



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

DESARROLLO DE NUEVAS  
HERRAMIENTAS EN BIOPSIA LÍQUIDA  
APLICADAS A CÁNCER DE MAMA Y  
GLIOMAS

Adrià Asensi i Puig

Universitat Autònoma de Barcelona

2022

Esta tesis está cofinanciada por el Ministerio de Economía y Competitividad, dentro de la convocatoria Retos-Colaboración del Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad, en el marco del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016, y por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), en el contexto de los proyectos Glibioliquid (RTC-2016-4990-1) y Metabreast (RTC-2016-5674-1).

Tesis doctoral presentada por:

**Adrià Asensi i Puig**

Para optar al grado de:

**Doctor en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina**

Bajo la dirección de:

**Dr. Víctor González  
Rumayor**

---

**Dra. Noemí García  
Romero**

---

Bajo tutela de:

**Dra. Francesca Canalias  
Reverter**

---

Departament de Bioquímica, Biologia molecular i Biomedicina

Universitat Autònoma de Barcelona

2022



A la mare.

Anomenar-les totes, les formes del mal,  
i cridar-ho: *tu ets el meu enemic i tu ets jo!*



## Agraïments

Aquestes pàgines són per a vosaltres. Per a tota aquella gent que m'ha ajudat a assolir aquesta fita que semblava impossible. Per a tots/es aquells/aquelles que m'heu acompanyat en aquest trajecte carregat d'emocions. Per a vosaltres, que m'heu suportat quan tot per a mi era negre i m'heu llançat un cap per ajudar-me a sortir de la foscor. Vosaltres, amb qui també he compartit moments feliços de somriures i rialles, de cafès i cigarretes, de dinars i pastissos, de sopars i festes. Aquestes pàgines són per a vosaltres.

Començaré per agrair a Atrys per apostar per mi i fer-me confiança en l'empresa de la primera tesis de la companyia. Per brindar-me l'oportunitat de cursar uns estudis de doctorat quan jo ja m'havia fet a la idea que mai em doctoraria. Anna, aquest agraïment també va per tu, sense tu, no estaria escrivint aquestes paraules avui.

Recordo els meus inicis, quan Atrys encara es deia Althia i ens coneixíem tots. Els del laboratori i els dels despatxos. Érem una gran família. Vaig començar els meus passos per la patologia molecular "real" de la mà de la Malena. Moltes gràcies per guiar-me en aquestes primeres passes i per ensenyar-me tant. També per ser-hi en els moments més complicats i per animar-me a continuar i a no deixar de lluitar per aconseguir els meus objectius. També agrair a l'Eva, que, a part de queixar-se de la calor "*chica muere de calor en Althia*", sempre ens explicava els secrets de totes i cadascuna de les tècniques del laboratori. Tant ella com la Rosa en sabien un munt. Rosa, a tu t'agraeixo les tertúlies a l'hora del cafè o al trobar-nos per casualitat pel laboratori. A l'altra Rosa, que quan estava al departament de patologia molecular no parava de demanar-me papers sobre les incidències i que tingués tots els fulls de tanda ben enumerats per les auditories. Ana, a tu gràcies pels bons moments i per a ensenyar-me que el món de l'hematologia no en té res, d'avorrit. Sempre recordaré la "*master-class*" que vam impartir junts a Mojácar.

També t'he d'agrair a tu, Enric, les estones compartides. Com parlàvem de tot i res i arreglàvem el món mentre ens menjàvem una amanida xinesa. Com maleíem Mordor entre mossegada i mossegada de pollastre amb salsa d'ametlles. Aquells dinars eren un oasi enmig del desert. Carles, per a tu també n'hi ha. Gràcies pels pastissos, les galetes, els "*cheese cakes*". Saps que et demanaré un ramen dels teus quan hagi acabat. Alba, has estat un dels pilars que m'ha aguantat més aquests anys. Haver estat pares quasi a l'hora ha fet que les nostres converses de l'últim any giressin al voltant dels petits. Ens ho hem passat bé.

Jonathan, a tu agrair-te la teva confiança. Quan em passava alguna cosa sabia a qui havia d'anar. M'has ajudat en els pitjors moments, però també ens ho hem passat d'allò més bé. Tant en els bons moments, com en els dolents, gràcies per ser-hi. Antonio, Álvaro, Ana, Maite, Estrella, Dubi i Eli hem passat bons moments plegats i més que m'agradaria haver-ne viscut. Quan acabi el

doctorat muntem un altre sopar. Us prometo que no me'l perdré. Khalid, germà, quina gran persona que ets. Amb tu també hem compartit estones molt especials, m'has fet costat sempre que ho he necessitat i sempre has tingut una abraçada per a mi.

A la Gemma, l'Estrella, la Sílvia i la Mercedes amb qui he compartit els dinars a la una. Gràcies per les converses desenfadades que hem mantingut tot aquest temps i per donar-me ànims quan estava baix de moral. Mar, a tu agrair-te que m'alliberessis del pes dels anàlisis d'altres projectes i alleugeressis la meva càrrega de treball. M'has vist en moments divertits i en moments tristos, gràcies per escoltar-me i per la teva paciència.

A tota la gent del laboratori que m'han hagut d'aguantar durant els pitjors dies. A tots vosaltres us agraeixo que sempre em féssiu costat i que sempre tinguéssiu bones paraules i algun acudit per aixecar-me els ànims. Irina, Carla, Pau, gràcies per acompanyar-me i aguantar-me els dies que els resultats no eren els esperats. A tu Mariona també t'agraeixo haver-me fet costat i haver tingut sempre una paraula amable per a mi. Recordo els teus inicis a Atrys amb el TFM, com has avançat en aquests anys, segueix així!

Pere, hores de microscopi al teu costat. Tertúlies sobre societat, esports i actualitat. Vas ser un pilar de la I+D durant molts anys, i a mi em vas ensenyar el valor de la ciència en el seu estat més pur. Gràcies per tot.

Irma, Xavi, Marta. Gràcies per guiar-me pel gran món de les classificacions de les diferents patologies. Xavi, gràcies per compartir la teva saviesa i experiència amb mi, ha estat un gran plaer escoltar-te. Irma, mil gràcies també per les teves converses que tant m'han ajudat a tirar endavant, no només la tesi sinó a seguir perseguint els meus somnis.

A nuestros socios de Proyectos, gracias por haber hecho posible este trabajo. Sin vuestra colaboración esta tesis no sería una realidad. Dr. Sánchez Rovira, muchas gracias por estar siempre atento a que los pacientes se introdujeran debidamente en la base de datos electrónica. A toda la gente del SAS que ha formado parte de este viaje, muchas gracias por vuestro trabajo. También agradecer a HM Hospitales por facilitarnos las tan apreciadas muestras de pacientes con tumores gliales. Ángel, eres una fuente de información inagotable, gracias por compartirla.

Aquí viene un agradecimiento muy especial, este va por ti Judit! Por superar la prueba de entender mis Excel interminables. ¡Esos aislamientos de VEs, extracciones de ADN, extracciones de ARN y demás que solo tú sabes procesar tan y tan bien! ¡Tus manos hacen milagros con las muestras, gracias! A ti Carlos, que me has ayudado a reentender la estadística y te has peleado con las enésimas versiones de esta tesis, gracias. También a Pili, que durante unos meses nos echó un cable, muchas gracias.

A Mavys, por su inestimable ayuda en el análisis de la detección de la mutación *IDH1*<sup>395G>A</sup>. Muchas gracias por tu dedicación, atención e interés en que todo funcionase como es debido. Muchas gracias Mavys.

A los miembros de la comisión de seguimiento Anna, Tito y Kiku. Muchas gracias por formar parte esta comisión y dedicarme parte de vuestro tiempo. Vuestros consejos en cada comisión de seguimiento anual han servido para que esta tesis haya sido exitosa. También agradecer a los miembros del tribunal titulares y suplentes Juan Luís, Atocha (Anna y Tito, vosotros repetís agradecimiento). Gracias por aveniros a formar parte de él.

A Víctor, mi jefe y director. Siempre has sabido como darme ese empujón que es tan necesario para continuar. Agradecerte la confianza depositada en mi para poder llevar a buen puerto esta tesis. No ha sido un proceso fácil, soy consciente de ello pero creo que formamos un buen tándem y equipo de trabajo. Sin ti, esta tesis no sería lo que es. También gracias por estar cerca en los diferentes momentos difíciles que han sucedido durante estos años. Muchas gracias por todos los sabios consejos sobre la vida misma, me los llevo todos conmigo.

Noe, tengo tantas cosas que agradecerte que necesitaría dos páginas más en los agradecimientos. Que caña me has dado en tus revisiones, siempre sabiendo como decir las cosas directas pero con tacto. Has estado a mi lado, acompañándome cuando todo parecía gris oscuro. Has sido para mí mucho más que una directora de tesis. Eres un ejemplo para mí. Tu dedicación y perseverancia son encomiables. ¡Nos debemos una celebración por todo lo alto!

Nadina, tot i no ser directora, saps que per a mi els teus consells han estat en la més alta consideració. No només has format part d'aquesta tesi, per mi, formes part de la meva vida. Ets plenament coneixedora de l'estima que et tinc. Com m'has ajudat, sobretot aquest últim any tan difícil per a mi. Sempre hi has estat, sempre m'has recolzat. Gràcies per les converses al despatx que han contribuït a formar-me i m'han permès seguir mirant endavant. També gracies per totes les abraçades sinceres que m'han omplert part del buit que m'ha quedat. M'encanta veure com se t'il·luminen els ulls quan veus al petit Guerau i t'hi presentes autoanomenant-te tieta. Per a mi, a part de ser un gran exemple, també ets com la meva tieta. Un infinit GRÀCIES per a tu!

Als amics de tota la vida, que no hi són sempre però sempre hi són. Marc, Pau, Jordi, Miki, Toni, Bernat. Això va per vosaltres. També als amics de nova collita, units per els naixements dels nostres fills, a vosaltres que també hi sou sempre i que ara ja sempre hi sereu. Gerard, Meri i Ton. Francesc, Maria, Max i el nouvingut Xavi. Gràcies per acompanyar-me en aquest llarg camí.

A la meva família, fans incondicionals. Gràcies a tots vosaltres per fer-me passar moments inoblidables. El vostre suport ha estat fonamental per a mi. Pepi, To, Tatos, Guiu i Xènia, sabeu que per a mi sou uns altres avis, pares i germans. Hem compartit tantes vivències... Gràcies per

ser-hi sempre! Maria i Ricard, ja sabeu com ens agrada compartir estones amb vosaltres, sou un exemple com a família. Gràcies per les converses eternes, tot i que de vegades intenteu posar-me el cap sobre les espatlles. Martí, Clàudia. Que ràpid passen les hores amb vosaltres. Jaume i Rosa Maria, amb vosaltres sempre gaudim de les millors menges i companyia. Sole, gràcies a tu soc qui soc, gràcies per acollir-me a casa teva i tergiversar la teva vida, aquesta tesi també la vas començar tu. Txell, Albert, Iona, Jordi i Queralt. Àstrid, Carles, Pol i Aniol. Consol i Anton. Rosa i Nonna. És difícil de veure'ns plegats, però quan ens ajuntem tots, som una gran família!

Rosa, què fariem sense tu a casa. Ajuda inestimable la teva, tant amb el Guerau com amb les feines quotidianes. Els matins són molt més fàcils quan hi ets. Saps que ets part de la família. Gràcies per preguntar cada dia: Com portes allò dels estudis? I afegir-hi sempre un “molts ànims” reconfortant.

Toni i Isabel. Per a mi també sou com uns pares, gràcies per ser tan atents, per oferir-nos sempre la comoditat d'un dinar a casa vostra. Per les vostres paraules sempre sinceres i reconfortants. Per les vostres abraçades i per ser unes persones genials. Gràcies per deixar-me entrar en les vostres vides. Gerard, Marta, Pol i Biel. Tot i estar a les antípodes, en els moments importants sempre hi sou presents. Que bé ens ho passem quan estem junts. Desitjo veure-us aviat, abraçar aquests nebots tan guapos i veure el Guerau, el Pol i el Biel jugant junts i passant-s'ho pipa!

Papa, finalment el teu fill serà doctor. Sé que són moments difícils i que t'has d'acostumar a una vida nova. Tot i això has sabut deixar-me el meu espai a l'hora de treballar en aquesta tesi. Soc conscient que veure'm doctor és per a tu un motiu d'alegria i felicitat. Això fa sentir-me reconfortat i estimat. Ambdós som homes de poques paraules però saps que t'estimo i t'admiro molt.

Germaneta, sé que hem passat moments molt difícils i encara tot és molt recent. Sempre tindrè el record del seu últim alè agafant-li cadascú una mà, mirant-nos sense dir res i dient-ho tot alhora. Anna, tot i tot, sempre em preguntaves què tal la tesi i com ho portava, intentant rascar una mica la cuirassa que porto a sobre. Gràcies per ser-hi en aquells moments en que més et necessitava. I si, a tu també t'estimo molt germaneta. Xavi, gràcies també a tu per estar al nostre costat.

Gal·la, companya de vida, de trajecte, d'il·lusions i projectes. A tu t'he d'agrair la paciència infinita que has mostrat aquests últims anys. També que m'aguantessis quan els experiments no anaven com jo voldria i que agafessis les rendes a casa aquests últims mesos. Han estat temps complicats en què no t'he dedicat el temps que realment et mereixes. M'has fet créixer personalment i professional, m'has ensenyat a valorar el que realment és important en aquesta vida. El camí que estem creant plegats ha estat, es i serà extraordinari. A més a més, aquest últim any i mig ens acompanya el nostre petitó Guerau, que ens fa sentir tan vius, tan especials. Ell té

la millor mare del món i nosaltres el millor fill. Guerau petit, a tu t'agraeixo l'alegria que has portat a casa, t'agraeixo que ens facis mirar la vida amb uns altres ulls i m'encanta imaginar-me com plegats, els tres construïm el nostre futur. Gal·la i Guerau, sou el millor motiu per a seguir lluitant i avançant. Us estimo amb bogeria.

Mama, com de feliç deus ser ara mateix i que difícil se'm fa no poder compartir aquesta felicitat amb tu. Miro endins meu i et veig radiant, radiant de veure el teu fill aconseguint aquesta fita. Vas marxar abans d'hora, no et tocava encara. Havies de viure el Guerau, havies de viure aquest moment. Quants cops t'he pensat i així m'has animat a continuar, a no rendir-me. Siguis allà on siguis mama, aquesta tesi és per a tu.

## Resumen

El cáncer de mama y los gliomas son dos de los tumores con más impacto en la sociedad actual: uno por ser el más prevalente y con una mayor incidencia y el otro por su dificultad de detección y su alto índice de mortalidad. A pesar de los avances en el campo de la oncología clínica, diagnóstico, pronóstico, monitorización y predicción de terapia, aún queda mucho camino para alcanzar una medicina personalizada. El auge de nuevas herramientas como la biopsia líquida (BL), se presenta como una oportunidad para reforzar la detección precoz; el seguimiento de la evolución del tumor; la evaluación de la respuesta a un determinado tratamiento; la detección de mutaciones accionables y el descubrimiento de nuevos biomarcadores.

El gran reto de la BL es la detección de aquellos compuestos que realmente han sido liberados por el tumor. Las tecnologías que, con un límite de detección suficiente, permiten hallar alteraciones genéticas procedentes del tumor, suponen una inversión económica ingente por parte de los laboratorios. En este sentido, las vesículas extracelulares (VEs) son una de las fuentes de biomarcadores más investigadas, ya que su aislamiento puede aumentar la representación de ácidos nucleicos procedentes del tumor. Sin embargo, su aislamiento y detección, supone de unos requerimientos técnicos no disponibles para todos los laboratorios.

En esta tesis presentamos un protocolo de aislamiento de VEs con un rendimiento superior a los métodos de referencia más usados. Asimismo, analizamos dos tipos de biomarcadores genéticos extraídos a partir de las VEs: miARN en los tumores mamarios y ADN en los tumores gliales.

De todas las moléculas presentes en las VEs, los miARNs son los que están captando mayor interés dentro de la comunidad científica. En esta investigación, proponemos por primera vez el análisis de expresión relativa de miARNs en VEs para la estratificación de la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante en pacientes con cáncer de mama con fenotipos que presentan una clínica más agresiva, que denominamos fenotipos extremos: HER2 sobreexpresado, luminal B con HER2 sobreexpresado y triple negativo.

También se ofrece una alternativa coste-efectiva en cuanto a la detección de la mutación *IDH1*<sup>R132H</sup> en ADN de VEs procedentes de pacientes con glioma. La tecnología aquí descrita es independiente tanto de métodos clásicos (secuenciación y RT-q-PCR), como de tecnologías de última generación (PCR digital y secuenciación de nueva generación), pudiéndose instaurar en cualquier laboratorio mínimamente equipado. Más aún, esta técnica es extensible a otras alteraciones genéticas de interés en gliomas y otras patologías.

---

## Abstract

Breast cancer and gliomas are two of the tumors with the greatest impact on today's society. Breast cancer is the most prevalent tumor and has the highest incidence, and gliomas for its difficulty in detection and its high mortality rate. Despite advances in the field of clinical oncology, diagnosis, prognosis, monitoring and therapy prediction, there is still a long way to go to achieve personalized medicine. The rise of new tools such as liquid biopsy (LB), is presented as an opportunity to reinforce early detection; monitoring of tumor evolution; the evaluation of the response to a treatment; the detection of actionable mutation changes and the discovery of new biomarkers.

The great challenge of LB is the detection of those compounds that have truly been released by the tumor. The technologies that, with a sufficient detection limit, make it possible to find genetic alterations derived from the tumour, represent a huge economic investment by laboratories. In this way, extracellular vesicles (EVs) are one of the most investigated sources of biomarkers since their isolation can increase the representation of tumor nucleic acids. However, its isolation and detection entail technical requirements that are not available to all laboratories.

In this thesis we present a protocol for isolating EVs with a higher yield than the most used reference methods. We also analysed two types of genetic biomarkers extracted from isolated EVs: miRNA in breast tumors and DNA in glioma.

Out of all the molecules contained in the EVs, miRNAs are the ones that are attracting the most interest within the scientific community. Here, we propose for the first time the analysis of relative expression of miRNAs in VEs for the stratification of response to neoadjuvant chemotherapy in patients with most aggressive breast cancer types: HER2 overexpressed, luminal B with HER2 overexpressed and triple negative. Which we call them extreme phenotypes.

In addition, we present a cost-effective alternative for the detection of the *IDH1*<sup>R132H</sup> mutation in DNA from EVs from glioma patients. The technology described here is independent of both classical methods (sequencing and RT-q-PCR) and cutting-edge technologies (digital PCR and next-generation sequencing), so it can be installed in any minimally equipped laboratory.

## Resum

El càncer de mama i els gliomes són dos dels tumors amb més impacte en la societat actual: un per ser el més prevalent i amb més incidència i l'altre per la dificultat de detecció i l'alt índex de mortalitat. Tot i els avenços en el camp de l'oncologia clínica, diagnòstic, pronòstic, monitorització i predicció de teràpia, encara queda molt camí per assolir una medicina personalitzada. L'auge de noves eines com la biòpsia líquida (BL), es presenta com una oportunitat per reforçar la detecció precoç; el seguiment de l'evolució del tumor; l'avaluació de la resposta a un tractament determinat; la detecció de mutacions accionables i el descobriment de nous biomarcadors.

El gran repte de la BL és la detecció dels compostos que realment han estat alliberats pel tumor. Les tecnologies que, amb un límit de detecció suficient, permeten detectar alteracions genètiques procedents del tumor, suposen una inversió econòmica ingent per gran part dels laboratoris. En aquest sentit, les vesícules extracel·lulars (VEs) són una de les fonts de biomarcadors més investigades, ja que el seu aïllament pot augmentar la representació d'àcids nucleics procedents del tumor. Tot i això, el seu aïllament i detecció suposa d'uns requeriments tècnics no disponibles per a tots els laboratoris.

En aquesta tesi presentem un protocol d'aïllament de VEs amb un rendiment superior als mètodes de referència més utilitzats. Així mateix, analitzem dos tipus de biomarcadors genètics extrets a partir de les VEs aïllades: miARN als tumors mamaris i ADN als tumors glials.

De totes les molècules presents a les VEs, els miARNs són els que estan captant més interès dins de la comunitat científica. En aquesta investigació, proposem per primera vegada l'anàlisi d'expressió relativa de miARNs de VEs per a l'estratificació de la resposta a la quimioteràpia neoadjuvant en pacients amb càncer de mama d'aquells fenotips que presenten una clínica més agressiva, que els hem anomenat fenotips extrems: HER2 sobreexpressat, luminal B amb HER2 sobreexpressat i triple negatiu.

També s'ofereix una alternativa cost-efectiva per a la detecció de la mutació *IDH1<sup>R132H</sup>* en ADN de VEs procedents pacients amb glioma. La tecnologia aquí descrita és independent tant de mètodes clàssics (seqüenciació i RT-q-PCR), com de tecnologies d'última generació (PCR digital i seqüenciació de nova generació) podent-se instaurar en qualsevol laboratori mínimament equipat. Encara més, aquesta tècnica és extensible a altres alteracions genètiques d'interès en gliomes i altres patologies.

## Índice

Índice.....	IX
Índice de figuras.....	XIII
Índice de tablas.....	XV
Listado de acrónimos .....	XVII
1. Introducción .....	1
1.1. Cáncer .....	1
Cáncer de mama.....	2
1.1.1. Epidemiología del cáncer de mama.....	3
1.1.2. Clasificación de las neoplasias mamarias .....	3
1.1.2.1. Grado histológico de los tumores mamarios .....	3
1.1.2.2. Estadaje patológico: sistema TNM en los tumores mamarios.....	4
1.1.2.3. Tipos histológicos de los tumores mamarios: Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) .....	5
1.1.2.4. Clasificación molecular de los tumores de mama .....	6
1.1.2.4.1. Grupo Luminal A .....	7
1.1.2.4.2. Grupo Luminal B .....	7
1.1.2.4.3. Grupo HER2 sobreexpresado.....	8
1.1.2.4.4. Grupo Triple Negativo .....	8
1.1.3. Tratamiento del cáncer de mama.....	9
1.2. Cáncer del sistema nervioso central .....	13
1.2.1. Epidemiología de los tumores del SNC .....	13
1.2.2. Clasificación de los tumores del SNC.....	13
1.2.3. Glioma.....	14
1.2.3.1. Glioblastoma .....	15
1.2.3.1.1. Clasificación molecular de los glioblastomas .....	16
1.2.3.2. Isocitrato deshidrogenasa .....	16
1.2.3.3. Tratamiento del glioma .....	18
1.3. Biopsia líquida .....	19

---

1.3.1. Tipos de biopsia líquida .....	20
1.3.1.1. Células tumorales circulantes .....	21
1.3.1.2. Ácidos nucleicos libres circulantes .....	22
1.3.1.2.1. ARNlc.....	22
1.3.1.2.2. ADNlc .....	23
1.3.1.3. Vesículas extracelulares .....	25
1.3.1.3.1. Métodos de aislamiento de vesículas extracelulares .....	28
1.3.1.3.2. Cuantificación y caracterización de los productos aislados .....	29
1.3.1.3.3. miARN encapsulados en vesículas extracelulares .....	29
1.3.1.3.4. ADN encapsulado en las vesículas extracelulares.....	32
1.3.1.4. Potenciación y detección del alelo mutado .....	33
2. Hipótesis.....	37
3. Objetivos generales y específicos .....	38
4. Materiales y métodos .....	39
4.1. Cohortes de estudio .....	39
4.1.1. Cohorte de comparación de técnicas de aislamiento de VEs .....	39
4.1.2. Cohorte de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama .....	39
4.1.3. Cohorte de pacientes diagnosticados de glioma.....	43
4.2. Análisis de calidad de los aislamientos de vesículas extracelulares.....	45
4.2.1. Aislamiento de vesículas extracelulares.....	45
4.2.2. Análisis de rastreo de nanopartículas .....	46
4.2.3. Aislamiento y cuantificación de proteínas .....	46
4.2.4. Western blot .....	47
4.2.5. Citometría de flujo de CD63 .....	47
4.2.6. Cuantificación de VEs mediante ELISA de CD9.....	48
4.2.7. Matrices de anticuerpos Exo-Check.....	48
4.2.8. Extracción y cuantificación del ADN .....	48
4.2.9. PCR digital .....	49
4.3. Materiales y métodos BL en cáncer de mama.....	49

4.3.1. Extracción de miARN de las VEs .....	49
4.3.2. Elección de los miARN para el estudio de expresión en cáncer de mama.....	50
4.3.3. Diseño de matrices de miARN.....	50
4.3.4. Síntesis de la cola poliadenilada, ligación del adaptador a 5', retro-transcripción de los miARNs, y preamplificación de los cDNAs .....	51
4.3.4.1. Poliadenilación de los miARNs .....	51
4.3.4.2. Ligación de los adaptadores en 5' .....	52
4.3.4.3. Retrotranscripción de los miARNs.....	53
4.3.4.4. Preamplificación del ADNc .....	53
4.3.5. Ensamblaje y procesado de las matrices de miARN .....	54
4.3.6. Curado y normalización de los resultados de amplificación .....	54
4.4. Materiales y métodos BL en glioma .....	55
4.4.1. Detección de VEs .....	55
4.4.2. Validación analítica intra e interlaboratorio de la amplificación mediante TT- <i>fast</i> -COLD-PCR y detección con la tecnología DGL- <i>Tech</i> <sup>TM</sup> .....	55
4.4.3. Extracción ADN.....	56
4.4.4. Amplificación con potenciación del alelo 395G>A frente al 395G mediante TT- <i>fast</i> -COLD-PCR.....	57
4.4.5. Secuenciación <i>IDH1</i> .....	58
4.4.6. Detección de la mutación 395G>A del gen <i>IDH1</i> con la tecnología DGL- <i>Tech</i> <sup>TM</sup> ..	59
4.5. Análisis estadístico.....	61
5. Resultados .....	63
5.1. Aislamiento y caracterización de las VEs .....	63
5.1.1. Cuantificación de las partículas aisladas .....	63
5.1.2. Análisis de proteínas de las vesículas extracelulares .....	65
5.1.3. Caracterización de las vesículas extracelulares.....	67
5.1.4. Cuantificación de ADN de las VEs.....	68
5.2. Resultados BL en cáncer de mama .....	70
5.2.1. Análisis de calidad de los miARNs extraídos de las VEs .....	70
5.2.2. miARNs detectados en los diferentes fenotipos analizados .....	70

---

5.2.3. Análisis de expresión relativa de los miARNs .....	71
5.2.4. Análisis <i>in silico</i> de enriquecimiento de genes.....	72
5.3. Resultados BL en glioma .....	75
5.3.1. Detección de VEs .....	75
5.3.2. Validación analítica de la detección de <i>IDH</i> <sup>395G&gt;A</sup> en glioma .....	76
5.3.2.1. Determinación del límite de detección de la mutación c.395G>A del gen <i>IDH1</i> mediante DGL- <i>Tech</i> <sup>TM</sup> .....	77
5.3.2.2. Determinación de la sensibilidad y especificidad analíticas .....	77
5.3.2.3. Reproducibilidad intra e interlaboratorio .....	78
5.3.3. Validación clínica de la detección de <i>IDH</i> <sup>395G&gt;A</sup> en glioma .....	79
5.3.3.1. Detección de la mutación <i>IDH1</i> R132H en los tejidos parafinados mediante inmunohistoquímica.....	79
5.3.3.2. Cuantificación del ADN.....	80
5.3.3.3. Amplificación del ADN con potenciación del alelo 395G>A.....	80
5.3.3.4. Detección mediante secuenciación del alelo 395G>A .....	81
5.3.3.5. Análisis de la sensibilidad y especificidad de la detección, post TT- <i>fast</i> -COLD-PCR, de la mutación <i>IDH1</i> <sup>395G&gt;A</sup> por secuenciación .....	82
5.3.3.6. Detección del alelo mutado 395G>A mediante la tecnología DGL- <i>Tech</i> <sup>TM</sup> .....	82
5.3.3.7. Comparativa de los resultados de la detección mediante la tecnología DGL- <i>Tech</i> <sup>TM</sup> con los resultados obtenidos a través de la secuenciación .....	83
6. Discusión.....	85
6.1. VEs.....	85
6.2. BL en cáncer de mama .....	87
6.3. BL en glioma.....	93
7. Conclusiones .....	99
Referencias .....	100
8. Anexos.....	i

## Índice de figuras

<b>Figura 1.1</b> Número estimado y porcentaje de fallecimientos a nivel mundial según la enfermedad causante.....	1
<b>Figura 1.2</b> Clasificación molecular de los tumores mamarios mediante tinciones IHQ de Ki-67, RE, RP y HER2/ERBB2. ....	7
<b>Figura 1.3</b> Algoritmo para el tratamiento de los tumores de mama iniciales.....	10
<b>Figura 1.4</b> Esquema de los tratamientos neoadyuvantes en tumores de mama en los fenotipos HER2 sobreexpresado, TN y luminales B con HER2 sobreexpresado. ....	11
<b>Figura 1.5</b> Clasificación integrada de los tumores gliales.....	15
<b>Figura 1.6</b> Localización y actividad enzimática de las diferentes isoformas de las enzimas IDH1, IDH2 y IDH3.....	17
<b>Figura 1.7</b> Representación gráfica de los tipos de BL según el elemento analizado.....	21
<b>Figura 1.8</b> Detalle de la biogénesis de los diferentes tipos de VEs.....	26
<b>Figura 1.9</b> Biogénesis canónica de los miARN.....	30
<b>Figura 4.1</b> Esquema de los pacientes incluidos en el estudio de BL en tumores de mama.....	40
<b>Figura 4.2</b> Esquema de los pacientes incluidos en el estudio de BL en tumores gliales.....	44
<b>Figura 4.3</b> Esquema realizado para la selección del método de aislamiento de las VEs de sueros. ....	45
<b>Figura 4.4</b> Distribución de las muestras y los miARNs seleccionados en la matriz de los chips Open Array®.....	51
<b>Figura 4.5</b> Esquema de las validaciones intra e interlaboratorio llevadas a cabo en los tres laboratorios independientes.....	56
<b>Figura 4.6</b> Representación gráfica de las sondas usadas en la detección de la mutación c.395G>A del gen <i>IDH1</i> .....	59
<b>Figura 4.7</b> Disposición de las sondas 2.0 y 3.0 en las membranas de nylon.....	60
<b>Figura 5.1</b> Distribución del número de partículas y su tamaño.....	63
<b>Figura 5.2</b> Análisis de partículas de las EVs.....	64
<b>Figura 5.3</b> Distribución de los tamaños de las VEs según el volumen inicial de suero y el método de aislamiento.....	65
<b>Figura 5.4</b> Análisis de proteínas y marcadores de VEs.....	66

---

<b>Figura 5.5</b> Índice de pureza de las VEs.....	67
<b>Figura 5.6</b> Western Blots de los niveles de expresión de la tetraspanina CD63 y de calnexina	67
<b>Figura 5.7</b> Expresión de marcadores de membrana asociados a VEs. ....	68
<b>Figura 5.8</b> Análisis de expresión de CD63 en los aislamientos de VEs mediante citometría de flujo. ....	68
<b>Figura 5.9</b> Cuantificación de ADN de doble cadena con el fluorómetro Qubit. ....	69
<b>Figura 5.10</b> Análisis de PCR digital para la cuantificación absoluta de las sondas <i>IDH1</i> , <i>BRAF</i> y <i>CDH4</i> . ....	69
<b>Figura 5.11</b> Gráfico tipo violín donde se muestra la variación entre pacientes respondedoras y no respondedoras del miR-342-3p .....	72
<b>Figura 5.12</b> Red de genes relacionados con el miR-342-3p.....	73
<b>Figura 5.13</b> Diagrama de Venn de las conjunciones de genes relacionados con el miR-342-3p.....	73
<b>Figura 5.14</b> Caracterización de las VEs aisladas de los sueros de pacientes diagnosticados de glioma.....	76
<b>Figura 5.15</b> Resultados de la secuenciación del banco de diluciones de la mutación c.394G>A del gen <i>IDH1</i> . ....	76
<b>Figura 5.16</b> Representación de los resultados obtenidos en una de las repeticiones de la validación analítica. ....	77
<b>Figura 5.17</b> Representación de los resultados obtenidos por secuenciación de los amplicones resultantes de la amplificación con potenciación del alelo mutado. ....	81
<b>Figura 5.18</b> Representación de los resultados de la detección de <i>IDH1R132H</i> mediante DGL-Tech™.....	83

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.1</b> Criterios de puntuación de las tres variables de la modificación de Elston y Ellis del sistema SRB. ....	4
<b>Tabla 4.1</b> Estadio patológico de las pacientes al momento del diagnóstico. ....	41
<b>Tabla 4.2</b> Tipos tumorales descritos en el diagnóstico de las pacientes de la cohorte. ....	41
<b>Tabla 4.3</b> Tipos de cirugía realizada a las pacientes incluidas en el proyecto. ....	41
<b>Tabla 4.4</b> Esquemas de tratamiento neoadyuvante recogidos en el estudio Metabreast. ....	42
<b>Tabla 4.5</b> Grados de respuesta patológica a la quimioterapia neoadyuvante de las pacientes del proyecto Metabreast. ....	42
<b>Tabla 4.6</b> Tipos de glioma incluidos en el estudio mutacional en tumores gliales. ....	44
<b>Tabla 4.7</b> Volúmenes de los reactivos a mezclar para la solución de trabajo de la síntesis de la cola Poli-A para 1 muestra. ....	51
<b>Tabla 4.8</b> Esquema de temperaturas y tiempos para la reacción de poliadenilación. ....	52
<b>Tabla 4.9</b> Volúmenes de los reactivos a mezclar para la solución de trabajo de ligación. ....	52
<b>Tabla 4.10</b> Volúmenes de los reactivos a mezclar para la solución de trabajo la retrotranscripción .....	53
<b>Tabla 4.11</b> Esquema de temperaturas y tiempos para la reacción de retrotranscripción. ....	53
<b>Tabla 4.12</b> Volúmenes de los reactivos para mezclar para la solución de trabajo de la reacción de preamplificación de los ADNc. ....	53
<b>Tabla 4.13</b> Esquema de temperaturas y tiempos para la reacción de preamplificación. ....	53
<b>Tabla 4.14</b> Detalle de los volúmenes por muestra a analizar de los reactivos de la solución de trabajo para la TT-fast-COLD-PCR. ....	57
<b>Tabla 4.15</b> Ciclos, temperaturas y tiempos de la TT-fast-COLD-PCR utilizados para la detección de la mutación 395G>A del gen IDH1. ....	57
<b>Tabla 4.16</b> Esquema de temperaturas y tiempos de la reacción de secuenciación. ....	58
<b>Tabla 5.1</b> miARNs detectados por RT-q-PCR en cada fenotipo incluido en el estudio de BL en cáncer de mama. ....	70
<b>Tabla 5.2</b> Comparativa de expresiones relativas, análisis in silico y enriquecimiento de genes de los diferentes miARNs ....	74
<b>Tabla 5.3</b> Resultados de la validación analítica de la amplificación con potenciación del alelo mutado fast-COLD-PCR y la detección mediante la tecnología DGL-Tech™. ....	78

---

<b>Tabla 5.4</b> Sensibilidad y especificidad en las diferentes diluciones del alelo mutado de cada laboratorio. ....	78
<b>Tabla 5.5</b> Estado de la mutación R132H de los gliomas de la cohorte mediante tinción IHQ...	80
<b>Tabla 5.6</b> Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la combinación de la amplificación mediante fast-COLD-PCR y la detección por secuenciación.....	82
<b>Tabla 5.7</b> Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la combinación de la amplificación mediante fast-COLD-PCR y la detección mediante la tecnología DGL-Tech™.....	83

---

## Listado de acrónimos

AB: Cuerpos apoptóticos

ADNlc: ADN libre circulante

ADN-VEs: ADN de las vesículas extracelulares

ANlc: ANs libres circulantes

ANs: Ácidos nucleicos

ANtc: AN tumorales circulantes

AN-VEs: Ácidos nucleicos de las VEs

ARNlc: ARN libre circulante

ARNm: ARN mensajero

ARNnc: ARN no codificante

BHE: Barrera hematoencefálica

BL: Biopsia líquida

CNV: Variación del número de copias de un gen

COLD-PCR: PCR de coamplificación a baja temperatura de desnaturalización

CTCs: Células circulantes tumorales

EGFR: Receptor del crecimiento epidérmico

ENT: Enfermedad no transmisible

*fast*-COLD-PCR: Variante rápida de la COLD-PCR

FFPE: Tejido fijado en formol embebido en parafina

GB: Glioblastoma

HER2: Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano

IDH: Isocitrato deshidrogenasa

IDH1<sup>R132H</sup>: Mutación R132H a nivel de cambio proteico del gen *IDH1*

IHQ: Inmunohistoquímica

ISEV: Asociación internacional de vesículas extracelulares

miARN: Micro ARN

MISEV: Guías la mínima información para el estudio de las VEs

NGS: Secuenciación de nueva generación

NTA: Técnica de rastreo de nanopartículas

OMS: Organización Mundial de la Salud

pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PEG: Polietilenglicol

QNA: Quimioterapia neoadyuvante

QT: Quimioterapia

RE: Receptor de estrógenos

RP.: Receptor de progesterona

SEC: Cromatografía de exclusión por tamaño

SMV.: Vesículas de *shedding*

SNC: Sistema nervioso central

SRB: Sistema de Scarff, Richardson y Bloom

TA: Temperatura ambiente

TMZ: Temozolamida

TN: Fenotipo triple negativo

TNE: Tipo no específico

TT-*fast*-COLD-PCR: COLD-PCR rápida y tolerante de temperatura

UC: Ultracentrifugación

VEs: Vesículas extracelulares

VPN: Valor predictivo negativo

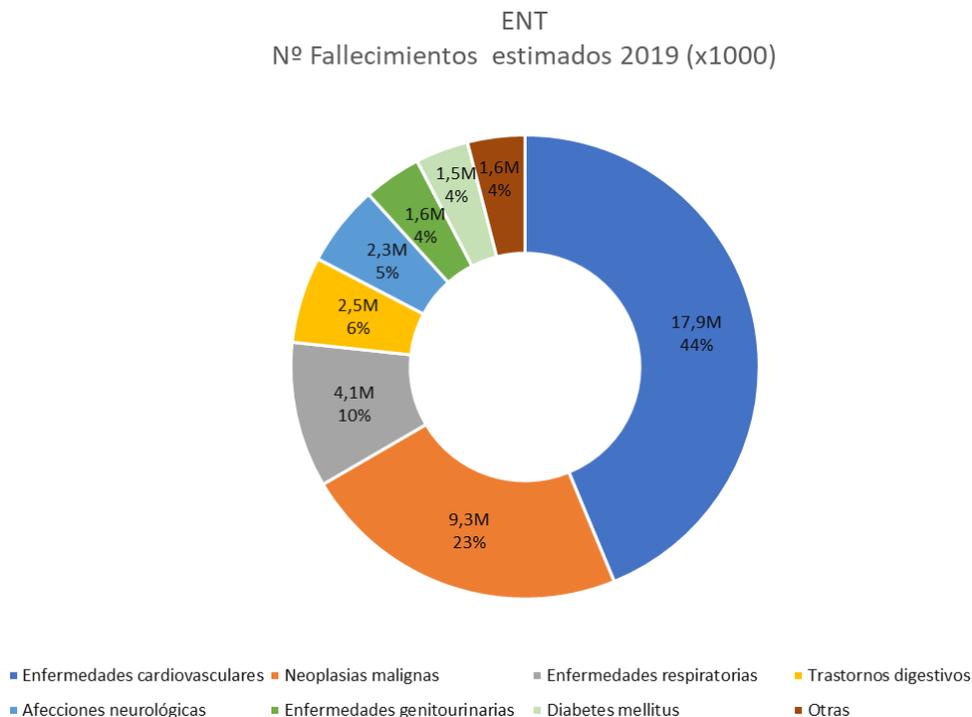
# 1. Introducción

## 1.1. Cáncer

El cáncer, también conocido como neoplasia maligna, es una enfermedad que se caracteriza por el crecimiento descontrolado de una masa celular que invade los tejidos adyacentes. Esto tiene lugar cuando una célula, tras sufrir diversas mutaciones genéticas, se reproduce sin control, escapando de los mecanismos reguladores del ciclo celular (Anders and Anders, 1978).

El cáncer es la enfermedad no transmisible (ENT) más extendida alrededor de todo el mundo. Su alta tasa de incidencia, prevalencia y mortalidad hacen de esta enfermedad una de las de mayor relevancia tanto científica como asistencialmente. Globalmente se calculó una incidencia de más de 19 millones de nuevos casos en 2020 (Sung *et al.*, 2021a) y se prevé un aumento del 63,9 % para el año 2040 (IARC, 2020). Las causas de este veloz crecimiento son complejas pero el envejecimiento y el aumento de la población mundial, así como las condiciones socioeconómicas se presentan como puntos clave para el auge de este fenómeno.

Actualmente se consideran las ENT como la principal causa de mortalidad en el mundo con un total de 40,8 millones de muertes estimadas en 2019, siendo las neoplasias malignas, (Figura 1.1), las que ocupaban la segunda posición en el ranking de número de muertes globales con un total de 9,3 millones; superada solamente por las enfermedades cardíacas, que reportaron un total de 17,9 millones de fallecimientos (World Health Organization, 2020).



**Figura 1.1** Número estimado y porcentaje de fallecimientos a nivel mundial según la enfermedad causante. Adaptado de: World Health Organization, 2020.

En España, la incidencia estimada en el año 2020 de todos los tipos tumorales excepto los de piel no melanomas se calculó en 276.239 nuevos diagnósticos (Sociedad española de oncología médica, 2021). La prevalencia del cáncer, también en el año 2020, se estimó en 1.066.959 casos y la mortalidad se estimó en 113.054 defunciones por neoplasias malignas (Sociedad española de oncología médica, 2021).

De entre los diferentes tumores, no solo por sus números en epidemiología, sino por ser uno de los más estudiados, destaca el cáncer de mama. Éste, a pesar de tener un mayor índice de respuesta a los tratamientos actuales, aún supone en números absolutos gran cantidad de fallecimientos (Sung *et al.*, 2021a). Una de las causas de esta elevada mortalidad, es la heterogeneidad celular que presentan las neoplasias mamarias. Esta característica también está presente en los tumores de la glía del sistema nervioso central (SNC). La alta tasa de mortalidad ligada a la dificultad en el diagnóstico y su localización anatómica, hacen de este tipo tumoral un candidato ineludible en cuanto al estudio de métodos no invasivos tanto para el propio diagnóstico como para el seguimiento de la enfermedad.

## Cáncer de mama

El cáncer de mama es una patología altamente heterogénea (Perou *et al.*, 2000), tanto en su histología, citología y genética como en la respuesta a los diferentes fármacos actualmente utilizados en su tratamiento.

Esta neoplasia puede ser dividida inicialmente en dos grandes entidades, el cáncer de mama inicial o temprano y el cáncer de mama avanzado o metastásico. Esta diferenciación de categorías es, por sí misma, un indicador pronóstico ya que la supervivencia en los tumores de mama avanzados se sitúa alrededor de los 2,5 años (Cardoso *et al.*, 2012) mientras que un 90 % de las pacientes con tumores iniciales sobrevive un mínimo de 4 años (Untch *et al.*, 2019). Otra diferencia importante entre los dos grupos es el tratamiento pues en los tumores iniciales, los tratamientos administrados son generalmente locales o regionales, de lo contrario, en los cánceres de mama avanzados, los tratamientos prescritos son de carácter sistémico. Estos últimos, tienen como principal inconveniente los efectos secundarios adversos que pueden provocar a las pacientes. Ahora bien, en los últimos años, los avances en el diagnóstico y la estandarización de los protocolos y tratamientos, ha permitido mejorar considerablemente no solo la esperanza, sino la calidad de vida de las pacientes con tumores de mama (Cardoso *et al.*, 2014).

En la actualidad, y sobre todo en los países desarrollados, el cáncer de mama se detecta de forma precoz gracias a las tecnologías de imagen clínica y al cribado realizado a partir de la propia observación de la mama por parte de las pacientes. Es por este motivo que en las consultas clínicas los tumores mamarios sean detectados en etapas iniciales de su desarrollo.

### 1.1.1. Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama es la neoplasia con una mayor prevalencia e incidencia a nivel mundial. En 2020 se estimó una prevalencia de 7,8 millones de mujeres con cáncer de mama en todo el mundo, con una incidencia de 2,3 millones de mujeres en la misma anualidad (Sung *et al.*, 2021a). La elevada prevalencia de este tipo tumoral es debida a la alta incidencia sumada a los avances en las terapias dirigidas que permiten que el cáncer de mama tenga una alta tasa de supervivencia. Sin embargo, la mortalidad debida a los tumores mamarios se sitúa en quinta posición como causa de muerte por neoplasia maligna en el mundo, con un total de más de 680.000 fallecimientos en la anualidad de 2020 (Sung *et al.*, 2021b).

En España se estima una incidencia de cáncer de mama de unos 33.000 casos en el transcurso del 2020, siendo así el tercer tipo tumoral más diagnosticado en el país, solamente superado por el cáncer de colon y recto (44.000) y próstata (35.126) (SEOM, 2020). La prevalencia a 5 años en nuestro país se calculó en 137.570 casos en el 2020 (Sung *et al.*, 2021a) ocupando, de nuevo, la primera posición en este apartado. En cuanto a defunciones, se reportaron un total de 6.606 fallecimientos en el 2020, siendo la cuarta patología oncológica con mayor número de muertes por anualidad (Sung *et al.*, 2021a).

### 1.1.2. Clasificación de las neoplasias mamarias

Al ser una entidad altamente heterogénea, para poder clasificar los tumores de mama, actualmente se dispone de un gran número de clasificaciones, cada una de ellas centrada en una o varias características, desde las basadas en patrones histológicos hasta las que manejan marcadores moleculares para establecer diferentes categorías de tumores (Harbeck *et al.*, 2019). Siendo los más aplicados en los diagnósticos de anatomía patológica:

#### 1.1.2.1. Grado histológico de los tumores mamarios

Ya en 1925, Greenough estableció las bases para una clasificación pronóstica de los tumores mamarios otorgando tres clases de malignidad: baja malignidad (clase 1), malignidad media (clase 2) y alta malignidad (clase 3); según el grado de diferenciación celular, el grado de secreción vacuolar, la presencia o ausencia de cambios hipercromáticos en los núcleos celulares, la uniformidad del tamaño celular y el pleomorfismo celular del componente tumoral de los tejidos estudiados (Greenough, 1925). Tres años más tarde, fueron Scarff y Patey quienes revisaron y confirmaron estos grupos de malignidad con una cohorte de 50 pacientes (Patey and Scarff, 1928). A mediados del siglo XX, Bloom y Richardson otorgaron una puntuación numérica a cada una de estas tres variables agrupando a los tumores en tres grupos según su virulencia histológica: GI

de baja malignidad, GII de media malignidad y GIII de alta malignidad (Bloom and Richardson, 1957).

Fue en 1991 cuando Ellis y Elston modificaron el sistema de puntaje de Scarff, Richardson y Bloom para estandarizar la metodología de puntuar cada una de las variables, minimizando así la variabilidad interlaboratorios e interpatólogos. La labor de Elston y Ellis en el grupo de histopatología de Nottingham se sigue utilizando actualmente para la agrupación de los tumores mamarios según su grado histológico, recibiendo esta clasificación el nombre de Nottingham o incluso modificación de Elston y Ellis del sistema de Scarff, Richardson y Bloom (SRB). La puntuación final de dicha clasificación agrupa a los tumores que obtienen 3,4 y 5 puntos en grado I, grado II a los que puntúan entre 6 y 7, y finalmente grado III a los mayores de 8 puntos. El sistema se detalla en la Tabla 1.1.

**Tabla 1.1** Criterios de puntuación de las tres variables de la modificación de Elston y Ellis del sistema SRB. Adaptado de (Elston and Ellis, 1991).

