchazo en la vena). Se empleará material estéril individual y desechable y las muestras se obtendrán por personal cualificado. La muestra de orina no conlleva riesgo ni molestias asociados.

BENEFICIOS.

La participación en el proyecto no será recompensada económicamente ni aportará beneficios económicos a los investigadores. Aparte de lo comentado anteriormente, se estima que el desarrollo del estudio en el que usted participará tal vez podrá comportar beneficios a medio plazo en el diagnóstico precoz del cáncer colorrectal y en el conocimiento de la patogenia de este tipo de cáncer.

COSTES.

El coste de la extracción y procesamiento de las muestras, así como los análisis posteriores serán cubiertos por el proyecto. Su participación no le supondrá ningún coste.

La investigadora principal, doña María MUÑOZ GARCÍA-BORRUEL, puede ser contactada en el teléfono 954229293, a fin de recabar información acerca del proyecto y en la siguiente dirección:

Unidad de Digestivo-Endoscopias

Centro médico Arenal

C/ Pastor y Landero, 9, 11 y 13

41001 Sevilla

En ningún caso su decisión de no participar en el proyecto le supondrá una rebaja en la calidad asistencial por parte de su médico.

CONFIDENCIALIDAD DE SU MUESTRA.

De acuerdo con la normativa legal vigente, los resultados de las muestras se tratarán con total confidencialidad. El protocolo de recogida de datos será archivado, y a cada

participante se le asignará una clave de tal modo que no pueda relacionarse la muestra e información obtenida con la identidad del sujeto. Las muestras serán anonimizadas, asegurando la imposibilidad de inferir su identidad, para su estudio y potencial análisis ulterior.

La investigadora principal del proyecto se compromete a que la confidencialidad de los datos que se puedan obtener en dicho proyecto será escrupulosamente observada, y que los datos personales de los sujetos participantes no serán conocidos por el resto de los investigadores. En los casos que corresponda, éstos informarán al responsable médico o a los afectados si creen que algún resultado del proyecto podría ser de su interés.

La investigadora principal del proyecto se compromete a no utilizar las muestras para otros estudios diferentes a los de este estudio y a no traspasar las muestras a otros posibles proyectos o equipos de investigación.

Para todo lo no previsto en este documento, se aplicará la legislación vigente sobre protección de datos de carácter personal (Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, BOE 274 de 15 de noviembre de 2002; Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal; BOE 298 de 14 de diciembre de 1999; Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal, BOE 17 de 19 de enero de 2008), sobre investigación biomédica (Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica; BOE 159 de 4 de julio de 2007) y cualquier otra que resultara aplicable.

Si fuese necesario el almacenamiento de las muestras para análisis ulteriores, tal como recoge la Ley 41/2007, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica (art. 9.3), el consentimiento escrito del paciente será necesario para cada una de las actuaciones que se lleven a cabo. Acción que podrá ser ejercitada por el paciente, por sus representantes, o por sus herederos si éste hubiera fallecido.

Los resultados del estudio pueden ser publicados en revistas científicas, en congresos científicos, en publicaciones de carácter general o en foros académicos universitarios. No obstante, la información concerniente a su participación será mantenida como confidencial.

Recibirá una copia de esta hoja de información y del consentimiento informado firmado por usted.

DECLARACIÓN DEL PACIENTE.

He sido informado por el personal relacionado con el proyecto mencionado:

- De las ventajas e inconvenientes de este procedimiento.
- Del fin para el que se utilizarán mis muestras.
- He sido informado de que las muestras que cedo serán utilizadas exclusivamente con finalidad de investigación sin ánimo de lucro.
- Que mis muestras serán proporcionadas de forma anónima a los investigadores del proyecto.
- Que en cualquier momento puedo solicitar información genérica sobre los estudios para los que se han utilizado mis muestras.
- Que he comprendido la información recibida y he podido formular todas las preguntas que he creído oportunas.

Usted tiene derecho de participar o no en la investigación y de retirar su consentimiento en cualquier fase del estudio. Como se menciona anteriormente, en ningún caso su decisión de no participar en el proyecto le supondrá una rebaja en la calidad asistencial por parte de su médico.

Anexo IV. Consentimiento informado.

CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE

Por el presente escrito, yo, don /doña.....
mayor de edad, en plenas facultades para decidir de forma autónoma, con DNI
nº.....y domicilio en la calle.....
de la ciudad de.....,

AUTORIZO a doña MARÍA MUÑOZ GARCÍA-BORRUEL, investigadora principal del proyecto titulado “*Estudio de los microRNAs vehiculados en exosomas como posibles biomarcadores de riesgo de desarrollo de carcinoma colorrectal en los sujetos con pólipos colónicos y familiares de pacientes con cáncer colorrectal*”, a obtener sendas muestras de sangre y de orina las cuales servirán para hacer los análisis oportunos. Con este trabajo se pretende averiguar si un análisis de sangre y/u orina puede servir para el diagnóstico precoz del carcinoma colorrectal (CCR) en personas de riesgo (familiares de primer grado con pólipos colónicos).

La investigadora me ha informado, de forma verbal y mediante una hoja informativa, de que el estudio no repercutirá económicamente ni en mí ni en el equipo de investigadores, que se procesarán las muestras de forma anónima respetando mi derecho a la intimidad y la protección de datos según la legislación vigente. También estoy informado/a de otros aspectos legales y éticos (hoja informativa) y de que el trabajo, con fines académicos, servirá de tesis doctoral de la investigadora principal.

Firmo este escrito y una copia de mi propiedad en la ciudad de Sevilla, a de de
20__

Fdo. Don/doña

Fdo. Doña María MUÑOZ GARCÍA-BORRUEL
Investigadora principal

Anexo V. Autorización Comité de Ética de Investigación Clínica (CEIC).



JUNTA DE EXTREMADURA
Consejería de Sanidad y Políticas Sociales

D. JULIO BENÍTEZ RODRÍGUEZ, SECRETARIO DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE BADAJOZ

CERTIFICA:

Que este Comité ha evaluado el Proyecto Tesis Doctoral de D^a. María Muñoz García-Borrueal titulado: *"Estudio de los microRNAs vehiculados en exosomas como posibles biomarcadores de riesgo de desarrollo de carcinoma colorrectal en lo sujetos con pólipos colónicos y familiares de pacientes con cáncer colorrectal"*, dirigido por el Prof. Dr. D. Agustín Muñoz Sanz y el Dr. D. Alberto Álvarez Barrientos, siendo la tutora la Prof. Dra. D^a. M.^a Jesús Lorenzo Benayas.

Y mediante este documento expresa que este proyecto se ajusta a las normas éticas esenciales utilizadas como referencia en este ámbito y ha decidido por unanimidad expresar la idoneidad científica del proyecto así como su apoyo al mismo.

Lo que Certifico para su conocimiento y efectos en Badajoz a 19 de junio de 2019.



18002909