Variable	Criterio	Puntuación
	> 75%	1
Formación de túbulos/glándulas	10% - 75%	2
	< 10%	3
	Células uniformes, regulares y pequeñas	1
Pleomorfismo nuclear	Variaciones moderadas del tamaño celular	2
	Marcada variación del tamaño celular	3
Recuento mitótico / 10 campos <sup>a</sup>	0 - 5	1
	5 - 10	2
	> 11	3

<sup>a</sup> En el número de mitosis por campo, se deben calcular los intervalos de cada categoría.

### 1.1.2.2. Estadaje patológico: sistema TNM en los tumores mamarios

Esta clasificación es publicada conjuntamente por la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) y la *Union for International Cancer Control* (UICC) y se basa en el tamaño tumoral, la cantidad de nódulos linfáticos afectados y la presencia o ausencia de metástasis. Ésta, distribuye a los tumores en cuatro categorías según su pronóstico siendo la categoría I la de mejor pronóstico y la categoría IV la de peor pronóstico y otorga información relevante para la toma de decisiones para las pautas de tratamiento.

El estadiaje patológico tiene sus orígenes en los años 60 (International Union Against Cancer, 1959, 1960) y sigue siendo utilizado en la actualidad, con una última actualización en 2018. Es una buena herramienta para complementar la información clínico-patológica y, en conjunción con los marcadores biológicos receptor de estrógenos (RE), receptor de progesterona (RP), receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), tipos histológicos y demás datos clínico-patológicos, sigue siendo útil en la toma de decisiones del tratamiento de los diferentes tumores de mama. La clasificación o estadiaje TNM también es de gran ayuda en la evaluación de la respuesta de los tumores al tratamiento administrado o bien a la administración de fármacos neoadyuvantes. \f “Acrónimos”

La clasificación de los tumores según su estadio patológico se realiza a través del análisis de tres parámetros histopatológicos. El primero de ellos es el tamaño tumoral en el momento del diagnóstico, este parámetro recibe la nomenclatura “T” y se divide en ocho entidades: TX, T0, Tis (CDIS), Tis (Paget), T1, T2, T3 y T4. Otra de las variables analizadas son los ganglios linfáticos regionales afectados, a los cuales se le otorga la letra “N” y una numeración del 0 al 3 dependiendo de si se observa metástasis y en la zona en la que se detecta.

Por último, para las metástasis distantes, la letra elegida es la “M” a la cual se le otorgan solamente los valores 0 si no hay evidencias de metástasis distante y 1 si se observa metástasis distantes por imagen o histología o metástasis en nódulos no regionales.

En la octava edición (Hortobagyi *et al.*, 2017), el Comité Americano Conjunto sobre el Cáncer (AJCC, de las siglas en inglés *American Joint Committee on Cancer*) ha incluido como variables los marcadores HER2, RE y RP, así como la puntuación histológica/nuclear SRB con las modificaciones del grupo Nottingham (Scarff and Handley, 1938; Bloom and Richardson, 1957; Elston and Ellis, 1991). Estas inclusiones pueden hacer variar el grupo pronóstico de un determinado tumor después de su evaluación por el método TNM. Para comprobar el grupo de cada tumor hay que referirse a las tablas anexas de la publicación (Hortobagyi *et al.*, 2017). Se pueden consultar las tablas con las variaciones de clasificación asociadas a los marcadores biológicos citados en este párrafo en el anexo I de esta tesis.

### **1.1.2.3. Tipos histológicos de los tumores mamarios: Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS)**

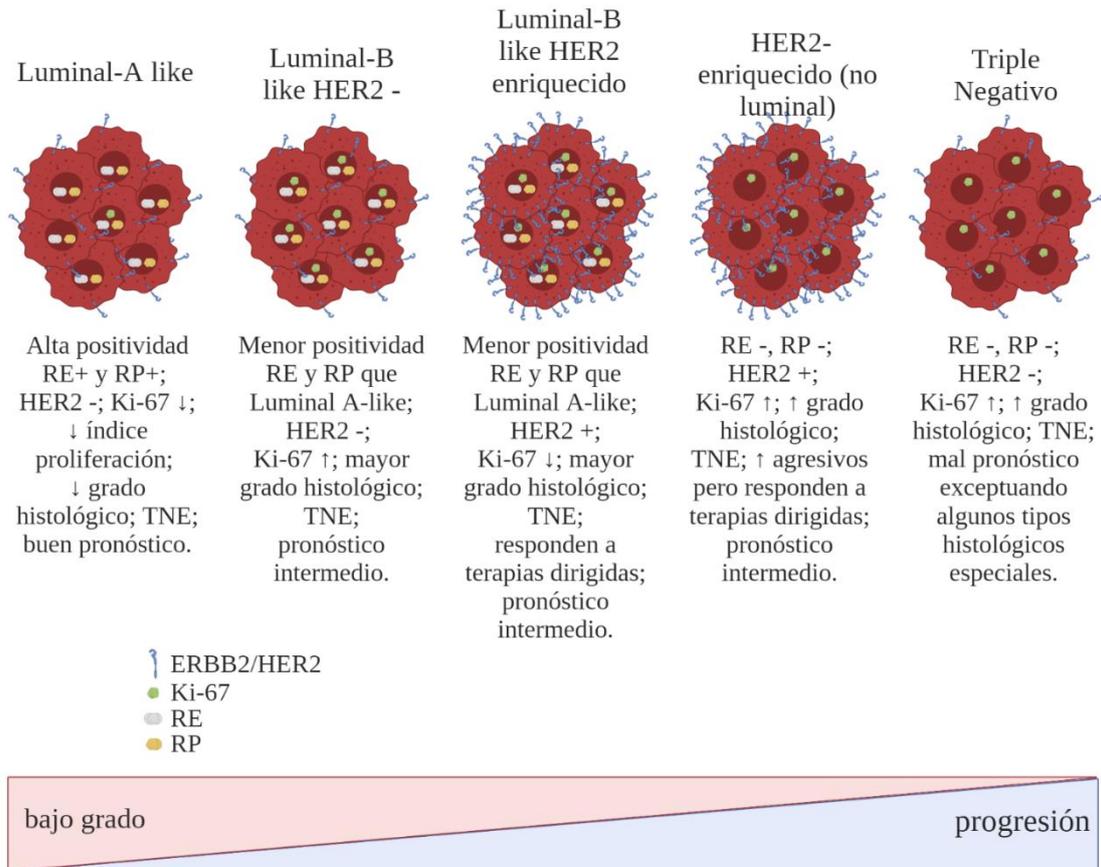
En la actual clasificación de la OMS, que clasifica los tumores según su tipo histológico, las neoplasias mamarias se agrupan en tumores no invasivos, carcinomas intraductales, neoplasias neuroendocrinas, neoplasias papilares, neoplasias epiteliales y mioepiteliales y tumores mamarios masculinos, resultando en un total de 44 subtipos de tumores de mama distintos (Hoon Tan *et al.*, 2020).

#### 1.1.2.4. Clasificación molecular de los tumores de mama

Por último y no menos importante, existe una clasificación de los tumores mamarios basada en las características moleculares descritas en el 2000 y en el 2001 por Perou y Sørlie (Perou *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2001). Esta clasificación agrupa las neoplasias de mama en cuatro grandes grupos: luminal A, luminal B, HER2 positivo (o sobreexpresado) y *basal-like* según patrones de expresión génica en el marco de un panel de 496 genes. Si bien la representación de los diferentes grupos de esta clasificación supuso un gran avance para la elección de los tratamientos a seguir, la realización de las determinaciones de este tipo de análisis en cada una de las pacientes no está al alcance de todos los centros económica y técnicamente.

En este sentido, fueron diversos los estudios que intentaron emular la clasificación molecular obtenida a través del citado panel multigénico mediante pruebas de marcadores únicos, accesibles económicamente y de fácil manejo técnico. De entre estas técnicas, la inmunohistoquímica (IHQ) destacó por cumplir ampliamente las anteriores características. Por ello, ya en 2009 se estableció un alto grado de concordancia entre la diferencia de expresión del marcador de proliferación celular Ki-67 en los tejidos tumorales y la segregación obtenida mediante el set de expresión génica para los tumores de tipo luminal A y luminal B (Cheang *et al.*, 2009). Actualmente se considera como una clasificación molecular aceptada la obtenida con el análisis de los marcadores HER2, RE, RP y Ki-67 mediante técnicas de IHQ (Goldhirsch *et al.*, 2011) (Goldhirsch *et al.*, 2013) – a excepción de la confirmación de la sobreexpresión de HER2 mediante la técnica de hibridación *in situ* (ISH, del inglés *In Situ Hybridization*) de aquellas tinciones IHQ determinadas como no concluyentes –. Esta clasificación engloba los tumores en cinco grandes grupos: luminal A *like*, luminal B *like* sin amplificación del gen HER2, luminal B *like* con amplificación del gen HER2, HER2 amplificado (o positivo) y triple negativo, tal y como se muestra en la Figura 1.2.

## CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA



**Figura 1.2** Clasificación molecular de los tumores mamarios mediante tinciones IHQ de Ki-67, RE, RP y HER2/ERBB2. Según la positividad o negatividad de estos marcadores se establecen 5 grupos de neoplasias de mama que se relacionan con su grado histopatológico y con la agresividad del tumor. RE: receptores de estrógeno, RP: receptores de progesterona, TNE: tumores de tipo no específico.

### 1.1.2.4.1. Grupo Luminal A

Los tumores dentro de esta categoría presentan en las pruebas de IHQ una tinción positiva para los RE y RP, una tinción negativa para la sobreexpresión del receptor HER2 y/o un resultado negativo para amplificación en pruebas ISH y un bajo índice de división celular (Ki-67 bajo). Las neoplasias mamarias incluidas en este grupo son las que presentan un menor riesgo de recaída, una mejor respuesta a los tratamientos hormonales y por consiguiente un mejor pronóstico (Alvarez-Lopez *et al.*, 2020).

### 1.1.2.4.2. Grupo Luminal B

En esta categoría el valor de la expresión de Ki-67 se eleva por encima del 14% de las células analizadas (Goldhirsch *et al.*, 2013; Soliman and Yussif, 2016), considerándose un valor alto. Además, la expresión de los receptores RE y RP es menor a los del grupo anterior y generalmente

los del grupo Luminal A presentan un componente tumoral de bajo grado, mientras que los del B tienen un alto grado histológico.

Este grupo se divide a su vez en dos subgrupos definidos por la presencia o ausencia de sobreexpresión del marcador HER2 y presentan diferente tratamiento y pronóstico.

El subgrupo Luminal B, entendiéndose como puro, está formado por los carcinomas mamarios con positividad en la expresión de los receptores hormonales, ya sean los RE o los PR, con ausencia de sobreexpresión de receptores HER2. El tratamiento de esta entidad es el mismo que el del grupo de tumores Luminales A con la inclusión de la quimioterapia en el esquema de tratamiento. Su pronóstico es menos favorable que el del grupo Luminal A.

En cuanto al subgrupo Luminal B con sobreexpresión de HER2, como indica su propio nombre, presenta las características en cuanto a receptores tumorales y expresión de Ki-67 de los luminales B con el añadido de la presencia de sobreexpresión del receptor HER2 en la membrana de las células tumorales. El tratamiento de estas neoplasias se diferencia de los luminales B sin sobreexpresión de HER2 por añadir trastuzumab a su pauta de tratamiento (Kolarova *et al.*, 2019). El pronóstico de este grupo es, como en el grupo anterior, intermedio. Sin embargo, la presencia de sobreexpresión de HER2 aumenta su agresividad.

#### **1.1.2.4.3. Grupo HER2 sobreexpresado**

Los RE y RP se presentan negativos en esta categoría, con un índice de proliferación elevado y con el receptor celular HER2 enriquecido. Aunque existe una terapia dirigida contra los tumores que presentan una sobreexpresión del marcador HER2, los tumores que pertenecen al grupo aquí descrito al ser tumores altamente invasivos y agresivos presentan un pronóstico intermedio.

El tratamiento de este grupo tumoral se basa en el bloqueo de la IV región del receptor HER2 impidiendo su dimerización. Este tratamiento se administra tanto en los tumores de mama tempranos como en los avanzados, pudiéndose complementar con la administración de quimioterapia (Nieto, Vega and Mart, 2020).

#### **1.1.2.4.4. Grupo Triple Negativo**

Los tumores que no presentan expresión de RE, RP y que además no presentan un enriquecimiento de HER2 son los que abarca este grupo. Al no presentar, o no haberse hallado hasta la fecha, un marcador de terapia dirigida juntamente al alto índice mitótico, hacen de este conjunto el de peor pronóstico de los tipos tumorales mamarios.

Este es un grupo altamente heterogéneo que puede subdividirse en subgrupos diferentes según la expresión de diferentes marcadores en el tejido tumoral. Cada uno de los subtipos resultantes

presenta un pronóstico distinto (Nielsen *et al.*, 2004; Cheang *et al.*, 2008; Blows *et al.*, 2010; Green *et al.*, 2013).

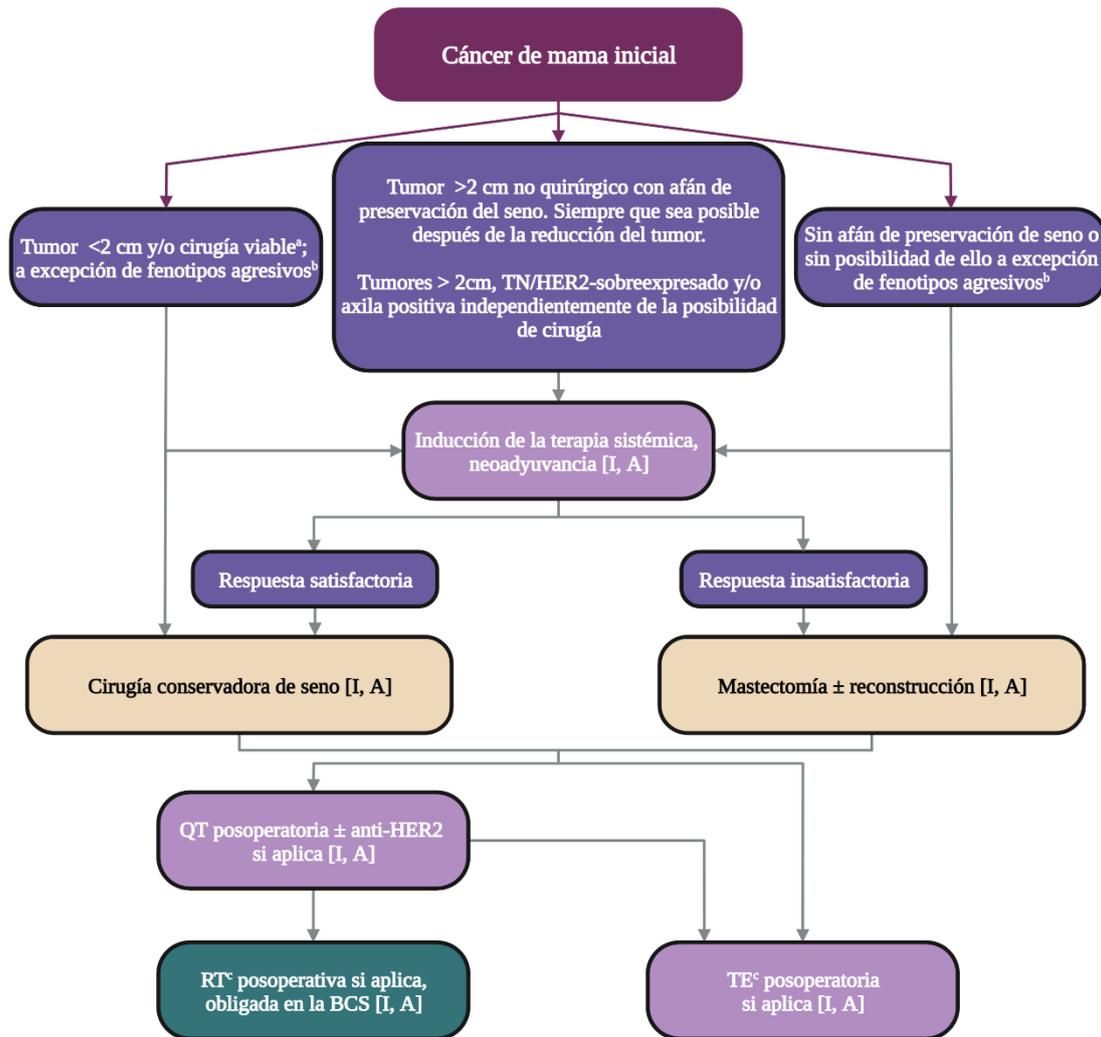
La clasificación molecular de las neoplasias mamarias es de suma importancia en la elección del tratamiento, pues cada uno de los grupos de esta clasificación presenta diferentes características en cuanto a malignidad, agresividad, capacidad de invasión y pronóstico. Además, existe la posibilidad de tratar los tumores con HER2 sobreexpresado mediante el anticuerpo monoclonal trastuzumab (Herceptin, Herzuma, Kanjinti, Ogivri, Ontruzant, Trazimera). Aunque la clasificación molecular es de vital importancia en la elección del tratamiento en los tumores de mama, hay que tener en cuenta los demás factores establecidos en las anteriores clasificaciones, así como, evaluar el estado de salud general de la paciente, la edad y el estado menopáusico. También hay que evaluar los efectos adversos presentados en cada caso una vez iniciado el tratamiento. Es por este motivo que la elección del tratamiento de cada uno de los tumores mamarios debe ser considerado teniendo en cuenta un gran número de variables y debe ser orientado en un comité multi o interdisciplinario (Cardoso *et al.*, 2017).

### 1.1.3. Tratamiento del cáncer de mama

Como se ha comentado en el apartado anterior, la determinación del tratamiento en los tumores de mama comprende el estudio de múltiples variables tanto clínicas como patológicas. Por este motivo se han creado diferentes comités internacionales formados por equipos de profesionales multidisciplinares que se encargan de diseñar guías de tratamiento en el cáncer de mama. Estas guías, a través de algoritmos clínico-patológicos, dirigen a los clínicos, ayudándolos en la toma de decisiones para establecer un tratamiento adecuado a cada caso (Gradishar *et al.*, 2018; Cardoso *et al.*, 2019). Las dos guías más usadas en la práctica clínica son la americana del NCCN (del inglés, *National Comprehensive Cancer Network*) y la europea ESMO (del inglés, *European Society for Medical Oncology*).

Los tumores de mama iniciales tienen como tratamiento estándar a seguir la cirugía con preservación del seno (BCS, del inglés *Breast-Conserving Surgery*) junto con tratamiento sistémico preoperatorio/quimioterapia neoadyuvante (QNA) en aquellos tumores superiores a 2 cm, o con la posibilidad de no realizar QNA en los menores a este tamaño siempre que no sean de fenotipo agresivo (Figura 1.3) (Hwang *et al.*, 2013; van Maaren *et al.*, 2016; Gentilini, Cardoso and Poortmans, 2017; Lagendijk *et al.*, 2018). Por el contrario, los tumores metastásicos siguen terapia sistémica (Gao *et al.*, 2020; Swain *et al.*, 2020; Bardia *et al.*, 2021). Incluso, las pacientes con tumores < 2 cm también se pueden someter a un régimen de terapia sistémica preoperatoria para después valorar su respuesta y decidir si se practica mastectomía en caso de no respuesta o,

en el caso de respuesta positiva a la QNA, se opta por la conservación de la mama con una intervención BCS (Figura 1.3).

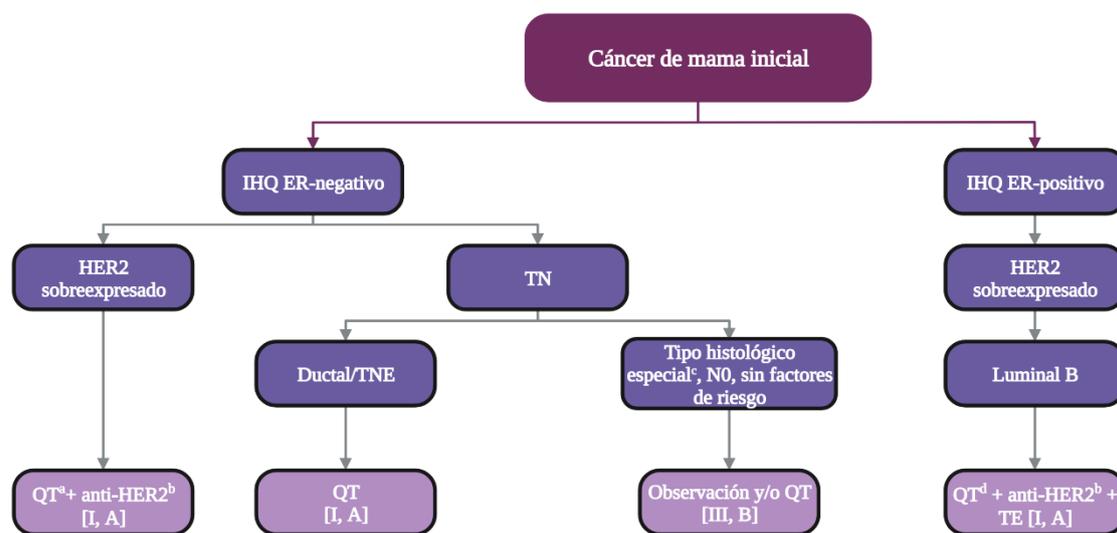


**Figura 1.3** Algoritmo para el tratamiento de los tumores de mama iniciales. Obsérvese que el tratamiento común en todos los tipos de tumores es la cirugía, sea conservadora de seno o mastectomía. <sup>a</sup> Se aconseja realizar QT preoperatoria (neoadyuvancia) en los tumores que por su biología (fenotipos HER2-sobreexpresado, Luminal B y TN) requieran QT. <sup>b</sup> Se consideran fenotipos agresivos los fenotipos HER2-sobreexpresado y TN <sup>c</sup> RT, ET y anti-HER2 posoperatorios concomitantes. Entre corchetes se indican el nivel de evidencia y el grado de recomendación de los tratamientos según la ESCAT. p. ej., [I, A]. BCS, del inglés *Breast-Conserving Surgery*; ESCAT, del inglés *ESMO Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets*; HER2, del inglés *Human Epidermal growth factor Receptor 2*; QT, Quimioterapia; RT, Radioterapia; TE, Terapia endocrina; TN, Triple negativo. Figura adaptada de Cardoso et al., 2019.

Otra característica de las pacientes incluidas es que todas presentan fenotipos de alto riesgo de recaída (TN, HER2 sobreexpresado, y luminales B con HER2 sobreexpresado) por lo que no deben ser tratados solamente con BCS tal y como se indica en la Figura 1.3. En estos tipos de tumores el esquema de tratamiento a seguir difiere según sus características biológicas

determinadas en el diagnóstico mediante la determinación del grado tumoral, el estadio tumoral, la clasificación TNM (clínica, patológica y post QNA) y el fenotipo tumoral.

En la Figura 1.4 vemos en detalle los diferentes regímenes de neoadyuvancia. El esquema a seguir para el fenotipo luminal B con HER2 sobreexpresado es la QNA juntamente con terapia dirigida contra HER2 y terapia endocrina para reducir los niveles y/o bloquear los RE y RP. En los tumores de fenotipo HER2 sobreexpresado, el tratamiento de referencia es la quimioterapia (QT) combinada con anticuerpos monoclonales antiHER2 (trastuzumab ± pertuzumab). Para los tumores TN de tipo no específico (TNE), se aconseja seguir un régimen de QT solamente, y aquellos que presentan una histología tipo adenoide, secretor o carcinoma metaplásico de bajo grado, pueden mantenerse en observación.



**Figura 1.4** Esquema de los tratamientos neoadyuvantes en tumores de mama en los fenotipos HER2 sobreexpresado, TN y luminales B con HER2 sobreexpresado. El tratamiento común en cada uno de los fenotipos es la QT añadiendo terapias dirigidas según el estado de los receptores ER/RP y HER2. <sup>a</sup> Con posibles excepciones en los tumores de bajo riesgo (T1abN0). <sup>b</sup> Anti-HER2: trastuzumab ± pertuzumab. <sup>c</sup> Tipos adenoide, secretor y metaplásico de bajo riesgo. <sup>d</sup> Excepto para pacientes de riesgo muy bajo (T1abN0) en los que se puede aplicar un régimen de TE con anti-HER2 sin QT. Entre corchetes se indican el nivel de evidencia y el grado de recomendación de los tratamientos según la ESCAT. p. ej., [I, A].

ESCAT, del inglés *ESMO Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets*; HER2, del inglés Human Epidermal growth factor Receptor 2; IHQ, Inmunohistoquímica; QT, Quimioterapia; RT, Radioterapia; TE, Terapia endocrina; TN, Triple negativo. Figura adaptada de: Cardoso et al., 2019.

Tanto en la Figura 1.3 como en la Figura 1.4 podemos observar que cada tratamiento tiene asociadas un número románico y una letra. Éstos hacen referencia al nivel de evidencia clínica en cuanto a la concordancia entre una alteración molecular y la respuesta a un determinado fármaco. Esta clasificación consta de seis niveles de mayor a menor evidencia clínica: I – V y un último nivel denominado X. Las letras que siguen a estos números se refieren al tipo de ensayo clínico con el que se valoró el tratamiento (aleatorizado/no aleatorizado; prospectivo/retrospectivo; etc.), refinando aún más el nivel de evidencia clínica (Mateo *et al.*, 2018).

Los regímenes de QNA más frecuentemente usados en la práctica clínica en los tumores de mama de alto riesgo son los compuestos por antraciclinas con o sin taxanos, aunque también existe la posibilidad de administrar ciclos de ciclofosfamida combinada con metotrexato/5-fluoracil o la combinación de doxorubicina con ciclofosfamida en pacientes con riesgo de cardiotoxicidad. La adición de taxanos a la pauta de antraciclinas aumenta levemente la eficacia de la QT, independientemente de la edad, el estado nodal, el tamaño del tumor o la expresión de los receptores hormonales de la paciente (Gianni *et al.*, 2009; Albain *et al.*, 2012). Se ha descrito que el uso secuencial de taxanos (paclitaxel, docetaxel, cabazitaxel) y antraciclinas (doxorubicina, epirubicina, daunorrubicina, idarrubicina) en lugar de administrarlos concomitantemente aumenta la potencia del tratamiento además de reducir considerablemente la toxicidad (Shao *et al.*, 2012). En conjunto, la pauta de tratamiento con antraciclinas y taxanos, reduce la mortalidad en el cáncer de mama en alrededor de una tercera parte (Abe *et al.*, 2005). En aquellos tumores con un alto índice de proliferación, se recomienda un esquema de dosis densa con soporte de G-CSF (del inglés, *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*) (Gray *et al.*, 2019).

Para evaluar la respuesta a la QNA en la pieza quirúrgica se usan diferentes sistemas. Entre ellos destacan el de la carga tumoral residual (RCB, del inglés *Residual Cancer Burden*) y el de Miller y Payne (MyP). Ambos clasifican la respuesta a QNA según la presencia, ausencia o cantidad de células tumorales después del tratamiento. El sistema RCB presenta 4 niveles de respuesta (RCB-0 – RCB-III) otorgando al RCB-0 la ausencia de células tumorales y RCB-III presencia significativa de células tumorales (Yau *et al.*, 2022). El sistema MyP, como se muestra en la Tabla 1.2 presenta 5 grados de respuesta a la QNA (G1 – G5). En este sistema el grado 5 es la ausencia de células malignas después de la QNA mientras que el grado 1 se otorga a aquellas lesiones en las que no se observa ningún cambio postratamiento (Ogston *et al.*, 2003). Actualmente se acepta que las pacientes con una respuesta patológica G4 y G5 no presentan diferencias significativas en cuanto a supervivencia sin progresión de la enfermedad (Wang *et al.*, 2021).

**Tabla 1.2** Sistema de Miller y Payne para la evaluación de la respuesta al tratamiento de QNA. Adaptado de Ogston *et al.*, 2003.

Grado	Descripción
G1	Mínimos cambios sin reducción significativa de la celularidad tumoral invasiva.
G2	Disminución de la celularidad, > 30 % de la masa tumoral invasiva.
G3	Disminución significativa de la celularidad, 30 – 90 % de la masa tumoral invasiva.
G4	Marcada disminución de la celularidad, > 90 % de la masa tumoral invasiva.

Grado	Descripción
G5	Ausencia de células tumorales invasivas.

En un metaanálisis donde se incluyeron 3.209 publicaciones que reportaron un total de 27.895 pacientes de cáncer de mama, se indicó que aquellas pacientes con una respuesta patológica completa posQNA presentaban una mejor supervivencia libre de enfermedad (SLE), respaldando la administración del tratamiento con QNA en los fenotipos más agresivos (en adelante fenotipos extremos). Además, se anunciaba que las pacientes con fenotipos TN y HER2 con respuesta patológica completa, eran las que mejor SLE presentaban (Spring *et al.*, 2020).

## 1.2. Cáncer del sistema nervioso central

La mayor parte de los tumores del SNC son de carácter primario y aparecen repentinamente, sin evidencias clínicas o histológicas de la existencia de lesiones previas de menor grado, en personas de edad generalmente avanzada. Los tumores del SNC secundarios progresan a partir de tumores de bajo grado, aparecen en pacientes más jóvenes y se caracterizan por poseer niveles inferiores de necrosis y un mejor pronóstico (Ohgaki and Kleihues, 2007).

### 1.2.1. Epidemiología de los tumores del SNC

Las neoplasias del SNC representan un 1,6% del total de neoplasias descritas, con una incidencia y prevalencia a 5 años estimadas de 296.851 y 771.110 pacientes diagnosticados de tumores cerebrales en todo el mundo en el año 2018. En cuanto a la mortalidad, este tipo tumoral representa un 2,5% del total de fallecimientos por cáncer y se estima que, en la misma anualidad, perecieron 241.037 enfermos de dicha patología (Bray, Ferlay and Soerjomataram, 2018). Debido a su baja incidencia (4.281 casos en 2018) y su alta mortalidad (3.211 fallecidos en 2018) la prevalencia a 5 años de los tumores cerebrales se sitúa en unos escasos 12.150 casos (IARC, 2018c).

### 1.2.2. Clasificación de los tumores del SNC

Históricamente la clasificación de la OMS de los tumores del SNC se ha basado en criterios histopatológicos (Zülch, 1979) (Kleihues, Burger and Scheithauer, 1993), siendo la atipia nuclear, la proliferación del endotelio vascular, la actividad mitótica y la presencia o ausencia de necrosis las principales características en consideración (Gudinaviciene, Pranys and Juozaityte, 2004). El grado de malignidad del tumor se determina según la evidencia de estas características histopatológicas, otorgando una numeración del I – más bajo grado – al IV – más alto grado.

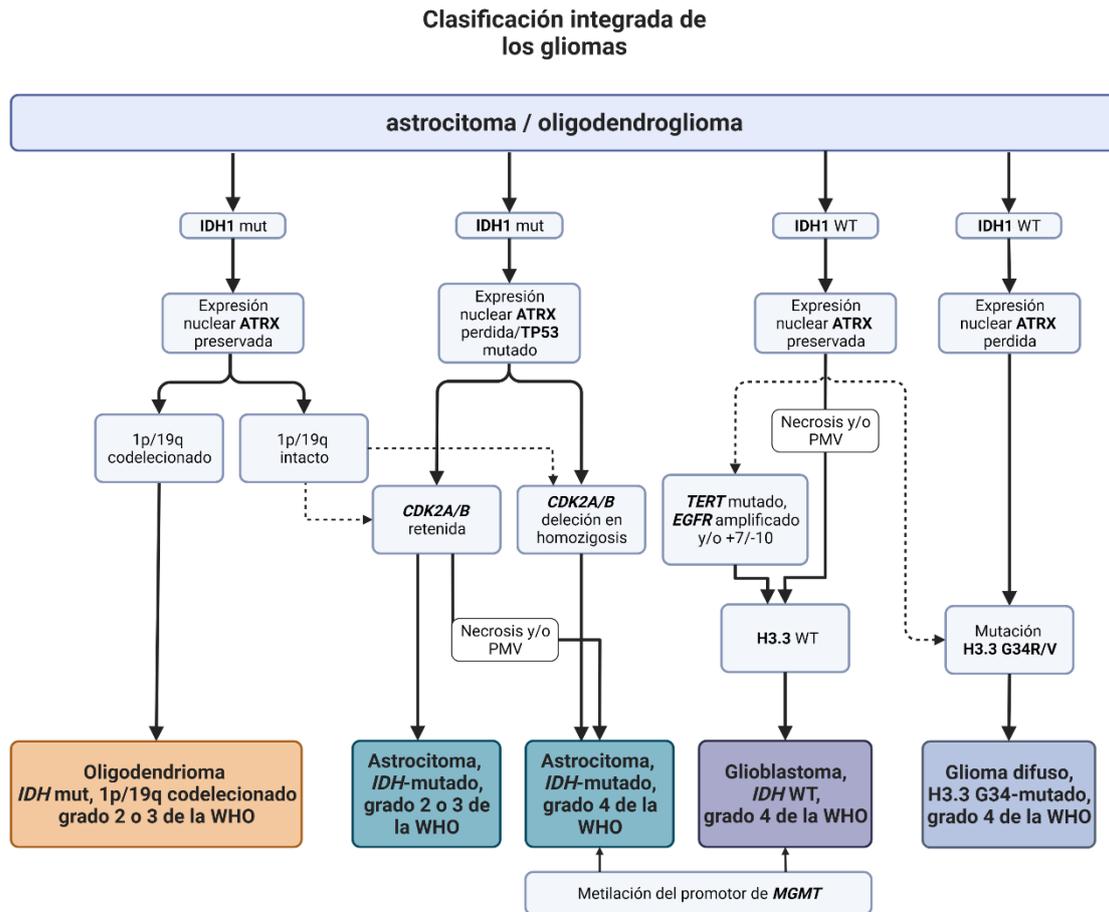
Es en la cuarta edición de la clasificación de los tumores del SNC de la OMS (4ª edición, 2007) cuando empiezan a presentarse determinados marcadores moleculares como factores pronósticos. Ya en la revisión de esta 4ª edición del libro azul de los tumores del SNC de 2016 se incluye el análisis de parámetros moleculares, no como factores pronósticos de las diferentes entidades dentro de la clasificación, sino como criterio propiamente clasificatorio (Louis *et al.*, 2016). Finalmente, es en la actual clasificación de la OMS - 5ª edición, 2021 - (Louis *et al.*, 2021) donde, aplicando las propuestas realizadas por el consorcio para informar acerca de los enfoques prácticos y moleculares de la taxonomía de tumores del SNC (cIMPACT-NOW, de sus siglas en inglés) (Louis *et al.*, 2020), el peso de los criterios de clasificación mediante marcadores moleculares sobrepasa el de los criterios histopatológicos.

### 1.2.3. Glioma

De los tumores del SNC, los gliomas son los tumores primarios más comunes, constituyendo un 81% del total de tumores malignos que afectan al encéfalo (Ostrom, Bauchet, *et al.*, 2014). Como su nombre indica, la procedencia de esta entidad es la neuroglia y es en base a la célula glial progenitora que se puede establecer una primera clasificación de los gliomas: si el carcinoma procede de los astrocitos, al tumor se le denomina astrocitoma; si deriva de los oligodendrocitos, oligodendroglioma y se conoce como ependimoma a los que su origen son células ependimarias (Bailey, 1948).

Actualmente, además del tipo histológico, se incluyen como criterios clasificatorios los marcadores moleculares. Entre estos marcadores al que se le otorga más importancia es el gen *IDH*, codificante de la proteína isocitrato deshidrogenasa. A parte del gen de la isocitrato deshidrogenasa (*IDH*), como se ilustra en la Figura 1.5, se incluyen como elementos clasificatorios la pérdida de expresión del gen *ATRX*, mutaciones en el gen *TP53*, la codelección del brazo corto del cromosoma 1 y del brazo largo del cromosoma 19 (1p/19q), deleciones en homocigosis del gen *CDK2A/B*, mutaciones en el gen *TERT*, amplificaciones del gen receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*, de sus siglas en inglés), la metilación en el promotor del gen *MGMT* y las mutaciones G34R y G34V de la variante H3.3 de la histona 3 (Louis *et al.*, 2021; Weller *et al.*, 2021).

En este sentido se ha cambiado la nomenclatura de los tipos de gliomas usando las alteraciones moleculares para la definición de cada entidad. Además, desaparece el término glioblastoma (GB) *IDH* mutado cambiándose por el de astrocitoma de grado IV con *IDH* mutado.



**Figura 1.5** Clasificación integrada de los tumores gliales. Adaptada de la 5ª edición de la Clasificación de los tumores del SNC de la OMS y de las guías de la EANO Louis et al., 2021; Weller et al., 2021.

### 1.2.3.1. Glioblastoma

El GB es el tipo de glioma más agresivo, con un crecimiento rápido, focos necróticos y una alta proliferación vascular. Asimismo, es el tipo tumoral con una mayor incidencia, aproximadamente 3,19 casos por 100.000 habitantes, aumentando dramáticamente a los 54 años y llegando a su máxima incidencia (15 de cada 100.000 habitantes) a las edades de 75 a 84 años (Ostrom, Gittleman, *et al.*, 2014).

Pese a ser considerado como una entidad clínica, el GB presenta una alta heterogeneidad en cuanto a diferentes aspectos: A nivel histopatológico, se pueden contemplar diferencias en la proliferación celular (número de mitosis), en la vascularización tumoral y en la presencia o no de calcificaciones y necrosis en las tinciones histológicas. A nivel molecular se pueden distinguir cambios de expresión génica, mutaciones puntuales, variaciones en el número de copias (CNV, del inglés Copy Number Variation) e incluso diferencias epigenéticas (Eder and Kalman, 2014). Finalmente, el diagnóstico viene definido por ambos parámetros, aunque debido a la elevada heterogeneidad, un mismo tumor puede devolver informes discordantes dependiendo de la parte del tumor adquirida en el momento de la biopsia (Sottoriva *et al.*, 2013), dificultando tanto la

obtención de resultados positivos en la validación de terapias dirigidas así como beneficiando la resistencia al tratamiento estándar para esta patología (Bao *et al.*, 2006) (Stavrovskaya, Shushanov and Rybalkina, 2016) (Jiapaer *et al.*, 2018).

#### 1.2.3.1.1. Clasificación molecular de los glioblastomas

En 2008 el TCGA (de inglés The Cancer Genome Atlas) presentó un estudio dónde se analizaba la expresión génica, las CNV y los patrones de metilación en 206 muestras de pacientes con GB y el incluía el análisis de mutaciones puntuales en otras 91 muestras de GB (McLendon *et al.*, 2008).

En base a estos estudios y mediante plataformas de expresión génica se estableció una clasificación de los GB en cuatro grandes grupos: clásico, mesenquimal, proneural y neural (Verhaak *et al.*, 2010). Los tumores ubicados en el grupo clásico presentan una ganancia del cromosoma 7, acarreado la amplificación del gen *EGFR*, junto a una pérdida del cromosoma 10 y una delección homocigota del gen *CDKN2A*. El subtipo mesenquimal se caracteriza por presentar deleciones hemicigólicas del gen *NF1* y sobreexpresión de *CHI3LI* y *MET* (marcadores de células mesenquimales). Mutaciones y amplificaciones en el gen *PDGFRA*, mutaciones puntuales en *IDH1/2* y un fenotipo G-CIMP (del inglés Glioma-CpG Island Methylator Phenotype) son las principales alteraciones descritas para el tipo proneural. Y, por último, el grupo neural al que se le asocian sobreexpresiones de marcadores genéticos característicos de las neuronas como *NEFL*, *GABRA1*, *SYTI* y *SLC12A5*.

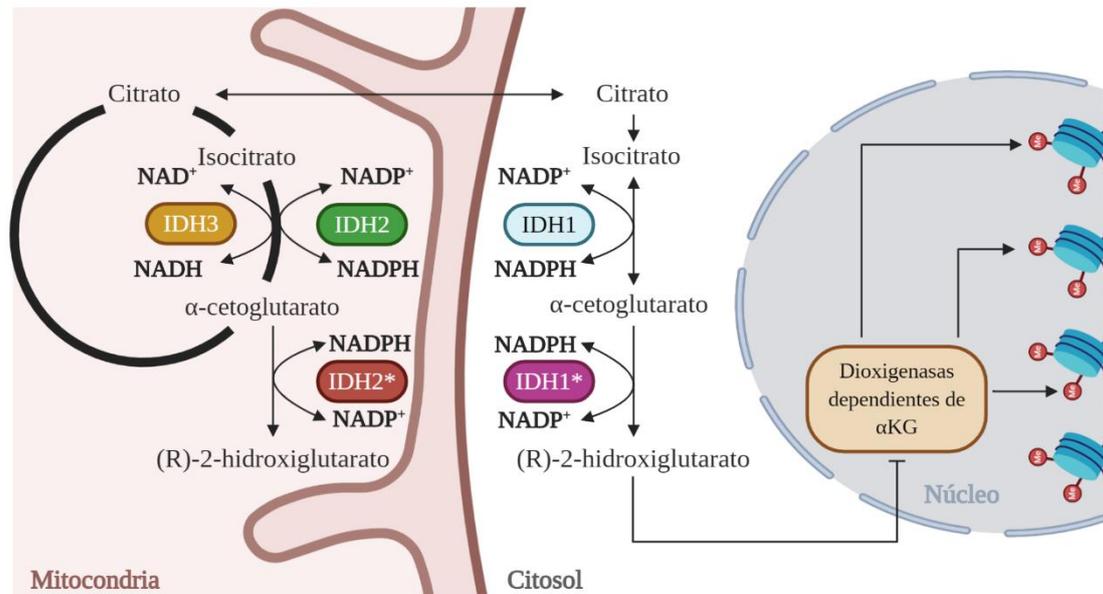
Como se ha podido observar en los apartados anteriores, el gen *IDH* es esencial en las actuales clasificaciones y en la determinación del pronóstico en los tumores gliales.

#### 1.2.3.2. Isocitrato deshidrogenasa

En las células eucariotas se expresan tres isoformas de la isocitrato deshidrogenasa: IDH1, IDH2 e IDH3. Mientras las dos primeras están formadas por homodímeros, la tercera es un heterotetrámero constituida por dos subunidades IDH3 $\alpha$ , una subunidad IDH3 $\beta$  y una subunidad IDH3 $\gamma$  (Bzymek and Colman, 2007). En su estado natural, los tres parálogos en su estado natural catalizan la conversión del isocitrato en  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ CG). Si bien su función es la misma, encontramos que mientras la localización de las enzimas IDH2 y IDH3 es mitocondrial la IDH1 se localiza en el citoplasma y/o en los lisosomas (Yang *et al.*, 2012).

Cuando aparece una mutación en los genes *IDH1* o *IDH2* se le añade una reducción a la descarboxilación oxidativa, catalizando el paso de  $\alpha$ CG a R-2-hidroxiglutarato (R2HG) (Dang, Yen and Attar, 2016). Como se muestra en la Figura 1.6, la acumulación de R2HG junto a la disminución de  $\alpha$ CG promueve el efecto oncogénico inhibiendo la acción de las dioxigenasas

dependientes de  $\alpha$ CG y alterando el perfil de metilación que a su vez modifica la expresión de genes asociados al crecimiento y diferenciación celular (Tommasini-Ghelfi *et al.*, 2019a). Actualmente se consideran tres vías de desmetilación del ADN afectadas por el metabolito R2HG en las células tumorales: la familia de las metilcitosina dioxigenasas (TET), las enzimas JmJc y las EglN prolyl-4-hydroxylases (Losman and Kaelin, 2013), que, al verse reducida la presencia de su principal cofactor ( $\alpha$ CG), inducen un patrón hipermetilado en las células con mutaciones en *IDH*.



**Figura 1.6** Localización y actividad enzimática de las diferentes isoformas de las enzimas IDH1, IDH2 y IDH3. Se representan los sustratos, productos y coenzimas de las reacciones bioquímicas catalizadas por las isocitrato deshidrogenasas 1, 2 (mutadas y no mutadas) y 3. Detalle de la hipermetilación por inactivación de las dioxigenasas dependientes de  $\alpha$ CG, inhibiendo la desmetilación de las histonas por parte de estas proteínas. Adaptada de: Tommasini-Ghelfi *et al.*, 2019b

Además de la hipermetilación del ADN, existen diferentes teorías sobre como las mutaciones en *IDH1* y *IDH2* promueven la oncogénesis. De entre estas teorías, destacan dos de ellas: en la primera los autores sugieren que al ser alterada la función mitocondrial se promueve la activación hacia la glucólisis de las células cancerosas (Leonardi *et al.*, 2012). En la segunda, se hipotetiza sobre la actuación del R2HG como oncometabolito promoviendo la transformación celular al alterar el estado redox de las células (Reitman and Yan, 2010).

Las mutaciones heterocigotas más comunes del gen *IDH1*, localizado en el cromosoma 2 (2q33.3), tienen lugar en el codón 132 que precisamente recae en el centro catalítico de la proteína, afectando el tipo de reacción y el sustrato de esta. Dentro de las mutaciones del codón 132, las más frecuentes son las que afectan al nucleótido Guanina (G) de la posición 395, y el cambio más habitual, con una presencia del 70-80% en los gliomas de bajo grado y un 5-10% en los gliomas de alto grado (Karpel-Massler *et al.*, 2019), se da entre bases púricas pasando de una G a una

Adenina (A), devolviendo la mutación c.395G>A (*IDH1*<sup>395G>A</sup>). A nivel proteico el cambio es de una arginina (R) a una histidina (H), expresado como p.R132H (en adelante, *IDH1*<sup>R132H</sup>) en la nomenclatura de mutaciones a este nivel. Con menor frecuencia, y en el mismo codón, aparecen las mutaciones p.R132G (c.394C>G), p.R132S (c.394C>A), p.R132C (c.394C>T) y p.R132L (c.395G>T). Además de las mutaciones en el gen *IDH1*, se contemplan, con una frecuencia de alrededor del 1%, las mutaciones en el codón 172 del gen *IDH2*, homólogo del codón 132 del gen *IDH1*. Dentro de las mutaciones de *IDH2* la mutación más frecuente es el cambio p.R172K (c.515G>A), seguido de p.R172M (c.515G>T), p.R172W (c.514A>T) y p.R172G (c.514A>G) (Yang *et al.*, 2012). La presencia de las mutaciones en *IDH1* o *IDH2* son mutuamente excluyentes y solo tienen lugar en un alelo (Cohen, Holmen and Colman, 2013).

Existen diversos ensayos clínicos que exploran la posibilidad de inhibir la actividad catalítica de la proteína mutada mediante una unión alostérica de pequeñas moléculas que realizan un cambio en la conformación de la estructura terciaria de la IDH mutada, convirtiéndola en una enzima catalíticamente inactiva (Chen *et al.*, 2017; Cho *et al.*, 2017; Yen *et al.*, 2017). Otra aproximación para inhibir la actividad catalítica de IDH es impidiendo la unión de los iones Mg/Mn<sup>2+</sup>, indispensables para su actividad enzimática (Deng *et al.*, 2015).

Clínicamente se establecen las mutaciones en los genes *IDH1* y *IDH2* como factores de buen pronóstico de los pacientes con tumores gliales, con un aumento de la supervivencia y de la sensibilidad al tratamiento con quimioterapia contra ADN metilado, sobre todo con temozolamida (TMZ) (Hegi *et al.*, 2005). Asimismo, se relacionan las mutaciones en dichos genes con el fenotipo hipermetilado de glioma G-CIMP, fenómeno que engloba diferentes ensayos con agentes hipometilantes y/o hiperacetilantes para su posible aplicación en la clínica (Natsume *et al.*, 2010; Christensen *et al.*, 2011; Berendsen *et al.*, 2012). También se ha descrito una sobreexpresión de *IDH1* en un 60 % de los gliomas, que podría representar una respuesta adaptativa, sustentando las capacidades de crecimiento agresivo de las células tumorales y dotándolas de resistencia al tratamiento (Calvert *et al.*, 2017). Es por este motivo que también se estudia la inhibición de IDH como terapia dirigida (Bergaggio and Piva, 2019).

### 1.2.3.3. Tratamiento del glioma

La terapia estándar para el tratamiento de los gliomas se basa en la eliminación por resección de la máxima área de tumoración, sin afectar a otras zonas próximas, seguido de radioterapia y con quimioterapia adyuvante (Stupp *et al.*, 2005, 2009). Debido a las propiedades intrínsecas del propio tumor, la resección total es muy limitada, por lo cual existe el riesgo de una recidiva tras la cirugía. La TMZ es un profármaco perteneciente al grupo de las nitrosureas, moléculas de pequeño tamaño, que se administra de forma oral. La TMZ es absorbida en el intestino delgado

pasando al torrente sanguíneo desde dónde cruza la barrera hematoencefálica (BHE) gracias a su pequeño tamaño (Wesolowski, Rajdev and Mukherji, 2010).

En 2015 la Administración de la alimentación y fármacos americana (FDA, del inglés Food and Drug Administration) aprobó el uso de campos eléctricos de frecuencia media (~200 kHz), denominados TTFields, para el tratamiento de GB con confirmación histológica en adultos, como terapia adyuvante junto con TMZ de GB de localización supratentorial y para GB recurrentes. El dispositivo, que recibe el nombre comercial Optune™ (Novocare), es un equipo portátil que transmite pulsos eléctricos al cerebro donde inhiben selectivamente el ciclo celular de aquellas células con un alto índice mitótico llevándolas a la muerte celular por apoptosis (Branter, Basu and Smith, 2018). En un estudio de 2017 con una cohorte de 695 pacientes, la supervivencia media global (SMG) de los pacientes que recibieron el tratamiento TTFields con TMZ fue de 20,9 meses, mientras que la SMG de los pacientes que recibieron solamente el tratamiento con TMZ fue de 16,0 meses (Stupp *et al.*, 2017). Es por este motivo que los TTFields están revolucionando el tratamiento de los GB en los últimos años.

Otra terapia innovadora en el tratamiento de los gliomas es la aparición de una vacuna que activa al sistema inmunológico contra la proteína mutada IDH1 R132H. El hecho de que esta mutación sólo aparezca en las células tumorales la convierte en un neoantígeno ideal para activar una respuesta inmunitaria dirigida. Actualmente, existen cuatro ensayos clínicos en fase I en los que se están probando tres componentes que actúan como activadores de esta respuesta inmunológica. En uno de ellos (NOA-16, NCT02454634), el grupo alemán de investigación del cáncer (NOA, de sus siglas en alemán) probó que su vacuna, en combinación con radioterapia y/o TMZ, propicia la presentación de la proteína mutada en el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHCII) e induce la respuesta inmunitaria a través de los linfocitos T CD4(+). Además, en este estudio clínico, se evidenció que dicha vacuna no presentaba efectos secundarios adversos en pacientes con astrocitomas *IDH1* mutado de grado 3 y 4 recién diagnosticados (Schumacher *et al.*, 2014). Si bien los resultados de este estudio no mejoraban en cuanto a resultados de supervivencia a los tratamientos estándares (Platten *et al.*, 2021), sí que los igualaba. Además, el mismo grupo propone, en un nuevo estudio clínico (AMPLIFY-NEOVAC, NCT03893903), la combinación de su vacuna con el inhibidor del *check-point* inmunitario PD-L1 (avelumab) en pacientes con gliomas recurrentes IDH1 mutados (Bunse *et al.*, 2022). Estos ensayos clínicos ponen de manifiesto la necesidad de la detección de la mutación IDH1<sup>R132H</sup>, no solo con criterio pronóstico y clasificatorio, sino como diana terapéutica en pacientes con tumores gliales.

### 1.3. Biopsia líquida

La biopsia líquida (BL) es aquella determinación en cualquier biofluido en la que se identifican células, proteínas, ácidos nucleicos (ANs) o vesículas extracelulares (VEs) provenientes de un

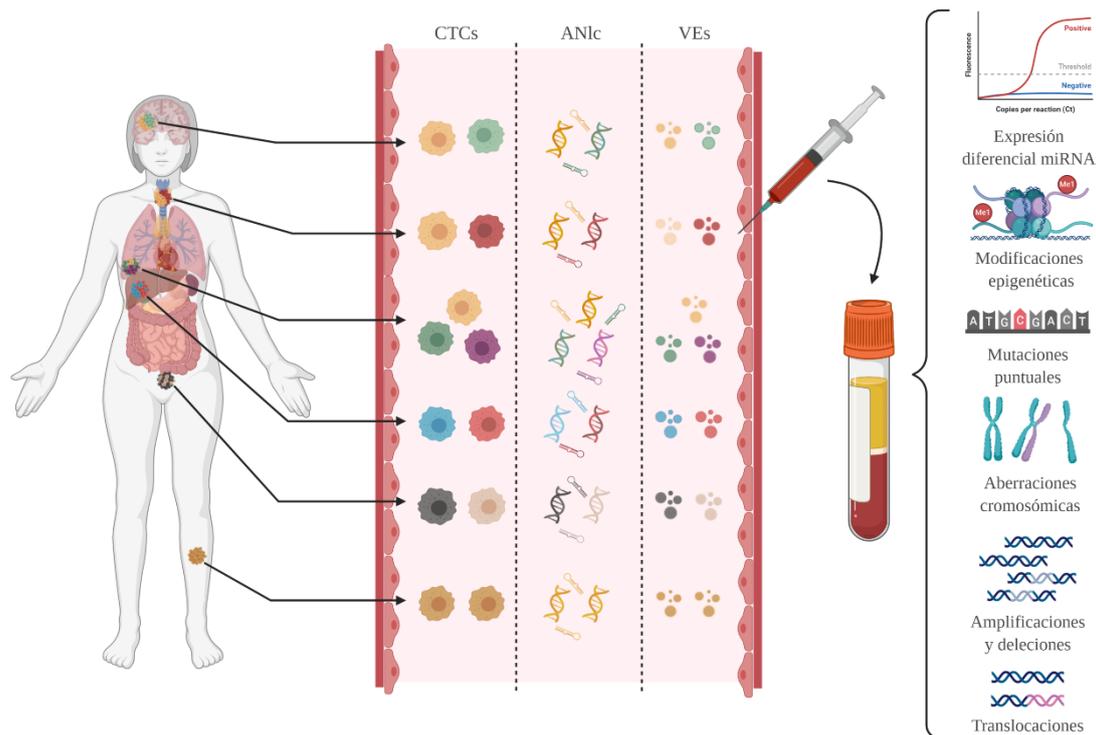
tumor. Su estudio aporta información diagnóstica y de seguimiento complementaria a las determinaciones que actualmente se realizan en la práctica clínica para tener una visión más amplia de la patología oncológica y ayudar en el manejo clínico de los pacientes.

Gracias a las guías de clasificación y estadiaje de los diferentes tumores, se llega a determinar con gran precisión el tipo tumoral. Esta estratificación permite establecer pautas diagnósticas acordes al grado de agresividad del propio tumor. Debido a la alta heterogeneidad genética y los cambios constantes en los linajes celulares, entre ellos los mecanismos de resistencia a los tratamientos aplicados, se requiere de una tecnología apropiada para poder trazar estos fenómenos temporalmente.

En este sentido la BL puede presentarse como una herramienta relevante en diferentes aplicaciones clínicas (Siravegna *et al.*, 2017): la monitorización a tiempo real p.ej. la detección de mutaciones del gen *KRAS* en cáncer colorrectal (CCR) (Liu *et al.*, 2021); la evaluación del riesgo de metástasis p.ej. contaje de células tumorales circulantes (CTCs) en tumores de mama (They *et al.*, 2019); la detección de mutaciones accionables así como la aparición de mecanismos de resistencia p.ej. mutaciones en *EGFR* de resistencia y sensibilización a inhibidores de la tirosina cinasa en cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) (Del Re *et al.*, 2019) y también en la detección temprana del cáncer p.ej. las propias mutaciones de *EGFR*. Todas estas aplicaciones se enmarcan en el contexto de una medicina enfocada cada vez más al tratamiento personalizado.

### 1.3.1. Tipos de biopsia líquida

Según el objeto de estudio, se pueden considerar diferentes tipos de BLs. En este sentido, tal y como se muestra en la Figura 1.7 existen BLs de CTCs, BLs de ANs libres circulantes (ANlc), ya sea ADN (ADNlc), ARN (ARNlc) o bien micro ARN (miARN) y BLs de VEs (Shigeyasu *et al.*, 2017). A través de estas entidades se cubre un amplio rango de estudios moleculares de los tumores como mutaciones puntuales, inserciones, deleciones, fusiones de genes, sobre expresiones de genes (p. ej., *HER2*), aberraciones cromosómicas, perfiles de expresión génica (expresión diferencial de miARN), variaciones en los CNV e incluso se pueden analizar cambios epigenéticos (p. ej., metilación del promotor del gen *MGMT*) (Palmirotta *et al.*, 2018).



**Figura 1.7** Representación gráfica de los tipos de BL según el elemento analizado. Adaptada de Siravegna et al., 2017.

### 1.3.1.1. Células tumorales circulantes

Las CTCs son células tumorales que se encuentran, entre otros biofluidos, en el torrente sanguíneo, y, por consiguiente, rodeadas de miles de células hematopoyéticas por lo cual su detección resulta una ardua tarea. La primera evidencia de la existencia de CTCs surgió en 1869 cuando Ashworth encontró células en la sangre de un paciente que eran “idénticas” a las de los varios tumores encontrados en su organismo (Ashworth, 1869).

A pesar del temprano descubrimiento de las CTCs, el estado del arte de las tecnologías no ha permitido una identificación, cuantificación y caracterización reproducible hasta la aparición de técnicas de IHQ que facilitaron la identificación de marcadores característicos de este tipo celular como son: EpCAM, CK8, CK18 o CK19, permitiendo diferenciarlas de las células hematopoyéticas no solo por el tamaño, sino por estos marcadores de membrana (Bhagat *et al.*, 2011). Estas últimas están presentes en el torrente sanguíneo del orden de  $10^4$  a  $10^7$  por cada CTC y expresan el marcador CD45 contrariamente a las CTCs, que carecen de él (Allard *et al.*, 2004).

Si bien no todas las CTCs son capaces de iniciar la metástasis, sí que existe un porcentaje de estas células que tienen la capacidad de desencadenar una tumoración distante (Poggiana, Rossi and Zamarchi, 2020). Son diversos los estudios que proponen la cuantificación de las CTCs en sangre como un biomarcador pronóstico. En los últimos años, se ha validado la detección de CTCs mediante la tecnología CellSearch® (Menarini) como factor pronóstico, no asociado al

tratamiento, para cáncer de mama metastásico (o avanzado), próstata y colorrectal (Miller, Doyle and Terstappen, 2010).

Las CTCs no siempre circulan en solitario, pues existen clústeres de dichas células que se encuentran en el torrente sanguíneo. Algunos autores convienen que dichos agrupamientos de CTCs tendrían una capacidad superior a las CTCs aisladas de metastazar los tumores sólidos (Amintas *et al.*, 2020). A pesar de ello, los avances tecnológicos se han centrado no solo en la detección de las CTCs que se encuentran circulando en un volumen de sangre periférica, sino en el aislamiento de estas células individualmente (Cheng *et al.*, 2020), permitiendo así su crecimiento en medios de cultivo, y el estudio de las características fenotípicas y genotípicas de una sola línea celular del tumor. Además, al aislar diferentes células de una misma muestra se obtiene una amplia visión de la heterogeneidad tumoral.

### 1.3.1.2. Ácidos nucleicos libres circulantes

Los ANlc están constituidos por el ADNlc y el ARNlc que contienen una mínima porción de ácidos nucleicos tumorales circulantes (ANtc).

#### 1.3.1.2.1. ARNlc

Es de general aceptación que el ARN es una molécula inestable y que el ARN mensajero (ARNm) en la circulación sanguínea es degradado rápidamente por la acción de las ribonucleasas (ARNasas). Este proceso podría indicar la no validez del ácido ribonucleico como biomarcador en las BLs, pero nada más lejos de la realidad, ya que la propia acción de las nucleasas, entre otras proteínas, puede modificar la estructura de los ARNs confiriéndoles más estabilidad. Entre estas estructuras encontramos moléculas pequeñas que protegen los extremos de la degradación, p.ej.: miARN, tRF (del inglés *tRNA-derived RNA fragments*), ARN Y (estructuras altamente conservadas de ARN que se unen a ribonucleoproteínas Ro60), así como estructuras circulares que evitan el efecto de las ARNasas uniendo covalentemente sus extremos, p.ej., ARN circular (ARNcirc) (De Candia *et al.*, 2016). El ARN puede adquirir estabilidad, no solo con la modificación de su estructura en el torrente sanguíneo, sino que también puede unirse con proteínas y/o lípidos inhabilitando la acción de las RNasas (Fernandez-Mercado *et al.*, 2015). Son precisamente estos ARNs los que encontramos en la sangre.

Pero si hablamos de ARN, el más conocido y estudiado es el ARNm. Éste codifica proteínas tomando como molde el ADN y tras sufrir diferentes modificaciones en el núcleo celular es trasladado al citoplasma dónde se traduce a proteína o se degrada. Con el análisis del ARNm libre circulante (ARNmlc) en BLs se pueden detectar mutaciones, reordenamientos genéticos, variantes de *splicing* alternativo o modificaciones epigenéticas (Feng, Qin and Zhang, 2013).

La mayor parte del ARNm es degradada en los diferentes biofluidos por la acción de las RNAsas, haciendo que frecuentemente su detección en las BLs sea en fragmentos inferiores a los 100 pares de bases (pb) (Reddi and Holland, 1976). Sin embargo, existen diversos ARNm que parecen no estar degradados por las RNAsas (p.ej. el ARNm de la Caspasa 3) (Deligezer *et al.*, 2006), presumiblemente por la formación de complejos con proteínas y/o lípidos. Asimismo, estudios recientes prueban que el ARNlc puede ser encapsulado en VEs aumentando su estabilidad (Huang *et al.*, 2013). Pese a que el primer documento que introduce el uso del ARNm en la clínica como biomarcador en BL fue en 1987 (Wieczorek *et al.*, 1987), el uso de éste no se ha popularizado como otros ARNlc. Actualmente, los estudios más prometedores que toman al ARNlc como biomarcador en diferentes neoplasias se basan en la detección de este AN encapsulado en VEs (García *et al.*, 2008; Nilsson *et al.*, 2009; Goldvaser *et al.*, 2017).

Además, el gran avance en las técnicas de detección genéticas ha permitido el descubrimiento de nuevos tipos de ARNs no codificantes (ARNnc). Es por este motivo que encontramos una extensa variedad de ARNs en este grupo. Se considera que los ARNnc constituyen alrededor de la mitad del transcriptoma, y que, a su vez, un 80% de los ARNlc son no codificantes (Yuan *et al.*, 2016; Danielson *et al.*, 2017). Una de las principales funciones de los ARNnc es la regulación de las vías de señalización celular, pudiendo actuar como moléculas tumorigénicas o bien supresoras de tumores, convirtiéndolos en potenciales dianas terapéuticas (Jin, Lai and Xiao, 2014; Lanzós *et al.*, 2017).

Dentro de los ARNlc no codificantes, los que concentran, hasta la fecha, un interés científico más remarcable, son los miARNs. A parte de los miARNs, encontramos el ARN largo no codificante (Gupta *et al.*, 2010; Huarte, 2015) y el ARN corto no codificantes (Kolenda *et al.*, 2020)

#### **1.3.1.2.2. ADNlc**

Una de las principales diferencias entre el ADN genómico, que se encuentra en los núcleos celulares, y del ADNlc, a parte de su localización, es que este último se encuentra en fragmentos de ~250 - 10.000 pb en los biofluidos (Jahr *et al.*, 2001; Thierry *et al.*, 2016). La primera evidencia de fragmentos de ADN en plasma sanguíneo fue descrita en 1948 (Mandel and Metais, 1948). Si bien al inicio no se determinó su importancia clínica, más tarde se expuso un aumento en la concentración de los fragmentos de ADN en suero de pacientes con diversas neoplasias. Además, se relacionó la disminución de la concentración de los fragmentos de ADN en suero postratamiento con una mejora clínica de pacientes con cáncer de ovario, de útero, de cérvix, de pulmón y leucemia (Leon *et al.*, 1977). Estudios más actuales determinan que el aumento de ADNlc no es un efecto exclusivo de las neoplasias ya que la concentración de este AN puede verse alterada en otros procesos patológicos. (Tsai *et al.*, 2011; Breitbach *et al.*, 2014; de

Vlaminck *et al.*, 2014, 2015; Rodrigues Filho *et al.*, 2014). Con todo, el aumento de ADNlc/ml de suero en pacientes con cáncer sigue siendo hoy en día aceptado.

Además de la sangre, existen evidencias de haber encontrado ADNlc en saliva (Mithani *et al.*, 2007), líquido cefalorraquídeo (LCR) (De Mattos-Arruda *et al.*, 2015; Mouliere *et al.*, 2018), líquido pleural (Sriram *et al.*, 2012) y orina (Botezatu *et al.*, 2000; Husain *et al.*, 2017). El ADNlc es excretado a través de la apoptosis, la necrosis, la fagocitosis y/o incluso por secreción activa (Stroun *et al.*, 2001; Thierry *et al.*, 2016). Dependiendo del mecanismo de excreción del ADNlc al torrente sanguíneo, el tamaño de este puede variar. Así pues, si es excretado vía necrosis, la longitud del ADNlc generalmente superará la Kilobase (Kb) (Cheng *et al.*, 2015); por el contrario, si el mecanismo mediante el cual el ADN celular ha acabado en la sangre es la apoptosis, el ADNlc presentará una mayor fragmentación con un tamaño medio de ~ 167 pb, coincidiendo con la longitud del ADN enrollado alrededor del nucleosoma (~ 147 pb) más el fragmento de unión entre nucleosomas, pudiéndose detectar también en tamaños múltiples como binucleosoma o trinucleosoma.

En los últimos años, y sobre todo, gracias al gran avance de las tecnologías moleculares (PCR digital [dPCR], secuenciación de nueva generación [NGS], BEAMing [del inglés, *beads, emulsions, amplification and magnetics*]), el estudio del ADNlc ha supuesto una auténtica revolución en el campo de la investigación oncológica. Éste refleja la genómica y la epigenética de la célula de origen, convirtiendo la BL de ADNlc en una potencial herramienta clínica para la detección temprana del cáncer; la detección de mutaciones accionables; el seguimiento de la respuesta a tratamiento; el monitoreo de enfermedad mínima residual; el estadiaje tumoral; la localización del tumor y la prognosis. De hecho, en 2016 fueron aprobados por la FDA dos test basados en la BL: el kit Cobas® EGFR Mutation Test (Lowes *et al.*, 2016) o el Epi proColon®, descrito en (Warren *et al.*, 2011).

Al igual que en las CTC, la mayor dificultad técnica es diferenciar los ANlc que provienen de células tumorales de los que proceden de células sanas. Para potenciar la detección de los ANlc procedentes del tumor y diferenciarlos de los ANlc, se han descrito diferentes técnicas o variaciones de tecnologías ya existentes, como, por ejemplo, el uso de los UMIs (del inglés *Unique molecular identifiers*) en la NGS, que logró aumentar considerablemente la sensibilidad de la técnica (Singh, 2020). Otra dificultad añadida a las tecnologías basadas en la NGS, son los errores inducidos por la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, se sus siglas en inglés: *Polymerase Chain Reaction*). Aunque actualmente existen metodologías basadas en la corrección de esos errores que logran aumentar la sensibilidad en la detección de los ANlc hasta un 0,001%, el análisis bioinformático de estas técnicas es complicado y aumenta

considerablemente el tiempo de respuesta, así como su coste por muestra (Cabel *et al.*, 2018; Postel *et al.*, 2018).

### 1.3.1.3. Vesículas extracelulares

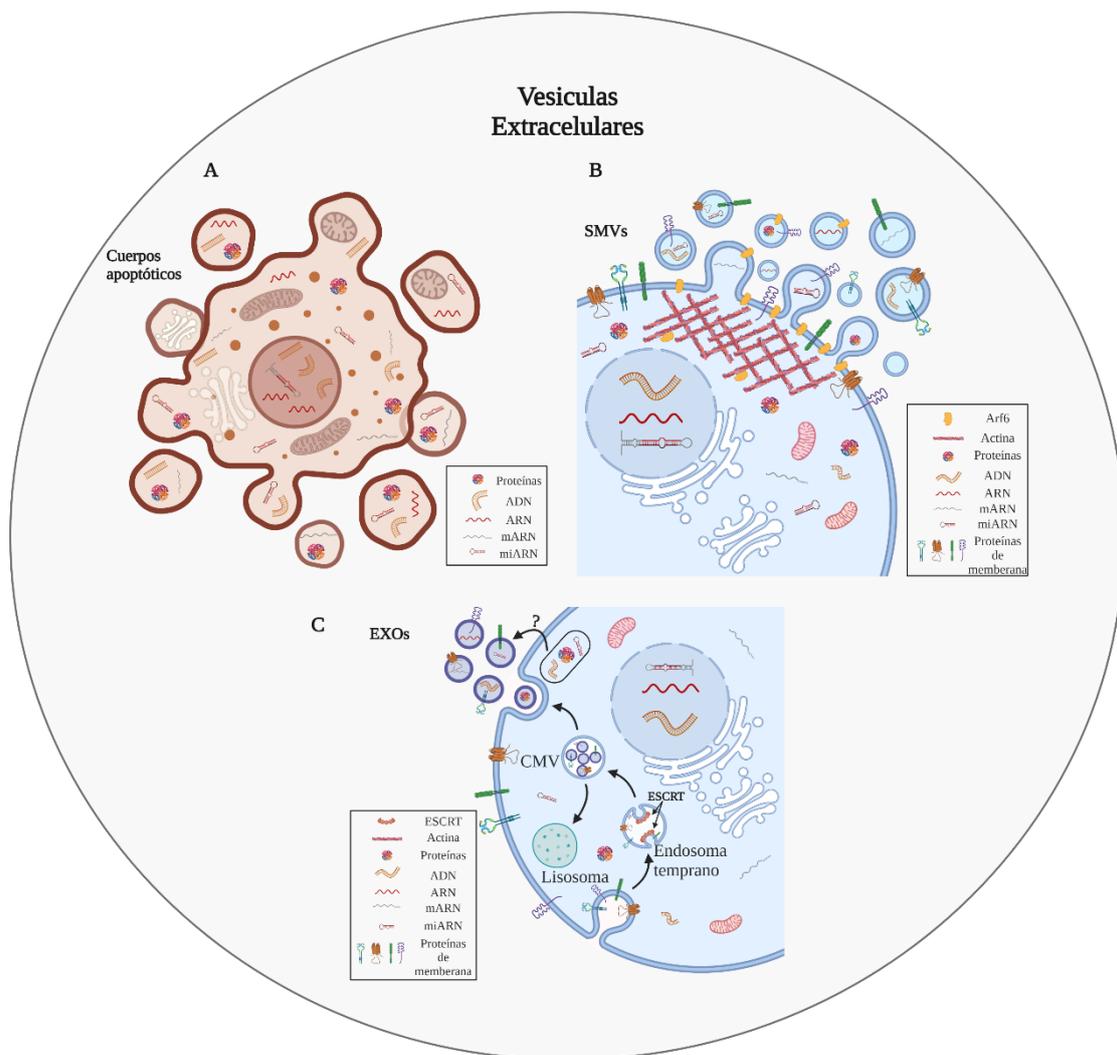
Las VEs se encuentran en cantidad de biofluidos: sangre (Fendl *et al.*, 2016) y derivados (suero (Dalton, 1975), plasma (Lobb *et al.*, 2015)), saliva (Lässer *et al.*, 2011), LCR (Chiasserini *et al.*, 2014; Guha *et al.*, 2019), linfa (Milasan *et al.*, 2016), orina (Pisitkun, Shen and Knepper, 2004), leche (Lässer *et al.*, 2011), líquido amniótico (Keller *et al.*, 2007) y semen (Arienti *et al.*, 2004). De entre estos, la sangre periférica y sus derivados son los más prometedores y por consiguiente los más estudiados para la realización de BL en la mayoría de los tumores. Las VEs tienen la capacidad de poder encapsular tanto proteínas como AN en una luz rodeada de membrana que, a su vez, puede incluir lípidos y receptores de la membrana celular (Lee *et al.*, 2014). Las VEs son secretadas al espacio extracelular por todos los tipos celulares en respuesta a estímulos endógenos y/o exógenos, cargando en su interior parte del material biológico de la célula que las secreta. Una vez secretadas, pueden pasar al torrente sanguíneo y transmitir las moléculas de las células origen a células distantes o bien volcar su contenido en células vecinas alterando su comportamiento (Wu *et al.*, 2019). En este sentido se les atribuye funciones tanto paracrinas como endocrinas (Tetta *et al.*, 2013). Además de esta función de comunicación celular, se les confiere competencias en el mantenimiento de la homeostasis, la degradación/eliminación de sustancias nocivas, la angiogénesis, la inflamación, la respuesta inmune y el desarrollo y progresión de condiciones patológicas (Revenfeld *et al.*, 2014).

La asociación internacional de vesículas extracelulares (ISEV, de sus siglas en inglés, *International Society of Extracellular Vesicles*) publica una guía de buenas praxis en materia de nomenclatura, recolección y preprocesamiento, aislamiento y caracterización de las VEs con revisiones periódicas (Théry *et al.*, 2018). Dadas sus características biológicas, se está extendiendo el potencial uso de las VEs como vehículos de fármacos tanto en medicinas convencionales como en terapia génica. Además, las características de las VEs permiten eludir las barreras biológicas; p.ej., la internalización de las VEs cargadas con el fármaco por el tracto intestinal, potenciando la absorción del fármaco (Sanwlani *et al.*, 2020).

Las VEs, a parte de su potencial como mecanismo de transporte de fármacos, están cada vez más presentes en las investigaciones de biomarcadores clínicos debido a su contenido biológico adquirido en las células originarias (Rupp *et al.*, 2011; Szajnik *et al.*, 2013; Frampton *et al.*, 2018). Suponiendo una herramienta clínica de apoyo para el diagnóstico temprano y la monitorización de la respuesta al tratamiento.

Se ha descrito que, en los procesos tumorales, las VEs pueden tener un papel tanto supresor (Xie *et al.*, 2019) como activador (Pu *et al.*, 2020) del sistema inmune. Además, las VEs están involucradas en la promoción de la angiogénesis y de las metástasis, fomentando la liberación de metaloproteasas encargadas de la degradación de la matriz extracelular y la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*) (Yuana, Sturk and Nieuwland, 2013). En este aspecto, se ha propuesto que el ambiente ácido peritumoral puede promover la lisis de las membranas de las VEs, haciendo que su contenido esté biodisponible para las células receptoras (Taraboletti *et al.*, 2006).

Desde su descubrimiento en 1946 (Chargaff and West, 1946) las VEs han sido nombradas en función de la célula o la especie de la que procedían (Théry *et al.*, 2018). Sin embargo, en la actualidad, existe la nomenclatura propuesta por la “*Vesiclepedia*”, que clasifican a las VEs según su tamaño y biogénesis, como se puede observar en la Figura 1.8 (Kalra *et al.*, 2012; Kalra, Drummen and Mathivanan, 2016).



**Figura 1.8** Detalle de la biogénesis de los diferentes tipos de VEs. A) Biogénesis de los cuerpos apoptóticos. Mecanismo de carga de proteínas, ANs y orgánulos de los cuerpos apoptóticos. Se observa la

presencia de orgánulos enteros en este tipo de VEs. B) Biogénesis de las SMVs. Los filamentos de actina y el factor 6 de ribosilación son participantes activamente en la formación de este subgrupo de VEs. Como proteínas de membrana se entiende en esta figura los marcadores para las SMVs: CD61, CD61, integrinas y selectinas e incluso la propia ARF6. C) Biogénesis de los exosomas. Detalle de la formación de los endosomas y los CMVs y de cómo se excretan los EXOs al espacio extracelular. Las proteínas de membrana en esta figura representan los marcadores presentes en los EXOs: ALIX, CD9, CD63, CD81 y las proteínas de choque térmico (HSP, del inglés *Heat Shock Proteins*) HSP60, HSP70 y HSP90.

Los cuerpos apoptóticos (AB, del inglés *apoptotic bodies*) son las vesículas de mayor tamaño (50 nm - 5 µm) y son secretados en las fases tardías de la apoptosis mediada por caspasas. Los ABs presentan grandes cantidades de fosfatidilserina y pueden contener micronúcleos, remanentes de cromatina, e incluso orgánulos intactos en su interior (El Andaloussi *et al.*, 2013; Battistelli and Falcieri, 2020). Se ha demostrado que las células pueden liberar ANs en la luz de los ABs durante el proceso de apoptosis, protegiéndolos de la degradación (Halicka, Bedner and Darzynkiewicz, 2000); hecho que explica la estabilidad del ARNm en suero (Hasselmann *et al.*, 2001).

Los ectosomas o vesículas de *shedding* (SMV, de sus siglas en inglés *shedding microvesicles*) son las VEs de tamaño intermedio, cuyo rango oscila desde los 100 nm a los 1000 nm. Se han descrito diferentes teorías acerca de la secreción de las SMV (Piccin, Murphy and Smith, 2007; Muralidharan-Chari *et al.*, 2010). Otra característica de los ectosomas es la presencia de los marcadores CD40, CD41, CD61 y el factor 6 de la ribosilación del ADP (ARF6, del inglés *ADP ribosilation factor 6*) (Barteneva *et al.*, 2013; Kalra, Drummen and Mathivanan, 2016).

Los exosomas (EXOs), con un tamaño inferior a 150 nm, son las VEs de tamaño más reducido. Detallada en la Figura 1.8, la biogénesis de los EXOs parece estar estrechamente relacionada con los endosomas. La génesis más aceptada actualmente de los EXOs empieza cuando la membrana celular se invagina por endocitosis y forma una vacuola intracelular. Esta vacuola se transforma en endosoma temprano bajo el control de la acción del complejo de clasificación endosomal para el transporte (ESCRT, del inglés *endosomal sorting complex required for transport*) (Tschuschke *et al.*, 2020).

Como consecuencia del mecanismo de biogénesis los EXOs presentan la misma orientación y similar composición (rica en colesterol) de la bicapa lipídica, hecho que los distingue de las SMVs (Cocucci and Meldolesi, 2015). Además, al participar el complejo ESCRT en el proceso de biogénesis, los EXOs poseen marcadores específicos como la proteína codificada por el gen de susceptibilidad tumoral 101 (TSG101); la Flotilina 1 (FLOT-1); la proteína de interacción con la muerte celular 6 (ALIX); la molécula de adhesión celular 1 (ICAM1, del inglés *Intercellular adhesion molecule 1*); la anexina A5 (ANXA5); las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81; o las proteínas de choque térmico (HSP, del inglés *heat shock protein*) HSP60, HSP70 y HSP90, entre otras. Esta firma de proteínas se cree debida a la regulación de señales de ubiquitinación (Taylor and Gerzel-Taylor, 2011).

No obstante, los analitos analizados a través de estas VEs dependerán directamente del método utilizado en su aislamiento. Existen diferentes metodologías para realizar los aislamientos de VEs basadas en diferentes principios fisicoquímicos.

#### 1.3.1.3.1. Métodos de aislamiento de vesículas extracelulares

Actualmente existen diferentes procedimientos para el aislamiento de VEs. Estos métodos se basan en las características fisicoquímicas y moleculares de las propias VEs como el diámetro, la densidad, la carga eléctrica o la presencia de determinados marcadores en sus membranas (Willms *et al.*, 2018). En este sentido existen protocolos fundamentados en el tamaño y la densidad como la ultracentrifugación (UC); en la precipitación, que puede ser realizada con kits comerciales o con polímeros como las lectinas (Samsonov *et al.*, 2016) o el polietilenglicol (PEG) (Weng *et al.*, 2016; García-Romero *et al.*, 2019); en el tamaño/diámetro de las VEs, como la UC (Grant *et al.*, 2011) y la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, de sus siglas en inglés *Size Exclusion Chromatography*) (Lozano-Ramos *et al.*, 2015); sistemas que usan los marcadores de membrana aislando por inmunoafinidad (Brett *et al.*, 2017; Brambilla *et al.*, 2021) y finalmente instrumentos que usan la microfluídica (Iliescu *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2020) para combinar diferentes aproximaciones de las aquí enumeradas.

Hasta la fecha, el método más utilizado para aislar VEs es la UC, siendo el protocolo de referencia en el que comparar los resultados obtenidos con otras técnicas más recientes. No obstante, el coste de la implementación del equipamiento necesario es elevado, además, el rendimiento del aislamiento mediante esta técnica se ha visto claramente superado por otras aproximaciones más recientes como la SEC, la microfluídica o la precipitación con reactivos comerciales o con polímeros como el PEG (Bano and Mohsin, 2021).

Por consiguiente, cada una de las metodologías presenta sus pros y sus contras y la elección del método dependerá en gran parte del uso que se les quiera dar a las mismas (Willms *et al.*, 2018). Otro factor que tener en cuenta en la elección del método de aislamiento es la gran heterogeneidad de las VEs. Estas diferencias serán cruciales si se requiere el aislamiento de un determinado tipo de VEs. Para aislar selectivamente un tipo de VE habrá que tener en cuenta sus propias características tanto moleculares como físicas.

Sin una estandarización de protocolos de aislamiento de VEs y habiendo tal cantidad de tecnologías disponibles con resultados dispares en cuanto a rendimiento y pureza, se requiere una cuantificación y caracterización de los productos aislados que ratifique la presencia de vesículas, así como la ausencia de contaminación por restos celulares (Théry *et al.*, 2018).

### 1.3.1.3.2. Cuantificación y caracterización de los productos aislados

En cuanto a la cuantificación y caracterización de las VEs, las guías de la ISEV llamadas MISEV (del inglés, *Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles*), proponen los siguientes pasos a seguir: volumen inicial antes del aislamiento; cuantificación global, que puede ser mediante número de partículas, de proteínas o de lípidos; ratio de las cuantificaciones realizadas; proteínas celulares de membrana o de los endosomas celulares; proteínas del citosol; determinación de presencia/ausencia de contaminantes; presencia de proteínas asociadas a componentes que no sean de membrana ni endosómicas; presencia de proteínas solubles secretadas y de su ligando transmembrana; imágenes de VEs obtenidas por técnicas de imagen, p. ej. microscopía electrónica y visualización de las VEs con métodos no basados en la imagen, p. ej. la técnica de rastreo de nanopartículas (NTA, del inglés *nanoparticle tracking analysis*) (Théry *et al.*, 2018). Las mismas guías MISEV, recomiendan la detección y/o la cuantificación de las tetraspaninas asociadas a las membranas de VEs (CD9, CD63 y CD81).

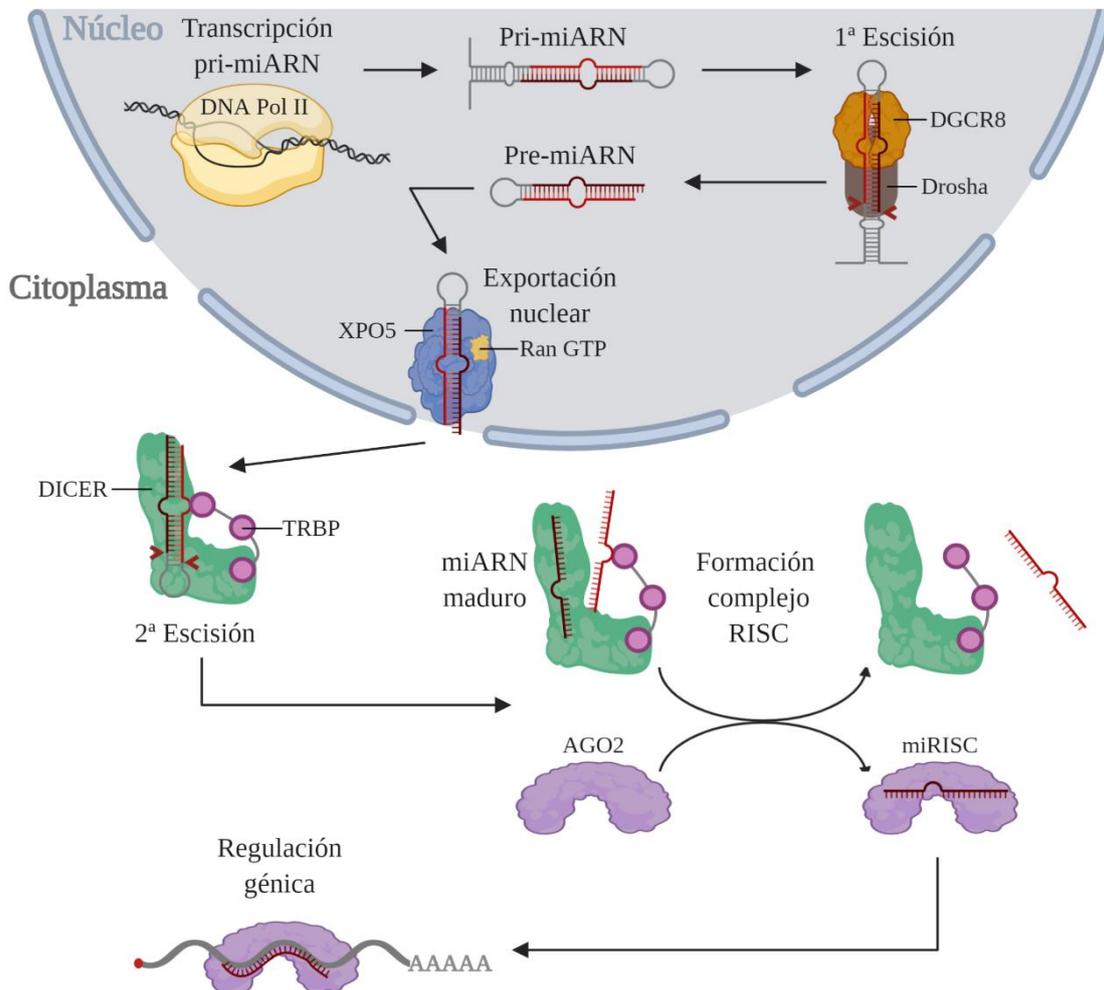
Además, la información vinculada a los tumores puede obtenerse a través de los diferentes tipos de ANs que transportan las VEs (AN-VEs) presentes en los líquidos biológicos (Yan *et al.*, 2021). Por consiguiente, la detección de AN-VEs en la sangre, se presenta como una alternativa real frente a la información obtenida mediante biopsias de tejido convencionales.

### 1.3.1.3.3. miARN encapsulados en vesículas extracelulares

Como ya se ha citado anteriormente en esta introducción, unas de las moléculas más interesantes que se encuentran en el interior de las VEs son los miARNs. Aunque no son específicas de las VEs, pues se encuentran tanto en las células como en la circulación de los diferentes biofluidos. Éstas pequeñas moléculas son una familia de ARNnc cortos de 20 a 24 nucleótidos, cuya función es la regulación postranscripcional actuando preferencialmente sobre los extremos 3' UTR (del inglés, *Untranslated Region*). Los miARNs forman parte, entre otras, de numerosas vías de señalización implicadas en el desarrollo tumoral: proliferación celular, control del ciclo celular, diferenciación, migración celular y metabolismo (Jansson and Lund, 2012).

Muchas vías del procesamiento de los miARNs han sido estudiadas, aunque existe un mecanismo establecido como canónico de su biogénesis, ilustrado en la Figura 1.9. Uno de los principales sistemas que aparecen en su maduración es el complejo formado por Drosha y por la ARNasa III (DGCR8), la cual corta el fragmento de ARN primario generando una horquilla de ARN llamada pre-miARN (Gregory *et al.*, 2004). A su vez, este pre-miARN es quebrado por las proteínas DICER (ARNasa III) y TRBP generando dos cadenas de ARN complementarias. Este miARN de doble cadena se une a la proteína argonauta 2 (AGO2) separándose las 2 cadenas complementarias

ejerciendo ya como complejo efector de las funciones de regulación génica. (Treiber, Treiber and Meister, 2019).



**Figura 1.9** Biogénesis canónica de los miARN. Adaptado de Treiber, Treiber and Meister, 2019; Syeda et al., 2020.

En los primeros estudios de miARNs en tumores sólidos, realizados a partir de tejidos fijados en formol y embebidos en parafina (FFPE, del inglés *Formol Fixed Parafin Embedded*), se presentaba una expresión disminuida de los miARNs en diferentes procesos neoplásicos (Lu *et al.*, 2005). Tres años más tarde una publicación con 540 muestras FFPE con diferentes tipos de tumores, contradecía la teoría de Lu y colegas, difundiendo que existen determinados miARNs que no presentan una baja expresión (Volinia *et al.*, 2006). Ambas publicaciones, con sus diferencias, postulaban que los patrones de expresión de miARNs podrían ser una herramienta para la clasificación de los tumores sólidos.

Además de las funciones biológicas que ejercen los miARNs en el entorno intracelular, se ha demostrado que una desregulación de los miARNs en los biofluidos se asocia a diferentes estados tumorales como pueden ser la progresión, la respuesta terapéutica y la supervivencia (Wang *et*

*al.*, 2018). También se ha revelado que, en los diferentes fluidos fisiológicos, como ocurre en los tejidos FFPE, diferentes perfiles de expresión se relacionan con diferentes tipos tumorales pudiendo llegar a diferenciar neoplasias histológicamente muy cercanas entre sí (Fernandez-Mercado *et al.*, 2015). Esta característica junto a la alta estabilidad de los miARNs hace de ellos perfectos candidatos como biomarcadores dentro de las BL.

Estudios recientes utilizando la técnica de la secuenciación masiva de todo el ARN (ARNseq) en BLs exponen el miARN como el ARNlc más abundante en el suero/plasma, comprendiendo un 45,7-50,5 % del total de éste (Martinez *et al.*, 2015; Umu *et al.*, 2018). En los biofluidos, los miARNs, al igual que los demás ANc, pueden aparecer libres, unidos a lípidos y/o proteínas o encapsulados y protegidos en VEs.

En cuanto al proceso de encapsulación de los miARNs en las VEs, este podría estar dirigido por diferentes vías. Por una parte, las proteínas de unión a RNA (RBPs, del inglés *RNA-binding protein*) con sus secuencias específicas de unión a RNA (RBD, del inglés *RNA-binding domain*) podrían ser responsables de aumentar la internalización de aquellos miARNs que contienen dichas secuencias (Teng and Fussenegger, 2021). Otra vía de incorporación de miARNs en las VEs, sería el complejo SUMO (de sus siglas en inglés *small ubiquitin-like modifier*) / hnRNPA2B1. La proteína SUMO es secuestrada en la luz de las VEs, mientras que la proteína nuclear hnRNPA2B1 reconoce secuencias GGAG/CCCU en las terminaciones 3' de los miARNs, aumentando la concentración de miARNs con dichas terminaciones (Villarroya-Beltri *et al.*, 2013). Otras RBPs que parecen interactuar con la internalización de los miARNs en las VEs serían la proteína SYNCRIPT que captura miARNs con el motivo hEXO (“GGCU”) (Santangelo *et al.*, 2016). Por añadidura, la RBP Y-box 1 (YBX1) empaqueta selectivamente el miR-223 en las VEs (Shurtleff *et al.*, 2016).

También se han descrito ciertas modificaciones post transcripcionales en 3' de adenilación y uridilación que afectarían al transporte de los miARNs a las VEs, presentando estas, un mayor número de moléculas con uridilación respecto las células excretoras que presentarían más miARNs adenilados (Koppers-Lalic *et al.*, 2014). Además de los mecanismos descritos, la anexina A2 (ANXA2) podría tener un papel relevante en la incorporación de miARNs en las VEs, ya que también actuaría como una RBP, uniendo secuencias cortas de ARN e internándolas en las VEs secretadas al espacio extracelular (Hagiwara *et al.*, 2015). También se ha propuesto que el complejo RISC, debido a una disminución de miARN-VEs en ratones AGO2 KO, podría tener un rol relevante en la internalización de los miARNs en las VEs (Guduric-Fuchs *et al.*, 2012; Hannafon and Ding, 2013). Incluso la proteína ALIX (marcador de VEs) podría aumentar la representación de los miARNs en las VEs (Iavello *et al.*, 2016). La última vía, a nuestro parecer, de empaquetamiento de miARNs en las VEs sería mediante la esfingomielinasa neutral 2

(nSMase2), la modulación negativa de esta proteína acarrió una disminución del contenido de miARNs de las VEs (Kosaka *et al.*, 2013).

En cuanto a los miARNs en cáncer de mama, ya en 2005, se describió una firma de 13 miARNs que discriminaba el estado patológico de los controles sanos con una precisión del 100 % (Iorio *et al.*, 2005). En esta publicación aparece, entre los 13 miARNs que constituyen la lista, uno de los miARN más interesantes y que curiosamente se encuentra sobreexpresado en esta patología: el miR-21. Este miARN modula la supervivencia y progresión celular regulando la expresión de los genes supresores de tumores *PTEN*, *PDCD4* y *TPM1*; por lo que una sobreexpresión del miR-21 se correlaciona con un alto grado histológico, un estadio clínico avanzado metástasis en los nódulos linfáticos y una mala prognosis en las pacientes con tumores mamarios (Yan *et al.*, 2008; Qian *et al.*, 2009). El miR-21 es uno de los primeros miARNs que se relacionó con el cáncer y ha sido altamente investigado por diferentes grupos que lo han hallado sobreexpresado en GB (Chan, Krichevsky and Kosik, 2005), ovario (Iorio *et al.*, 2007) y pulmón (Markou *et al.*, 2008) además de en los tumores colorrectales (Schetter *et al.*, 2008) y de páncreas (Roldo *et al.*, 2006) en los que la sobreexpresión del miR-21 también se relaciona con una peor supervivencia.

En BL en pacientes con cáncer de mama la expresión de miR-126, miR-155, miR-199a y miR-335 se asocia con características fisiopatológicas del tumor (Wang *et al.*, 2010). Los miARNs miR-122, miR-10b, miR-34a y miR-155 descritos en dos artículos, se asocian con la presencia de metástasis (Roth *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2012). También se han descrito miARNs relacionados con el estado de los receptores hormonales; en concreto, se relaciona altos niveles de miR-10b en suero con los tumores negativos para la IHQ dirigida a los RE (Heneghan *et al.*, 2010). Por último, el miR-210 se postula como un indicador de respuesta al tratamiento con trastuzumab en pacientes con sobreexpresión del receptor HER2 (Jung *et al.*, 2012).

Otro de los compuestos presentes en las VEs que está centrando la atención de la comunidad científica es el ADN. En este AN, como en el ARN de las VEs, se puede examinar el estado mutacional del tumor en un momento determinado. Además, el ADN presenta mejor estabilidad que el ARN, facilitando su manejo en el laboratorio.

#### **1.3.1.3.4. ADN encapsulado en las vesículas extracelulares**

Desde 2014, cuando Thaku *et al.* y Kahlert *et al.* publicaron sus respectivas investigaciones hallando mutaciones en ADN de doble cadena encapsulado en VEs (Kahlert *et al.*, 2014; Thakur *et al.*, 2014), este ha sido relacionado con diferentes procesos vinculados con numerosas enfermedades. Sin embargo, existe una carencia en el estudio del ADN encapsulado en VEs (ADN-VEs) si se compara con el estudio de otras moléculas contenidas en las VEs como las proteínas o el ARN.

Aunque se desconocen los mecanismos de internalización del ADN en los diferentes tipos de VEs, existe la teoría que este AN se incorpora en la luz de las vesículas de mayor tamaño (1 – 10 µm) (Vagner *et al.*, 2018), mientras que en las VEs pequeñas (50–130 nm), la mayor cantidad de ADN se podría encontrar no en su luz, sino asociado a su membrana (Fischer *et al.*, 2016; Lázaro-Ibáñez *et al.*, 2019). No solo se han reportado diferencias entre VEs pequeñas y grandes en cuanto a la localización del ADN, pues también se ha descrito que la longitud del ADN en VEs pequeñas sería de unos 200 pb (Fernando *et al.*, 2017; Takahashi *et al.*, 2017; Lázaro-Ibáñez *et al.*, 2019), mientras que en las VEs de mayor diámetro, los fragmentos de ADN llegarían a alcanzar los 2 millones de pb (Vagner *et al.*, 2018). Ahora bien, como toda teoría, existen estudios que la rebaten. Zangh *et al.* encontraron ADN de 100-10.000 pb en exosomas, además relacionaron la abundancia de ADN no con el tamaño de las VEs sino con las células de las que estas fueron excretadas (Zhang *et al.*, 2018).

No solo se desconocen los mecanismos de internalización del ADN-VEs, sino que también existe una carencia de conocimiento en como éste es transferido al interior de las células diana y como, una vez al interior celular, este es capaz de modular diferentes procesos biológicos. En este sentido se ha relacionado el ADN-VEs con la regulación del sistema inmunitario tanto en enfermedades autoinmunes como en procesos tumorales (Malkin and Bratman, 2020). En relación con el cáncer, la comunicación celular mediada por las VEs y su contenido, aparte de modular la respuesta inmunitaria frente a esta patología (Ferguson Bennit *et al.*, 2019), facilita la tumorigénesis así como la aparición de nichos premetastásicos (Wortzel *et al.*, 2019).

Actualmente, uno de los principales atractivos que presenta el ADN-VEs es su potencial como biomarcador en diferentes tipos de tumores. Aunque, hasta la fecha, el ADNtc ha acaparado la mayor parte de los esfuerzos para su detección y estudio mutacional, se ha descrito una mayor sensibilidad y especificidad a la hora de detectar la mutación T790M del gen *EGFR* en ADN-VEs que en ADNtc (Lee *et al.*, 2018). Otra ventaja que supone el uso del ADN-VEs frente al ctDNA es que, contrariamente a este, las VEs son capaces de cruzar la BHE, permitiendo la detección de diferentes mutaciones asociadas a tumores gliales (García-Romero *et al.*, 2017a).

Ahora bien, tanto la detección del ADN-VEs, como la detección del ADNtc, requieren tecnologías altamente sensibles y con un límite de detección (LdD) suficientemente bajo para llegar a identificar las alteraciones que provienen del tumor. Una alternativa a estos sistemas de detección es la potenciación del alelo mutado mediante la modificación de la PCR.

#### **1.3.1.4. Potenciación y detección del alelo mutado**

Como se ha comentado anteriormente, el principal inconveniente de las biopsias líquidas es el de la detección del ANs provenientes del tumor, pues este se representa en una muy baja proporción

del total del ANs (Avanzini *et al.*, 2020). Aunque con el aislamiento de las VEs ya se esté incrementando la representación de ANs tumorales, este aumento no es suficiente para poder detectar alteraciones genéticas. Pese a que existen tecnologías como la NGS que permiten alcanzar la sensibilidad suficiente para la detección de mutaciones somáticas procedentes de los tumores sólidos en BL, el elevado coste de estas hace inviable su implementación en muchos laboratorios de biología molecular (Oellerich *et al.*, 2017). Además de la NGS, existen otras tecnologías, basadas en la PCR, que poseen la sensibilidad suficiente para la detección de mutaciones en BL. Una de ellas es BEAMing, que combina la PCR cuantitativa (qPCR) con la citometría de flujo para detectar una fracción de alrededor del 0,1 % de ADN tumoral (Diehl *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006). Otra tecnología basada en la qPCR, es la dPCR (Vogelstein and Kinzler, 1999), que permite la detección de hasta un 0,01% del alelo mutado (Stahl *et al.*, 2015). Tanto BEAMing como dPCR se basan en el mismo principio, que se puede resumir con la célebre frase “*Divide y vencerás*”. Estas tecnologías parten de la división de los ANs de la muestra en parcelas de tan solo una cadena de AN. Este hecho permite detectar la fluorescencia en cada una de esas divisiones eliminando el fondo del alelo no mutado en las celdas que contienen la copia del AN mutado. Estas tecnologías, aunque eficaces en la detección de mutaciones con muy baja frecuencia, estas tecnologías también suponen una gran inversión económica, pues requieren de equipamiento tecnológicamente avanzado.

Para sortear este impedimento se han descrito diferentes modificaciones de la PCR, de las cuales cabe destacar la PCR de coamplificación a baja temperatura de desnaturalización (COLD-PCR del inglés, *co-amplification at lower denaturation temperature-PCR*) (Li *et al.*, 2008), que ofrece una alternativa real para la detección de mutaciones a muy baja frecuencia (Masfarré *et al.*, 2021). Esta técnica se basa en la diferencia de temperaturas de desnaturalización ( $T_m$ , del inglés *melting Temperature*) entre las secuencias del ADN mutado y del no mutado (WT, del inglés *wild type*). Si bien esta diferencia es mínima, generalmente entre 0,2 y 1,5 °C, se puede hallar aquella temperatura de desnaturalización crítica ( $T_c$ ) en la que las cadenas de ADN mutadas se desnaturalizan, mientras que las cadenas homocigotas para WT permanecen unidas entre sí (Li *et al.*, 2008). En estas condiciones de desnaturalización los cebadores no pueden unirse a las secuencias del ADN WT por lo que se favorece la amplificación del alelo mutado.

Existen diferentes tipos de COLD-PCR: *full-COLD-PCR*, *fast-COLD-PCR* e *ice-COLD-PCR* (*ice*, del inglés, *improved and complete enrichment*) entre otros. La *full-COLD-PCR* se caracteriza por introducir un paso intermedio de formación de heterodímeros MUT/WT antes de la aplicación de la  $T_c$ . En la *ice-COLD-PCR* se añade a la reacción una cadena de ADN sintética complementaria a la secuencia WT y fosforilada en 3' que permite un bloqueo de la desnaturalización más eficaz. La *fast-COLD-PCR* es la más sencilla de las tres variantes aquí descritas pues simplemente se modifica la temperatura de desnaturalización en la PCR. Si bien

las dos primeras COLD-PCR permiten la amplificación selectiva de cualquier tipo de mutación, la *fast*-COLD-PCR se limita a mutaciones puntuales en las que la  $T_m$  de la mutación es inferior a la  $T_m$  del WT (Milbury *et al.*, 2011; Mauger, How-Kit and Tost, 2017). En cuanto a capacidad de potenciación del alelo mutado, la *fast*-COLD-PCR es la que mejor se desenvuelve, proporcionando una amplificación del mutado de aproximadamente 20 veces superior a la del WT. La *ice*-COLD-PCR y la *full*-COLD-PCR, si bien son aplicables a cualquier tipo de mutación, se limitan a amplificar aproximadamente 15 y 7 veces más el alelo mutado, respectivamente (Milbury *et al.*, 2011). Debido a que la  $T_c$  puede variar según el termociclador usado, existe la variante tolerante de temperatura (TT, del inglés *tolerant temperature*) de la *fast*-COLD-PCR, de abreviación final TT-*fast*-COLD-PCR (Mauger, How-Kit and Tost, 2017). En esta variación de la COLD-PCR se introducen diferentes  $T_c$  en el mismo programa de PCR. Esta modificación permite reducir el efecto sobre la  $T_c$  de los diferentes termocicladores usados, así como, minimizar las variaciones interlaboratorio, logrando así aumentar el rango de cobertura de la potenciación.

Una vez potenciado el alelo mutado frente al alelo WT debe realizarse una detección eficaz de la mutación. Como ya se ha comentado en apartados anteriores, la tecnología actual, permite la detección eficaz de mutaciones procedentes del tumor en muy baja frecuencia alélica. El inconveniente de estas nuevas tecnologías es que suponen una alta inversión en el equipamiento, o bien un análisis complejo de los datos obtenidos. Aunque, los productos resultantes de la amplificación con potenciación del alelo mutado obtenidos con la COLD-PCR pueden ser detectados mediante tecnologías la secuenciación Sanger, la implantación de ésta también supone una inversión considerable para cualquier laboratorio. En este sentido, existe una tecnología, que, aunque hasta la fecha no se ha usado en la detección de mutaciones puntuales, sí que se ha probado en el diagnóstico diferencial, de infecciones por *L. major* y *T. cruzi* (Tabraue-Chávez *et al.*, 2019). Este análisis se realiza mediante la tecnología DGL-*Tech*<sup>TM</sup> (DestiNA Genomics), que propone una detección y diferenciación eficaz de cadenas de ADN con un solo nucleótido distinto mediante una reacción colorimétrica sin necesidad de equipamiento altamente especializado.

Esta tecnología consta de sondas específicas denominadas DGL-Probes unidas covalentemente a una membrana de nylon ensamblada en un tubo de microcentrífuga. Estas sondas contienen un espacio carente de nucleósido en el locus donde se halla la mutación/el alelo en la cadena de ADN interrogada. Cuando la cadena de ADN que se analiza se une a la sonda, se añade una base modificada complementaria a la interrogada. Esta base modificada se denomina SMART-Base, y su modificación permite la unión de biotina, que posteriormente reaccionará con estreptavidina dando lugar a la reacción colorimétrica que permitirá diferenciar las cadenas mutadas de las WT (Tabraue-Chávez *et al.*, 2019). Con un correcto diseño de las sondas, una determinada distribución de esas mismas sondas en la membrana de nylon y mediante una simple reacción

colorimétrica de estreptavidina y biotina; la tecnología *DGL-Tech<sup>TM</sup>*, permite la detección de aquellas secuencias de ANs que contengan una mutación y diferenciarlas de aquellas WT o bien la presentan en heterocigosis. Todo ello sin la necesidad de la implementación de equipamiento especializado y altamente costoso, además de presentar unos resultados fácilmente interpretables por el personal de laboratorio.

Con todo lo expuesto en esta introducción, se presentarán en los siguientes capítulos, las hipótesis y los objetivos generales y específicos que fundamentan esta tesis doctoral.

## 2. Hipótesis

La biopsia líquida, por su potencial en cuanto a detección temprana, diagnóstico, pronóstico, monitorización, detección de mecanismos de resistencia, etc., se está aplicando cada vez más en el campo de la oncología clínica. El principal reto que supone la BL es la detección de aquellos biomarcadores que provienen específicamente de las células tumorales. Uno de los mecanismos para poder salvar este obstáculo es el aislamiento de VEs. Además, las VEs pueden traspasar la barrera hematoencefálica (BHE), permitiendo la aplicación de la BL en tumores del SNC.

En esta tesis se trabaja sobre la hipótesis de que las VEs aisladas de sangre son una herramienta para la obtención de biomarcadores genéticos tumorales.

En cuanto a la aplicación de BL en cáncer de mama se atiende a la siguiente hipótesis: la diferencia de expresión de determinados miARNs encapsulados en VEs es capaz de predecir la respuesta al tratamiento con QNA en pacientes con fenotipos extremos de cáncer de mama.

En relación con la BL en tumores gliales, la hipótesis que presentamos es la siguiente: es posible determinar la mutación *IDH1*<sup>395G>A</sup> en cualquier laboratorio mínimamente equipado a través del aislamiento de ADN de las VEs.

### 3. Objetivos generales y específicos

El objetivo general es:

1. Desarrollar procedimientos estandarizados de análisis de biomarcadores genéticos contenidos en las vesículas extracelulares a partir de muestras de biopsia líquida en modelos de patologías tumorales extremas.

Los objetivos específicos son:

1. Optimizar el aislamiento de VEs
  - a. Desarrollar un nuevo método de aislamiento basado en PEG 8000 comparándolo con otros procedimientos de aislamiento de VEs, incluida la técnica de referencia UC.
  - b. Establecer un método de aislamiento de VEs con un alto rendimiento en la recuperación de ácidos nucleicos.
2. Hallar una firma de expresión de miARNs procedentes de VEs para predecir la respuesta al tratamiento neoadyuvante en tumores de mama con fenotipos extremos.
  - a. Diseñar una matriz de miARNs con potencial discriminatorio entre pacientes respondedoras y no respondedoras al tratamiento neoadyuvante.
  - b. Identificar aquellos miARNs con capacidad de diferenciar las pacientes con respuesta patológica a quimioterapia neoadyuvante en fenotipos extremos de cáncer de mama.
3. Determinar un sistema de detección de mutaciones en VEs de tumores gliales de aplicación en laboratorios con equipamiento estándar de biología molecular independiente de equipamiento altamente especializado (secuenciación Sanger, RT-qPCR, dPCR y NGS).
  - a. Desarrollar un protocolo de potenciación de mutaciones en BL.
  - b. Validar un sistema de detección de mutaciones en BL sin equipamiento altamente especializado en diferentes laboratorios.
  - c. Comparar los resultados obtenidos mediante el nuevo método con la metodología de referencia (secuenciación Sanger).

## 4. Materiales y métodos

### 4.1. Cohortes de estudio

Todas las muestras se obtuvieron tras garantizar el cumplimiento de toda la legislación vigente en términos de protección de datos, y después de haber sido aprobado el proyecto por parte de los Comités de Ética de Investigación Clínica pertinentes. Solo se incluyeron las muestras de los pacientes de lo que se recibió el consentimiento informado firmado. Asimismo, las muestras de sangre recolectadas para los proyectos enmarcados en esta tesis fueron obtenidas mediante venopunción, se dejaron coagular a temperatura ambiente (TA). Posteriormente se obtuvieron los sueros tras una centrifugación a 1800g durante 15 minutos a 4 °C para la obtención de los sueros y posterior almacenamiento a -80 °C.

#### 4.1.1. Cohorte de comparación de técnicas de aislamiento de VEs

Para testar diferentes aproximaciones de aislamiento de VEs, se usó una cohorte de 50 donantes sanos provenientes de HM Hospitales en Madrid. Los sueros fueron juntados para evitar la variabilidad interindividual y realizar las pruebas de aislamiento de VEs en las mismas condiciones preanalíticas.

#### 4.1.2. Cohorte de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama

Esta cohorte está compuesta por pacientes de cáncer de mama diagnosticadas con uno de los tres siguientes fenotipos: luminales B con sobreexpresión de HER2 (LumB HER2), HER2 sobreexpresado (HER2) o triple negativo (TN). Se recolectaron un total de 141 muestras de suero al momento del diagnóstico, procedentes de los siguientes centros hospitalarios: Complejo Hospitalario de Jaén (CHJ), Complejo Hospitalario Torrecárdenas (CHT, Almería) y Complejo Hospitalario de Granada (CHG).

Como criterios de inclusión se establecieron los siguientes:

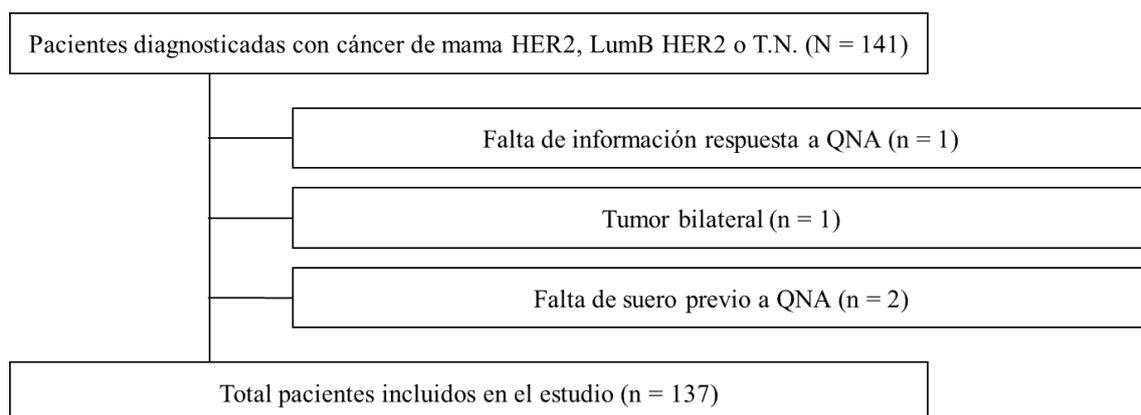
- Mujeres de entre 18 y 80 años.
- Con cáncer de mama de uno de los tres siguientes fenotipos:
  - o TN
  - o HER2 +.
  - o LumB HER2 +.
- Disponer de muestra sanguínea al momento del diagnóstico.

Y se establecieron los siguientes criterios de exclusión:

- La falta de los siguientes datos clinicopatológicos:

- Edad al diagnóstico.
  - Estado de los receptores RE, PR.
  - Estado HER2.
  - Tipo de tratamiento pautado.
  - Respuesta patológica al tratamiento.
- Pacientes con tumoración bilateral.
  - Falta de la firma y/o el documento del consentimiento informado para el uso de sus muestras biológicas para este proyecto.
  - Presencia o progresión con metástasis.

Del total de 141 muestras, como se ilustra en la Figura 4.1, 1 de ellas no contenía información del estado de respuesta patológica al tratamiento neoadyuvante ya por lo que se desestimó para el estudio. Otra muestra correspondía a un tumor bilateral, y de otras dos pacientes no se dispuso de tubo de suero previo al tratamiento. Por consiguiente, en este estudio de expresión de miARNs se incluyeron un total de 137 pacientes con muestras de suero previo al tratamiento de neoadyuvancia.



**Figura 4.1** Esquema de los pacientes incluidos en el estudio de BL en tumores de mama.

La media de edad al momento del diagnóstico fue de 51,6 años ( $\pm 11,4$ ) y el tamaño medio del tumor fue de 32,18 mm ( $\pm 18,8$  mm). Se diagnosticaron 69 tumores en la mama derecha y 68 en la mama izquierda.

Centrándonos en el fenotipo, clasificación en la que se sustentan los resultados de este estudio, se procesaron 66 muestras de tumores con fenotipo triple negativo (43,80 %), 44 muestras procedentes de tumores diagnosticados como luminales B con HER2 sobreexpresado (32,12 %) mientras que las 33 muestras restantes (24,09 %) corresponden al fenotipo HER2 sobreexpresado. Además de estas tres subcohortes, se realizó un análisis englobando las muestras con HER2 sobreexpresado con y sin expresión de marcadores hormonales con una  $n = 77$  (56,20 %).

En cuanto al estadio patológico, como se indica en la Tabla 4.1, el más representado en esta cohorte con un 50,39 % del total de tumores incluidos en el estudio fue el IIA, el segundo más representado fue el estadio IIB con un 34,11 %. Con estadio IIIA se reportaron un total de 12 pacientes (9,3 %) y 4 pacientes, el 3,1 %, con estadios IA y IIIB.

**Tabla 4.1** *Estadio patológico de las pacientes al momento del diagnóstico.*

<b>Estadio patológico</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>Acumulado</b>
IA	4	3,10 %	3,10 %
IIA	66	50,39 %	53,49 %
IIB	45	34,11 %	87,60 %
IIIA	12	9,30 %	96,90 %
IIIB	4	3,10 %	100 %
<b>Total</b>	<b>131</b>		

*Nota:* No se pudieron conseguir datos de 6 pacientes. Los porcentajes se realizaron sobre el total de observaciones.

Referente al tipo tumoral, tal y como se detalla en la Tabla 4.2, un 64,96 % (n = 89) de la cohorte estudiada presentaban carcinoma ductal infiltrante (CDI), un 24,82 % (n = 34) se diagnosticaron como carcinomas infiltrantes de tipo no especial (TNE) y un 5,11 % (n = 7) de las pacientes incluidas en el estudio presentaron carcinomas luminales infiltrantes (CLI). También se observó un 5,11 % (n = 7).

**Tabla 4.2** *Tipos tumorales descritos en el diagnóstico de las pacientes de la cohorte.*

<b>Tipo de tumor</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>Acumulado</b>
CDI	89	64,96 %	64,96 %
C. Infiltrante TNE	34	24,82 %	88,32 %
CLI	7	5,11 %	70,07 %
Otros	7	5,11 %	100 %
<b>Total</b>	<b>137</b>		

*Nota:* CDI: Carcinoma Ductal Infiltrante, CLI: Carcinoma Luminal Infiltrante, TNE: carcinoma infiltrante de Tipo No Especial.

De las 137 pacientes incluidas en el estudio, 132 (96,3 %) fueron sometidas a cirugía mientras que solo 3 (2,2 %) pacientes evitaron pasar por el quirófano. No se dispone de información quirúrgica de 2 pacientes. El tipo de intervención se detalla en la Tabla 4.3.

**Tabla 4.3** *Tipos de cirugía realizada a las pacientes incluidas en el proyecto.*

<b>Tipo de cirugía</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>Acumulado</b>
Cuadrantectomía	1	0,76 %	0,76 %
Tumorectomía	97	74,05 %	74,81 %
Mastectomía	33	25,19 %	100 %
<b>Total</b>	<b>131</b>		

*Nota:* no se obtuvieron datos del tipo de cirugía de 6 pacientes. Los porcentajes se realizaron sobre el total de observaciones.

En relación con la QNA, el esquema de tratamiento más común fue, como se indica en la Tabla 4.4, el de antraciclinas más taxanos, administrado a 112 de las 137 pacientes (84,12 %). El mismo esquema de estos dos fármacos, combinados con platino se aplicó a 3 pacientes (2,26 %); mientras que 10 (7,52 %) pacientes fueron tratadas con taxanos solamente y 2 pacientes (1,5 %) recibieron antraciclinas sin combinar. Un total de 6 pacientes (4,51 %) recibieron un esquema distinto de los 4 descritos anteriormente.

**Tabla 4.4** *Esquemas de tratamiento neoadyuvante recogidos en el estudio Metabreast.*

<b>Esquema de tratamiento</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>Acumulado</b>
Antraciclinas + Taxanos	112	84,21 %	84,21 %
Taxanos	10	7,52 %	91,73 %
Antraciclinas +Taxanos + Platino	3	2,26 %	93,99 %
Antraciclinas	2	1,50 %	95,49 %
Otros	6	4,51 %	100 %
<b>Total</b>	<b>133</b>		

*Nota:* no se obtuvieron datos del tratamiento neoadyuvante de 4 pacientes. Los porcentajes se realizaron sobre el total de observaciones.

Para el estudio de la respuesta a la QNA se utilizó la escala de MyP. En esta cohorte, tal y como se indica en la Tabla 4.5, 63 pacientes (46 %) presentaron un G5, 23 pacientes (16,8 %) obtuvieron una respuesta patológica de G4, 33 (24,1 %) un G3, 10 (7,3 %) presentaron un G2 y finalmente sólo 8 pacientes (5,8 %) no presentaron respuesta alguna a la QNA.

**Tabla 4.5** *Grados de respuesta patológica a la quimioterapia neoadyuvante de las pacientes del proyecto Metabreast.*

<b>Respuesta local</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>Acumulado</b>
G1	8	5,84 %	5,84 %
G2	10	7,3 %	13,14 %
G3	33	24,09 %	37,23 %
G4	23	16,79 %	54,01 %
G5	63	45,99 %	100 %
<b>Total</b>	<b>137</b>		

Toda la información clínica de las pacientes incluidas en este proyecto se registró en un cuaderno de recogida de datos electrónico, permitiendo la actualización del estado de esas pacientes a tiempo real. Este requerimiento es imprescindible en este trabajo pues la respuesta al tratamiento de QNA se adquiere en un espacio temporal indefinido al inicio de este.

Asimismo, se utilizaron 11 controles de mujeres sin patología mamaria para la puesta a punto de la técnica.

### 4.1.3. Cohorte de pacientes diagnosticados de glioma

Se obtuvieron muestras de tejido y sangre periférica (suero y plasma) provenientes de 114 pacientes enrolados en el Hospital Universitario la Fe de Valencia, el Hospital General Universitario Gregorio Marañón y HM Hospitales de Madrid. Los tejidos tumorales de los pacientes, provenientes de la cirugía, se fijaron en formaldehído al 4 % tamponado y se embecieron en parafina. Su almacenaje fue a TA hasta su utilización.

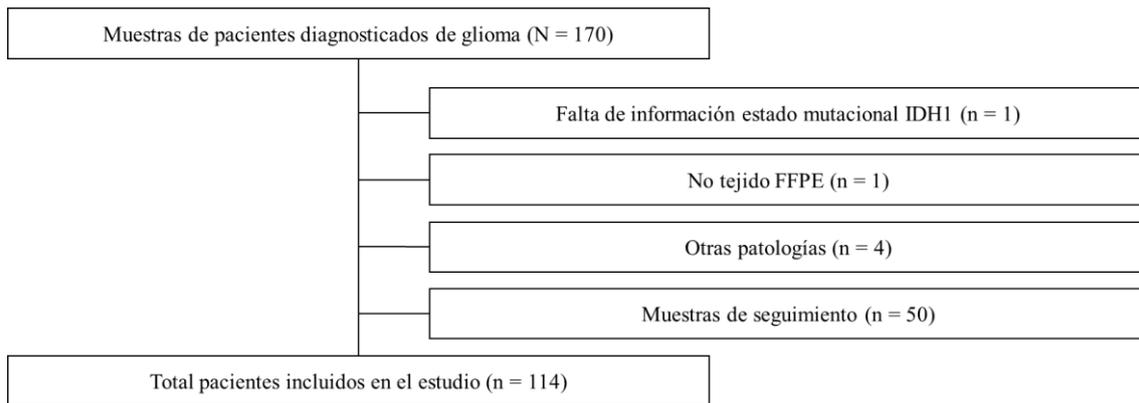
Para la recolección de muestras de esta cohorte se establecieron los siguientes criterios de inclusión:

1. Pacientes mayores de 18 años.
2. Con diagnóstico radiológico de glioma previo a la cirugía.
3. Disponer de muestra sanguínea obtenida previamente a la cirugía.
4. Diagnóstico histológico de glioma de cualquier grado.
5. La firma del consentimiento informado.

Y los siguientes criterios de exclusión:

- Embarazo y/o lactancia.
- Patología cerebral previa de cualquier tipo.
- Los pacientes con datos clínico-patológicos incompletos.
- Tumores previos.

Se obtuvieron 170 muestras de sangre de pacientes con tumores gliales, 50 de esas muestras provenían de seguimientos de pacientes ya reclutados. Asimismo, se desestimó una muestra para el estudio debido a que no contenía información del estado mutacional de IDH1<sup>R132H</sup>. Otra se descartó debido a que correspondía a una gliosis reactiva y otras 2 muestras fueron clasificadas como un linfoma y una metástasis cerebral de melanoma. Tampoco se dispuso de tejido tumoral FFPE de otra muestra debido a que el paciente no pudo ser sometido a operación. Finalmente, como se puede observar en la Figura 4.2, en este estudio mutacional se incluyeron un total de 114 pacientes de los que se extrajeron 164 muestras de tejido parafinado representativo del tumor con la correspondiente muestra de sangre periférica previos a la cirugía. 50 muestras procedían de seguimientos de pacientes ya incluidos en el estudio.



**Figura 4.2** Esquema de los pacientes incluidos en el estudio de BL en tumores gliales.

Del total de pacientes, 62 (57,41 %) eran de género masculino y 46 (42,59 %) eran de género femenino. La media de la edad en el momento del diagnóstico se fue de 57 años (26 – 84). Referente al tipo tumoral, tal y como se detalla en la Tabla 4.6, la cohorte estudiada constó de 67 GB (de entre los que se contabilizaron 2 gliosarcomas), 24 astrocitomas, 14 oligodendriomas, 5 gangliogliomas y 4 oligoastrocitomas. Del total de astrocitomas, 12 se clasificaron como astrocitomas anaplásicos (grado III de la OMS), 11 como astrocitomas difusos (grado II de la OMS) y 1 como pilocítico (grado I de la OMS). Entre los oligodendrogliomas, se cuantificaron 8 de grado II de la OMS y 6 de grado III. De los gangliogliomas, 2 de los 5 se consideraron de grado I y los 3 restantes de grado III, no se describió ningún ganglioglioma de grado II. En cuanto a los oligoastrocitomas incluidos en el proyecto, 3 presentaron un grado III de la OMS mientras que 1 se consideró de grado II.

**Tabla 4.6** Tipos de glioma incluidos en el estudio mutacional en tumores gliales.

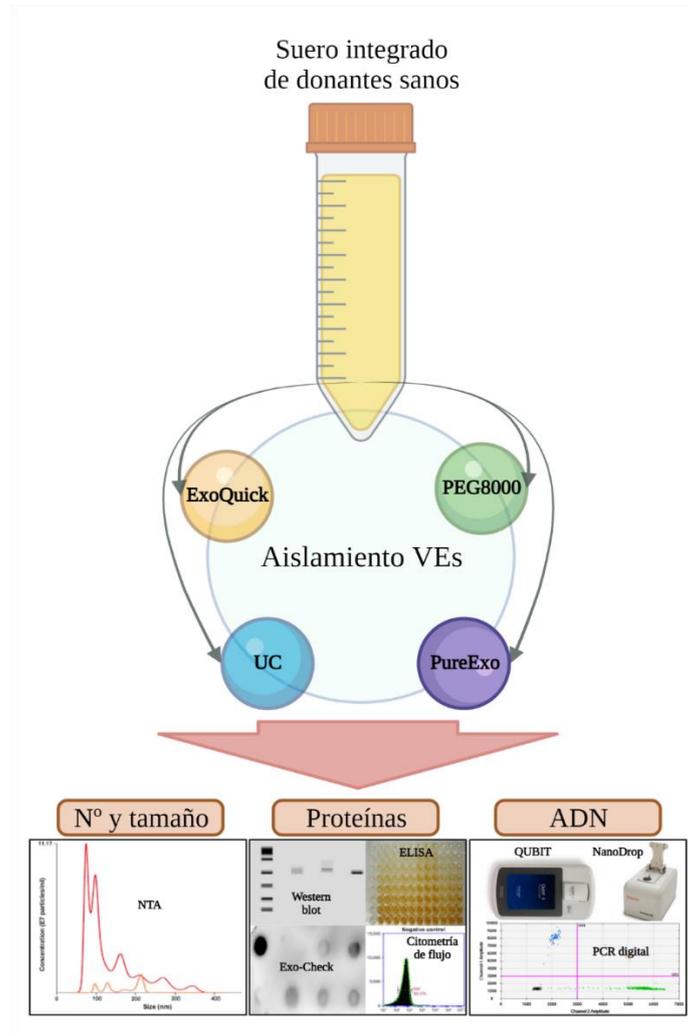
Tipo tumoral	Grado OMS	N	%
GBM <sup>a</sup>	grado IV	67	40,85 %
Astrocitoma (n = 24; 21,05 %)	grado I	1	0,61 %
	grado II	11	6,71 %
	grado III	12	7,32 %
	grado III	12	7,32 %
Oligodendroglioma (n = 14; 12,28 %)	grado II	8	4,88 %
	grado III	6	3,66 %
Ganglioglioma (n = 5; 4,39 %)	grado I	2	1,22 %
	grado III	3	1,83 %
Oligoastrocitoma (n = 4; 3,51 %)	grado II	1	0,61 %
	grado III	3	1,83 %
<b>TOTAL</b>		<b>114</b>	

<sup>a</sup> 2 de los 67 GBM (2,98 %) fueron diagnosticados de gliosarcoma.

A parte de la cohorte de pacientes, se dispuso de controles comerciales con la mutación c.394G>A del gen *IDH1* para proceder a la puesta a punto y posterior validación analítica de las técnicas de amplificación con potenciación del alelo mutado (*fast-COLD-PCR*) y de detección mediante la tecnología *DGL-Tech™* (Destina genomics).

## 4.2. Análisis de calidad de los aislamientos de vesículas extracelulares

Tal y como se muestra en la Figura 4.3, se procedió al aislamiento de VEs mediante comparando nuestro protocolo basado en PEG8000, con dos kits comerciales y el método de referencia en aislamiento de VEs, la UC, utilizando diferentes volúmenes iniciales de suero.



**Figura 4.3** Esquema realizado para la selección del método de aislamiento de las VEs de sueros.

### 4.2.1. Aislamiento de vesículas extracelulares

Para el aislamiento de VEs contenidas en los sueros se usaron diferentes volúmenes iniciales de suero (0,5 ml, 1 ml y 2 ml) que se procesaron con el protocolo basado en la precipitación mediante polietilenglicol 8000 (PEG8000) descrito por (García-Romero *et al.*, 2019); dos kits comerciales (ExoQuick®; System Biosciences y PureExo®; 101Bio) y la UC, considerada el “*gold standard*” para el aislamiento de VEs. Antes de empezar con cada protocolo y con la finalidad de eliminar células contaminantes y restos celulares se centrifugaron los sueros a 3.000g durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante.

Antes de empezar el aislamiento de VEs con PEG8000, se preparó una solución de este reactivo al 40% m/v y se filtró al vacío con una membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro (Thermo Scientific) para su esterilización. Esta solución de trabajo es estable 1 año a TA. Seguidamente, se mezcló el PEG8000 a razón del 10% m/v con los sueros y se procedió a realizar una incubación 1 h a 4 °C. Luego de esta incubación se volvió a centrifugar la mezcla 5 minutos a 16.000g y a 4 °C. Una vez centrifugado, se eliminó el sobrenadante y se realizó un lavado con PBS 1X. Para el lavado se añadió 1 ml de PBS al pellet, se centrifugó 5 minutos a 1.500g a TA y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente se resuspendió el pellet en 300  $\mu\text{l}$  de PBS1X y se procedió a la extracción de miARN (cáncer de mama) o de ADN (tumores cerebrales) o se almacenó a -80 °C para su preservación hasta su utilización.

Los aislamientos de VEs con los kits comerciales se realizaron siguiendo los protocolos propuestos por las casas comerciales: ExoQuick® de System Biosciences y PureExo® de 101Bio.

La UC de los sueros se realizó a 117.000g durante 90 minutos en el equipo Optima-LE 80 K, con los rotores 55.2 Ti (Beckman Coulter). Se descartó el sobrenadante y se lavaron los precipitados con una solución de tampón fosfato salino (PBS, del inglés phosphate buffered saline) (Invitrogen, 14040133) para ultracentrifugarse de nuevo mediante el mismo esquema.

Una vez aisladas las VEs con los diferentes protocolos, los productos que se obtuvieron con cada uno de ellos se sometieron a un análisis de calidad. En este análisis se comprobó el tamaño medio y la concentración de las partículas aisladas; la cantidad de proteínas totales y de membrana; la presencia de marcadores de membrana específicos de VEs y la cantidad de ADN en cada uno de los métodos evaluados.

#### **4.2.2. Análisis de rastreo de nanopartículas**

Para el análisis del tamaño y concentración de partículas, se utilizó la técnica de rastreo de nanopartículas (NTA, del inglés *nanoparticle tracking analysis*). Para ello, se diluyeron las muestras 1:1000 en PBS 1X y se procesaron los productos de cada método directamente a través del equipo NS500 (Malvern Instruments). Los vídeos generados por el equipo, de 60 segundos, donde se observan las partículas, se grabaron 3 veces para cada muestra a una temperatura constante de 25 °C. Los resultados se analizaron con el software NTA 3.1 (Malvern Panalytical).

#### **4.2.3. Aislamiento y cuantificación de proteínas**

Una vez analizados los tamaños medios y las concentraciones de los aislamientos de VEs, se prosiguió con una detección de proteínas. Se realizaron dos tipos de medidas para la concentración de proteínas. La primera, que se realizó directamente sobre las VEs aisladas de los sueros, fue para medir la concentración de proteínas de membrana. En la segunda determinación, se

comprobó la concentración de proteínas totales. Para ello, se procedió a un lisado de 50 µl de VEs con 50 µl de tampón de RIPA (del inglés *radioimmunoprecipitation buffer*), (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM ácido etilendiaminetetraacético (EDTA, del inglés *ethylenediaminetetraacetic acid*), 1% Triton x-100, 5 mM NaF y un coctel de proteasas/fosfatasas). Luego se extrajeron las proteínas recogiendo el sobrenadante tras 20 minutos de centrifugación a 13.200g a 4 °C. Las concentraciones tanto de las VEs como de los lisados se determinaron mediante el kit *Protein Assay* (Bio-Rad) siguiendo las recomendaciones del fabricante y leyendo la absorbancia a 595 nm en el equipo Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific).

#### 4.2.4. Western blot

Una vez calculadas las concentraciones de proteínas de membrana y totales, se procedió a la confirmación de la presencia de VEs en los productos de cada método de aislamiento. Para determinar la presencia o ausencia de VEs en los diferentes productos, se procesaron 40 µl de extracto de proteínas para la detección del marcador de VEs CD63. Los extractos de proteínas se procesaron en una electroforesis con gel al 12% de SDS-PAGE (del inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se bloquearon 1 h con albúmina de suero bovino en tampón salino tween-tris al 1X (T-TBS, del inglés *Bovine Serum Albumin in Tween-Tris Buffered Saline*). Después del bloqueo se incubaron las membranas de nitrocelulosa con los anticuerpos monoclonales de ratón contra CD63 humano (Abcam, ab8219, 1 µg/ml) y contra la proteína de retículo endoplasmático calnexina (Abcam, ab112995, 1 µg/ml) durante una noche (O/N del inglés, *over night*) a 4 °C. Una vez realizado el lavado, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario de caballo contra IgG de ratón unido a peroxidasa (1:2000, PI-2000, Vector) durante 1 h a TA. La detección se llevó a cabo con los reactivos de ECL™ acuerdo con las instrucciones del fabricante (GE Healthcare).

#### 4.2.5. Citometría de flujo de CD63

Para corroborar estos resultados se analizó la misma proteína CD63 mediante citometría de flujo. En este ensayo, las VEs fueron adsorbidas al 4% w/v en partículas de látex de 4 µm (Thermo Fisher Scientific) durante 1 h a 4 °C. La ratio entre VEs y el número de partículas se mantuvo constante a 1:1 para todas las muestras. Se paró la adsorción con glicina 100 mM y fueron lavadas con 1 ml de PBS 1X mediante centrifugación a 800 g. Las partículas unidas a las membranas de las VEs fueron incubadas con anticuerpo de ratón contra CD63 humano (1:100, 556019, BD Bioscience) durante 1 h a TA para seguidamente incubarlas con anticuerpo secundario unido a isotiocianato de fluoresceína (FITC, del inglés *fluorescein isothiocyanate*) (1:200, R&D Systems)

durante 1 h a TA. Se lavaron las muestras y se resuspendieron en 0,5 ml de PBS 1X. Finalmente se analizaron con el citómetro Attune Acoustic Focusing Cytometer (Thermo Fisher Scientific).

#### 4.2.6. Cuantificación de VEs mediante ELISA de CD9

Seguidamente se determinó la concentración de VEs indirectamente midiendo la cantidad de CD9, proteína de membrana asociada a las VEs, mediante el sistema ExoELISA™ (System Biosciences). Se añadieron 20 µl de VEs en una placa de 96 pocillos y se incubaron O/N a 37 °C, posteriormente se lavó la placa y se incubó con el anticuerpo primario contra CD9 a TA durante 1 h con agitación. Se volvió a lavar la placa (3 veces) y se incubó con el anticuerpo secundario (1:5000) más sustrato 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) específico para ensayos por inmunoabsorción de ligado a enzimas (ELISA, del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*). Las absorbancias fueron detectadas en el equipo Varioskan a 450 nm. Los resultados finales se expresaron en número de VEs por ml de suero.

#### 4.2.7. Matrices de anticuerpos Exo-Check

Para asegurar la presencia de VEs, se usaron matrices de anticuerpos en membrana Exo-Check (System Biosciences). Con estas matrices se realizó la detección de 8 conocidos marcadores de VEs (FLOT-1, ICAM, ALIX, CD81, CD63, EpCAM, ANXA5 y TSG101). La realización del test se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante: se lisaron 400 µg de proteínas y se incubaron O/N en la membrana con los anticuerpos contra los citados antígenos. Se lavó tres veces la membrana, se incubó con el tampón de detección y se procedió a la captación de imágenes con un equipo de quimioluminiscencia.

Las imágenes se transformaron a 8 bits con el programa libre de licencia ImageJ para medir las medias de la intensidad de los grises de cada punto de tinción. Se normalizaron los valores mediante los controles positivo y negativo otorgando a cada control de cada array la puntuación 0 para el control negativo y 100 para el control positivo. Se aplicó una agrupación jerárquica para detectar la relación entre la intensidad normalizada de cada marcador de VEs en los diferentes métodos realizados. La métrica empleada fue de 1 menos el coeficiente de correlación de Pearson.

#### 4.2.8. Extracción y cuantificación del ADN

Una vez caracterizadas las VEs, para determinar la carga de ADN de los productos aislados, se llevó a cabo una cuantificación absoluta de este ADN mediante la tecnología dPCR. Antes de proceder a la prueba de dPCR, se extrajeron los ADNs de las VEs. A tal efecto, se lisaron 200 µl de VEs con 100 µl de tampón de lisis [(50 mM NaCl (S5886, Sigma Aldrich), 5 mM EDTA (E9889, Sigma Aldrich), 5 mM Tris, pH 8.0 (T6066, Sigma Aldrich), 1% de dodecilsulfato sódico

(SDS, del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS, L3771, Sigma Aldrich), 20 mM ditioneitol (DTT, 43816, Sigma Aldrich) y 0,5 mg/ml de proteinasa K (P4850, Sigma Aldrich)] O/N a 56 °C. Posteriormente, se realizó una extracción de ADN siguiendo el protocolo estándar con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (1:1:1). Se cuantificaron las concentraciones de ADN mediante fluorimetría con el kit *Qubit™ dsDNA High Sensitivity assay*, midiendo las absorbancias en el fluorómetro Qubit™ 3.0 (Thermo Fisher Scientific), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

#### 4.2.9. PCR digital

Para la cuantificación mediante dPCR de los ADNs extraídos de las VEs, se eligieron tres genes de interés en el estudio genómico de los tumores gliales como son *BRAF*, *CDH4* y *IDH1*. Se usó el equipo QuantStudio™ 3D Digital PCR System (Thermo Fisher Scientific), y se siguió el protocolo para mutaciones raras adjuntado por el fabricante. Se mezclaron los ADNs con agua libre de nucleasas, la Master Mix QuantStudio™ 3D Digital PCR y los reactivos (sonda más primer) listos para su uso TaqMan Assay 20X para rs6142884 (*CDH4*), rs28746 (*IDH1*) y rs113488022 (*BRAF*) (Thermo Fisher Scientific). Los resultados se analizaron con el software QuantStudio™ 3D Analysis Suite Cloud y se calcularon las medias de número de copias por µl.

### 4.3. Materiales y métodos BL en cáncer de mama

#### 4.3.1. Extracción de miARN de las VEs

La extracción de miARN de las VEs (miARN-VEs) se realizó con el kit Maxwell® RSC miRNA plasma and serum kit (AS1680, Promega) partiendo de 200 µl de la suspensión de VEs en PBS. Se procesaron las muestras en el equipo automatizado Maxwell® 16 con una incubación previa como se detalla en las instrucciones facilitadas por el propio fabricante. Para el correcto funcionamiento del equipo Maxwell® 16 con un kit diseñado para el Maxwell® RSC se precisa de un émbolo específico que hay que solicitar aparte (AS6101, Promega).

El propio kit se abastece de un control externo de miARN para comprobar el rendimiento de la propia extracción. Éste se basa en la introducción de un miARN de secuencia conocida y a una concentración determinada en los reactivos del kit.

Una vez extraído el miARN de las muestras, se procedió a determinar la concentración de éste mediante el kit Qubit™ microRNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) en el fluorómetro Qubit™ 4.0 (Thermo Fisher Scientific). También se realizó la cuantificación del ARN total con el espectrofotómetro NanoDrop ND1000 (ThermoFisher) realizando un análisis de calidad mediante las ratios de absorbancia A260/A230, para descartar la contaminación con fenoles y diferentes sales y A260/A280 para descartar la contaminación con proteínas.

### 4.3.2. Elección de los miARN para el estudio de expresión en cáncer de mama

Una primera búsqueda bibliográfica en PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>) con la fórmula (((“Breast Neoplasms/analysis”[Mesh] OR “Breast Neoplasms/blood”[Mesh] OR “Breast Neoplasms/genetics”[Mesh])) AND “MicroRNAs/analysis”[Mesh]) AND “Extracellular Vesicles”[Mesh]) reportó 16 resultados. Para ampliar los resultados se eliminó el término “vesículas extracelulares” de la fórmula quedando en (((“Breast Neoplasms/analysis”[Mesh] OR “Breast Neoplasms/blood”[Mesh] OR “Breast Neoplasms/genetics”[Mesh])) AND “MicroRNAs/analysis”[Mesh]) y obteniendo un total de 250 artículos, se filtró posteriormente para la búsqueda de revisiones en este campo obteniendo un total de 36 manuscritos. Se revisaron los resultados en busca de los miARNs que potencialmente tuviesen más relevancia en las neoplasias mamarias y se revisó su posible relación con el cáncer de mama usando la base de datos miRNet (Fan *et al.*, 2016).

Finalmente se eligió un total de 50 miARNs objetivo más cuatro posibles controles endógenos sugeridos por la casa comercial (ThermoFisher) y dos *spike-in*, miARNs de secuencias conocidas de organismos no humanos que se usaron como controles técnicos. Se detallan los mi-ARNs incluidos en el estudio en el Tabla A 8.5 del Anexo B.

### 4.3.3. Diseño de matrices de miARN

Los chips del sistema *Open Array*<sup>®</sup> (Thermo Fisher) disponen de un total de 3.072 pocillos de reacción distribuidos en 12 matrices de 64 pocillos. Los cebadores y sondas contra los miARNs seleccionados se distribuyeron en estas matrices de 64 pocillos. Se dejaron sin sondas ni cebadores 8 pocillos correspondientes a G1, G2, H1, H2, G7, G8, H7 y H8 en las 12 matrices del chip pues el equipo que distribuye la mezcla de reacción en los arrays tiende a cometer errores de dispensación en estos pocillos. Las muestras se dispusieron de 11 en 11 (Figura 4.4) en cada chip y se realizaron cuadruplicados de cada una de ellas, asimismo, se incluyó un espacio de 4 matrices para un control de contaminación libre de ADN (NTC, del inglés *Non Template Control*).



**Figura 4.4** Distribución de las muestras y los miARNs seleccionados en la matriz de los chips Open Array®. Cada color en el chip representa una muestra diferente, obsérvese que se distribuyen en cuadruplicados y se reservaron las últimas 4 matrices para el control NTC (en azul claro).

#### 4.3.4. Síntesis de la cola poliadenilada, ligación del adaptador a 5', retrotranscripción de los miARNs, y preamplificación de los cDNAs

El procesado de los miARNs de las muestras hasta su detección mediante RT-qPCR consta de cuatro pasos: una síntesis de una cola poliadenilada (Poli-A) en el extremo 3', una ligación de un adaptador a 5', una retrotranscripción (RT) y una preamplificación (PreAmp). Los cuatro procesos se realizaron mediante los reactivos proporcionados por el kit TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (A28007, ThermoFisher Scientific) siguiendo las directrices de la casa comercial tal y como se detalla a continuación.

##### 4.3.4.1. Poliadenilación de los miARNs

Antes de empezar con la síntesis de la cola Poli-A, se añadieron directamente al tubo de reacción que contenía los 200 µl de VEs de la muestra, 5 µl del *spike-in* ath-miR-149a a 0,1 nM. Para la síntesis de la Poli-A se mezclaron los volúmenes de los reactivos especificados en la Tabla 4.7 en un tubo de reacción estéril y libre de nucleasas.

**Tabla 4.7** Volúmenes de los reactivos a mezclar para la solución de trabajo de la síntesis de la cola Poli-A para 1 muestra.

Reactivo	Volumen
Tampón 10X Poly(A)	0,50 µL
ATP	0,50 µL
Enzima Poly(A) (PAP)	0,30 µL

H <sub>2</sub> O	1,70 µL
Total	3,00 µL

*Nota:* Para no aumentar en exceso los tiempos entre técnicas del protocolo, se aconseja no realizar más de 22 muestras a la vez.

Una vez mezclados los reactivos, se realizó un vórtex, un pulso de centrifuga y se traspasaron 3 µl de la solución a un nuevo tubo de reacción de 200 µl (tubos de reacción de PCR). Seguidamente se le añadieron 2 µl de las muestras a procesar y se incubaron en un termociclador ABI Geneamp™ 9700 (ThermoFisher) siguiendo el esquema de temperaturas y tiempos indicado en la Tabla 4.8.

**Tabla 4.8** Esquema de temperaturas y tiempos para la reacción de poliadenilación.

Paso	T <sup>a</sup> (°C)	Tiempo (minutos)
Poliadenilación	37	45
Cese reacción	65	10
Enfriamiento final	4	∞

Una vez finalizada la reacción de poliadenilación se procedió rápidamente a la reacción de ligación de los adaptadores.

#### 4.3.4.2. Ligación de los adaptadores en 5'

Para la ligación de los adaptadores en 5' se aprovecha el fosfato de este mismo extremo de los miARNs maduros para poder unir mediante una ligasa un adaptador que permita la reacción de retrotranscripción de todos los miARNs de las muestras simultáneamente. En el laboratorio, se preparó una mezcla de ligación en un tubo de reacción de 1,5 ml estéril y libre de nucleasas acorde con lo descrito en la Tabla 4.9.

**Tabla 4.9** Volúmenes de los reactivos a mezclar para la solución de trabajo de ligación de los adaptadores a 5' para 1 muestra.

Reactivo	Volumen
Tampón 5X ADN Ligasa	3,00 µL
50% PEG8000	4,50 µL
Adaptador 25X	0,60 µL
RNA Ligasa	1,50 µL
H <sub>2</sub> O	0,40 µL
Total	10,00 µL

Una vez realizada la mezcla se transfirieron 10 µl de esta a los tubos de PCR en los que se encontraba el producto de la reacción de síntesis de la cola Poli-A realizada en el paso anterior (volumen final = 15 µl) y se incubó en un termociclador ABI Geneamp™ 9700 (ThermoFisher)

a 16 °C durante 1 h para la reacción de ligación seguido de una bajada de temperatura a 4 °C para detenerla. Luego se procede rápidamente al siguiente paso.

#### 4.3.4.3. Retrotranscripción de los miARNs

En este paso se realizó la conversión de los miARNs con la cola poli-A en 3' y los adaptadores en 5' a ADNc mediante la reacción de transcripción reversa. Se procedió a la preparación de una mezcla de trabajo con los volúmenes y reactivos especificados en la Tabla 4.10. Posteriormente, se utilizó el termociclador ABI Geneamp™ 9700 (ThermoFisher) siguiendo el esquema de temperaturas y tiempos de la Tabla 4.11. Finalizada la reacción de retrotranscripción, se procedió a la preamplificación de la muestra.

**Tabla 4.10** Volúmenes de los reactivos a mezclar para la solución de trabajo la retrotranscripción universal de los miARNs.

Reactivo	Volumen
Tampón RT 5X	6,00 µl
Mezcla dNTP (25nM)	1,20 µl
Cebador universal RT 20X	1,50 µl
Enzima RT 10X	3,00 µl
H <sub>2</sub> O	3,30 µl
Total	15,00 µl

**Tabla 4.11** Esquema de temperaturas y tiempos para la reacción de retrotranscripción.

Paso	T <sup>a</sup> (°C)	Tiempo (minutos)
Retrotranscripción	42	15
Cese reacción	85	5
Enfriamiento final	4	∞

#### 4.3.4.4. Preamplificación del ADNc

Para la preamplificación, se realizó una combinación de reactivos siguiendo las indicaciones de la Tabla 4.12.

**Tabla 4.12** Volúmenes de los reactivos para mezclar para la solución de trabajo de la reacción de preamplificación de los ADNc.

Reactivo	Volumen
Mezcla reacción miR-Amp 2X	25,00 µl
Cebadores MiR-Amp 20X	2,50 µl
H <sub>2</sub> O	17,50 µl
Total	45,00 µl

Esta reacción se incubó como se describe en la Tabla 4.13.

**Tabla 4.13** Esquema de temperaturas y tiempos para la reacción de preamplificación.

Paso	T <sup>a</sup> (°C)	Tiempo (segundos)	Ciclos
Activación enzimática	95	300	1
Desnaturalización	95	3	
Alineamiento cebadores y elongación	60	30	22
Cese reacción	99	600	1
Enfriamiento final	4	∞	1

#### 4.3.5. Ensamblaje y procesado de las matrices de miARN

El diseño de las matrices de esta tesis se realizó para el procesado de 11 muestras más un control NTC por matriz. Este diseño fue producido por la casa comercial ThermoFisher Scientific en sus laboratorios en un formato tfs con el que se transfirió esta información al equipo de análisis (Quant Studio 12K flex).

Antes de empezar con el ensamblaje de las matrices de miARN se diluyeron los productos resultantes de la reacción de preamplificación 1/20 con TBE a 0.1X (en nuestro caso se combinaron 2 µl de producto de la pre-amplificación con 38 µl de TBE 0.1X). Asimismo, se mezclaron 7 µl de TaqMan® OpenArray Genotyping Master Mix (4404846, ThermoFisher) con 7 µl de los productos de la reacción de preamplificación diluidos (1:1 v/v) por duplicado en una placa de 96 pocillos según el esquema de la Figura A 8.1 del Anexo B. Luego se centrifugó 2 minutos a 1500 g.

Al finalizar el ensamblaje, las matrices de miARNs se introdujeron en el equipo QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific) para la realización de la qPCR siguiendo el esquema de temperaturas y tiempos especificados por la propia casa comercial en su protocolo estándar de expresión génica, volcado al equipo mediante un archivo de formato *eds*.

#### 4.3.6. Curado y normalización de los resultados de amplificación

Para un correcto análisis de los resultados y siguiendo los consejos de las guías MIQE (Bustin *et al.*, 2009; Nolan, Huggett and Sanchez, 2013), antes de proceder a la normalización, se realizó un curado de los ciclos de cuantificación (Cq, del inglés *quantification Cycle*) de las amplificaciones de los miARN incluidos en las matrices diseñadas. Inicialmente se agruparon los resultados de los diferentes grupos incluidos en el estudio (HER2, LumB HER2 sobreexpresado y TN). Para cada grupo, se eliminaron aquellos miARN en los que no se detectaba amplificación en un 20% de las muestras. Luego, de cada cohorte se eliminaron todos aquellos replicados técnicos cuyos Cq difirieron en 0,5 ciclos de amplificación entre ellos y se estableció la media de los valores que cumplieran con el requisito. Si de los 4 replicados técnicos, ningún Cq mantenía una diferencia inferior a 0,5, se eliminaban todos.

Una vez curados los resultados, se procedió a la normalización mediante el método de la normalización por medias globales (GMN, del inglés *Global Mean Normalization*) (Mestdagh *et al.*, 2009; D'haene *et al.*, 2012). Para esta normalización se realiza una media de todos los miARNs de cada muestra, luego cada Cq de cada miARN, se divide por esta media.

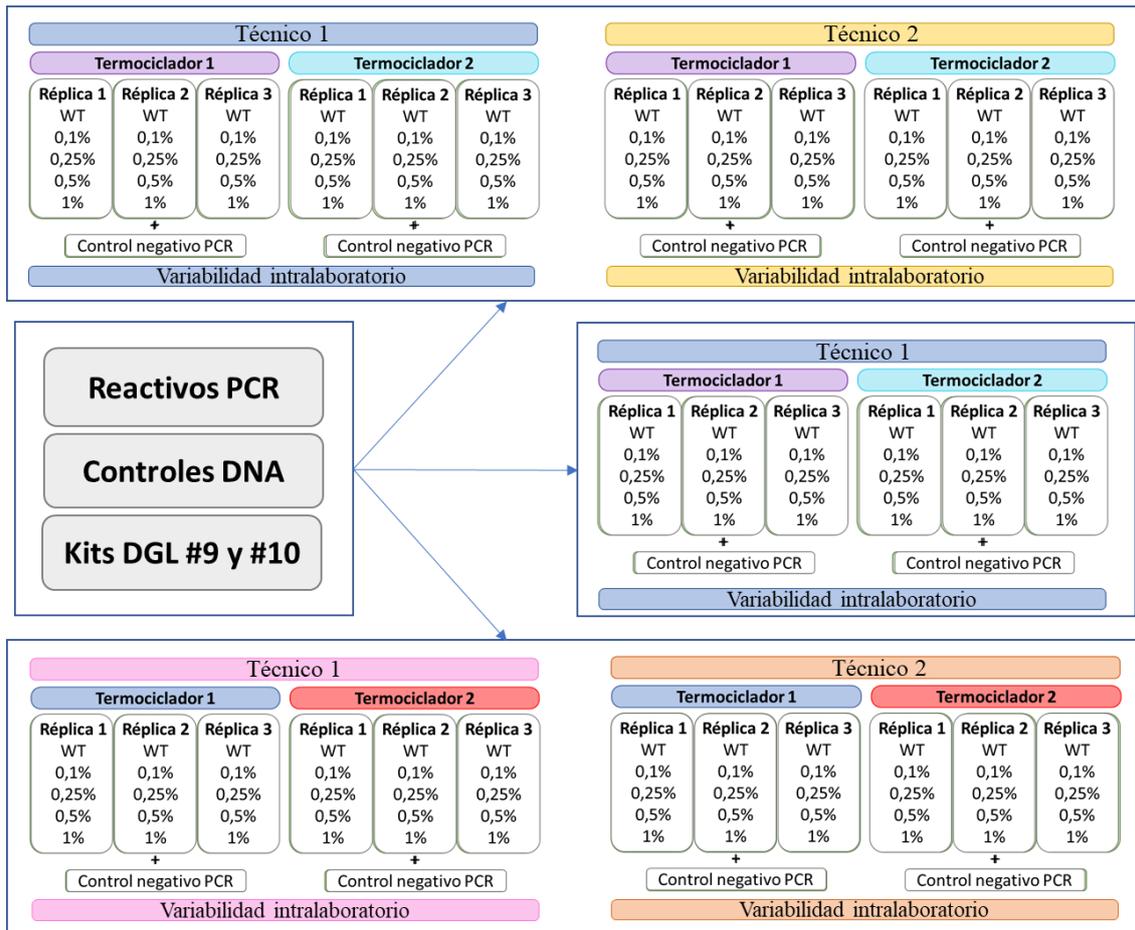
## 4.4. Materiales y métodos BL en glioma

### 4.4.1. Detección de VEs

Los diferentes materiales y métodos aquí empleados se han descrito en los apartados: 4.2.4. Western blot; 4.2.6. Cuantificación de VEs mediante ELISA de CD9; 4.2.7 Matrices de anticuerpos Exo-Check; 4.2.3. Aislamiento y cuantificación de proteínas y 4.2.8. Extracción y cuantificación del ADN.

### 4.4.2. Validación analítica intra e interlaboratorio de la amplificación mediante *TT-fast- COLD-PCR* y detección con la tecnología *DGL-Tech™*

En cuanto a la validación de la conjunción de ambas tecnologías para la detección de la mutación c.394G>A del gen *IDH1*, se usaron los controles comerciales de Horizon Discovery tanto para la secuencia WT (HD678) como del ADN con presencia de dicha mutación al 50% (HD677). Así mismo, para calcular el límite de detección de ambas técnicas, se realizaron diluciones seriadas de los controles hasta tener un DNA con un 0,1 % de mutación y un 99,9 % de alelo WT. El banco de diluciones final fue el siguiente: *IDH1* c.394G>A al 1 %; *IDH1* c.394G>A al 0,5 %; *IDH1* c.394G>A al 0,25 %; *IDH1* c.394G>A al 0,1 % y *IDH1* WT. Además, se añadió un control NTC para descartar posibles contaminaciones en las PCR. Como se detalla en la Figura 4.5, se preparó la cantidad suficiente de diluciones para poder proceder a las validaciones intra e interlaboratorio, también se prepararon alícuotas de reactivos de PCR del mismo lote con volumen suficiente para realizar todas las pruebas. Se realizó la validación en tres laboratorios independientes: Atrys Barcelona, Atrys Granada y en el laboratorio de biología molecular de la Universidad CEU San Pablo de Madrid. En cada laboratorio, a excepción de uno de ellos, prepararon las mezclas de amplificación dos técnicos independientes y se realizaron las reacciones en dos equipos diferentes de este modo se pudo realizar una validación intralaboratorio además de la validación interlaboratorio. Este proceso se ilustra en la Figura 4.5.



**Figura 4.5** Esquema de las validaciones intra e interlaboratorio llevadas a cabo en los tres laboratorios independientes. Todos los reactivos y controles usados en las validaciones fueron del mismo lote. Las repeticiones se realizaron en días diferentes para asegurar una correcta validación intralaboratorio.

Además de la detección mediante la tecnología DGL-*Tech*<sup>TM</sup>, en el laboratorio Atrys Barcelona, se realizó la secuenciación Sanger de una tanda de los controles diluidos, pudiendo de este modo comparar la citada tecnología basada en SMART Bases con el *gold standard* para la detección de mutaciones.

#### 4.4.3. Extracción ADN

Una vez aisladas las VEs mediante el protocolo de precipitación basado en PEG8000 del suero de los pacientes, la extracción de ADN (ADN-VEs) se realizó con el kit QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen) de acuerdo con las especificaciones técnicas del fabricante. Una vez extraído el ADN-VEs se determinó la concentración de ese mediante el espectrofotómetro EPOCH (BioTek Instruments) y el software Gen5 asociado a él.

#### 4.4.4. Amplificación con potenciación del alelo 395G>A frente al 395G mediante TT-fast-COLD-PCR

Para la TT-fast-COLD-PCR se diseñaron y comprobaron, mediante las aplicaciones en línea PrimerQuest® Tool y PrimerBlast, los cebadores denominados *IDH1* qHM con los que se obtiene un amplicón de 73 pb del codón 4 del gen *IDH1* incluyendo el codón 395. Las secuencias de los diferentes cebadores fueron las siguientes:

6. Cebador directo *IDH1* qHM: 5' – CGGTCTTCAGAGAAGCCATT – 3'
7. Cebador indirecto *IDH1* qHM: 5' – AGTAAGTCATGTTGGCAATAA – 3'

La solución de trabajo de la PCR se elaboró mediante la mezcla detallada en la Tabla 4.14.

**Tabla 4.14** Detalle de los volúmenes por muestra a analizar de los reactivos de la solución de trabajo para la TT-fast-COLD-PCR.

Reactivo	Volumen (µl)
H <sub>2</sub> O estéril	12,38
5x tampón w/o Mg <sup>++</sup>	5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5
10 mM dNTP's	2
10 µM <i>IDH1</i> qHM Fw	1
10 µM <i>IDH1</i> qHM Rv	1
3,5 U/µL GO Taq	0,125

Los ciclos realizados para la TT-fast-COLD-PCR se describen en la Tabla 4.15.

**Tabla 4.15** Ciclos, temperaturas y tiempos de la TT-fast-COLD-PCR utilizados para la detección de la mutación 395G>A del gen *IDH1*.

Tipo de PCR	Paso	Temperatura (° C)	Tiempo (s)	Ciclos
PCR convencional	Desnaturalización inicial	95	300	1
	Desnaturalización	95	30	
	Alineamiento cebadores	55	30	10
	Elongación	72	30	
Primera Tc	Desnaturalización Tc <sub>1</sub>	75,4	30	
	Alineamiento cebadores	55	30	7
	Elongación	72	30	
Segunda Tc	Desnaturalización Tc <sub>2</sub>	76	30	
	Alineamiento cebadores	55	30	7
	Elongación	72	30	
Tercera Tc	Desnaturalización Tc <sub>3</sub>	76,6	30	
	Alineamiento cebadores	55	30	7
	Elongación	72	30	
Cuarta Tc	Desnaturalización Tc <sub>4</sub>	77,2	30	7

Tipo de PCR	Paso	Temperatura (° C)	Tiempo (s)	Ciclos
Quinta Tc	Alineamiento cebadores	55	30	
	Elongación	72	30	
	Desnaturalización Tc <sub>5</sub>	77,8	30	
	Alineamiento cebadores	55	30	7
	Elongación	72	30	
	Elongación final	72	60	1
	Enfriamiento final	4	60	1

Para la comprobación de que el amplicón presentaba el número de pb esperado y antes de proceder a la secuenciación de este, se procedió a corroborar el tamaño del producto amplificado mediante un gel de agarosa (Sigma Aldrich) al 3 % m/v en un tampón de Tris/Ácido bórico/EDTA (TBE). Se usó como marcador molecular un ADN procesado previamente que ofrece un patrón de bandas de 50 a 800 pb con incrementos de 50 pb (G4521, Promega).

#### 4.4.5. Secuenciación *IDHI*

Para corroborar la potenciación del alelo mutado obtenido con la TT-*fast*-COLD-PCR, se realizó una secuenciación Sanger del producto amplificado. Los cebadores usados fueron los mismos que los de la TT-*fast*-COLD-PCR pero diluidos 1:10 para una concentración final de 1  $\mu$ M. Hay que puntualizar que las reacciones de secuenciación de la cadena sentido y sinsentido se realizaron por separado. Para obtener la secuenciación de la cadena sentido se mezclaron 3  $\mu$ l del cebador directo con 3  $\mu$ l del reactivo BigDye™ Terminator (4337450, ThermoFisher Scientific) y a ésta se la agregaron 4  $\mu$ l del producto de PCR amplificado. Y con la finalidad de obtener la secuencia de la cadena antisentido solamente cambiemos el cebador directo por el indirecto de la solución descrita en la frase anterior.

La reacción de secuencia se realizó aplicando a la solución el esquema de temperaturas propuesto por la casa comercial, modificando la temperatura de alineamiento de los cebadores para que coincidiese con la T<sub>m</sub> de los nuestros tal y como se muestra en la Tabla 4.16.

**Tabla 4.16** Esquema de temperaturas y tiempos de la reacción de secuenciación.

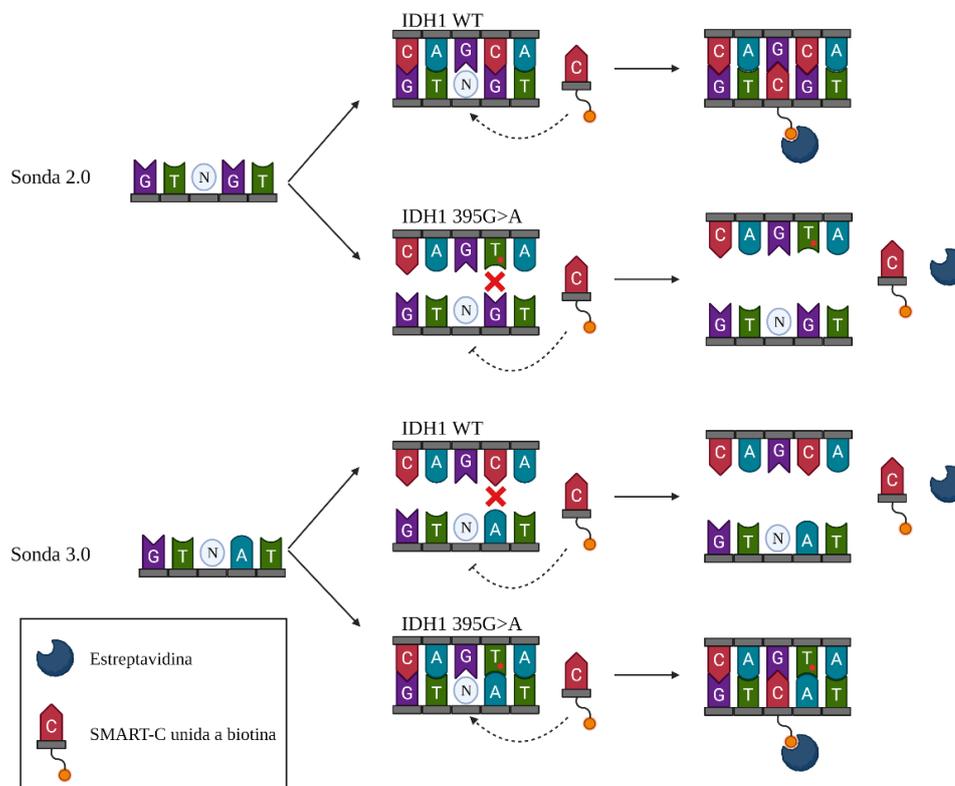
Paso	Temperatura °C	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturalización inicial	96	60	1
	96	10	
Reacción de secuenciación	55	5	25
	60	240	
Enfriamiento final	4	$\infty$	1

Los productos de esta reacción fueron purificados mediante las columnas de gel Centri-Sep™ (401762 Invitrogen/ThermoFisher Scientific), siguiendo las instrucciones facilitadas por la casa

comercial. Una vez purificados, se precipitaron en un concentrador de ADN (DNA120 SpeedVac Concentrator, ThermoScientific), se resuspendieron con formamida (4311320, Hi-Di™ Formamide, ThermoFisher Scientific) y se realizó la electroforesis capilar en el equipo ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Los resultados de las secuencias se reportaron en electroferogramas y fueron analizados con comparación directa con las secuencias del transcrito *IDH1* 203, obtenido en la página web Ensembl, accesible en el siguiente enlace: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Exons?db=core:g=ENSG00000138413;r=2:208236229-208266074;t=ENST00000415913](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core:g=ENSG00000138413;r=2:208236229-208266074;t=ENST00000415913).

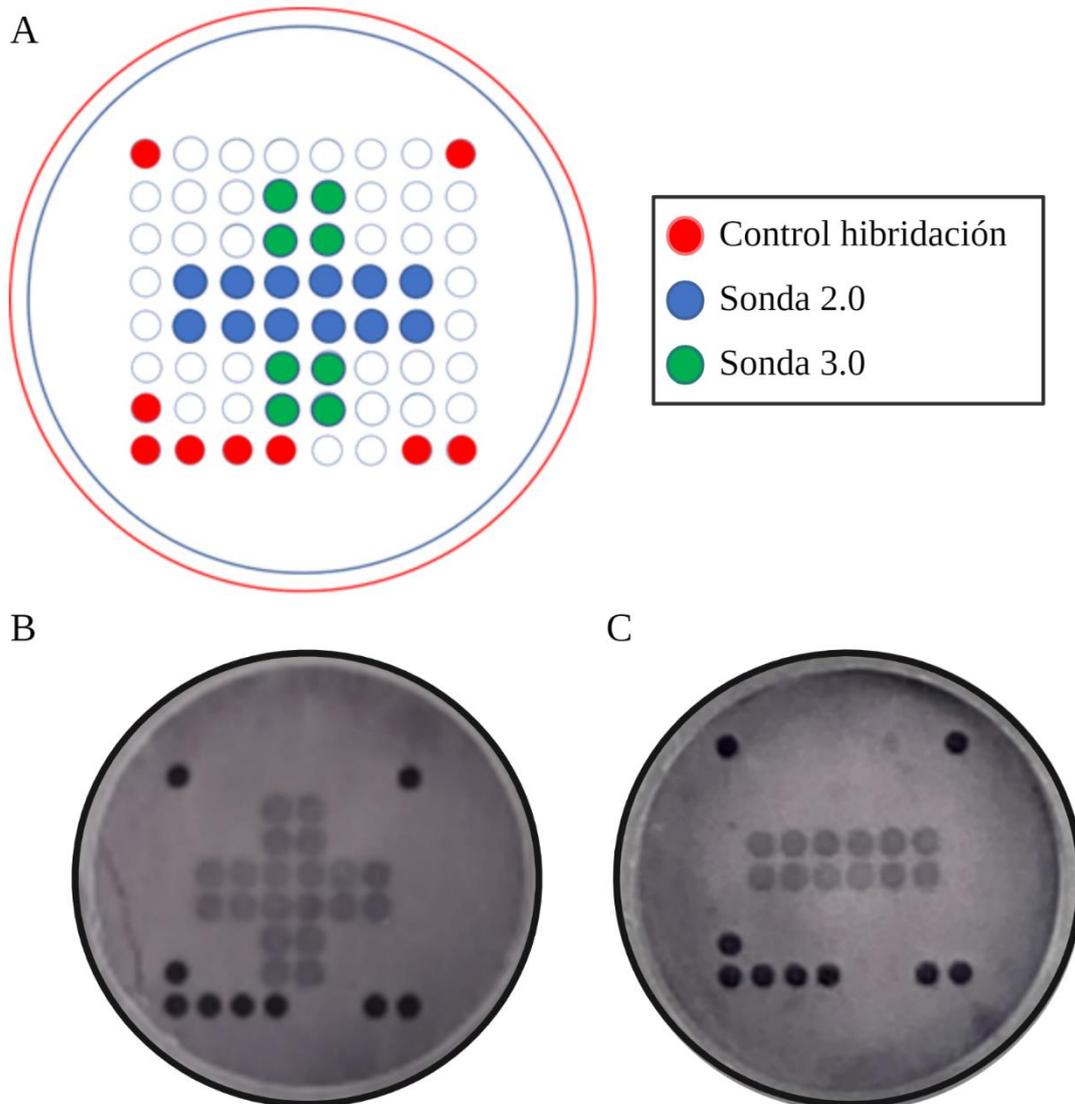
#### 4.4.6. Detección de la mutación 395G>A del gen *IDH1* con la tecnología DGL-Tech™

Una vez obtenidos los resultados de la secuenciación, se procedió a la detección de las mutaciones mediante la tecnología DGL-Tech™. En este proyecto se han usado dos tipos de sondas y una SMART-Base (SMART-C). Tal y como se muestra en la Figura 4.6, la sonda 2.0 se diseñó para la detección del alelo WT mientras que la mutación se revela a través de la sonda 3.0. También se ilustra en la Figura 4.6, como el cambio en una sola base de las dos sondas fue suficiente para poder determinar la presencia o ausencia de la mutación c.395G>A del gen *IDH1*.



**Figura 4.6** Representación gráfica de las sondas usadas en la detección de la mutación c.395G>A del gen *IDH1*.

Para que la detección de la mutación c.395G>A del gen *IDH1* fuese visualmente sencilla de interpretar se diseñaron las membranas combinando las dos versiones de las sondas tal y como se muestra en la Figura 4.7. Así en el caso de un resultado positivo para la detección de dicha mutación, se presentaría el resultado en forma de una cruz (+) y en caso de un resultado negativo para la mutación se obtendría la forma de un signo menos (-).



**Figura 4.7** Disposición de las sondas 2.0 y 3.0 en las membranas de nylon. A) Esquema de la disposición de las sondas 2.0 y 3.0 en las membranas de nylon. B) Resultado positivo en heterocigosis, que se presenta como una cruz. C) Resultado negativo que se interpreta con un signo (-).

## 4.5. Análisis estadístico

Los resultados del aislamiento y caracterización de las VEs se analizaron mediante la prueba ANOVA para la comparación de varianzas. Los p valores obtenidos se ajustaron usando el método de Bonferroni para contrarrestar la comparación múltiple. Para la realización de los cálculos estadísticos se recurrió al programa GraphPad Prism 5.0 y se estableció un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$  para el ensayo de hipótesis.

En cuanto a los resultados obtenidos con las matrices de miARN, para determinar si la hipótesis alternativa, dado que las medias de las expresiones de los miARN del grupo de pacientes que no respondieron al tratamiento neoadyuvante son diferentes a las medias del grupo con una respuesta positiva a dicho tratamiento, se realizó un análisis de comparación de hipótesis. Antes de realizar este análisis, se determinó para cada miARN si los resultados de expresión relativa presentaban homocedasticidad o no mediante las pruebas de Shapiro-Wilk, Kolmogórov-Smirnov, Andersson-Darling y de D'Agostino y Pearson. En aquellos resultados que cumplían los parámetros de homocedasticidad, se aplicó la prueba para datos paramétricos t-Student y en el caso de los que no presentaron homocedasticidad, se aplicó la prueba para muestras no paramétricas U de Mann-Whitney. Se aceptó que las medias de los dos grupos estudiados (respondedoras y no respondedoras) eran significativamente diferentes en el caso de que el p valor fuese inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ). Así mismo, debido al reducido tamaño de la muestra (n), se consideraron aquellos resultados con un p-valor superior a 0,05 pero inferior a 0,09 como candidatos a discriminar los grupos de respondedoras (R) y no respondedoras (NR) al tratamiento neoadyuvante. Se consideraron como pacientes R a QNA aquellas clasificadas como G4 y G5 del sistema MyP. Así como se consideraron NR aquellas con un grado G1 – G3 del mismo sistema MyP.

De los miARNs que resultaron significativos en la discriminación de las pacientes R comparadas con las NR, se realizó un estudio con las herramientas on-line miRTarBase (Huang *et al.*, 2020) y miRNet (Chang *et al.*, 2020) para determinar que genes son regulados por los diferentes miARN con expresión diferencial. miRTarBase devuelve un listado con los genes que interactúan con cada miARN con validación experimental, mientras que miRNet permite realizar una red de interacciones entre el miARN seleccionado y diferentes genes. Esta red de interacciones se puede curar seleccionando diferentes procesos celulares, enfermedades, vías de señalización, etc. enriqueciendo así el estudio según los parámetros deseados. En nuestro caso, se procedió a la selección de aquellos genes relacionados con los miARN significativamente capaces de discernir entre las dos cohortes del proyecto que además tuviesen relación con vías relacionadas con el cáncer y patologías mamarias; con genes implicados en la respuesta a fármacos; metabolismo de fármacos a través de citocromo P450. Se hizo un primer curado con los genes que intervienen en

diferentes procesos relacionados con los tumores malignos o bien con el cáncer de mama. Luego se seleccionaron tres procesos y/o relaciones que presentaban un mayor valor estadístico (p-valor).

Una vez hallados los genes con mayor potencia estadística relacionados con el miARN diana y con procesos tumorales y/o neoplasias mamarias, se realizó un diagrama de Venn a través de la herramienta on-line DeepVenn (Hulsen, de Vlieg and Alkema, 2008) para determinar cuáles de los genes se presentan en todos los procesos previamente seleccionados. Se analizaron *in silico* las vías en las que participan estos genes a modo de aportar información extra a la selección de los miARN que se incluirán el estudio.

A parte de los análisis de expresión de miARN y de enriquecimiento de genes, se realizó un estudio de las variables clínicas disponibles para discriminar aquellas que podrían sesgar los resultados de expresión relativa de los miARNs. En este sentido, se compararon las medias entre las pacientes R y NR de las variables cuantitativas continuas: edad, peso, altura y tamaño del tumor al diagnóstico; y se realizó un análisis de frecuencias en las variables cualitativas binarias: antecedentes oncológicos, antecedentes gestacionales, menopausia, diabetes, hipertensión arterial (HTA), hiperlipemia y tiroidismo. Se examinaron las diferentes variables en las cuatro cohortes (HER2, LumB, LumB HER2 y TN) así como de la cohorte entera.

Para los análisis de la validación de las diferentes técnicas de detección de la mutación *IDH1<sup>R132H</sup>* se realizaron tablas de contingencia con las que se calcularon la sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo.

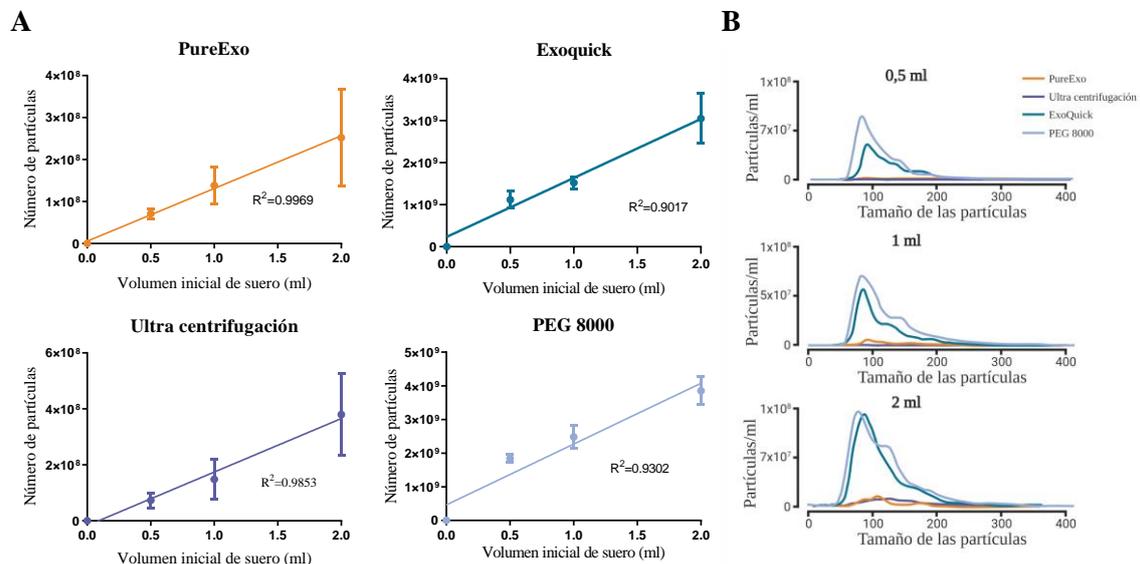
## 5. Resultados

### 5.1. Aislamiento y caracterización de las VEs

Para asegurar un rendimiento óptimo en el aislamiento de VEs, se comparó el protocolo mediante PEG8000 con dos kits comerciales PureExo® (101 Bio) y ExoQuick® (System Biosciences), y el “gold standard” del aislamiento de VEs, la UC. Para evaluar la eficiencia del aislamiento de VEs se realizaron cuatro estudios diferentes, siguiendo las directrices de las guías MISEV 2018 (Théry *et al.*, 2018).

#### 5.1.1. Cuantificación de las partículas aisladas

En este primer ensayo, se comparó el número de partículas aisladas mediante los métodos citados anteriormente. Se realizaron diferentes ensayos para la cuantificación y distribución del tamaño de estas partículas. Observando la Figura 5.1 A, la correlación lineal entre el volumen de suero inicial y número de partículas totales confirma que el número de partículas obtenidas con todos los kits es directamente proporcional al volumen inicial de suero. Una vez realizado este estudio, se analizó la distribución del tamaño de las partículas aisladas mediante NTA. En la Figura 5.1 B, se puede observar cómo el número de partículas dependió tanto del método de aislamiento como del volumen inicial de suero (0,5, 1 y 2 ml).

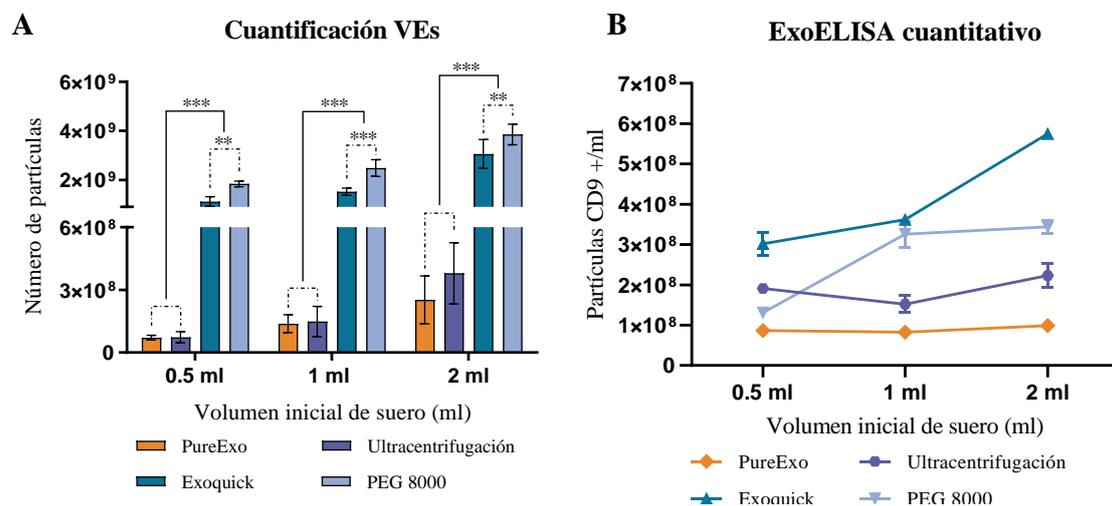


**Figura 5.1** Distribución del número de partículas y su tamaño. (A) Correlación entre el volumen inicial de suero y el número de partículas aisladas. (B) Distribución del tamaño de las partículas aisladas mediante NTA. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado y repetidos tres veces.

Para una mejor valoración del número de partículas obtenido, se realizó el histograma de la Figura 5.2 A. Como se puede apreciar, el método que reportó el menor número de partículas aisladas por ml en los tres volúmenes iniciales de suero fue el kit comercial PureExo®, siendo el volumen inicial de suero de 0,5 ml en el que menos partículas aisladas se observaron ( $7,1 \times 10^7$  partículas

por ml). Contrariamente, el método que presentó una mayor eficiencia en el aislamiento de partículas fue la precipitación mediante PEG, que partiendo de un volumen de 2 ml de suero reportó un total de  $3,85 \times 10^9$  partículas por ml. La tasa de recuperación de partículas obtenidas mediante PEG fue significativamente superior a la obtenida por Exoquick® ( $p < 0,01$ ). Sorprendentemente, el kit comercial PureExo® y la UC presentaron unos resultados muy parecidos devolviendo un menor rendimiento en cuanto a número de partículas se refiere, siendo significativamente inferiores ( $p < 0,001$ ) al número de partículas aisladas por los métodos de precipitación mediante PEG y el kit Exoquick®.

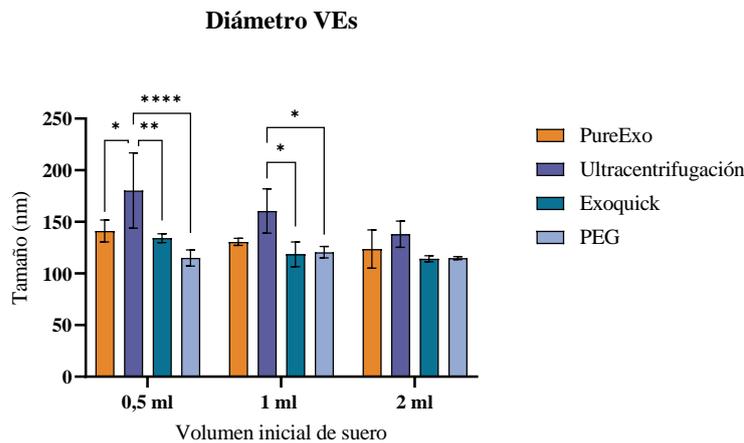
Además, se procedió a la cuantificación de las VEs mediante el kit ExoELISA (System Biosciences) basado en la detección de la tetraspanina CD9. Representado en la Figura 5.2 B, se destaca como el valor más alto de tetraspanina CD9 se obtuvo con el kit Exoquick® partiendo de 2 ml de suero. Para el mismo volumen inicial, el kit comercial PureExo® reportó un resultado 5,8 veces inferior al del propio Exoquick®.



**Figura 5.2** Análisis de partículas de las EVs. A) Cuantificación total del número de partículas aisladas. (B) ExoELISA cuantitativo, en partículas por ml, de la tetraspanina CD9. \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ . Todos los datos se muestran como la media  $\pm$  S.D. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado y repetidos tres veces.

En cuanto al diámetro medio de las partículas recuperadas con los distintos métodos, se puede observar que el perfil de distribución de los diámetros de las partículas aisladas, dependieron tanto del método de aislamiento como del volumen inicial de suero. El diámetro medio de las partículas aisladas mediante UC ( $159,67 \pm 23,5$  nm) en todos los volúmenes iniciales de suero fue superior a las medias de los diámetros de las partículas aisladas con los otros tres métodos: PureExo®  $131,77 \pm 10,86$  nm; ExoQuick®  $122,36 \pm 6,37$  nm y PEG8000  $116,86 \pm 4,9$  nm. Desgranando estos resultados, se puede observar como las medias de los tamaños de las partículas aisladas mediante los diferentes métodos iban acercándose a medida que aumentaba el volumen inicial de suero. Si observamos la Figura 5.3, partiendo de 0,5 ml de suero se observa como los tamaños de

las partículas aisladas con UC son significativamente superiores a los demás. Partiendo de 1 ml de suero se observaron diferencias significativas entre la UC y los métodos de precipitación ExoQuick® y PEG8000 ( $p < 0,05$ ). Finalmente, partiendo de 2 ml de suero, no se observaron diferencias significativas en los tamaños de las partículas aisladas. No obstante, los diámetros observados en todos los métodos y volúmenes iniciales de suero se pueden considerar dentro del rango de tamaños de las diferentes VEs.



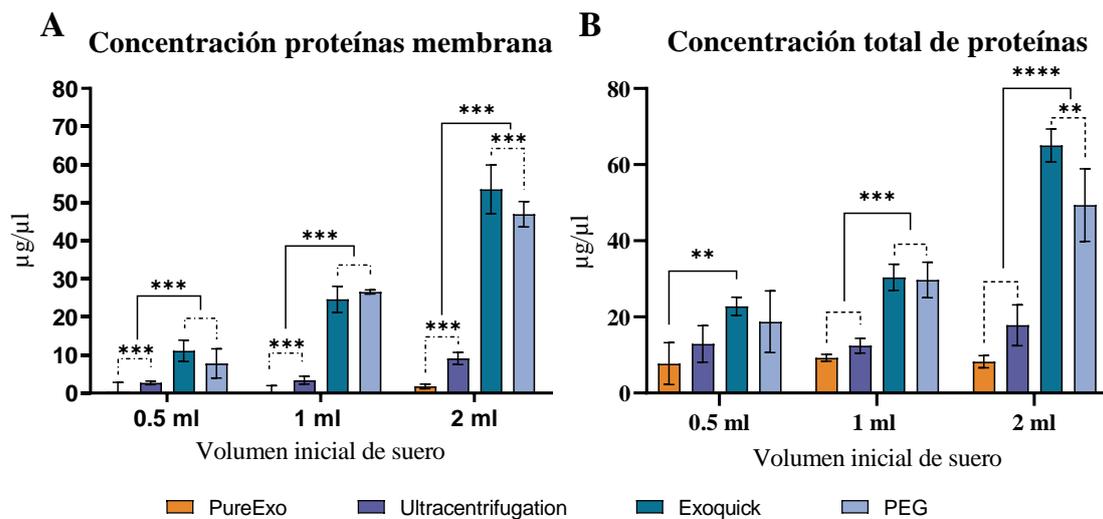
**Figura 5.3** Distribución de los tamaños de las VEs según el volumen inicial de suero y el método de aislamiento. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ . Todos los datos se muestran como la media  $\pm$  S.D. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado y repetidos tres veces.

Los métodos UC (*gold standard*) y PureExo® reportaron un menor número de partículas aisladas en todos los volúmenes iniciales de suero. El rendimiento de estos dos métodos fue muy inferior al de los protocolos basados en precipitación, destacando la casi nula recuperación de partículas con volúmenes iniciales a 2 ml de suero. Por lo contrario, el número de partículas aisladas con los métodos Exoquick® y PEG8000 es considerablemente superior. Además, los diámetros de las partículas son acordes con los de las VEs.

### 5.1.2. Análisis de proteínas de las vesículas extracelulares

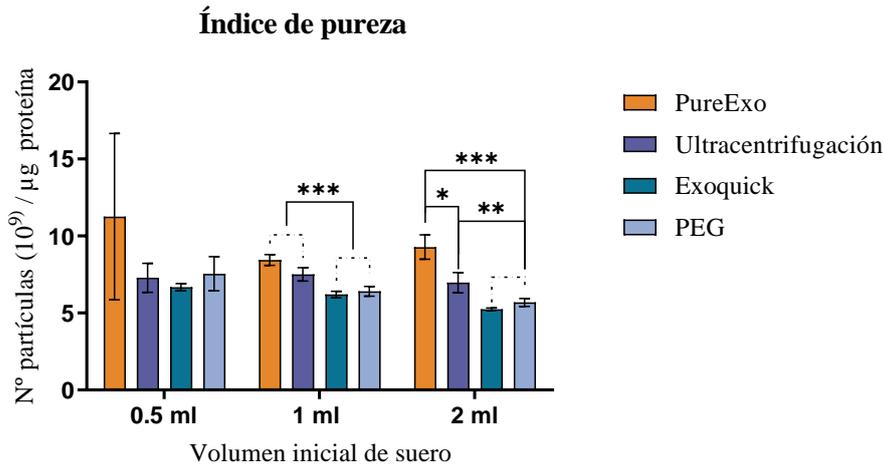
Se realizó un estudio de proteínas, donde se compararon la concentración de proteínas de membrana de las VEs, la concentración de proteínas totales y el índice de pureza de cada uno de los métodos analizados. En la Figura 5.4 A se muestran las diferencias en la concentración de proteínas de membrana entre los diferentes métodos. Apréciase la igualdad entre los niveles de proteína de membrana obtenidas con el kit comercial Exoquick® y los del método con PEG, aunque se encontró una diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) entre ambos cuando el volumen de partida fue de 2 ml de suero, siendo más elevado en Exoquick®. Contrariamente, con el kit comercial PureExo® solamente se detectaron proteínas de membrana partiendo de 2 ml de suero. Se detectan diferencias significativas al compararlo con todos los demás protocolos ( $p < 0,001$ ). Comparando la UC con el grupo de métodos basados en la precipitación (PEG y Exoquick®) se

aprecia que las proteínas de membrana detectadas con la técnica “gold standard” son significativamente inferiores ( $p < 0,001$ ) aunque en el volumen inicial de 0,5 ml, y comparando la UC con el PEG, la significación fue menor ( $p < 0,05$ ). Después de lisar las células, se cuantificaron de nuevo las proteínas totales. Como se detalla en la Figura 5.4 B, los resultados fueron consistentes con los obtenidos antes de la lisis, observándose rendimientos menores con los métodos PureExo<sup>®</sup> y UC al compararlos con PEG y Exoquick<sup>®</sup> partiendo de 1 y 2 ml ( $p < 0,001$ ). Partiendo de 0,5 ml, solo se percibieron diferencias significativas comparando Exoquick<sup>®</sup> con PureExo<sup>®</sup> y con UC ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5.4** Análisis de proteínas y marcadores de VEs. (A) cuantificación de proteínas totales. (B) cuantificación de proteínas de la membrana de VEs. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ . Test ANOVA Bonferroni.

Dado que la relación entre el número de partículas y las proteínas aisladas es un factor importante para considerar, se realizó este cálculo, aportando información sobre la pureza de las VEs aisladas con cada método. En la Figura 5.5 se muestra que el protocolo que mejor pureza reportó fue el PureExo<sup>®</sup> seguido por la UC, sugiriendo una presencia inferior de proteínas contaminantes en estos aislamientos. Contrariamente, los métodos PEG y Exoquick<sup>®</sup> presentaron una ratio de pureza inferior.

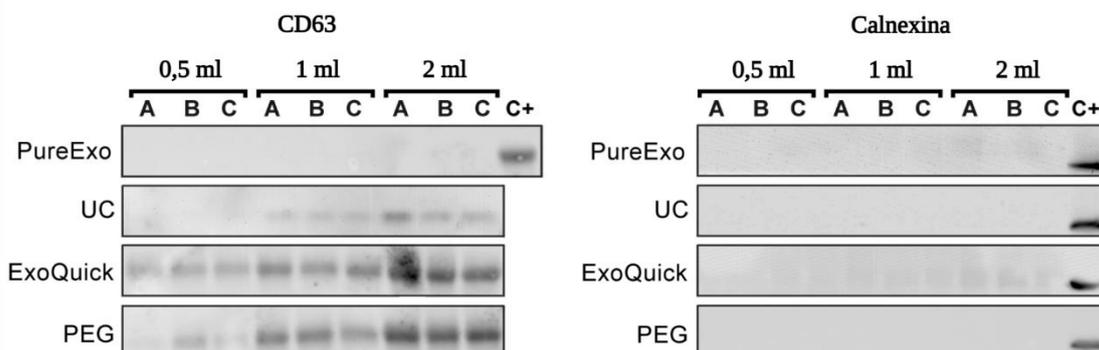


**Figura 5.5** Índice de pureza de las VEs de cada procedimiento de aislamiento y por cada volumen inicial de suero. \* $p \leq 0,05$  \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ .

Los métodos PEG y Exoquick® mostraron una mayor cantidad de proteínas en los aislamientos.

### 5.1.3. Caracterización de las vesículas extracelulares

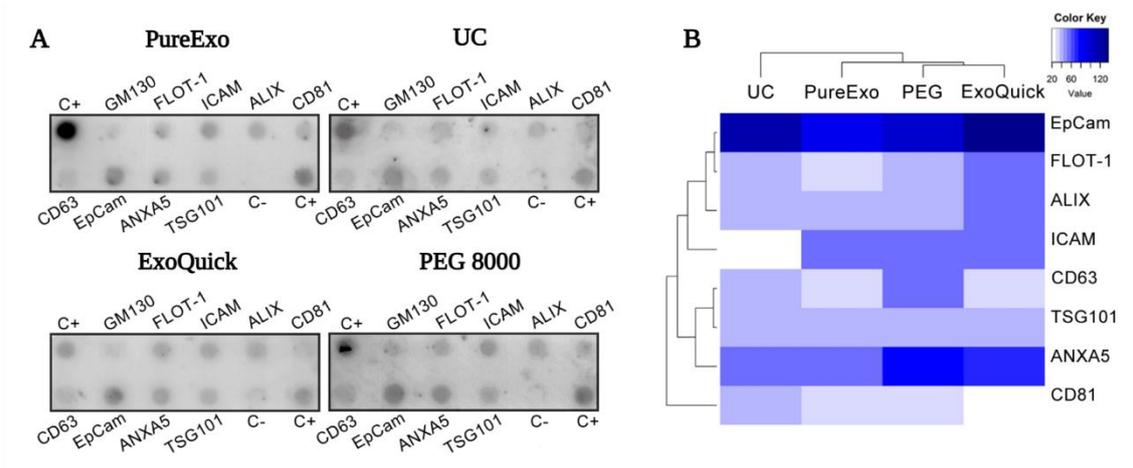
Para contrastar que los aislamientos realizados en este estudio presentaban marcadores típicos de VEs, se procedió a la realización de la expresión de la proteína transmembrana CD63 mediante Western Blot (WB). Como se presenta en la Figura 5.6, dicha proteína se detectó en todos los volúmenes iniciales de suero en los métodos PEG y Exoquick®. Por el contrario, con el protocolo de UC, solamente se observaron señales en los volúmenes iniciales de 1 y 2 ml. No se detectó señal alguna en ninguno de los volúmenes iniciales de suero cuando se realizó el aislamiento de VEs mediante el método PureExo®. Se comprobó la ausencia de contaminación celular al incluir el marcador de retículo endoplasmático calnexina en otro WB.



**Figura 5.6** Western Blots de los niveles de expresión de la tetraspanina CD63 y de calnexina (proteína de retículo endoplasmático). Todos los análisis se realizaron por triplicado (A, B y C).

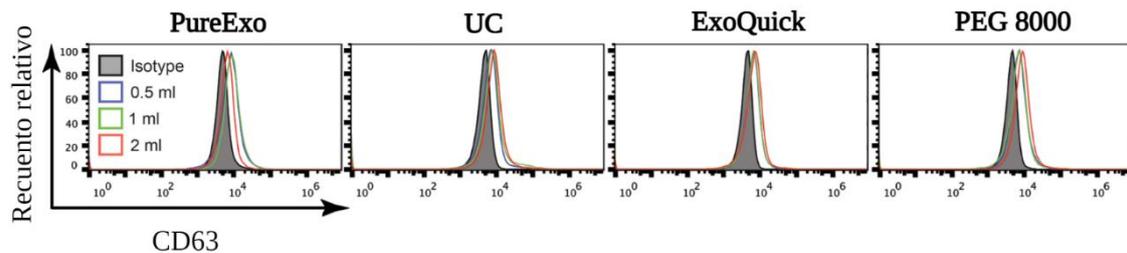
Para una mejor caracterización de las VEs, se realizó una matriz de anticuerpos contra 8 marcadores de VEs conocidos: FLOT-1, ICAM1, ALIX, CD81, CD63, EpCam, ANXA5 y TSG101. La matriz se representa en la Figura 5.7 A. La expresión relativa de estos marcadores

en los diferentes métodos de aislamiento se muestra como un mapa de calor en la Figura 5.7 B, donde se puede observar la fuerte correlación de los perfiles obtenidos con PEG y Exoquick®. Ambos presentan cierta similitud con el protocolo propuesto por PureExo®. El que más dista en cuanto a perfil de expresión en esta matriz es la UC, que es el que menos correlación presenta con los demás métodos estudiados. La misma matriz incorpora el marcador de cis-golgi GM130, que como se puede observar no dio señal en ninguno de los protocolos.



**Figura 5.7** Expresión de marcadores de membrana asociados a VEs. (A) Matriz de expresión de proteínas exosómicas. (B) Mapa de calor de la expresión de proteínas de VEs (blanco; no expresión o expresión muy débil; azul claro: expresión débil; azul oscuro: alta expresión).

Por último, Figura 5.8, se realizó un análisis de citometría de flujo para validar los resultados obtenidos en el WB y en la matriz de marcadores de VEs. Para obtener las señales de las VEs, se usaron partículas de aldehído/sulfato. Se confirmó la presencia de CD63 en la superficie de todas las VEs aisladas.



**Figura 5.8** Análisis de expresión de CD63 en los aislamientos de VEs mediante citometría de flujo.

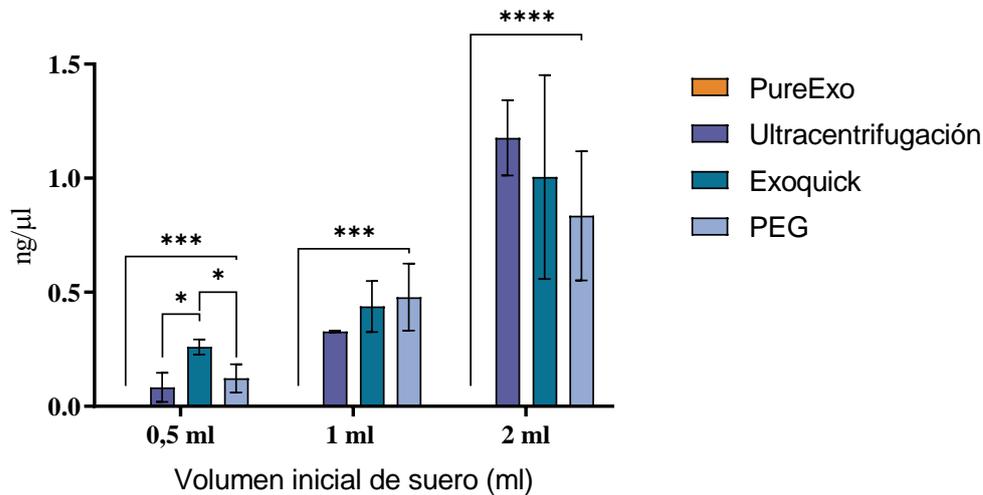
Todos los métodos presentaron expresión de los diferentes marcadores de VEs incluidos en el ensayo. Además, no se observó contaminación por restos celulares en ninguno de los cuatro métodos analizados.

#### 5.1.4. Cuantificación de ADN de las VEs

Para medir el índice de recuperación, se abordaron dos diferentes estudios: la cuantificación del ADN mediante un ensayo fluorimétrico y una dPCR. En la primera aproximación, tal y como se

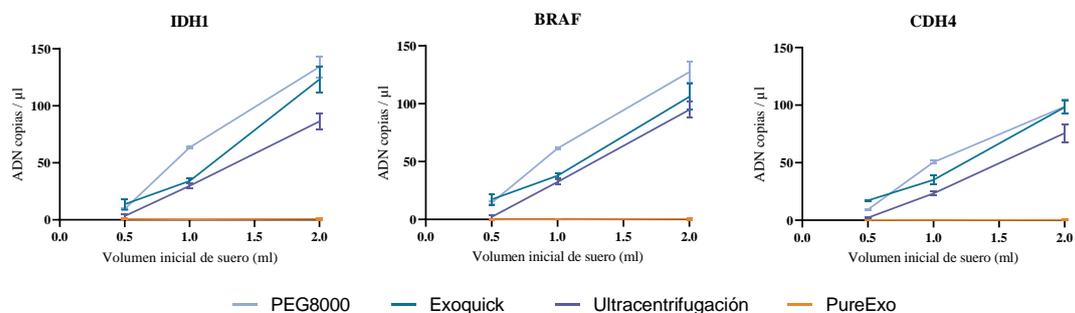
ve reflejado en la Figura 5.9, el protocolo con PEG devolvió la mejor eficiencia en la obtención del ácido nucleico partiendo de 1 ml de suero. Partiendo de 0,5 ml el método Exoquick® recuperó más ADN, y partiendo de 2 ml, la UC superó a los demás protocolos. No se observó ADN en ninguno de los volúmenes de partida de suero con el kit comercial PureExo®. se detectaron diferencias significativas entre Exoquick®, PEG y UC solo partiendo de 0,5 ml de suero ( $p < 0,05$ ).

### Concentración ADN



**Figura 5.9** Cuantificación de ADN de doble cadena con el fluorómetro Qubit. Las barras de error representan la desviación estándar; \* $p \leq 0,05$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$  \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ .

El ensayo con PCR digital se realizó para demostrar la aplicabilidad clínica de las VEs. Se analizaron el número de copias por  $\mu\text{l}$  de tres genes (*IDH1*, *BRAF* y *CDH4*). En primer lugar, como se precisa en la Figura 5.10, resaltar que se obtuvieron valores similares usando las tres sondas y que el número de copias por  $\mu\text{l}$  aumentaba con el aumento del volumen de partida. El valor más alto de copias por  $\mu\text{l}$  se obtuvo con el protocolo basado en PEG, la sonda para *IDH1* y un volumen inicial de 2 ml de suero, con un total de  $134,14 \pm 9,43$  copias por  $\mu\text{l}$ . La mínima concentración detectada con la dPCR se reportó para el kit comercial PureExo® y con un volumen inicial de 0,5 ml, que devolvió menos de una copia por  $\mu\text{l}$  en todas las sondas estudiadas.



**Figura 5.10** Análisis de PCR digital para la cuantificación absoluta de las sondas *IDH1*, *BRAF* y *CDH4*. Las barras de error representan la desviación estándar.

Aunque en la cuantificación colorimétrica los métodos UC y Exoquick® presentaron una mayor concentración de AN partiendo de 2 ml, el aislamiento mediante PEG8000 presentó, en la cuantificación absoluta con dPCR, un mayor número de copias de ADN por  $\mu\text{l}$  partiendo de 1 y 2 ml.

## 5.2. Resultados BL en cáncer de mama

En todas las muestras de suero de esta cohorte se procedió al aislamiento de VEs mediante el protocolo basado en la precipitación con PEG8000, descrito en 4.2.1. Así mismo, se extrajeron los miARN encapsulados en las VEs de los que se determinó la concentración y pureza.

### 5.2.1. Análisis de calidad de los miARNs extraídos de las VEs

La media de las cuantificaciones mediante el fluorómetro Qubit™ 4.0 fue determinada en 4,61 ng/ml (3,95 – 5,27 ng/ml), mientras que en el espectrofotómetro NanoDrop ND1000 se estableció en 5,64 ng/ $\mu\text{l}$  (1,92 – 9,36 ng/ $\mu\text{l}$ ). La ratio 260/280 se definió en 1,29 (1,10 – 1,48). Al ser un kit con amplificaciones dirigidas, con estas concentraciones, se pudo continuar con el proceso de la amplificación a tiempo real de los miARNs de las matrices prediseñadas.

### 5.2.2. miARNs detectados en los diferentes fenotipos analizados

Debido a las diferentes pautas de QNA que presentan los tres fenotipos incluidos en el estudio y para poder discriminar entre pacientes R y NR, los datos se curaron y analizaron independientemente en cada grupo. Como resultado del curado de datos, no todos los miARNs incluidos en las matrices de RT-q-PCR pudieron ser analizados pues no todos cumplieron los parámetros establecidos en el apartado 4.3.6 (curado y normalización de los resultados de amplificación). Se detalla en la Tabla 5.1 los miARNs que cumplieron esos parámetros y se llevaron a análisis en cada subgrupo. Se prosiguió con el análisis de 20 miARNs en el fenotipo HER2 y 21 miARNs para los fenotipos TN y LumB HER2. Concretamente, en el fenotipo HER2 los miARNs miR-143-5p y 342-3p no presentaron buenas amplificaciones; en el fenotipo LumB HER2 el miARN miR-142-3p tampoco pudo llevarse a análisis y en el grupo de TN no se pudo analizar el miR-195-5p.

**Tabla 5.1** miARNs detectados por RT-q-PCR en cada fenotipo incluido en el estudio de BL en cáncer de mama.

miARN	HER2	LumB HER2	TN	Cohorte entera
hsa-let-7b-5p	✓	✓	✓	✓
hsa-miR-101-3p	✓	✓	✓	✓
hsa-miR-10a-5p	✓	✓	✓	✓
hsa-miR-126-3p	✓	✓	✓	✓
hsa-miR-126-5p	✓	✓	✓	✓

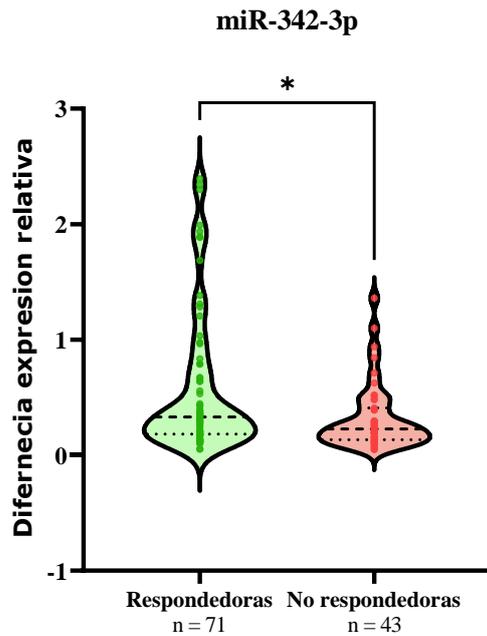
<b>miARN</b>	<b>HER2</b>	<b>LumB HER2</b>	<b>TN</b>	<b>Cohorte entera</b>
hsa-miR-130a-3p	✓	✓	✓	✓
hsa-miR-142-3p	✓		✓	✓
hsa-miR-143-3p		✓	✓	✓
hsa-miR-145-5p	✓	✓	✓	✓
hsa-miR-155-5p	✓	✓	✓	✓
hsa-miR-181a-5p	✓	✓	✓	✓
hsa-miR-194-5p	✓	✓	✓	✓
hsa-miR-195-5p	✓	✓		✓
hsa-miR-21-5p	✓	✓	✓	✓
hsa-miR-221-3p	✓	✓	✓	✓
hsa-miR-222-3p	✓	✓	✓	✓
hsa-miR-26a-5p	✓	✓	✓	✓
hsa-miR-27a-3p	✓	✓	✓	✓
hsa-miR-320a	✓	✓	✓	✓
hsa-miR-342-3p		✓	✓	✓
hsa-miR-382-5p	✓	✓	✓	✓
hsa-miR-423-5p	✓	✓	✓	✓
<b>Total</b>	20	21	21	22

### 5.2.3. Análisis de expresión relativa de los miARNs

Una vez confirmadas las amplificaciones de los miARNs, se procedió al análisis de las pacientes incluidas en el estudio. Los análisis estadísticos de los resultados obtenidos se realizaron tanto en la cohorte entera como en cada uno de los fenotipos incluidos en la misma. Asimismo, se realizó un análisis conjunto de los fenotipos LumB HER2 y HER2 (HER2 LumB HER2) para obtener un análisis de todas las pacientes con sobreexpresión de este receptor.

Resultante de este análisis de pacientes con tumores de mama de fenotipos extremos, se hallaron 6 miARNs con expresión diferencial entre pacientes R y NR tratadas con quimioterapia neoadyuvante. 5 de ellos presentaron, tal y como se representa en la Tabla 5.2, una sobreexpresión en las pacientes R, mientras que el miR-221-3p presentaba una expresión reducida en el mismo grupo de pacientes. También se puede observar en la misma tabla, que todos los miARNs con diferencias de expresión entre ambos grupos, presentan relaciones con diferentes procesos y/o vías relacionadas con el cáncer. Además, estos miARNs, regulan diferentes genes que afectan a estos procesos. A continuación, se exponen los resultados del miARN miR-342-3p en la cohorte entera a modo de ejemplo del procedimiento que se siguió en el análisis de aquellos miARNs que separaban significativamente las pacientes R comparadas con las NR en cada uno de los fenotipos.

Como se ilustra en la Figura 5.11, en la comparación de expresiones relativas mediante  $2^{\Delta\Delta Cq}$  del miR-342-3p, se encontró una diferencia significativa entre las pacientes R y NR a la quimioterapia neoadyuvante ( $p = 0,0177$ ) en la cohorte entera.

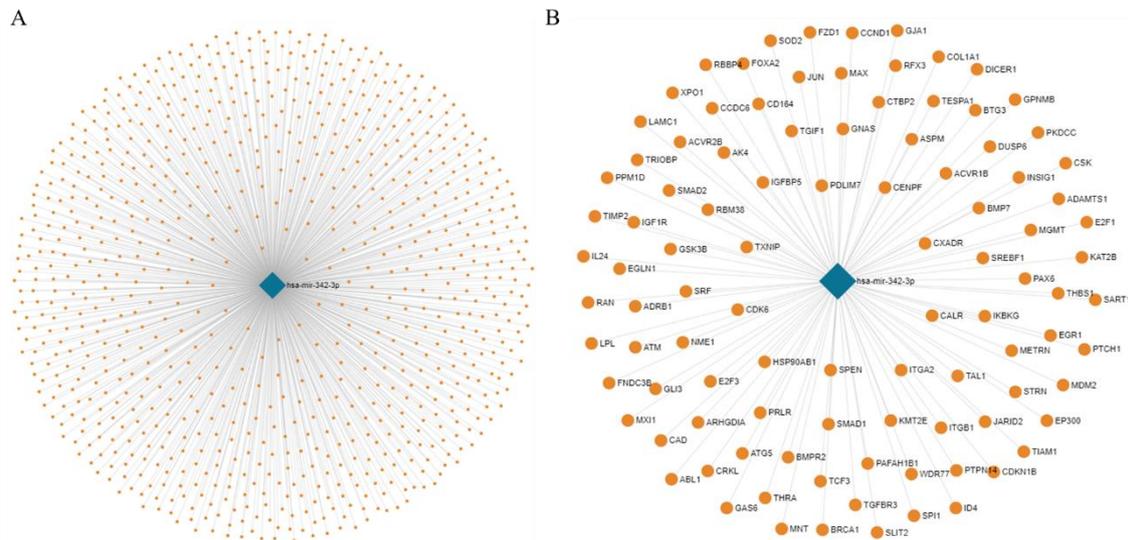


**Figura 5.11** Gráfico tipo violín donde se muestra la variación entre pacientes respondedoras y no respondedoras del miR-342-3p en la expresión relativa. \*  $p < 0,05$ , prueba U de Mann-Whitney.

Seguidamente se presentan los resultados del estudio *in silico* realizados al miR-342-3p.

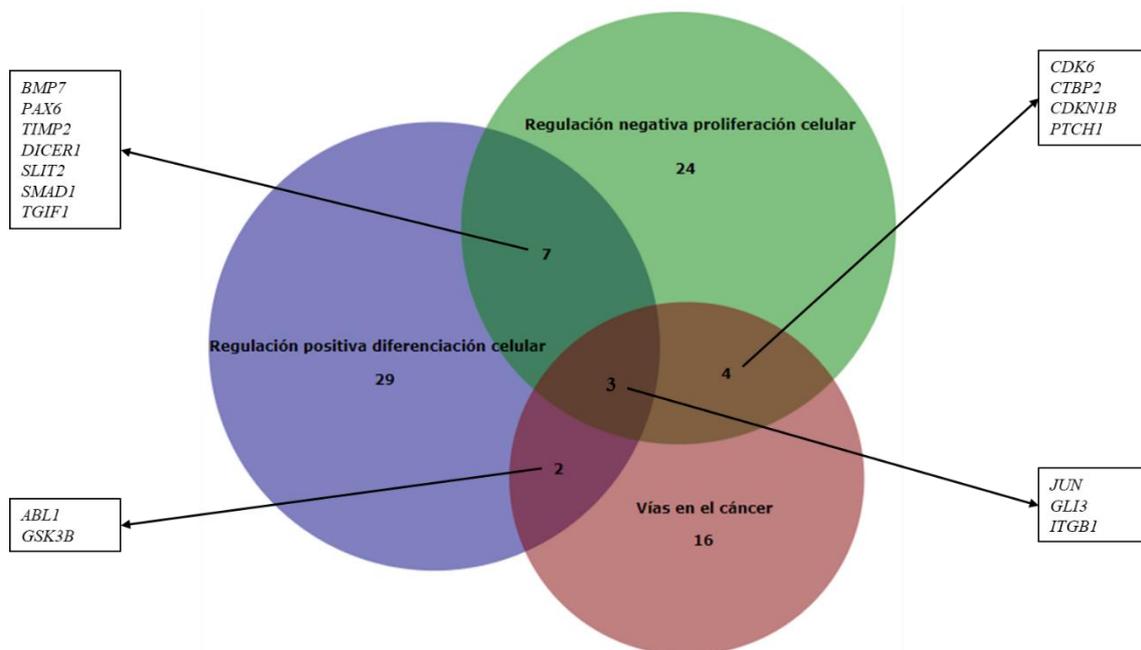
#### 5.2.4. Análisis *in silico* de enriquecimiento de genes

En el estudio mediante las herramientas on-line miRNet y TarBase se hallaron un total de 808 y 568 interacciones con genes regulados por el miR-342-3p respectivamente, representados en la Figura 5.12 A. Asimismo, también a través de la plataforma miRNet se construyó una red con 86 genes que además de estar relacionados con miR-342-3p intervienen en la regulación negativa de la proliferación celular ( $n = 39$ ), la regulación positiva de la diferenciación celular ( $n = 42$ ) y que actúan en las principales vías del cáncer ( $n = 26$ ). Estos genes aparecen detallados en la Figura 5.12 B.



**Figura 5.12** Red de genes relacionados con el miR-342-3p. A) 3018 genes que interactúan con el miR-342-3p. B) Selección de 86 genes relacionados con la regulación negativa de la proliferación celular, la regulación positiva de la diferenciación celular y que se vinculan con las principales vías tumorigénicas.

Con esta selección, se realizó un diagrama de Venn para determinar cuáles de estos 86 genes estaban involucrados en las tres aproximaciones antes citadas. Se hallaron 3 genes representados en la Figura 5.13: *JUN*, *GLI3* y *ITGB1*.



**Figura 5.13** Diagrama de Venn de las conjunciones de genes relacionados con el miR-342-3p y con la regulación negativa de la proliferación celular, la regulación positiva de la diferenciación celular y con vías significativas en los procesos cancerígenos.

A continuación, se detallan en la Tabla 5.2 los resultados obtenidos siguiendo este esquema en las diferentes cohortes.

**Tabla 5.2** Comparativa de expresiones relativas, análisis *in silico* y enriquecimiento de genes de los diferentes miARNs que resultaron tener una capacidad discriminativa significativa entre pacientes R y NR a la QNA en los diferentes fenotipos y en la cohorte entera.

Fenotipo/cohorte	miARN	p-valor	Estadístico	Expresión R vs NR	Procesos implicados en cáncer de mama relacionados con el miARN	Genes regulados por el miARN que actúan en las 3 vías
<b>Global</b>	miR-342-3p	0,0177	U-Mann	↑	Regulación negativa proliferación celular. Regulación positiva diferenciación celular. Vías tumorigénicas.	<i>JUN</i> <i>GLI3</i> <i>ITGB1</i>
<b>LumB HER2</b>	miR-221-3p	0,0359	t-test	↓	Regulación negativa muerte celular programada. Vías tumorigénicas. Neoplasias mamarias.	<i>CDK1</i> <i>PIK3R1</i> <i>TP53</i> <i>IL6</i>
<b>HER2 LumB HER2</b>	miR-194-5p	0,0373	U-Mann	↑	Metabolismo de fármacos. Vías tumorigénicas. Regulación negativa ciclo celular.	<i>PTGS2/COX-2</i> <i>MYC</i> <i>JUN</i>
	miR-342-3p	0,0089	U-Mann	↑	Regulación negativa proliferación celular. Regulación positiva diferenciación celular. Vías tumorigénicas.	<i>JUN</i> <i>GLI3</i> <i>ITGB1</i>
<b>HER2</b>	miR-194-5p	0,0339	U-Mann	↑	Metabolismo de fármacos. Vías tumorigénicas. Regulación negativa ciclo celular.	<i>PTGS2/COX-2</i> <i>MYC</i> <i>JUN</i>
	miR-222-3p	0,0244	t-test	↑	Muerte celular programada. Regulación negativa proliferación celular. Neoplasias mamarias y metástasis.	<i>MYC</i> <i>TP53</i>
<b>TN</b>	-	-	-		---	---

Nota: Las flechas verdes (hacia arriba) significan sobreexpresión. Las flechas rojas (hacia abajo) significan expresión disminuida.

Aparte de los miARNs en los que la diferencia de expresiones relativas entre pacientes R y NR al tratamiento con QNA fue estadísticamente significativa, se hallaron otros miARNs en los que el p-valor, no fue menor a 0,05 pero tampoco superior a 0,1. Estos resultados se presentan en el la Tabla A 8.6 del Anexo C. Aparte de estos resultados, también se añaden en los anexos, los resultados del análisis de las variables de confusión Tabla A 8.7 - Tabla A 8.12 del Anexo D.

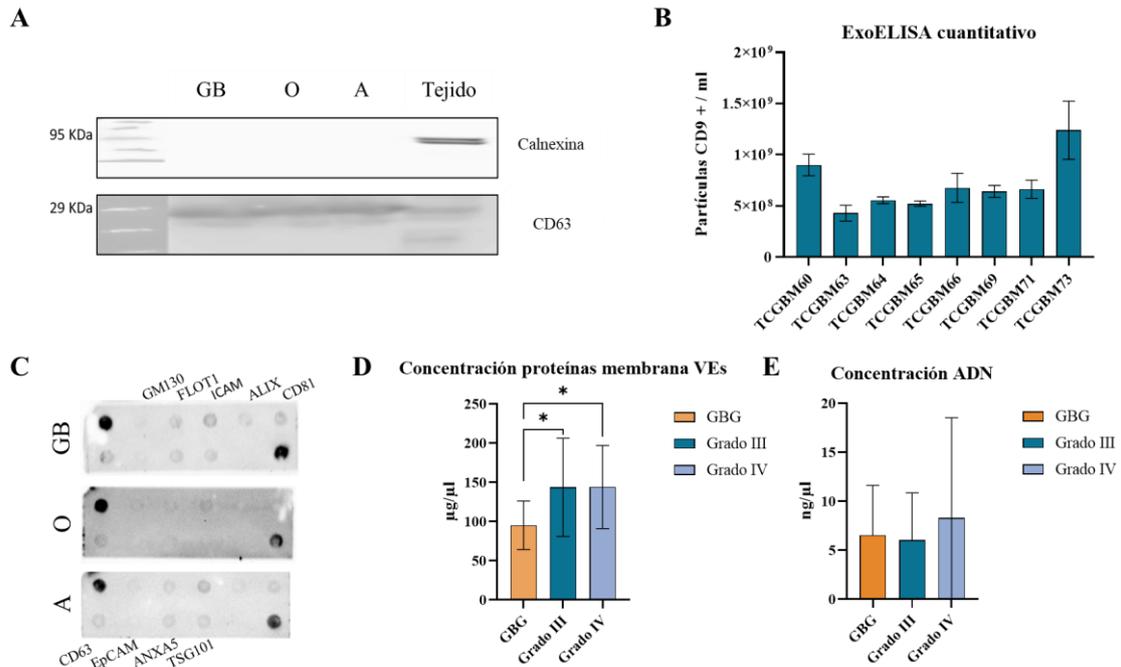
No se encontraron diferencias significativas entre pacientes R y NR en las variables edad, peso, altura, tamaño del tumor al diagnóstico, antecedentes oncológicos y gestacionales, menopausia, diabetes, HTA, hiperlipemia y tiroidismo en las cohortes HER2 y TN, así como en la cohorte entera. Ahora bien, en la cohorte LumB HER2 se encontró una diferencia significativa entre las edades de las pacientes R y NR. Concretamente las pacientes de esta cohorte que no tenían una buena respuesta al tratamiento con QNA eran más jóvenes que aquellas que respondieron bien al mismo tratamiento. También se encontraron diferencias significativas entre R y NR con relación al tamaño del tumor al diagnóstico en la cohorte conjunta HER2 LumB HER2.

### 5.3. Resultados BL en glioma

#### 5.3.1. Detección de VEs

En la caracterización de las VEs de pacientes diagnosticados de glioma, como se puede observar en la Figura 5.14 A, se detectó la tetraspanina CD63 en todos los lisados de VEs provenientes de los diferentes tipos de gliomas incluidos en este ensayo (GBM, astrocitomas y oligodendrogliomas). Mediante un ensayo ELISA (Figura 5.14 B) también se identificaron aquellas partículas con expresión del marcador de VEs CD9. Todas las muestras analizadas presentan este marcador con una media de  $7,04 \times 10^8$  partículas /  $\mu\text{l}$  ( $4,03 \times 10^8 - 1,24 \times 10^9$  partículas/ $\mu\text{l}$ ). En la matriz de anticuerpos contra marcadores de exosomas, se detectaron las proteínas FLOT-1, ICAM1, ALIX, CD81, CD63, EpCam, ANXA5 y TSG101 en las partículas aisladas de los diferentes tipos de tumores gliales (Figura 5.14 C). En ninguno de ellos se detectó la proteína de cis-golgi GM130, indicadora de contaminación celular.

En la Figura 5.14 D se representan las concentraciones de proteínas de los gliomas de bajo grado (GBG), los gliomas de grado III y los de grado IV. Se aprecia un incremento de la concentración de proteínas conforme aumenta el grado tumoral. Los GBG presentan la concentración más baja mientras que los gliomas de grado IV la más alta. No sucede así cuando se determina la concentración de ADN (Figura 5.14 E), pues no se encontraron diferencias significativas entre los tumores de diferentes grados de agresividad.

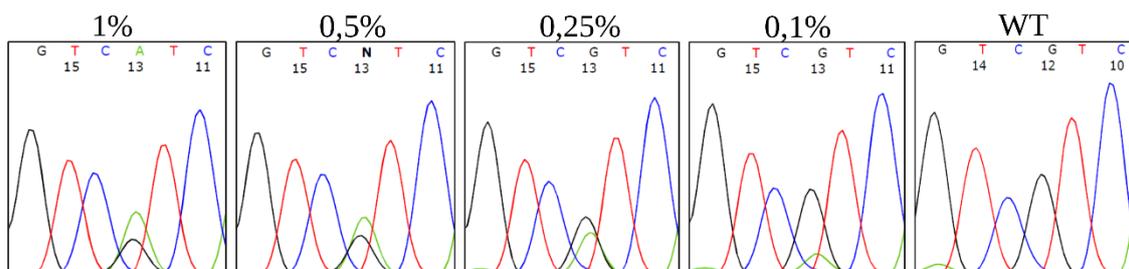


**Figura 5.14** Caracterización de las VEs aisladas de los sueros de pacientes diagnosticados de glioma. A) Western Blot con el marcador celular Calnexina y la tetraspanina CD63 como marcados de membrana de VEs. B) Histograma de los valores de partículas CD9 +/- ml de diferentes muestras de gliomas. C) Matriz de expresión de proteínas exosómicas. D) Concentración de proteínas de membrana de las VEs aisladas de tumores gliales de diferentes grados de malignidad. E) Concentración de ADN-VEs de tumores gliales de diferentes grados de malignidad. \* $p \leq 0,05$ .

### 5.3.2. Validación analítica de la detección de *IDH*<sup>395G>A</sup> en glioma

Para la validación analítica de la técnica, la determinación del límite de detección y las validaciones intra e interlaboratorio se llevó a cabo, tal y como se ha expuesto en el apartado 550, un banco de diluciones con controles comerciales con y sin presencia de la mutación c.395G>A del gen *IDH1*.

En una primera aproximación, para comprobar el éxito de la potenciación del alelo mutado por medio de la *fast*-TT-COLD-PCR, se procedió al análisis de los diferentes productos del banco de diluciones detallado en el apartado 0. mediante la técnica de referencia en detección de mutaciones puntuales: la secuenciación Sanger.



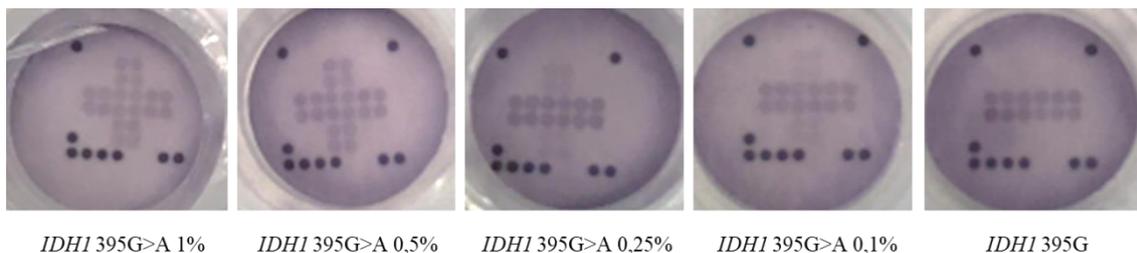
**Figura 5.15** Resultados de la secuenciación del banco de diluciones de la mutación c.394G>A del gen *IDH1*. Se aprecia la mutación al 0,1 % así como la ausencia de esta en el control WT.

Como se puede observar en la Figura 5.15, con la potenciación del alelo mutado mediante la *TT-fast-COLD-PCR*, se llegó a detectar hasta un 0,1 % del alelo mutado en el 99,9 % de alelo WT. Teniendo en cuenta el límite de detección (LdD) de la secuenciación Sanger ( $\pm 20\%$ ), se pudo confirmar que la potenciación estaba funcionando correctamente.

Una vez comprobada la efectividad de esta potenciación, se procedió a la validación analítica, por medio de la determinación del límite de detección y la sensibilidad y especificidad analíticas, de la combinación de la propia *TT-fast-COLD-PCR* con la detección mediante la tecnología *DGL-Tech™*.

### 5.3.2.1. Determinación del límite de detección de la mutación c.395G>A del gen *IDH1* mediante *DGL-Tech™*

Los resultados se obtuvieron mediante la observación de los patrones colorimétricos de las sondas dispuestas en las membranas de nylon, tal y como se indica en el apartado 4.4.6. En la Figura 5.16 puede observarse los diferentes patrones obtenidos de un banco de diluciones (del 1 % al 0,1 % más el WT) realizados en las pruebas de la validación analítica.



**Figura 5.16** Representación de los resultados obtenidos en una de las repeticiones de la validación analítica. Obsérvese que la mutación se puede detectar hasta una dilución del 0,1 %.

El límite de detección (LdD) de la técnica se determinó como el menor porcentaje de mutación detectado por lo menos en un 90 % del total de repeticiones realizadas en los tres laboratorios participantes de la validación analítica. Tal y como se puede constatar en la Tabla 5.3, este criterio se cumple en la dilución del 0,25 % de alelo mutado frente al 99,75 % de WT. Consecuentemente, éste se determinó como el límite de detección de la técnica.

### 5.3.2.2. Determinación de la sensibilidad y especificidad analíticas

Como se puede observar en la Tabla 5.3, las diluciones de la mutación al 1 % y al 0,5 % se detectaron en el 100 % de las repeticiones realizadas, mientras que el 0,25 % se detectó en un 91,67 %. Así mismo, la presencia de la dilución al 0,1 % de mutación fue detectada en un 36 % de las pruebas. También se pudo comprobar que la especificidad de la determinación fue del 100 %.

%, pues ninguno de los controles WT analizados dio resultado positivo para la mutación *IDH1*<sup>395G>A</sup>.

**Tabla 5.3** Resultados de la validación analítica de la amplificación con potenciación del alelo mutado *fast-COLD-PCR* y la detección mediante la tecnología *DGL-Tech*<sup>TM</sup>.

1%	E +	E -	Total	0,5%	E +	E -	Total
T +	25	0	25	T +	25	0	25
T -	0	25	25	T -	0	25	25
<b>Total</b>	25	25		<b>Total</b>	25	25	
<b>Sensibilidad:</b>	100,00%	<b>VPP:</b>	100,00%	<b>Sensibilidad:</b>	100,00%	<b>VPP:</b>	100,00%
<b>Especificidad:</b>	100,00%	<b>VPN:</b>	100,00%	<b>Especificidad:</b>	100,00%	<b>VPN:</b>	100,00%

0,25%	E+	E-	Total	0,1%	E+	E-	Total
T+	22	0	22	T+	9	0	9
T-	2	25	27	T-	16	25	41
<b>Total</b>	24	25		<b>Total</b>	25	25	50
<b>Sensibilidad:</b>	91,67%	<b>VPP:</b>	100,00%	<b>Sensibilidad:</b>	36,00%	<b>VPP:</b>	100,00%
<b>Especificidad:</b>	100,00%	<b>VPN:</b>	92,59%	<b>Especificidad:</b>	100,00%	<b>VPN:</b>	60,98%

Nota: VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo.

La combinación de las técnicas *TT-fast-COLD-PCR* y *DGL-Tech*<sup>TM</sup> permite una detección de la mutación 395G>A del gen *IDH1* con una especificidad máxima en todas las diluciones testadas, pues no se observó ningún falso positivo. En cuanto a la sensibilidad, esta se presenta máxima (100 %) en las diluciones 1 % y 0,5 % de alelo mutado frente WT. En la dilución 0,25 % deja de detectarse la mutación en alguna de las repeticiones, aunque sigue presentando una buena sensibilidad (91,67 %). Por último, en la dilución del 0,1 % de alelo mutado frente WT se detectan solamente el 36 % de las repeticiones con presencia de mutación.

### 5.3.2.3. Reproducibilidad intra e interlaboratorio

Para comprobar la reproducibilidad interlaboratorio se compararon en cada dilución la sensibilidad y especificidad de cada laboratorio (Tabla 5.4). Las determinaciones de los bancos de diluciones se realizaron por triplicado en 3 laboratorios y 6 termocicladores diferentes. En total participaron 5 técnicos en la ejecución de la técnica de detección.

**Tabla 5.4** Sensibilidad y especificidad en las diferentes diluciones del alelo mutado de cada laboratorio.

1,0%	Laboratorio 1	Laboratorio 2	Laboratorio 3
<b>Sensibilidad</b>	100,00%	100,00%	100,00%
<b>Especificidad</b>	100,00%	100,00%	100,00%

0,5%	Laboratorio 1	Laboratorio 2	Laboratorio 3
<b>Sensibilidad</b>	91,67%	100,00%	100,00%

<b>Especificidad</b>	100,00%	100,00%	100,00%
<b>0,25%</b>	<b>Laboratorio 1</b>	<b>Laboratorio 2</b>	<b>Laboratorio 3</b>
<b>Sensibilidad</b>	80,00%	100,00%	100,00%
<b>Especificidad</b>	100,00%	100,00%	100,00%
<b>0,1%</b>	<b>Laboratorio 1</b>	<b>Laboratorio 2</b>	<b>Laboratorio 3</b>
<b>Sensibilidad</b>	16,67%	60,00%	55,56%
<b>Especificidad</b>	100,00%	100,00%	100,00%

La especificidad respecto al alelo mutado se mantuvo en un 100 % en todas las diluciones analizadas en todos los laboratorios. Por lo contrario, la sensibilidad disminuyó a medida que menguaba la concentración de alelo mutado. Esta disminución se evidencia ya en la dilución del 0,5 % de alelo mutado en el laboratorio 1, mientras que tanto en el laboratorio 2 como en el laboratorio 3 no deja de detectarse la mutación hasta el 0,1 % de alelo mutado.

En la validación intralaboratorio se compararon los resultados obtenidos por diferentes técnicos y en diferentes termocicladores. Estos resultados, igual que en el ensayo de reproducibilidad interlaboratorio, no presentaron diferencias en cuanto a sensibilidad y especificidad (datos no mostrados).

Una vez realizada la validación analítica, se procedió a la ejecución de la validación clínica a través de las muestras de la cohorte de tumores gliales.

### 5.3.3. Validación clínica de la detección de $IDH^{395G>A}$ en glioma

Todos los aislamientos de VEs del suero de los pacientes de esta cohorte se realizaron mediante el protocolo basado en la precipitación con PEG8000, descrito en 4.2.1. Para las extracciones del ADN en la validación clínica se recurrió al protocolo descrito en el apartado 4.4.3.

Para la validación clínica se compararon las detecciones realizadas con la tecnología DGL-*Tech*<sup>TM</sup> y la secuenciación de los productos de la TT-*fast*-COLD-PCR obtenidos de BL contra los resultados de las tinciones de IHQ realizada sobre los tejidos FFPE. A continuación, se detallan los procedimientos realizados.

#### 5.3.3.1. Detección de la mutación IDH1 R132H en los tejidos parafinados mediante inmunohistoquímica

Para la determinación de la presencia de la mutación R132H del gen IDH1 en tejido, se obtuvieron las tinciones IHQ de los tumores gliales en los diferentes hospitales de origen. Además, se realizó una segunda tinción mediante la misma técnica en el laboratorio de la Fundación HM en Monte

Príncipe. La determinación de la mutación R132H del gen IDH1 se realizó en los tejidos FFPE de las muestras con la clona H09 (Ventana, Roche Diagnostics). En la Tabla 5.5 se representa el estado de la mutación R132H de las muestras del proyecto.

**Tabla 5.5** Estado de la mutación R132H de los gliomas de la cohorte mediante tinción IHQ.

Estado IDH1 R132H IHQ	N	%
Mutación R132H presente	45	27,44 %
Mutación R132H no detectada	119	72,56 %
TOTAL (N)	164	

De las 45 muestras que presentaban tinción positiva en la IHQ para la mutación R132H, 25 se clasificaron como astrocitomas, 17 presentaban histología de oligodendroglioma, 2 se correspondieron con gangliogliomas y el restante fue clasificado como GB.

A continuación, se procedió al aislamiento de VEs mediante el protocolo basado en la precipitación con PEG8000. Así mismo, se extrajo el ADN encapsulado en las VEs del que se determinó la concentración y pureza.

### 5.3.3.2. Cuantificación del ADN

La media de las concentraciones de los ADN-VEs provenientes de sueros de pacientes con gliomas cuantificados mediante el espectrofotómetro EPOCH (BioTek Instruments) fue de 79,33 ng/ $\mu$ l (27,27 – 265,24 ng/ $\mu$ l) y la media de la ratio 260/280 se determinó en 2,02 ( $\pm$  0,38). Con estas concentraciones y ratios se pudo proceder a la amplificación con potenciación del alelo mutado mediante la técnica TT-*fast*-COLD-PCR para el análisis de la mutación c.395G>A del gen *IDH1* de las 164 muestras incluidas en el proyecto.

La cantidad y pureza del ADN fue suficiente para proceder a la amplificación y a la detección de la mutación c.395G>A del gen *IDH1*.

### 5.3.3.3. Amplificación del ADN con potenciación del alelo 395G>A

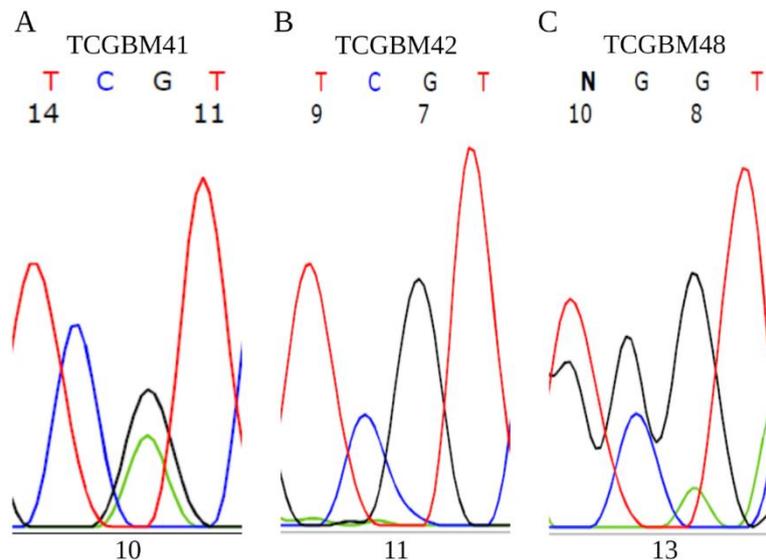
De las 164 muestras procesadas en el estudio 84 amplificaron correctamente (51,22 %), 55 no presentaron banda de amplificación (33,54 %) y 25 (15,24 %) presentaron un patrón de amplificación inespecífico. Estas últimas pueden dividirse en dos grupos: las que presentan amplificación de la región incluida entre los cebadores y las que no.

Se detectó el codón 132 del gen *IDH1* en más de la mitad de las muestras de ADN procedentes el aislamiento de VEs del suero de pacientes con tumores gliales.

La detección de la mutación *IDH1*<sup>395G>A</sup> se realizó en todas las muestras tanto a través de la secuenciación Sanger como mediante la tecnología DGL-Tech™.

#### 5.3.3.4. Detección mediante secuenciación del alelo 395G>A

Se secuenciaron aquellas muestras que presentaron una óptima amplificación más aquellas con patrones no específicos en las que se observó amplificación de la región comprometida entre los dos cebadores. Finalmente, un total de 96 muestras (58,54 %) fueron secuenciadas. De estas, se pudieron analizar 69 (42,07 % del total de muestras; 71,88 % de las muestras secuenciadas) mientras que 27 muestras (28,12 % de las secuencias) presentaron resultados no valorables (NV). De las 69 muestras analizadas por secuenciación, 4 presentaron la mutación c.395G>A del gen *IDH1* (5,80 %), en 1 se detectó la mutación c.395G>T (p.R132L). A modo de representación de los resultados, en la Figura 5.17, se muestran las secuenciaciones del codón R132 de tres muestras con resultado positivo, negativo y NV.



**Figura 5.17** Representación de los resultados obtenidos por secuenciación de los amplicones resultantes de la amplificación con potenciación del alelo mutado. A) Muestra TCGBM41 con resultado positivo para la mutación c.395G>A. B) Muestra TCGBM42 con resultado negativo para la mutación c.395G>A. C) Muestra TCGBM48 con resultado no valorable.

En total, mediante la conjunción de la potenciación del alelo mutado con la TT-*fast*-COLD-PCR y la secuenciación, se llegaron a detectar 5 mutaciones en el gen *IDH1* analizando el ADN encapsulado en VEs aisladas de sueros de pacientes diagnosticados de glioma.

Con estos datos, se procedió al análisis de sensibilidad y especificidad de las técnicas de potenciación y secuenciación.

### 5.3.3.5. Análisis de la sensibilidad y especificidad de la detección, post TT-fast-COLD-PCR, de la mutación *IDH1*<sup>395G>A</sup> por secuenciación

Los productos de la reacción de amplificación con potenciación del alelo mutado mediante la TT-fast-COLD-PCR secuenciados, se sometieron a análisis comparándolos con los resultados obtenidos por IHQ. Actualmente, la IHQ es la técnica de referencia usada en los hospitales para la determinación de la mutación R132H en *IDH1* en tejido FFPE.

**Tabla 5.6** Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la combinación de la amplificación mediante fast-COLD-PCR y la detección por secuenciación.

	IHQ +	IHQ -	Total
SEC +	4	1	5
SEC -	19	45	64
<b>Total</b>	23	46	69
<b>Sensibilidad:</b>	17,39 %	<b>VPP:</b>	80,00 %
<b>Especificidad:</b>	97,83 %	<b>VPN:</b>	70,31 %

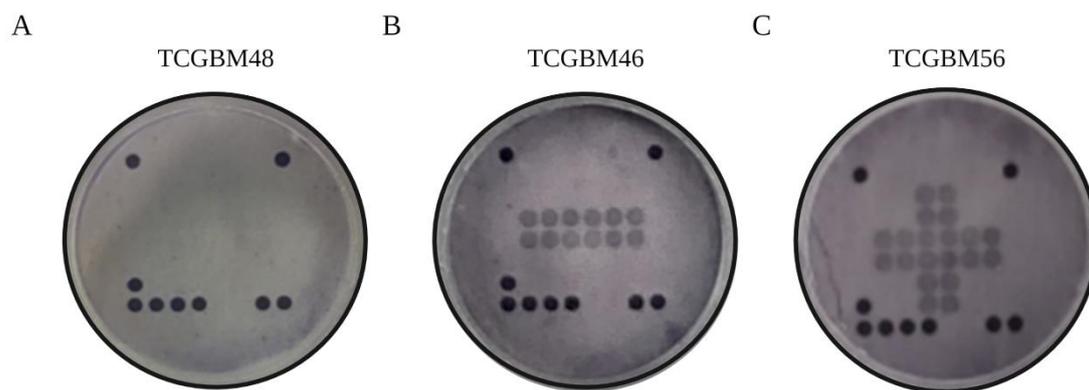
VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo

Como se observa en la Tabla 5.6, la sensibilidad de la combinación de la amplificación con potenciación del alelo mutado TT-fast-COLD-PCR con la detección mediante secuenciación fue del 17,39 %. No obstante, la especificidad de la combinación de ambas técnicas se calculó en un 97,83 %. El VPP y VPN se establecieron en 80,00 % y 70,31 % respectivamente.

Analizadas la sensibilidad y especificidad de las secuenciaciones, se procedió con el estudio de la mutación *IDH1*<sup>395G>A</sup> en las muestras de gliomas, mediante los mismos productos amplificados, con la tecnología DGL-Tech<sup>TM</sup>.

### 5.3.3.6. Detección del alelo mutado 395G>A mediante la tecnología DGL-Tech<sup>TM</sup>

Los mismos productos de la TT-fast-COLD-PCR que se analizaron por secuenciación Sanger, se sometieron a la detección a través de la tecnología DGL-Tech<sup>TM</sup>. Por consiguiente, se procesaron con esta técnica específica para la detección de la mutación *IDH1*<sup>395G>A</sup> 96 ADNs extraídos de VEs aisladas de sueros de pacientes con glioma. Se pudieron valorar 72 muestras (43,90 % del total de las muestras; 75,00 % de las muestras procesadas), mientras que 24 resultaron no valorables (NV) (25 % de las muestras procesadas). De las muestras analizadas, 69 se reportaron como WT (95,83 %) y se detectó la mutación *IDH1*<sup>395G>A</sup> en 3 de ellas (4,34 %). Se ilustra en la Figura 5.18, una representación de cómo se valoran los resultados obtenidos mediante la tecnología de DestiNA.



**Figura 5.18** Representación de los resultados de la detección de  $IDH1^{R132H}$  mediante DGL-Tech<sup>TM</sup>. A) Muestra TCGBM48 con resultado no valorable. B) Muestra TCGBM46 con resultado negativo para la mutación c.395G>A. C) Muestra TCGBM56 con resultado positivo para la mutación c.395G>A.

Mediante la combinación de la TT-*fast*-COLD-PCR y la detección con DGL-*Tech*<sup>TM</sup>, se detectaron 3 mutaciones en BL de suero de pacientes diagnosticados con glioma. Siguiendo con la validación clínica de este ensayo, se realizaron las comparaciones de estos resultados con los obtenidos mediante el *gold standard* en la detección de mutaciones puntuales: la secuenciación Sanger.

### 5.3.3.7. Comparativa de los resultados de la detección mediante la tecnología DGL-*Tech*<sup>TM</sup> con los resultados obtenidos a través de la secuenciación

Con afán de averiguar la capacidad de detección del sistema basado en sondas modificadas adheridas a membranas de nylon (DGL-*Tech*<sup>TM</sup>) se realizó un estudio de sensibilidad y especificidad tomando como referencia los resultados obtenidos mediante secuenciación. También se calcularon los valores predictivos positivo y negativo. Estos resultados se reflejan en la Tabla 5.7.

**Tabla 5.7** Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la combinación de la amplificación mediante *fast-COLD-PCR* y la detección mediante la tecnología DGL-*Tech*<sup>TM</sup>.

	SEC +	SEC -	Total
<b>DGL +</b>	2	1	3
<b>DGL -</b>	1	61	62
<b>Total</b>	3	62	65
<b>Sensibilidad:</b>	66,67 %	<b>VPP:</b>	66,67 %
<b>Especificidad:</b>	98,39 %	<b>VPN:</b>	98,39 %

VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo

La detección de la mutación  $IDH1^{395G>A}$  mediante el innovador sistema de detección de mutaciones basado en sondas modificadas adheridas a membranas de nylon, presentó una

sensibilidad del 66,67 % y una especificidad del 98,39 % en relación con la actual técnica de referencia en detección de mutaciones puntuales. Dos de las 3 mutaciones detectadas mediante DGL-Tech™ también se observaron en la detección por secuenciación, mientras que una de ellas, solamente se detectó mediante la tecnología DGL-Tech™. También una de las mutaciones detectadas por secuenciación no fue detectada por la DGL-Tech™. Ambas muestras, se determinaron como positivas en la tinción IHQ sobre tejido FFPE. La comparativa entre los resultados de IHQ contra los resultados de la tecnología DGL-Tech™ se presentan en la Tabla A 8.12 del Anexo D.

## 6. Discusión

### 6.1. VEs

La BL ha emergido como una herramienta complementaria a las biopsias convencionales capaz de aportar información adicional para un mejor manejo clínico de los pacientes oncológicos. Como ya se ha comentado en este documento, las principales aportaciones de los análisis en BL son: la capacidad de englobar los diferentes clones de un mismo tumor en un solo análisis; la capacidad de realizar un diagnóstico temprano; evaluar la respuesta a tratamientos y realizar seguimientos (Du *et al.*, 2018; Garcia-Romero *et al.*, 2018; Wan *et al.*, 2021). Todo ello usando técnicas mínimamente invasivas, evitando el quirófano y mejorando así, la calidad de vida del paciente oncológico.

En esta tesis se ha optado por las VEs como objeto de estudio de la BL por dos razones diferentes: por su capacidad de encapsular miARNs y protegerles de la acción de las RNAsas y porque, contrariamente al ADNlc (De Mattos-Arruda *et al.*, 2015), las VEs son capaces de atravesar la BHE, permitiendo el estudio de del ADN proveniente de células gliales (García-Romero *et al.*, 2017a).

Asimismo, y con la finalidad de refinar el aislamiento de las VEs provenientes de los tumores de mama y de los gliomas que nos permitiese obtener una cantidad suficiente de ácidos nucleicos (AN-VEs), se realizó una comparativa de 4 metodologías de aislamiento de VEs.

Aquí se presenta el método de aislamiento mediante PEG8000 como un procedimiento coste-efectivo que ofrece un alto rendimiento en la recuperación de VEs. En un primer experimento, el análisis NTA demostró que el método de precipitación PEG8000 fue el que más partículas recuperó partiendo de cualquiera de los volúmenes iniciales de suero, seguido del kit comercial también basado en la precipitación Exoquick<sup>®</sup>, contrastando los resultados obtenidos por otros investigadores en trabajos similares (Tang *et al.*, 2017; Ludwig *et al.*, 2018). Tanto el kit comercial PureExo<sup>®</sup> como la UC presentaron un rendimiento sorprendentemente bajo en el aislamiento de partículas. En cuanto al tamaño de las partículas aisladas, todos los protocolos presentaron un rango (50 – 120 nm) acorde al de las VEs, aunque las partículas recuperadas por la UC fueron de mayor tamaño. Una posible explicación del menor tamaño de partículas observados en los tres métodos restantes sería la presencia de disolventes orgánicos en los reactivos de los kits. Estos disolventes podrían degradar la membrana de las VEs de mayor tamaño debido a la abundancia de fosfatidilserina en sus membranas (El Andaloussi *et al.*, 2013). Mediante este estudio, queda demostrado que las partículas aisladas por los diferentes métodos aquí analizados presentan diámetros acordes a los que presentan las VEs.

Otra forma de estimar el número de VEs aisladas es midiendo la concentración de proteínas totales y de membrana, así como la realización de una cuantificación basada en anticuerpos. En este trabajo se optó por la cuantificación de la tetraspanina CD9 con ExoELISA (Naseri *et al.*, 2021). Tanto en la detección de proteínas totales y de membrana como en el ensayo ExoELISA, el kit comercial Exoquick<sup>®</sup> fue el que presentó un mayor rendimiento. Si bien estos resultados no concuerdan con el número de partículas detectado mediante NTA, en el que el método PEG8000 obtuvo un mayor número de partículas/ $\mu\text{l}$ , la mayor presencia de proteínas en el protocolo Exoquick<sup>®</sup> se podría explicar por una sedimentación de proteínas no procedentes de las VEs (Franquesa *et al.*, 2014; Zarovni *et al.*, 2015). En este sentido, los resultados del índice de pureza muestran como el PEG8000 presenta un valor ligeramente superior al de Exoquick<sup>®</sup> las técnicas UC y PureExo<sup>®</sup> fueron las que reportaron un mayor índice de pureza en todos los volúmenes iniciales de suero, coincidiendo con los resultados presentados por Patel y colaboradores (Patel *et al.*, 2019).

Siguiendo con el análisis de proteínas y con afán de confirmar que las partículas aisladas, realmente fuesen VEs, se estudiaron diferentes marcadores de membrana, confirmándose la presencia de FLOT-1, ICAM1, ALIX, CD81, CD63, EpCam, ANXA5 y TSG101. Sin embargo, en la UC se detectó un perfil de proteínas significativamente diferente al del resto. Este fenómeno se puede explicar debido a la diferencia en la distribución de tamaños de las VEs, ya que las de mayor tamaño presentan diferentes marcadores de membrana debido a su distinta biogénesis (Kalra, Drummen and Mathivanan, 2016; Gurung *et al.*, 2021). También se descartó la contaminación celular en los aislamientos al no observarse señal para los marcadores de orgánulos calnexina y GM130 (Scharadin *et al.*, 2011). La población de partículas CD63 positivas, confirmada por citometría de flujo, fue similar a las descritas en publicaciones anteriores (Manterola *et al.*, 2014) y confirmadas en trabajos posteriores (Gassmann *et al.*, 2021). Aunque el aislamiento mediante el PEG8000 no es capaz de aislar un tipo exclusivo de VEs, como tampoco de separar aquellas VEs que provengan de tipos celulares específicos, este podría presentarse como una separación previa a esta estratificación (Rider, Hurwitz and Meckes, 2016; Martínez-Greene *et al.*, 2021).

Finalmente, y persiguiendo el objetivo expuesto en esta tesis de obtener suficientes ANs para poder proceder con la detección de perfiles de expresión de miARN y la detección de mutaciones a partir del ADN, se comparó mediante dPCR - por primera vez según nuestro conocimiento - la cantidad de ANs recuperados con los cuatro procedimientos de aislamiento de VEs. En primer lugar, el número de copias por  $\mu\text{l}$  incrementaba con el aumento del volumen de partida, no solo reforzando los resultados de partículas aisladas, sino probando la repetibilidad de la técnica. Sorprendentemente, aunque en nuestra aproximación se detectaron menos VEs, el rendimiento en la extracción de AN con la UC fue similar al de los métodos con los que se detectó más ADN

(Exoquick® y PEG8000). Estos resultados corroboran los obtenidos en el análisis del tamaño de las partículas aisladas, y apuntan a que las VEs aisladas mediante UC se correspondería con las vesículas de mayor tamaño, que corresponde con los AB. Estos, tanto por su mayor tamaño como por su biogénesis, presentan una mayor cantidad de ADN (Vagner *et al.*, 2018; Elzanowska, Semira and Costa-Silva, 2021). Algunos autores cualifican el ADN encapsulado en los AB (ADN-AB) como desechos de la degradación del ADN genómico celular (Paludan and Bowie, 2013) otras publicaciones indican que el ADN-AB podría estar involucrado en la transmisión horizontal del material genético entre células (Fischer *et al.*, 2016).

Teniendo en cuenta que el método basado en PEG8000 es un protocolo que ofrece un alto rendimiento en la recuperación de VEs y que la recuperación de AN de estas VEs ofrece una alta efectividad en comparación con otros métodos comerciales e incluso con el *gold-standard* UC, podemos afirmar que el protocolo mediante PEG8000 es un método alternativo para la recuperación de AN-VEs. Además, al ser un protocolo sencillo, económico y rápido, nos decantamos por la aplicación de éste en el aislamiento de VEs de sueros procedentes de pacientes diagnosticados de cáncer de mama y glioma.

## 6.2. BL en cáncer de mama

Gracias a la notable mejora de los avances en técnicas de imagen y al aumento de los cribados en la población, los tumores de mama generalmente son detectados en fases iniciales. Además, los procedimientos de anatomía patológica y patología molecular actuales propician una mejor clasificación de los tumores mamarios basada en el análisis de biomarcadores en tejido. Esta clasificación permite, a su vez, una más ajustada administración de fármacos con buenos índices de respuesta (Duffy *et al.*, 2017), dirigiendo cada vez más los tratamientos hacia una medicina personalizada. Aparte de la entrada en acción de nuevos tratamientos dirigidos y de la inmunoterapia, la administración de fármacos convencionales previos a la cirugía (neoadyuvancia, NA) también parece aumentar la respuesta en los tumores mamarios, especialmente en los fenotipos TN y HER2 sobreexpresado (Cardoso *et al.*, 2019). A pesar de estos avances, una fracción de las mujeres tratadas de cáncer de mama presentan progresión de la enfermedad a corto o a largo plazo. En este sentido, sigue siendo necesaria la búsqueda y estandarización de nuevos biomarcadores para la detección temprana, el pronóstico, la evaluación de las terapias y la monitorización. Es en estas situaciones donde la BL se presenta como una herramienta de gran utilidad para la exploración de nuevos biomarcadores que, a su vez, permitan la estratificación de las respuestas a los tratamientos administrados (Oitabén *et al.*, 2022).

Ahora bien, nos encontramos en el apogeo de la era de la oncología personalizada y de precisión, y la BL es su punta de lanza. Al ser un procedimiento mínimamente invasivo, la BL permite la monitorización y evaluación de la terapia evitando los efectos secundarios propios de las biopsias,

mejorando la calidad de vida de las pacientes con patologías mamarias (Ignatiadis, Sledge and Jeffrey, 2021). En los biofluidos corporales podemos encontrar diferentes biomarcadores liberados por las células tumorales. De entre ellos, destacan los miARNs por su buena preservación y por su rol en la regulación de diferentes procesos celulares y en la comunicación intercelular (Makarova *et al.*, 2021). En cáncer de mama diferentes estudios indican los miARNs como potenciales biomarcadores en: detección temprana (Iorio *et al.*, 2005), pronóstico (Z. Zhang *et al.*, 2020), metástasis (Tang *et al.*, 2012; Haider, Smit and Taipaleenmäki, 2022) y también como predictivos de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante (QNA) (Di Cosimo *et al.*, 2019; Isca *et al.*, 2021; Xing *et al.*, 2021).

Con la finalidad de hallar miARNs capaces de discernir entre las pacientes que respondían de las que no respondían a los tratamientos de QNA, se planteó un ensayo con 50 miARNs en una cohorte de pacientes con fenotipos extremos (N = 137): HER2 sobreexpresado, luminales B con HER2 sobreexpresado y TN. Tras su correspondiente procesamiento, pudimos evaluar 20 miARNs en el grupo HER2 y 21 en los grupos TN y LumB HER. Este reducido número de miARNs detectados puede ser debido principalmente a dos motivos: por un lado, se encuentra el efecto proveniente de los mecanismos de internalización diferencial de los miARNs dentro de las VEs, ya que hay que tener en cuenta que el diseño del ensayo se hizo en base a la bibliografía del perfil de expresión observado en células, tejido o suero. Sin embargo, posteriormente al diseño del ensayo, se ha publicado que los miARNs encapsulados en las VEs no coinciden totalmente con los miARNs que se encuentran en las células ni en el suero (Garcia-Romero *et al.*, 2018). Por otro lado, la técnica usada en la determinación de perfiles de expresión de miARNs también resulta trascendental, pues la cantidad de dichas moléculas es mínima y los resultados obtenidos pueden evidenciar ciertas desviaciones según la metodología empleada en su detección (Mohammadi *et al.*, 2021; Cardinali *et al.*, 2022). En esta tesis se eligió la tecnología de matrices de miARNs en chips debido a que la detección de estas moléculas se lleva a cabo mediante una RT-q-PCR que es la técnica de referencia para realizar ensayos de expresión génica. Otra ventaja de realizar la exploración en matrices de miARNs es que la tecnología usada está ampliamente extendida en laboratorios de biología/patología molecular y su estandarización no conllevaría una gran dificultad añadida.

Con el fin de reducir sesgos, se analizaron estadísticamente las diferencias de las variables clínicas disponibles entre los grupos R y NR en las diferentes cohortes. Sólo encontramos diferencias significativas entre pacientes R y NR en la variable de edad en la cohorte LumB HER2. Siendo las de edad avanzada las que responderían mejor al tratamiento. No se ha encontrado en la bibliografía ninguna publicación que respalde que una avanzada edad sea un factor que indique respuesta al tratamiento por QNA, más bien al contrario: una edad < 50 años es un indicador de respuesta patológica completa en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado (Chou *et*

*al.*, 2019). Consideramos que la diferencia de edades entre los grupos R y NR podría ser debida a un sesgo por el reducido tamaño muestral ( $n = 44$ ) en la cohorte del fenotipo LumB HER2. Por otro lado, también encontramos diferencias con relación al tamaño del tumor al diagnóstico entre las pacientes R y NR en la cohorte conjunta de sobreexpresión de HER2 y LumB HER2. Aquí se correlaciona un mayor tamaño del tumor con una peor respuesta al tratamiento con QNA, efecto ya descrito en la bibliografía (Masood, 2016).

En el análisis de la expresión de miARNs se describe por primera vez una sobreexpresión relativa del miR-342-3p en las pacientes R comparadas con las NR en tumores de mama de fenotipos HER2, LumB HER2 y TN. Recientemente se ha relacionado este miARN con la sensibilización a la quimioterapia en tumores de mama (Yu *et al.*, 2022) pero nunca hasta la fecha se vincula al miR-342-3p con la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante. En coherencia a nuestro hallazgo, el estudio *in silico* relacionó el miR-342-3p con 3 genes que intervienen en la regulación negativa de la proliferación celular, la regulación positiva de la diferenciación celular y en las principales vías del cáncer. Se trata de los genes *JUN*, *GLI3* y *ITGB1*.

El gen *JUN* codifica por la proteína c-Jun que, formando heterodímero con c-Fos, conforman el factor de transcripción (FT) proteína de activación 1 (AP-1, de sus siglas en inglés). Este dímero es clave en la regulación del ciclo celular, proliferación y apoptosis (Yamashita and McCauley, 2006). *GLI3* es un regulador de la vía *Sonic the hedgehog* (SHH, de sus siglas en inglés), y se le relaciona con la proliferación, migración y angiogénesis (Matissek and Elsawa, 2020a). De *GLI3* se ha descrito su implicación en tumores gástricos, pancreáticos, prostáticos, pulmonares y hepáticos (Berman *et al.*, 2003; Thayer *et al.*, 2003; Watkins *et al.*, 2003; Karhadkar *et al.*, 2004; Sicklick *et al.*, 2006), así como en los tumores de mama más agresivos (Noman *et al.*, 2017; Riaz *et al.*, 2018). El rol de *GLI3* en estos procesos tumorales parece ser ambiguo, pues aparece tanto como activador en su forma completa (GLI3-FL, FL del inglés *GLI3-full length*), como represor en su forma truncada (GLI3-R, del inglés *GLI3-repressor*) (Dai *et al.*, 1999; Matissek and Elsawa, 2020). En cáncer de mama, un estudio en 124 pacientes con dicha patología resolvió que su co-expresión con EphA10 parecería promover la proliferación, la invasión y la migración celulares (Peng and Zhang, 2021). También se ha relacionado directamente la expresión de *GLI3*, entre otros componentes de la vía SHH, con los fenotipos con HER2 sobreexpresado y TN. Además, hallaron un nexo entre esa expresión de *GLI3* y un mal pronóstico en tumores de mama de grado 3 (Kuehn *et al.*, 2021).

El tercer gen resultante del análisis *in silico*, el gen *ITGB1* (de sus siglas en inglés, *integrin beta-1*) codifica por la proteína de su mismo nombre también conocida como CD29. A parte de su relación con la invasividad y metástasis en tumores de mama TN (Kadamb *et al.*, 2022), se ha descrito una progresión libre de enfermedad y una supervivencia mayores cuando aparece *ITGB1*

en co-expresión con la proteína fascina (FSCN1) en células de tumores mamarios *in vitro* e *in vivo* tratadas con quimioterapia (Barnawi *et al.*, 2019). En otra publicación, se expone como las células adquieren resistencia al tratamiento con cisplatino, doxorrubicina y mitoxantrona a través una activación de los transportadores ABC, debida a la unión de ITGB1 al colágeno de tipo 1 (Baltés *et al.*, 2020).

Los resultados del estudio de enriquecimiento apuntan posibles explicaciones de los mecanismos moleculares que podrían llevar al miR-342-3p a modular la respuesta al tratamiento de QNA en pacientes con tumores de mama de fenotipos extremos.

En la cohorte de pacientes con fenotipo **HER2** sobreexpresado, en nuestro análisis detectamos los miR-194-5p y miR-222-3p como predictores de respuesta a QNA. Ambos miARNs se describen por primera vez en esta tesis en sobreexpresión en las pacientes R al compararlas con las NR.

Ahora bien, se ha descrito una sobreexpresión del miR-194-5p en las pacientes tratadas con trastuzumab (Le *et al.*, 2012), pero hasta la fecha de realización de este estudio, no se ha descrito el miR-194-5p como biomarcador de respuesta a QNA con antraciclinas y taxanos (a parte del bloqueo de HER2) en pacientes con cáncer de mama del fenotipo HER2. De los más de 1000 genes que aparecen regulados por el miR-194-5p en las bases de datos, encontramos 3 (*PTGS2*, *MYC* y *JUN*) que a su vez tienen relación con el metabolismo de fármacos, la regulación negativa del ciclo celular y las vías carcinogénicas. La familia de proto-oncogenes *MYC*, una de las más estudiadas en biología, interviene en la regulación de la proliferación celular, la apoptosis y la diferenciación celular. La sobreexpresión conjunta de *MYC* y HER2 en sobreexpresión parece ser un factor de mal pronóstico en modelos de tumores mamarios en ratones (Nair *et al.*, 2014). También se ha descrito en un modelo murino como la sobreexpresión de HER2 mantendría una activación del gen *MYC* aumentando la heterogeneidad y la agresividad de los tumores mamarios (Risom *et al.*, 2020). Para un mejor entendimiento de las relaciones entre los tres, habría que determinar que rol tiene el miR-194-5p en los tumores con ambas sobreexpresiones y si esta relación puede afectar al tratamiento con QNA.

En cuanto al factor de transcripción *PTGS2*, también conocido como SOX2 o bien SRY-box2 (de sus siglas inglés *sex determining region Y-box 2*), está relacionado, en caso de sobreexpresión, con una menor supervivencia de los pacientes de cáncer (Zhang, Xiong and Sun, 2020). La relación de este gen con el miR-194-5p aparece descrita por Das y colaboradores, donde, además, se relaciona dicho miARN con la metástasis en cáncer de próstata (Das *et al.*, 2017). En los últimos años se ha descrito un ARNlnc que lo regula positivamente: SOX2OT (del inglés, *SOX2 overlapping transcript*). Además, se vincula SOX2OT con la inhibición del miR-194-5p (Qu and Cao, 2018; Wei *et al.*, 2018) que a su vez aumenta la proliferación celular y/o metástasis en

diferentes tipos tumorales tales como cáncer de pulmón no microcítico (Ni *et al.*, 2021), GB (Su *et al.*, 2017) y cáncer gástrico (Wei *et al.*, 2018). No existen publicaciones que relacionen esta vía SOX2OT/miR-194-5p - SOX2 con los tumores de mama. Acerca de la relación del miR-194-5p con el gen *JUN*, se ha descrito su relación directa en cáncer colorrectal, donde el miR-194-5p ejercería de supresor del crecimiento tumoral mediante la regulación de la vía MAP4K4/c-Jun/MDM2 (Wang *et al.*, 2015).

Referente al miR-222-3p, este es citado como una herramienta de diagnóstico precoz y una posible diana terapéutica (Amini *et al.*, 2018) y como biomarcador para nódulos linfáticos afectados en cáncer de mama (Chernyy *et al.*, 2018). Asimismo, en estudios *in vivo* con línea celular MCF-7, se propuso la sobreexpresión de los miR-222-3p y miR-221-3p como un mecanismo de adquisición de resistencia al tratamiento con tamoxifeno (Miller *et al.*, 2008). En otro estudio más reciente, se observó una baja expresión del miR-222-3p como indicador de respuesta patológica completa en pacientes tratadas con trastuzumab (S. Zhang *et al.*, 2020). En este sentido, los resultados expuestos en esta tesis, contrariamente a los expuestos por Zhang y colaboradores, reflejan una expresión relativa del miR-222-3p significativamente superior en las pacientes R comparadas con las NR en tumores con HER2 sobreexpresado. Una de las diferencias entre ambos estudios es la procedencia de los miARNs analizados. En su estudio, los miARNs proceden de suero mientras que, en el nuestro, los miARNs proceden de VEs. Se ha descrito que la expresión del miR-222-3p se ve aumentada en las VEs (Ying *et al.*, 2016), por lo que este origen de los miARNs puede ser la fuente de la disparidad entre los resultados.

En el enriquecimiento de los genes modulados por el miR-222-3p, se relaciona éste miARN con *MYC* y *TP53*. Sun y colaboradores detectaron la participación del miR-222 en una inducción de tumores mamarios mediante *c-Myc* (Sun *et al.*, 2009). También se ha descrito que la sobreexpresión del miR-222-3p puede inhibir el promotor de *c-Myc*, inhibiendo su transcripción y la de los oncogenes regulados por el propio *c-Myc*. Además, el gen *MYC*, como FT, tiene la propiedad de regular ARNs no codificantes incluyendo los de la familia miR-221 (miR-221 y miR-222) que a su vez regulan la expresión de sus genes diana (Wang, Wang and Wang, 2022). Entre esos genes se encuentra el *CDKN1B/p27<sup>Kip1</sup>* (Kim, Mori and Nevins, 2010) que está relacionado con proliferación celular (Chu, Hengst and Slingerland, 2008) y la metástasis (McAllister *et al.*, 2003). El miR-222-3p y *c-Myc* se regulan uno a otro modulando la proliferación celular y la metástasis, pudiendo influir en el desarrollo de resistencias a los tratamientos de QNA.

Los procesos biológicos y los genes con los que se relacionan los miR-194-5p y miR-222-3p podrían ser nuevas líneas de investigación para hallar los mecanismos moleculares mediante los que ambos miARNs afectan a la respuesta a QNA en pacientes de cáncer de mama con el fenotipo HER2 sobreexpresado.

En relación con la cohorte de pacientes de cáncer de mama con fenotipo luminal B con HER2 sobreexpresado (**LumB HER2**) se presenta al miR-221-3p como biomarcador de predicción de respuesta a la QNA. Como se ha comentado en la discusión del miR-222-3p, a esta familia se le atribuye la capacidad de conferir resistencia al tratamiento con tamoxifeno (Miller *et al.*, 2008). Además, Ye y colaboradores detectaron una resistencia adquirida a trastuzumab asociada a la acción reguladora del miR-221-3p sobre la región 3'-UTR del gen *PTEN* en cultivos celulares de tumores mamarios con sobreexpresión de HER2 (Ye *et al.*, 2014). En nuestro análisis de enriquecimiento de genes regulados encontramos una relación entre el *PIK3R1*, el miR-221-3p, las neoplasias mamarias y la muerte celular programada. Precisamente, este gen forma parte de la vía de señalización PTEN-PI3K-AKT. Más recientemente, diversos autores contemplan como lugar de unión del miR-221-3p la región 3'-UTR de este gen, pudiendo ser la regulación negativa de este la que llevara a una baja expresión de *PTEN* en la resistencia a trastuzumab (Krebs *et al.*, 2019; Pan *et al.*, 2020), aportando un valor añadido al hallazgo del miR-221-3p como modulador de la respuesta a tratamiento QNA en pacientes LumB HER2.

Además de *PIK3R1*, describimos un vínculo del miR-221-3p con el gen *CDK1*, los tumores mamarios y la muerte celular programada. De este gen ya se ha hablado en la discusión de los resultados del miR-222-3p en la cohorte HER2 donde se detalla la regulación negativa de *CDKN1B / p27<sup>Kip1</sup>* por la familia miR-221. Esta regulación parece ser clave en el desarrollo de resistencias al tratamiento con el inhibidor de los dominios tirosina-cinasa intracelulares del receptor HER2 lapatinib. El tratamiento mediante lapatinib además de la inhibición de HER2, produciría un aumento de las proteínas tirosina-cinasa Src. Estas promoverían un aumento del miR-221-3p, contrarrestando el efecto del propio lapatinib e induciendo la proliferación celular (Huynh *et al.*, 2021). Sin embargo, no queda claro mediante qué posibles mecanismos los miARNs miR-221-3p y miR-222-3p, miembros de la misma familia, tendrían roles opuestos en la resistencia o sensibilización a los tratamientos neoadyuvantes en los fenotipos LumB HER2 y HER2. Recordamos que, según nuestros resultados, el miR-222-3p en sobreexpresión parecería ser un biomarcador de predicción de respuesta al tratamiento, mientras que el miR-221-3p en el fenotipo LumB HER2 predeciría lo contrario. Ciertamente, se ha descrito que ambos miARNs tienen un efecto negativo sobre los tratamientos dirigidos al RE (Miller *et al.*, 2008; Ouyang *et al.*, 2021). Por otra parte, la bibliografía dice que la sobreexpresión de ambos marcadores sería predictiva de resistencia a los tratamientos contra HER2. En una publicación se relaciona la variante del receptor HER2 sin dominio extracelular (p95HER2) con la sobreexpresión de los miARNs miR-221-3p y miR-222-3p además de con la inhibición del gen *ESR1* que codifica para el RE. Este receptor, está presente en la cohorte LumB HER2 mientras que los tumores de la cohorte HER2 no presentan dicho receptor (Gorbatenko *et al.*, 2019). En base a estas publicaciones, se podría iniciar una línea de investigación para determinar si la variante p95HER2

es la predominante el fenotipo HER2 y el receptor convencional predomina en el fenotipo LumB HER2.

En la cohorte resultante de unir las cohortes HER2 y LumB HER2 (**HER2 LumB HER2**), encontramos por primera vez una sobreexpresión de los miR-194-5p y miR-342-3p en pacientes R en relación con pacientes NR al tratamiento de QNA. Curiosamente, el miR-342-3p no apareció alterado en ninguna de las dos cohortes por separado. El estudio *in silico* de enriquecimiento de genes de estos dos miARNs ya se ha discutido en líneas superiores.

En cuanto a la cohorte de pacientes con cáncer de mama TN, no se observó ningún miARN que separase las pacientes R de la NR al tratamiento de QNA. Sí que se hallaron 4 miARNs: miR-142-3p, miR-21-5p, miR-26a-5p y miR-342-3p que, aunque no presentaban una significación estadística, sí que estaban cerca de ella. Entre estos, destacamos al miR-21-5p por su potencial para predecir la respuesta a quimioterapia preoperatoria (Liu *et al.*, 2017) así como su posible uso como biomarcador en la progresión de tumores TN (Piasecka *et al.*, 2018).

En este punto, recomendaríamos un estudio de los miARNs que aquí se han reportado como predictores de respuesta a QNA en ensayos de RT-qPCR de cada miARN en cohortes de mayor tamaño muestral para cada una de las cohortes (HER2, LumB HER2, HER2 LumB HER2 y TN). Asimismo, se recomendaría añadir a esta validación los miARNs de cada cohorte que no han sido estadísticamente significativos pero que están cerca de ella.

### 6.3. BL en glioma

Desde el punto de vista clínico, los tumores cerebrales malignos, más allá de su elevada tasa de mortalidad e ineludible morbilidad neurológica (García-Romero *et al.*, 2019), suponen un reto no resuelto en tanto que la obtención de biomarcadores está sujeta a la realización de una biopsia cerebral. De forma añadida, la imposibilidad de repetir la obtención de tejido cerebral tras el fracaso de una aproximación terapéutica concreta limita la información disponible a aquella existente en la muestra inicial, cuando las células tumorales no habían sido expuestas a ninguna modalidad de tratamiento. Además, la propia heterogeneidad tumoral, muy marcada en los tumores cerebrales (Nicholson and Fine, 2021), restringe la información obtenida a la región del tumor sobre la que se ha realizado la biopsia. Precisamente, una de las principales utilidades de la BL es la detección de los diferentes clones que conforman la totalidad de un tumor, pudiendo explorar la heterogeneidad tumoral con una herramienta mínimamente invasiva (Bettegowda *et al.*, 2014; Blakely *et al.*, 2017). Otra aportación relevante de la BL en la práctica clínica es la detección de mecanismos de resistencia adquiridos al tratamiento a tiempo real (Siravegna *et al.*, 2017; Parikh *et al.*, 2019), convirtiéndola en un procedimiento de gran valor en los seguimientos de la evolución de la enfermedad.

Con la BL en mente, y con el auge de los biomarcadores moleculares en el sistema clasificatorio de los tumores cerebrales propuesto por la OMS en 2021 (Louis *et al.*, 2021), en este trabajo planteamos la posibilidad de trasladar el estudio de alteraciones genéticas en tumores cerebrales mediante BL a cualquier laboratorio, sin la necesidad de la implementación de equipamiento altamente especializado. Para ello, se eligió el estudio de la mutación p.R132H (c. 395G>A) del gen *IDH1* en pacientes diagnosticados de glioma en concepto de modelo escalable a otras alteraciones genéticas tanto en esta patología como en otras. Como se ha expuesto en la introducción, esta mutación tiene su relevancia tanto en la clasificación y pronóstico de los tumores gliales como en su proyección como futura diana terapéutica con el surgimiento de las vacunas para tumores contra el epítipo IDH1 R132H (Schumacher *et al.*, 2014; Platten, Bunse and Wick, 2021).

Uno de los mayores desafíos fue la detección de mutaciones que se encuentran en una proporción ínfima respecto al alelo no mutado sin emplear equipamiento altamente especializado. Todo ello, para permitir que cualquier laboratorio, pudiese implementarlo.

Con la detección de marcadores de membrana mediante diferentes técnicas, aseguramos la presencia de estas partículas en nuestros aislamientos. Además, se observó que a mayor grado de agresividad tumoral mayor concentración de proteínas de membrana en las VEs. Este efecto ya ha sido descrito anteriormente (Muller *et al.*, 2015), aunque se desconocen los motivos por los que sucede. Centrando el foco en al ADN, no se observaron diferencias significativas entre la concentración de este ácido nucleico y el grado del tumor.

Conocida la presencia de ADN en nuestras muestras, con objeto de potenciar el alelo mutado se propuso la *fast-COLD-PCR*. Ahora bien, la reproducibilidad intralaboratorio es uno de los puntos críticos de esta técnica. Ligeras variaciones en la temperatura crítica ( $T_c$ ), del orden de 0,1 – 0,5 °C, debidas al uso de diferentes termocicladores, pipetas, reactivos e incluso la temperatura del propio laboratorio pueden afectar drásticamente a la potenciación del alelo mutado (Mauger, How-Kit and Tost, 2017). Para paliar este efecto, y habilitar la incorporación de esta técnica en cualquier laboratorio, se apostó por la variante TT-*fast-COLD-PCR*. Esta variante incluye en sus ciclos de amplificación, una  $T_c$  creciente, permitiendo la potenciación en diferentes condiciones ambientales (Castellanos-Rizaldos *et al.*, 2012; Mauger, How-Kit and Tost, 2017). Por consiguiente, el uso de la tecnología TT-*fast-COLD-PCR* en lugar de la *fast-COLD-PCR* se consideró la idónea para la potenciación del alelo mutado y su implantación en diferentes laboratorios. Se constató la validación analítica ya que mediante la potenciación TT-*fast-COLD-PCR*, se llegó a detectar el alelo 395G>A del gen *IDH1* hasta en un 0,1 % frente al 99,99 % de alelo WT tanto en la secuenciación como con DGL-Tech. Estos resultados respaldan los obtenidos por

Castellanos-Rizaldos y Galbiati publicados anterior y posteriormente a la realización de los análisis para esta tesis respectivamente (Castellanos-Rizaldos *et al.*, 2015; Galbiati *et al.*, 2019).

Una vez solventado el inconveniente de la potenciación del alelo mutado, el siguiente paso fue establecer una tecnología de detección que se pudiese instaurar en cualquier laboratorio de patología molecular, sin la necesidad de realizar una gran inversión en equipamiento. A tal efecto, presentamos por primera vez el uso de la tecnología de DestiNA DGL-*Tech*<sup>TM</sup> en la detección de mutaciones puntuales procedentes de VEs de pacientes con gliomas. Con el fin de validar esta tecnología, se usaron los mismos controles comerciales mencionados en el párrafo anterior. En esta validación de la tecnología DGL-*Tech*<sup>TM</sup> se estableció el límite de detección (LdD) en 0,25 % de alelo mutado frente WT, con una sensibilidad y especificidad analítica del 91,67 % y del 100 % respectivamente. Además, se comprobó la reproducibilidad de la combinación de la TT-*fast*-COLD-PCR con la tecnología DGL-*Tech*<sup>TM</sup> realizando los experimentos en tres laboratorios, 6 equipos termocicladores y 5 técnicos diferentes.

Todas las muestras en las que se detectó el fragmento de 73 pb fueron secuenciadas, de esas, se obtuvieron un total de 40 secuencias no valorables (36,70 %), 62 secuencias con resultado WT (56,88 %) y en 7 secuencias se detectó una mutación en el codón 132 del gen *IDH1* (6,42 %). Si bien el total de secuencias que no se pudieron valorar fue elevado, hay que destacar la capacidad de secuenciar ADN proveniente de VEs de tumores gliales. La sensibilidad y especificidad de la combinación de la TT-*fast*-COLD-PCR con la detección mediante secuenciación, tomando como referencia los resultados obtenidos por IHQ en tejido, se establecieron en 17,39 % y 97,83 % respectivamente. Mediante la combinación de la TT-*fast*-COLD-PCR y la secuenciación se llegaron a detectar 7 mutaciones. De estas 7 mutaciones, una de ellas resultó ser una mutación diferente a la *IDH1*<sup>395G>A</sup> que también se potenció con la técnica TT-*fast*-COLD-PCR. En concreto se detectó la mutación C.395G>T (p.R132L) del mismo gen. Los resultados de la tinción IHQ contra R132H, realizada por partida doble, dieron positivo para esta mutación en esta muestra. Ambas preparaciones fueron analizadas por patólogos expertos en tumores cerebrales. Esta reactividad cruzada en la que el anticuerpo monoclonal producido por el clon h9, usada en las tinciones IHQ en este estudio, se une al epítipo R132L, está descrita en diferentes estudios (Agarwal *et al.*, 2013; Kato, 2015).

En otro caso, siendo la tinción IHQ negativa al momento del diagnóstico, se observó la mutación *IDH1*<sup>395G>A</sup> en la secuencia y en la detección DestiNA comentada más adelante en esta discusión. *A posteriori*, se volvió a procesar la IHQ sobre el tejido FFPE en el que aún había representación tumoral. Los resultados de esta preparación fueron analizados por un patólogo experto en tumores cerebrales valorándola como positiva para la mutación R132H. Este cambio en el resultado de la tinción de IHQ podría deberse a qué en la primera tinción la región tratada con los teñida con la

IHQ no presentase células que expresaran la mutación IDH1 R132H. Por lo contrario, en la segunda tinción, tratándose una región diferente a la del diagnóstico por el uso del tejido FFPE en otras determinaciones, ésta sí que expresaba la proteína IDH1 mutada. Este caso es un reflejo de la heterogeneidad de los tumores gliales. Además, con las guías actuales (Louis *et al.*, 2016) y los resultados obtenidos en esta tesis, el diagnóstico de esta paciente pasaría a ser de astrocitoma de grado IV de la OMS con IDH1 mutado, en lugar de GBM con ausencia de la mutación IDH1 R132H.

Más allá de la potenciación del alelo mutado se precisaba de una tecnología de detección altamente sensible que no supusiese un sobre coste a los laboratorios. Por consiguiente, esta detección de mutaciones debería ser capaz de diferenciar aquellas muestras mutadas de aquellas no mutadas sin la necesidad de valerse de equipos, que, aunque no de nueva generación, sí que suponen una inversión tanto económica como en personal formado para el análisis de sus resultados. La tecnología elegida fue la propuesta por DestiNA llamada DGL-*Tech*<sup>TM</sup> (Tabraue-Chávez *et al.*, 2019). La tecnología DGL-*Tech*<sup>TM</sup> se había usado previamente en la detección de organismos patógenos (Escobedo *et al.*, 2019), esta es la primera vez que se emplea en la detección de mutaciones puntuales. Además, también por primera vez, se ha analizado ADN proveniente de VEs aisladas de sueros de pacientes diagnosticados de glioma mediante dicha tecnología.

La muestra que presentó la mutación R132L en la secuenciación, presentó un resultado negativo en la detección con la tecnología DGL-*Tech*<sup>TM</sup>, aportando robustez y demostrando que la tecnología, tal y como se defiende en las publicaciones que la presentan (Escobedo *et al.*, 2019; Tabraue-Chávez *et al.*, 2019), es capaz de discriminar el cambio de un solo nucleótido. Además, se reportó una muestra (TCGBM39) que resultó negativa en la IHQ en tejido pero que se evaluó como positiva en ambas técnicas de detección en BL. A nuestro parecer, y al detectarse la mutación en BL con ambas técnicas de detección, podríamos sugerir que el fragmento de tumor extraído mediante la biopsia convencional no representaba el propio tumor en su totalidad. Este caso puede resumir una de las principales ventajas de la detección de biomarcadores en BL frente al tejido procedente de una biopsia convencional: la representación de la totalidad del tumor o heterogeneidad tumoral (Bettegowda *et al.*, 2014; Blakely *et al.*, 2017; Parikh *et al.*, 2019).

En cuanto a la validación de la combinación de la TT-*fast-COLD-PCR* con la detección mediante la tecnología DGL-*Tech*<sup>TM</sup>, se observó una sensibilidad del 66,67 % y una especificidad del 98,39 % tomando como referencia los resultados de la secuenciación. Aunque la baja sensibilidad detectada en este análisis nos llevaría a pensar que esta técnica no podría ser de aplicación clínica para esta mutación y patología, hay que tener en cuenta que la elevada especificidad podría

adecuarse en un test de cribaje que ayudaría al clínico en el manejo inicial del paciente con tumores gliales. Además, con el surgimiento de la vacunación contra IDH1 R132H (Schumacher *et al.*, 2014; Platten, Bunse and Wick, 2021), la detección de la mutación a través de la BL propuesta en esta tesis doctoral, aportaría una herramienta mínimamente invasiva de gran utilidad clínica para la discriminación de aquellos pacientes que se verían beneficiados por la vacunación.

En cuanto a los valores predictivos positivo y negativo (VPP y VPN), observamos que un 98,39 % de los negativos detectados mediante la tecnología DGL-Tech<sup>TM</sup> también lo fueron en la detección mediante secuenciación. Ahora bien, si comparamos la detección de la secuenciación con la IHQ, el VPN disminuye hasta el 70,31 %. Por lo que un resultado negativo obtenido ya sea con la detección mediante DGL-Tech<sup>TM</sup> como con la secuenciación necesitaría una prueba independiente que confirmara el resultado. En cuanto al VPP, de la comparativa entre secuenciación y DGL-Tech<sup>TM</sup>, debido al bajo número de mutaciones detectados por ambas técnicas es del 66,67 %. Ahora bien, si comparamos la secuenciación con la IHQ, el VPP aumenta al 80 %. Estos resultados indican que, en el caso de un resultado positivo por alguna de las dos técnicas de detección, podemos decir que la muestra en cuestión presenta la mutación *IDH1<sup>395G>A</sup>*.

Queda un largo camino para poder incluir esta determinación en el entorno clínico ya que el número de muestras mutadas detectadas con la combinación de ambas tecnologías (TT-fast-COLD-PCR y DGL-Tech<sup>TM</sup>) no permite evaluar hoy por hoy de forma precisa la bonanza del método en este entorno. Existe la posibilidad de que el bajo número de muestras en las que se ha detectado la mutación *IDH1<sup>395G>A</sup>* sea debido a que dichas VEs no provinieran del propio tumor, ya que, con la intención de que sea una técnica aplicable a cualquier laboratorio mínimamente equipado, no se realizó un aislamiento selectivo de VEs de origen glial. Otra explicación sería que debido al proceso de aislamiento de las VEs y extracción de ADN, se perdiese rendimiento y la mutación se diluyese tanto en algunas muestras, que ésta no estuviera o estuviera por debajo del 0,25 % del LdD de la técnica al realizar la potenciación del alelo mutado. Sin embargo, haber detectado estas 3 muestras con la mutación *IDH1<sup>395G>A</sup>* mediante el análisis del ADN-VEs abre las puertas a futuras investigaciones en el entorno del estudio genético en BL de tumores cerebrales.

Hay que destacar que esta detección se ha realizado mediante termocicladores convencionales, una centrífuga de sobremesa y un baño termoestable, entre otros; sin utilizar técnicas de nueva generación que impliquen la utilización de equipamiento de elevado coste. Esto hace que la determinación de *IDH1<sup>R132H</sup>* en BL propuesta por primera vez en esta tesis, sea aplicable a cualquier laboratorio tanto de anatomía patológica como de biología molecular, mínimamente equipado.

La tecnología DGL-*Tech*<sup>TM</sup> permite, con la pertinente edición de las sondas, extrapolar este procedimiento a otras mutaciones de interés. Por consiguiente, esta técnica podría posibilitar la determinación de marcadores genéticos a muchos laboratorios que actualmente no pueden ofrecer debido al requerimiento de tecnologías altamente especializadas e inasequibles. De igual forma, la combinación del aislamiento de VEs con el protocolo PEG8000, la potenciación del alelo de interés a través de la COLD-PCR y la detección mediante DGL-*Tech*<sup>TM</sup> ofrecerían una alternativa coste-efectiva para todos aquellos laboratorios que quisieran adentrarse en la detección de biomarcadores genéticos en BL.

## 7. Conclusiones

1. Se han desarrollado dos procedimientos estandarizados de análisis de biomarcadores genéticos contenidos en VEs a partir de BL en pacientes de cáncer de mama y tumores gliales.
2. El aislamiento de VEs mediante el protocolo PEG 8000 presenta un rendimiento superior en número de partículas aisladas, concentración de proteínas y ANs, considerándose una alternativa eficaz, sencilla, económica y rápida a otros métodos descritos, para la detección de alteraciones genéticas.
3. El análisis estandarizado de miARNs en VEs ha permitido la detección de 4 miARNs capaces de segregar pacientes R de NR a la QNA en fenotipos extremos de cáncer de mama.
4. El aumento de la expresión relativa del miR-342-3p segrega a las pacientes R de las NR al tratamiento con QNA en fenotipos extremos de cáncer de mama (HER2, LumB HER2 y TN).
5. Una expresión relativa disminuida del miR-221-3p predice una buena respuesta al tratamiento con QNA en pacientes con tumores de mama de fenotipo Luminal B con sobreexpresión de HER2.
6. La sobreexpresión de los miARNs miR-194-5p y miR-342-3p diferencia entre las pacientes respondedoras y no respondedoras en los fenotipos con sobreexpresión de HER2, con y sin expresión de receptores hormonales, tratadas con QNA.
7. Las pacientes con fenotipo HER2 sobreexpresado con un aumento en la expresión relativa de los miARNs miR-194-5p y miR-222-3p presentan una mejor respuesta al tratamiento de QNA.
8. Se ha puesto a punto una metodología de alta sensibilidad basada en la TT-*fast*-COLD-PCR que permite detectar la mutación *IDH1*<sup>395G>A</sup> en ADN proveniente de VEs en pacientes diagnosticados de glioma.
9. La combinación de las tecnologías TT-*fast*-COLD-PCR y DGL-*Tech*<sup>TM</sup> es reproducible y permite la detección de la mutación *IDH1*<sup>395G>A</sup>, con un límite de detección del 0,25 % de alelo mutado, sin la necesidad de invertir en equipamiento altamente especializado.
10. La detección de la mutación *IDH1*<sup>395G>A</sup> en VEs aisladas de sueros de pacientes con gliomas mediante la tecnología DGL-*Tech*<sup>TM</sup> presenta unos resultados comparables a los obtenidos con la metodología de referencia (secuenciación Sanger).

## Referencias

Abe, O. *et al.* (2005) 'Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials', *The Lancet*, 365(9472), pp. 1687–1717. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66544-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66544-0).

Agarwal, S. *et al.* (2013) 'Comparative study of IDH1 mutations in gliomas by immunohistochemistry and DNA sequencing', *Neuro-Oncology*, 15(6), pp. 718–726. Available at: <https://doi.org/10.1093/neuonc/not015>.

Albain, K. *et al.* (2012) 'Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: Meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials', *The Lancet*, 379(9814), pp. 432–444. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61625-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61625-5).

Allard, W.J. *et al.* (2004) 'Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases', *Clinical Cancer Research*, 10(20), pp. 6897–6904. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0378>.

Alvarez-Lopez, I. *et al.* (2020) 'Review of concepts in therapeutic decision-making in HER2-negative luminal metastatic breast cancer', *Clinical and Translational Oncology*, 22(8), pp. 1364–1377. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12094-019-02269-7>.

Amini, S. *et al.* (2018) 'Expression Analysis of MicroRNA-222 in Breast Cancer', *Clinical Laboratory*, 64(04/2018), pp. 491–496. Available at: <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2017.171002>.

Amintas, S. *et al.* (2020) 'Circulating Tumor Cell Clusters: United We Stand Divided We Fall', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), p. 2653. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21072653>.

El Andaloussi, S. *et al.* (2013) 'Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities', *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(5), pp. 347–357. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrd3978>.

Anders, A. and Anders, F. (1978) 'Etiology of cancer as studied in the platyfish-swordtail system', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 516(1), pp. 61–95. Available at: [https://doi.org/10.1016/0304-419X\(78\)90004-5](https://doi.org/10.1016/0304-419X(78)90004-5).

Arienti, G. *et al.* (2004) 'Role of human prostasomes in the activation of spermatozoa', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 8(1), pp. 77–84. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2004.tb00261.x>.

- Ashworth, T. (1869) 'A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death', *The Medical Journey of Australia*, 14, pp. 146–147.
- Avanzini, S. *et al.* (2020) 'A mathematical model of ctDNA shedding predicts tumor detection size', *Science Advances*, 6(50), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc4308>.
- Bailey, P. (1948) *Intracranial Tumors*. 2nd edn. Thomas: Springfield, IL.
- Baltes, F. *et al.* (2020) ' $\beta$ 1-Integrin binding to collagen type 1 transmits breast cancer cells into chemoresistance by activating ABC efflux transporters', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1867(5), p. 118663. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118663>.
- Bano, R. and Mohsin, M. (2021) 'A perspective on the isolation and characterization of extracellular vesicles from different bio fluids', pp. 19598–19615. Available at: <https://doi.org/10.1039/d1ra01576a>.
- Bao, S. *et al.* (2006) 'Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response', *Nature*, 444(7120), pp. 756–760. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature05236>.
- Bardia, A. *et al.* (2021) 'Sacituzumab Govitecan in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer', *New England Journal of Medicine*, 384(16), pp. 1529–1541. Available at: <https://doi.org/10.1056/nejmoa2028485>.
- Barnawi, R. *et al.* (2019) ' $\beta$ 1 Integrin is essential for fascin-mediated breast cancer stem cell function and disease progression', *International Journal of Cancer*, 145(3), pp. 830–841. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.32183>.
- Barteneva, N.S. *et al.* (2013) 'Circulating microparticles: square the circle', *BMC Cell Biology*, 14(1), p. 23. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2121-14-23>.
- Battistelli, M. and Falcieri, E. (2020) 'Apoptotic bodies: Particular extracellular vesicles involved in intercellular communication', *Biology*, 9(1). Available at: <https://doi.org/10.3390/biology9010021>.
- Berendsen, S. *et al.* (2012) 'Valproic acid for the treatment of malignant gliomas: Review of the preclinical rationale and published clinical results', *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 21(9), pp. 1391–1415. Available at: <https://doi.org/10.1517/13543784.2012.694425>.
- Bergaggio, E. and Piva, R. (2019) 'Wild-Type IDH Enzymes as Actionable Targets for Cancer Therapy', *Cancers*, 11(4), p. 563. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers11040563>.

- Berman, D.M. *et al.* (2003) 'Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours', *Nature*, 425(6960), pp. 846–851. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature01972>.
- Bettegowda, C. *et al.* (2014) 'Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies', *Science Translational Medicine*, 6(224), pp. 69–122. Available at: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007094>.
- Bhagat, A.A.S. *et al.* (2011) 'Pinched flow coupled shear-modulated inertial microfluidics for high-throughput rare blood cell separation', *Lab on a Chip*, 11(11), pp. 1870–1878. Available at: <https://doi.org/10.1039/c0lc00633e>.
- Blakely, C.M. *et al.* (2017) 'Evolution and clinical impact of co-occurring genetic alterations in advanced-stage EGFR-mutant lung cancers', *Nature Genetics*, 49(12), pp. 1693–1704. Available at: <https://doi.org/10.1038/ng.3990>.
- Bloom, H.J. and Richardson, W.W. (1957) 'Histological grading and prognosis in breast cancer a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years', *British Journal of Cancer*, 11(3), pp. 359–377. Available at: <https://doi.org/10.1038/bjc.1957.43>.
- Blows, F.M. *et al.* (2010) 'Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: A collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies', *PLoS Medicine*, 7(5). Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000279>.
- Botezatu, I. *et al.* (2000) 'Genetic analysis of DNA excreted in urine: A new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism', *Clinical Chemistry*, 46(8 I), pp. 1078–1084. Available at: <https://doi.org/10.1093/clinchem/46.8.1078>.
- Brambilla, D. *et al.* (2021) 'EV Separation: Release of Intact Extracellular Vesicles Immunocaptured on Magnetic Particles', *Analytical Chemistry*, 93(13), pp. 5476–5483. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c05194>.
- Branter, J., Basu, S. and Smith, S. (2018) 'Tumour treating fields in a combinational therapeutic approach', *Oncotarget*, 9(93), pp. 36631–36644. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26344>.
- Bray, F., Ferlay, J. and Soerjomataram, I. (2018) 'Global Cancer Statistics 2018 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries', pp. 394–424. Available at: <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.

- Breitbach, S. *et al.* (2014) 'Direct measurement of cell-free DNA from serially collected capillary plasma during incremental exercise', *Journal of Applied Physiology*, 117(2), pp. 119–130. Available at: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00002.2014>.
- Brett, S.I. *et al.* (2017) 'Immunoaffinity based methods are superior to kits for purification of prostate derived extracellular vesicles from plasma samples', *Prostate*, 77(13), pp. 1335–1343. Available at: <https://doi.org/10.1002/pros.23393>.
- Bunse, L. *et al.* (2022) 'AMPLIFY-NEOVAC: a randomized, 3-arm multicenter phase I trial to assess safety, tolerability and immunogenicity of IDH1-vac combined with an immune checkpoint inhibitor targeting programmed death-ligand 1 in isocitrate dehydrogenase 1 mutant gliomas', *Neurological Research and Practice*, 4(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s42466-022-00184-x>.
- Bustin, S.A. *et al.* (2009) 'The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments', *Clinical Chemistry*, 55(4), pp. 611–622. Available at: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- Bzymek, K.P. and Colman, R.F. (2007) 'Role of  $\alpha$ -Asp 181 ,  $\beta$ -Asp 192 , and  $\gamma$ -Asp 190 in the Distinctive Subunits of Human NAD-Specific Isocitrate Dehydrogenase †', *Biochemistry*, 46(18), pp. 5391–5397. Available at: <https://doi.org/10.1021/bi700061t>.
- Cabel, L. *et al.* (2018) 'Clinical potential of circulating tumour DNA in patients receiving anticancer immunotherapy', *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(10), pp. 639–650. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0074-3>.
- Calvert, A.E. *et al.* (2017) 'Cancer-Associated IDH1 Promotes Growth and Resistance to Targeted Therapies in the Absence of Mutation', *Cell Reports*, 19(9), pp. 1858–1873. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.014>.
- De Candia, P. *et al.* (2016) 'Extracellular RNAs: A secret arm of immune system regulation', *Journal of Biological Chemistry*, 291(14), pp. 7221–7228. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.708842>.
- Cardinali, B. *et al.* (2022) 'Circulating miRNAs in Breast Cancer Diagnosis and Prognosis.', *Cancers*, 14(9), pp. 1–20. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers14092317>.
- Cardoso, F. *et al.* (2012) '1st International consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 1)', *Breast*, 21(3), pp. 242–252. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.breast.2012.03.003>.

- Cardoso, F. *et al.* (2014) 'ESO-ESMO 2nd international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC2)', *Breast*, 23(5), pp. 489–502. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.breast.2014.08.009>.
- Cardoso, F. *et al.* (2017) 'European Breast Cancer Conference manifesto on breast centres/units', *European Journal of Cancer*, 72, pp. 244–250. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.10.023>.
- Cardoso, F. *et al.* (2019) 'Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up', *Annals of Oncology*, 30(8), pp. 1194–1220. Available at: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz173>.
- Castellanos-Rizaldos, E. *et al.* (2012) 'Temperature-Tolerant COLD-PCR Reduces Temperature Stringency and Enables Robust Mutation Enrichment', *Clinical Chemistry*, 58(7), pp. 1130–1138. Available at: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.183095>.
- Castellanos-Rizaldos, E. *et al.* (2015) 'Single-tube, highly parallel mutation enrichment in cancer gene panels by use of temperature-tolerant COLD-PCR', *Clinical Chemistry*, 61(1), pp. 267–277. Available at: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.228361>.
- Chan, J.A., Krichevsky, A.M. and Kosik, K.S. (2005) 'MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells', *Cancer Research*, 65(14), pp. 6029–6033. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0137>.
- Chang, L. *et al.* (2020) 'miRNet 2.0: Network-based visual analytics for miRNA functional analysis and systems biology', *Nucleic Acids Research*, 48(W1), pp. W244–W251. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa467>.
- Chargaff, E. and West, R. (1946) 'The biological significance of the thromboplastic protein of blood.', *The Journal of biological chemistry*, 166 1, pp. 189–197.
- Cheang, M.C.U. *et al.* (2008) 'Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype', *Clinical Cancer Research*, 14(5), pp. 1368–1376. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1658>.
- Cheang, M.C.U. *et al.* (2009) 'Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer', *Journal of the National Cancer Institute*, 101(10), pp. 736–750. Available at: <https://doi.org/10.1093/jnci/djp082>.
- Chen, J. *et al.* (2017) 'Allosteric inhibitor remotely modulates the conformation of the orthosteric pockets in mutant IDH2/R140Q', *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16427-w>.

- Chen, Z. *et al.* (2020) 'Isolation of cancer-derived extracellular vesicle subpopulations by a size-selective microfluidic platform', *Biomicrofluidics*, 14(3), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1063/5.0008438>.
- Cheng, J. *et al.* (2020) 'Nanotechnology-Assisted Isolation and Analysis of Circulating Tumor Cells on Microfluidic Devices', *Micromachines*, 11(8), p. 774. Available at: <https://doi.org/10.3390/mi11080774>.
- Cheng, S.H. *et al.* (2015) 'Noninvasive Prenatal Testing by Nanopore Sequencing of Maternal Plasma DNA: Feasibility Assessment', *Clinical Chemistry*, 61(10), pp. 1305–1306. Available at: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.245076>.
- Chernyy, V. *et al.* (2018) 'Increased expression of miR-155 and miR-222 is associated with lymph node positive status', *Journal of Cancer*, 9(1), pp. 135–140. Available at: <https://doi.org/10.7150/jca.22181>.
- Chiasserini, D. *et al.* (2014) 'Proteomic analysis of cerebrospinal fluid extracellular vesicles: A comprehensive dataset', *Journal of Proteomics*, 106, pp. 191–204. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.04.028>.
- Cho, Y.S. *et al.* (2017) 'Discovery and Evaluation of Clinical Candidate IDH305, a Brain Penetrant Mutant IDH1 Inhibitor', *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 8(10), pp. 1116–1121. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.7b00342>.
- Chou, H.H. *et al.* (2019) 'Impact of age on pathological complete response and locoregional recurrence in locally advanced breast cancer after neoadjuvant chemotherapy', *Biomedical Journal*, 42(1), pp. 66–74. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.10.007>.
- Christensen, B.C. *et al.* (2011) 'DNA methylation, isocitrate dehydrogenase mutation, and survival in glioma', *Journal of the National Cancer Institute*, 103(2), pp. 143–153. Available at: <https://doi.org/10.1093/jnci/djq497>.
- Chu, I.M., Hengst, L. and Slingerland, J.M. (2008) 'The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy', *Nature Reviews Cancer*, 8(4), pp. 253–267. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc2347>.
- Cocucci, E. and Meldolesi, J. (2015) 'Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles', *Trends in Cell Biology*, 25(6), pp. 364–372. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.01.004>.

- Cohen, A.L., Holmen, S.L. and Colman, H. (2013) 'IDH1 and IDH2 mutations in gliomas', *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 13(5), pp. 1–7. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11910-013-0345-4>.
- Di Cosimo, S. *et al.* (2019) 'Plasma miRNA levels for predicting therapeutic response to neoadjuvant treatment in HER2-positive breast cancer: Results from the NeoALTTO trial', *Clinical Cancer Research*, 25(13), pp. 3887–3895. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2507>.
- Dai, P. *et al.* (1999) 'Sonic Hedgehog-induced Activation of the Gli1 Promoter Is Mediated by GLI3', *Journal of Biological Chemistry*, 274(12), pp. 8143–8152. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.12.8143>.
- Dalton, A.J. (1975) 'Microvesicles and vesicles of multivesicular bodies versus "virus like" particles', *Journal of the National Cancer Institute*, 54(5), pp. 1137–1148. Available at: <https://doi.org/10.1093/jnci/54.5.1137>.
- Dang, L., Yen, K. and Attar, E.C. (2016) 'IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics', *Annals of Oncology*, 27(4), pp. 599–608. Available at: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw013>.
- Danielson, K.M. *et al.* (2017) 'High throughput sequencing of extracellular RNA from human plasma', *PLoS ONE*, 12(1), pp. 1–18. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164644>.
- Das, R. *et al.* (2017) 'MicroRNA-194 promotes prostate cancer metastasis by inhibiting SOCS2', *Cancer Research*, 77(4), pp. 1021–1034. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2529>.
- Deligezer, U. *et al.* (2006) 'Circulating fragmented nucleosomal DNA and caspase-3 mRNA in patients with lymphoma and myeloma', *Experimental and Molecular Pathology*, 80(1), pp. 72–76. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2005.05.001>.
- Deng, G. *et al.* (2015) 'Selective inhibition of mutant isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) via disruption of a metal binding network by an allosteric small molecule', *Journal of Biological Chemistry*, 290(2), pp. 762–774. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.608497>.
- D'haene, B. *et al.* (2012) 'miRNA expression profiling: From reference genes to global mean normalization', *Methods in Molecular Biology*, 822, pp. 261–272. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-427-8\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-427-8_18).
- Diehl, F. *et al.* (2006) 'BEAMing: Single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions', *Nature Methods*, 3(7), pp. 551–559. Available at: <https://doi.org/10.1038/nmeth898>.

- Du, M. *et al.* (2018) ‘Genomic alterations of plasma cell-free DNAs in small cell lung cancer and their clinical relevance’, *Lung Cancer*, 120(December 2017), pp. 113–121. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.04.008>.
- Duffy, M.J. *et al.* (2017) ‘Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM)’, *European Journal of Cancer*, 75, pp. 284–298. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.01.017>.
- Eder, K. and Kalman, B. (2014) ‘Molecular Heterogeneity of Glioblastoma and its Clinical Relevance’, *Pathology and Oncology Research*, 20(4), pp. 777–787. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12253-014-9833-3>.
- Elston, C.W. and Ellis, I.O. (1991) ‘pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up’, *Histopathology*, 19(5), pp. 403–410. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x>.
- Elzanowska, J., Semira, C. and Costa-Silva, B. (2021) ‘DNA in extracellular vesicles: biological and clinical aspects’, *Molecular Oncology*, 15(6), pp. 1701–1714. Available at: <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12777>.
- Escobedo, P. *et al.* (2019) ‘Smartphone-based diagnosis of parasitic infections with colorimetric assays in centrifuge tubes’, *IEEE Access*, 7, pp. 185677–185686. Available at: <https://doi.org/10.1109/ACCESS.2019.2961230>.
- Fan, Y. *et al.* (2016) ‘miRNet - dissecting miRNA-target interactions and functional associations through network-based visual analysis’, *Nucleic acids research*, 44(W1), pp. W135–W141. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw288>.
- Fendl, B. *et al.* (2016) ‘Characterization of extracellular vesicles in whole blood: Influence of pre-analytical parameters and visualization of vesicle-cell interactions using imaging flow cytometry’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 478(1), pp. 168–173. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.07.073>.
- Feng, H., Qin, Z. and Zhang, X. (2013) ‘Opportunities and methods for studying alternative splicing in cancer with RNA-Seq’, *Cancer Letters*, 340(2), pp. 179–191. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.11.010>.
- Ferguson Bennit, H.R. *et al.* (2019) ‘Peripheral Blood Cell Interactions of Cancer-Derived Exosomes Affect Immune Function’, *Cancer Microenvironment*, 12(1), pp. 29–35. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12307-018-0209-1>.

- Fernandez-Mercado, M. *et al.* (2015) 'The circulating transcriptome as a source of non-invasive cancer biomarkers: Concepts and controversies of non-coding and coding RNA in body fluids', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(10), pp. 2307–2323. Available at: <https://doi.org/10.1111/jcmm.12625>.
- Fernando, M.R. *et al.* (2017) 'New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes', *PLoS ONE*, 12(8), pp. 1–15. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183915>.
- Fischer, S. *et al.* (2016) 'Indication of horizontal DNA gene transfer by extracellular vesicles', *PLoS ONE*, 11(9), pp. 1–22. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163665>.
- Frampton, A.E. *et al.* (2018) 'Glypican-1 is enriched in circulating-exosomes in pancreatic cancer and correlates with tumor burden', *Oncotarget*, 9(27), pp. 19006–19013. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24873>.
- Franquesa, M. *et al.* (2014) 'Update on controls for isolation and quantification methodology of extracellular vesicles derived from adipose tissue mesenchymal stem cells', *Frontiers in Immunology*, 5(OCT), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00525>.
- Galbiati, S. *et al.* (2019) 'Evaluation of three advanced methodologies, COLD-PCR, microarray and ddPCR, for identifying the mutational status by liquid biopsies in metastatic colorectal cancer patients', *Clinica Chimica Acta*, 489(November 2018), pp. 136–143. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.12.004>.
- Gao, J.J. *et al.* (2020) 'CDK4/6 inhibitor treatment for patients with hormone receptor-positive, HER2-negative, advanced or metastatic breast cancer: a US Food and Drug Administration pooled analysis', *The Lancet Oncology*, 21(2), pp. 250–260. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30804-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30804-6).
- García, J.M. *et al.* (2008) 'Extracellular plasma RNA from colon cancer patients is confined in a vesicle-like structure and is mRNA-enriched', *Rna*, 14(7), pp. 1424–1432. Available at: <https://doi.org/10.1261/rna.755908>.
- García-Romero, N. *et al.* (2017) 'DNA sequences within glioma-derived extracellular vesicles can cross the intact blood-brain barrier and be detected in peripheral blood of patients', *Oncotarget*, 8(1), pp. 1416–1428. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13635>.
- García-Romero, N. *et al.* (2018) 'Extracellular vesicles compartment in liquid biopsies: Clinical application', *Molecular Aspects of Medicine*, 60, pp. 27–37. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.11.009>.

- García-Romero, N. *et al.* (2019) 'Polyethylene glycol improves current methods for circulating extracellular vesicle-derived DNA isolation', *Journal of Translational Medicine*, 17(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1825-3>.
- Gassmann, H. *et al.* (2021) 'Ewing Sarcoma-Derived Extracellular Vesicles Impair Dendritic Cell Maturation and Function'.
- Gentilini, O.D., Cardoso, M.J. and Poortmans, P. (2017) 'Less is more. Breast conservation might be even better than mastectomy in early breast cancer patients', *Breast*, 35, pp. 32–33. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.breast.2017.06.004>.
- Gianni, L. *et al.* (2009) 'Phase III trial evaluating the addition of paclitaxel to doxorubicin followed by cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil, as adjuvant or primary systemic therapy: European cooperative trial in operable breast cancer', *Journal of Clinical Oncology*, 27(15), pp. 2474–2481. Available at: <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.2567>.
- Goldhirsch, A. *et al.* (2011) 'Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011', *Annals of Oncology*, 22(8), pp. 1736–1747. Available at: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr304>.
- Goldhirsch, A. *et al.* (2013) 'Personalizing the treatment of women with early breast cancer : highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013', pp. 2206–2223. Available at: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt303>.
- Goldvaser, H. *et al.* (2017) 'Characterisation of blood-derived exosomal hTERT mRNA secretion in cancer patients: A potential pan-cancer marker', *British Journal of Cancer*, 117(3), pp. 353–357. Available at: <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.166>.
- Gorbatenko, A. *et al.* (2019) 'HER2 and p95HER2 differentially regulate miRNA expression in MCF-7 breast cancer cells and downregulate MYB proteins through miR-221/222 and miR-503', *Scientific Reports*, 9(1), p. 3352. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39733-x>.
- Gradishar, W.J. *et al.* (2018) 'Clinical practice guidelines in oncology', *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 16(3), pp. 310–320. Available at: <https://doi.org/10.6004/jnccn.2018.0012>.
- Grant, R. *et al.* (2011) 'A filtration-based protocol to isolate human Plasma Membrane-derived Vesicles and exosomes from blood plasma', *Journal of Immunological Methods*, 371(1–2), pp. 143–151. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.06.024>.

- Gray, R. *et al.* (2019) ‘Increasing the dose intensity of chemotherapy by more frequent administration or sequential scheduling: a patient-level meta-analysis of 37 298 women with early breast cancer in 26 randomised trials’, *The Lancet*, 393(10179), pp. 1440–1452. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)33137-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)33137-4).
- Green, A.R. *et al.* (2013) ‘Identification of key clinical phenotypes of breast cancer using a reduced panel of protein biomarkers’, *British Journal of Cancer*, 109(7), pp. 1886–1894. Available at: <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.528>.
- Greenough, R.B. (1925) ‘Varying degrees of malignancy in cancer of the breast’, *Journal of Cancer Research*, 9(4), pp. 453–463. Available at: <https://doi.org/10.1158/jcr.1925.453>.
- Gregory, R.I. *et al.* (2004) ‘The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs’, *Nature*, 432(7014), pp. 235–240. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature03120>.
- Gudinaviciene, I., Pranys, D. and Juozaityte, E. (2004) ‘Impact of morphology and biology on the prognosis of patients with gliomas.’, *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 40(2), pp. 112–120.
- Guduric-Fuchs, J. *et al.* (2012) ‘Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types’, *BMC Genomics*, 13(1), p. 1. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-357>.
- Guha, D. *et al.* (2019) ‘Proteomic analysis of cerebrospinal fluid extracellular vesicles reveals synaptic injury, inflammation, and stress response markers in HIV patients with cognitive impairment’, *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), pp. 1–19. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1617-y>.
- Gupta, R.A. *et al.* (2010) ‘Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis’, *Nature*, 464(7291), pp. 1071–1076. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature08975>.
- Gurung, S. *et al.* (2021) ‘The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling’, *Cell Communication and Signaling*, pp. 1–19. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00730-1>.
- Hagiwara, K. *et al.* (2015) ‘Commitment of Annexin A2 in recruitment of microRNAs into extracellular vesicles’, *FEBS Letters*, 589(24), pp. 4071–4078. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.11.036>.
- Haider, M.T., Smit, D.J. and Taipaleenmäki, H. (2022) ‘MicroRNAs: Emerging Regulators of Metastatic Bone Disease in Breast Cancer’, *Cancers*, 14(3). Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers14030729>.

- Halicka, H.D., Bedner, E. and Darzynkiewicz, Z. (2000) 'Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis', *Experimental Cell Research*, 260(2), pp. 248–256. Available at: <https://doi.org/10.1006/excr.2000.5027>.
- Hannafon, B.N. and Ding, W.Q. (2013) 'Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer', *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), pp. 14240–14269. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms140714240>.
- Harbeck, N. *et al.* (2019) *Breast cancer, Nature Reviews Disease Primers*. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>.
- Hasselmann, D.O. *et al.* (2001) 'Extracellular Tyrosinase mRNA within Apoptotic Bodies Is Protected from Degradation in Human Serum', *Clinical Chemistry*, 47(8), pp. 1488–1489. Available at: <https://doi.org/10.1093/clinchem/47.8.1488>.
- Hegi, M.E. *et al.* (2005) 'MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma', *New England Journal of Medicine*, 352(10), pp. 997–1003. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043331>.
- Heneghan, H.M. *et al.* (2010) 'Circulating micromas as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer', *Annals of Surgery*, 251(3), pp. 499–505. Available at: <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3181cc939f>.
- Hoon Tan, P. *et al.* (2020) 'The 2019 WHO classification of tumours of the breast', *Histopathology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1111/his.14091>.
- Hortobagyi, G.N. *et al.* (2017) 'Breast', in *AJCC Cancer Staging Manual*. Cham: Springer International Publishing, pp. 589–636. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-40618-3\\_48](https://doi.org/10.1007/978-3-319-40618-3_48).
- Huang, H.Y. *et al.* (2020) 'MiRTarBase 2020: Updates to the experimentally validated microRNA-target interaction database', *Nucleic Acids Research*, 48(D1), pp. D148–D154. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz896>.
- Huang, X. *et al.* (2013) 'Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing', *BMC Genomics*, 14(1), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-319>.
- Huarte, M. (2015) 'The emerging role of lncRNAs in cancer', *Nature Medicine*, 21(11), pp. 1253–1261. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.3981>.

- Hulsen, T., de Vlieg, J. and Alkema, W. (2008) 'BioVenn - A web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams', *BMC Genomics*, 9, pp. 1–6. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-488>.
- Husain, H. *et al.* (2017) 'Monitoring daily dynamics of early tumor response to targeted therapy by detecting circulating tumor DNA in urine', *Clinical Cancer Research*, 23(16), pp. 4716–4723. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0454>.
- Huynh, T.K. *et al.* (2021) 'miR-221 confers lapatinib resistance by negatively regulating p27kip1 in HER2-positive breast cancer', *Cancer Science*, 112(10), pp. 4234–4245. Available at: <https://doi.org/10.1111/cas.15107>.
- Hwang, E.S. *et al.* (2013) 'Survival after lumpectomy and mastectomy for early stage invasive breast cancer', *Cancer*, 119(7), pp. 1402–1411. Available at: <https://doi.org/10.1002/cncr.27795>.
- IARC (2020) *Cancer Tomorrow*. Available at: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype> (Accessed: 23 August 2020).
- Iavello, A. *et al.* (2016) 'Role of Alix in miRNA packaging during extracellular vesicle biogenesis', *International Journal of Molecular Medicine*, 37(4), pp. 958–966. Available at: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2488>.
- Ignatiadis, M., Sledge, G.W. and Jeffrey, S.S. (2021) 'Liquid biopsy enters the clinic — implementation issues and future challenges', *Nature Reviews Clinical Oncology*, 18(5), pp. 297–312. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41571-020-00457-x>.
- Iliescu, F.S. *et al.* (2019) 'Microfluidic technology for clinical applications of exosomes', *Micromachines*, 10(6), pp. 6–9. Available at: <https://doi.org/10.3390/mi10060392>.
- International Union Against Cancer (1959) 'Clinical stage classification for malignant tumours of the breast', *British Journal of Surgery*, 47(203), pp. 330–332. Available at: <https://doi.org/10.1002/bjs.18004720332>.
- Iorio, M. V. *et al.* (2005) 'MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer', *Cancer Research*, 65(16), pp. 7065–7070. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1783>.
- Iorio, M. V. *et al.* (2007) 'MicroRNA signatures in human ovarian cancer', *Cancer Research*, 67(18), pp. 8699–8707. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1936>.
- Isca, C. *et al.* (2021) 'Circulating and intracellular mirnas as prognostic and predictive factors in her2-positive early breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy: A review of the literature', *Cancers*, 13(19). Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers13194894>.

- Jahr, S. *et al.* (2001) 'DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells', *Cancer Research*, 61(4), pp. 1659–1665.
- Jansson, M.D. and Lund, A.H. (2012) 'MicroRNA and cancer', *Molecular Oncology*, 6(6), pp. 590–610. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.09.006>.
- Jiapaer, S. *et al.* (2018) 'Potential strategies overcoming the temozolomide resistance for glioblastoma', *Neurologia Medico-Chirurgica*, 58(10), pp. 405–421. Available at: <https://doi.org/10.2176/nmc.ra.2018-0141>.
- Jin, H.Y., Lai, M. and Xiao, C. (2014) 'microRNA-17-92 is a powerful cancer driver and a therapeutic target', *Cell Cycle*, 13(4), pp. 495–496. Available at: <https://doi.org/10.4161/cc.27784>.
- Jung, E.J. *et al.* (2012) 'Plasma microRNA 210 levels correlate with sensitivity to trastuzumab and tumor presence in breast cancer patients', *Cancer*, 118(10), pp. 2603–2614. Available at: <https://doi.org/10.1002/cncr.26565>.
- Kadamb, R. *et al.* (2022) 'Invasive phenotype in triple negative breast cancer is inhibited by blocking SIN3A–PF1 interaction through KLF9 mediated repression of ITGA6 and ITGB1', *Translational Oncology*, 16, p. 101320. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101320>.
- Kahlert, C. *et al.* (2014) 'Identification of doublestranded genomic dna spanning all chromosomes with mutated KRAS and P53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer', *Journal of Biological Chemistry*, 289(7), pp. 3869–3875. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.C113.532267>.
- Kalra, H. *et al.* (2012) 'Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation', *PLoS Biology*, 10(12), pp. 8–13. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001450>.
- Kalra, H., Drummen, G.P.C. and Mathivanan, S. (2016) 'Focus on Extracellular Vesicles : Introducing the Next Small Big Thing'. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms17020170>.
- Karhadkar, S.S. *et al.* (2004) 'Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis', *Nature*, 431(7009), pp. 707–712. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature02962>.
- Karpel-Massler, G. *et al.* (2019) 'Novel IDH1-Targeted Glioma Therapies', *CNS Drugs*, 33(12), pp. 1155–1166. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40263-019-00684-6>.

- Kato, Y. (2015) 'Specific monoclonal antibodies against IDH1/2 mutations as diagnostic tools for gliomas', *Brain Tumor Pathology*, 32(1), pp. 3–11. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10014-014-0202-4>.
- Keller, S. *et al.* (2007) 'CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid', *Kidney International*, 72(9), pp. 1095–1102. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002486>.
- Kim, J.W., Mori, S. and Nevins, J.R. (2010) 'Myc-Induced MicroRNAs Integrate Myc-Mediated Cell Proliferation and Cell Fate', *Cancer Research*, 70(12), pp. 4820–4828. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0659>.
- Kleihues, P., Burger, P.C. and Scheithauer, B.W. (1993) *Histological Typing of Tumours of the Central Nervous System*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Available at: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-84988-6>.
- Kolarova, I. *et al.* (2019) 'Therapeutic significance of hormone receptor positivity in patients with her-2 positive breast cancer', *Biomedical Papers*, 163(4), pp. 285–292. Available at: <https://doi.org/10.5507/bp.2019.060>.
- Kolenda, T. *et al.* (2020) 'cfRNAs as biomarkers in oncology – still experimental or applied tool for personalized medicine already?', *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*, 25(5), pp. 783–792. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2020.07.007>.
- Koppers-Lalic, D. *et al.* (2014) 'Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes', *Cell Reports*, 8(6), pp. 1649–1658. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.027>.
- Kosaka, N. *et al.* (2013) 'Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic micrnas regulate cancer cell metastasis', *Journal of Biological Chemistry*, 288(15), pp. 10849–10859. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.446831>.
- Krebs, M. *et al.* (2019) 'MiR-221 Augments TRAIL-Mediated Apoptosis in Prostate Cancer Cells by Inducing Endogenous TRAIL Expression and Targeting the Functional Repressors SOCS3 and PIK3R1', *BioMed Research International*, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1155/2019/6392748>.
- Kuehn, J. *et al.* (2021) 'Prognostic significance of hedgehog signaling network-related gene expression in breast cancer patients', *Journal of Cellular Biochemistry*, 122(5), pp. 577–597. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcb.29886>.

- Lagendijk, M. *et al.* (2018) 'Breast conserving therapy and mastectomy revisited: Breast cancer-specific survival and the influence of prognostic factors in 129,692 patients', *International Journal of Cancer*, 142(1), pp. 165–175. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.31034>.
- Lanzós, A. *et al.* (2017) 'Discovery of Cancer Driver Long Noncoding RNAs across 1112 Tumour Genomes: New Candidates and Distinguishing Features', *Scientific Reports*, 7(December 2016), pp. 1–16. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep41544>.
- Lässer, C. *et al.* (2011) 'Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: Uptake by macrophages', *Journal of Translational Medicine*, 9, pp. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-9>.
- Lázaro-Ibáñez, E. *et al.* (2019) 'DNA analysis of low- and high-density fractions defines heterogeneous subpopulations of small extracellular vesicles based on their DNA cargo and topology', *Journal of Extracellular Vesicles*, 8(1). Available at: <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1656993>.
- Le, X.-F. *et al.* (2012) 'Modulation of MicroRNA-194 and Cell Migration by HER2-Targeting Trastuzumab in Breast Cancer', *PLoS ONE*. Edited by M. Tan, 7(7), p. e41170. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041170>.
- Lee, J.-K. *et al.* (2014) 'Extracellular Vesicles as an Emerging Paradigm of Cell-to-Cell Communication in Stem Cell Biology', *Journal of Stem Cell Research & Therapy*, 04(05). Available at: <https://doi.org/10.4172/2157-7633.1000206>.
- Lee, J.S. *et al.* (2018) 'Liquid biopsy using the supernatant of a pleural effusion for EGFR genotyping in pulmonary adenocarcinoma patients: A comparison between cell-free DNA and extracellular vesicle-derived DNA', *BMC Cancer*, 18(1), pp. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12885-018-5138-3>.
- Leon, S.A. *et al.* (1977) 'Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy', *Cancer Research*, 37(3), pp. 646–650.
- Leonardi, R. *et al.* (2012) 'Cancer-associated isocitrate dehydrogenase mutations inactivate NADPH-dependent reductive carboxylation', *Journal of Biological Chemistry*, 287(18), pp. 14615–14620. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.C112.353946>.
- Li, J. *et al.* (2008) 'Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing', *Nature Medicine*, 14(5), pp. 579–584. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm1708>.

- Li, M. *et al.* (2006) 'BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants', *Nature Methods*, 3(2), pp. 95–97. Available at: <https://doi.org/10.1038/nmeth850>.
- Liu, B. *et al.* (2017) 'Serum miR-21 and miR-125b as markers predicting neoadjuvant chemotherapy response and prognosis in stage II/III breast cancer', *Human Pathology*, 64, pp. 44–52. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.03.016>.
- Liu, Y. *et al.* (2021) 'Analysis of KRAS mutations in circulating tumor DNA and colorectal cancer tissue', *Biotechnic and Histochemistry*, 96(5), pp. 376–383. Available at: <https://doi.org/10.1080/10520295.2020.1810775>.
- Lobb, R.J. *et al.* (2015) 'Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma', *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1). Available at: <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27031>.
- Losman, J.A. and Kaelin, W.G. (2013) 'What a difference a hydroxyl makes: Mutant IDH, (R)-2-hydroxyglutarate, and cancer', *Genes and Development*, 27(8), pp. 836–852. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.217406.113>.
- Louis, D.N. *et al.* (2016) 'The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary', *Acta Neuropathologica*, 131(6), pp. 803–820. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>.
- Louis, D.N. *et al.* (2020) 'cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading', *Brain Pathology*, 30(4), pp. 844–856. Available at: <https://doi.org/10.1111/bpa.12832>.
- Louis, D.N. *et al.* (2021) 'The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary', *Neuro-Oncology*, 23(8), pp. 1231–1251. Available at: <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>.
- Lowes, L.E. *et al.* (2016) 'Circulating tumor cells (CTC) and cell-free DNA (cfDNA) workshop 2016: Scientific opportunities and logistics for cancer clinical trial incorporation', *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms17091505>.
- Lozano-Ramos, I. *et al.* (2015) 'Size-exclusion chromatography-based enrichment of extracellular vesicles from urine samples', *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(2015), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27369>.
- Lu, J. *et al.* (2005) 'MicroRNA expression profiles classify human cancers', *Nature*, 435(7043), pp. 834–838. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature03702>.

- Ludwig, A.K. *et al.* (2018) 'Precipitation with polyethylene glycol followed by washing and pelleting by ultracentrifugation enriches extracellular vesicles from tissue culture supernatants in small and large scales', *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1). Available at: <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1528109>.
- van Maaren, M.C. *et al.* (2016) '10 year survival after breast-conserving surgery plus radiotherapy compared with mastectomy in early breast cancer in the Netherlands: a population-based study', *The Lancet Oncology*, 17(8), pp. 1158–1170. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30067-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30067-5).
- Makarova, J. *et al.* (2021) 'Extracellular miRNAs and Cell–Cell Communication: Problems and Prospects', *Trends in Biochemical Sciences*, 46(8), pp. 640–651. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.01.007>.
- Malkin, E.Z. and Bratman, S. V. (2020) 'Bioactive DNA from extracellular vesicles and particles', *Cell Death and Disease*, 11(7). Available at: <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02803-4>.
- MANDEL, P. and METAIS, P. (1948) 'Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme', *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales*, pp. 241–243.
- Manterola, L. *et al.* (2014) 'A small noncoding RNA signature found in exosomes of GBM patient serum as a diagnostic tool', *Neuro-Oncology*, 16(4), pp. 520–527. Available at: <https://doi.org/10.1093/neuonc/not218>.
- Markou, A. *et al.* (2008) 'Prognostic value of mature MicroRNA-21 and MicroRNA-205 overexpression in non-small cell lung cancer by quantitative real-time RT-PCR', *Clinical Chemistry*, 54(10), pp. 1696–1704. Available at: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.101741>.
- Martinez, B.V. *et al.* (2015) 'Circulating small non coding RNA signature in head and neck squamous cell carcinoma', *Oncotarget*, 6(22), pp. 19246–19263. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4266>.
- Martínez-Greene, J.A. *et al.* (2021) 'Quantitative proteomic analysis of extracellular vesicle subgroups isolated by an optimized method combining polymer-based precipitation and size exclusion chromatography', *Journal of Extracellular Vesicles*, 10(6). Available at: <https://doi.org/10.1002/jev2.12087>.
- Masfarré, L. *et al.* (2021) 'Ctdna to guide adjuvant therapy in localized colorectal cancer (Crc)', *Cancers*, 13(12), pp. 1–20. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers13122869>.

- Masood, S. (2016) 'Neoadjuvant chemotherapy in breast cancers', *Women's Health*, 12(5), pp. 480–491. Available at: <https://doi.org/10.1177/1745505716677139>.
- Mateo, J. *et al.* (2018) 'A framework to rank genomic alterations as targets for cancer precision medicine: The ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT)', *Annals of Oncology*, 29(9), pp. 1895–1902. Available at: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy263>.
- Matissek, S.J. and ElSawa, S.F. (2020a) 'GLI3: A mediator of genetic diseases, development and cancer', *Cell Communication and Signaling*. BioMed Central Ltd. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00540-x>.
- Matissek, S.J. and ElSawa, S.F. (2020b) 'GLI3: a mediator of genetic diseases, development and cancer', *Cell Communication and Signaling*, 18(1), p. 54. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00540-x>.
- De Mattos-Arruda, L. *et al.* (2015) 'Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour DNA better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma', *Nature Communications*, 6, pp. 1–6. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms9839>.
- Mauger, F., How-Kit, A. and Tost, J. (2017) 'COLD-PCR Technologies in the Area of Personalized Medicine: Methodology and Applications', *Molecular Diagnosis and Therapy*, 21(3), pp. 269–283. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40291-016-0254-8>.
- McAllister, S.S. *et al.* (2003) 'Novel p27 kip1 C-Terminal Scatter Domain Mediates Rac-Dependent Cell Migration Independent of Cell Cycle Arrest Functions', *Molecular and Cellular Biology*, 23(1), pp. 216–228. Available at: <https://doi.org/10.1128/mcb.23.1.216-228.2003>.
- McLendon, R. *et al.* (2008) 'Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways', *Nature*, 455(7216), pp. 1061–1068. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature07385>.
- Mestdagh, P. *et al.* (2009) 'A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization', *Genome Biology*, 10(6). Available at: <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-6-r64>.
- Milasan, A. *et al.* (2016) 'Extracellular vesicles are present in mouse lymph and their level differs in atherosclerosis', *Journal of Extracellular Vesicles*, 5(1). Available at: <https://doi.org/10.3402/jev.v5.31427>.
- Milbury, C.A. *et al.* (2011) 'COLD-PCR: Improving the sensitivity of molecular diagnostics assays', *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 11(2), pp. 159–169. Available at: <https://doi.org/10.1586/erm.10.115>.

- Miller, M.C., Doyle, G. V. and Terstappen, L.W.M.M. (2010) 'Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer', *Journal of Oncology*, 2010, pp. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.1155/2010/617421>.
- Miller, T.E. *et al.* (2008) 'MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27Kip1', *Journal of Biological Chemistry*, 283(44), pp. 29897–29903. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M804612200>.
- Mithani, S.K. *et al.* (2007) 'Mitochondrial Resequencing Arrays Detect Tumor-Specific Mutations in Salivary Rinses of Patients with Head and Neck Cancer', *Clinical Cancer Research*, 13(24), pp. 7335–7340. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0220>.
- Mohammadi, C. *et al.* (2021) 'miRNA as promising theragnostic biomarkers for predicting radioresistance in cancer: A systematic review and meta-analysis', *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 157, p. 103183. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.103183>.
- Mouliere, F. *et al.* (2018) 'Detection of cell-free DNA fragmentation and copy number alterations in cerebrospinal fluid from glioma patients', *EMBO Molecular Medicine*, 10(12), pp. 1–6. Available at: <https://doi.org/10.15252/emmm.201809323>.
- Muller, L. *et al.* (2015) 'Exosomes isolated from plasma of glioma patients enrolled in a vaccination trial reflect antitumor immune activity and might predict survival'. Available at: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1008347>.
- Muralidharan-Chari, V. *et al.* (2010) 'Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression', *Journal of Cell Science*, 123(10), pp. 1603–1611. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.064386>.
- Nair, R. *et al.* (2014) 'C-Myc and Her2 cooperate to drive a stem-like phenotype with poor prognosis in breast cancer', *Oncogene*, 33(30), pp. 3992–4002. Available at: <https://doi.org/10.1038/onc.2013.368>.
- Naseri, M. *et al.* (2021) 'Dendritic cells loaded with exosomes derived from cancer stem cell-enriched spheroids as a potential immunotherapeutic option', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(7), pp. 3312–3326. Available at: <https://doi.org/10.1111/jcmm.16401>.
- Natsume, A. *et al.* (2010) 'Epigenetic aberrations and therapeutic implications in gliomas', *Cancer Science*, 101(6), pp. 1331–1336. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01545.x>.

- Ni, J. *et al.* (2021) 'Tumour-derived exosomal lncRNA-SOX2OT promotes bone metastasis of non-small cell lung cancer by targeting the miRNA-194-5p/RAC1 signalling axis in osteoclasts', *Cell Death and Disease*, 12(7), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03928-w>.
- Nicholson, J.G. and Fine, H.A. (2021) 'Diffuse glioma heterogeneity and its therapeutic implications', *Cancer Discovery*, 11(3), pp. 575–590. Available at: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1474>.
- Nielsen, T.O. *et al.* (2004) 'Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma', *Clinical Cancer Research*, 10(16), pp. 5367–5374. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0220>.
- Nieto, C., Vega, M.A. and Mart, E.M. (2020) 'Trastuzumab: More than a Guide in HER2-Positive Cancer Nanomedicine', 2.
- Nilsson, J. *et al.* (2009) 'Prostate cancer-derived urine exosomes: A novel approach to biomarkers for prostate cancer', *British Journal of Cancer*, 100(10), pp. 1603–1607. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605058>.
- Nolan, T., Huggett, J. and Sanchez, E. (2013) 'Good Practice Guide for the Application of Quantitative PCR (qPCR)', *National Measurement System*, p. 50.
- Noman, A.S. *et al.* (2017) 'Serum sonic hedgehog (SHH) and interleukin-(IL-6) as dual prognostic biomarkers in progressive metastatic breast cancer', *Scientific Reports*, 7(1), p. 1796. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01268-4>.
- Oellerich, M. *et al.* (2017) 'Using circulating cell-free DNA to monitor personalized cancer therapy', *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 54(3), pp. 205–218. Available at: <https://doi.org/10.1080/10408363.2017.1299683>.
- Ogston, K.N. *et al.* (2003) 'A new histological grading system to assess response of breast cancers to primary chemotherapy: Prognostic significance and survival', *Breast*, 12(5), pp. 320–327. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(03\)00106-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(03)00106-1).
- Ohgaki, H. and Kleihues, P. (2007) 'Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma', *American Journal of Pathology*, 170(5), pp. 1445–1453. Available at: <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070011>.
- Oitabén, A. *et al.* (2022) 'Emerging Blood-Based Biomarkers for Predicting Immunotherapy Response in NSCLC', *Cancers*, 14(11), p. 2626. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers14112626>.

- Ostrom, Q.T., Gittleman, H., *et al.* (2014) 'CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007–2011', *Neuro-Oncology*, 16, pp. iv1–iv63. Available at: <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou223>.
- Ostrom, Q.T., Bauchet, L., *et al.* (2014) 'The epidemiology of glioma in adults: A state of the science review', *Neuro-Oncology*, 16(7), pp. 896–913. Available at: <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou087>.
- Ouyang, Y.X. *et al.* (2021) 'miR-221/222 sponge abrogates tamoxifen resistance in ER-positive breast cancer cells through restoring the expression of ER $\alpha$ ', *Molecular Biomedicine*, 2(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s43556-021-00045-0>.
- Palmirotta, R. *et al.* (2018) 'Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology', *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 10(6), p. 175883591879463. Available at: <https://doi.org/10.1177/1758835918794630>.
- Paludan, S.R. and Bowie, A.G. (2013) 'Immune Sensing of DNA', *Immunity*, 38(5), pp. 870–880. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.004>.
- Pan, X. *et al.* (2020) 'Exosomal MicroRNA-221-3p Confers Adriamycin Resistance in Breast Cancer Cells by Targeting PIK3R1', *Frontiers in Oncology*, 10(April), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00441>.
- Parikh, A.R. *et al.* (2019) 'Liquid versus tissue biopsy for detecting acquired resistance and tumor heterogeneity in gastrointestinal cancers', *Nature Medicine*, 25(9), pp. 1415–1421. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0561-9>.
- Patel, G.K. *et al.* (2019) 'Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications', (November 2018), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41800-2>.
- Patey, D.H. and Scarff, R.W. (1928) 'the Position of Histology in the Prognosis of Carcinoma of the Breast.', *The Lancet*, 211(5460), pp. 801–804. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)76762-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)76762-6).
- Peng, J. and Zhang, D. (2021) 'Coexpression of EphA10 and Gli3 promotes breast cancer cell proliferation, invasion and migration', *Journal of Investigative Medicine*, 69(6), pp. 1215–1221. Available at: <https://doi.org/10.1136/jim-2021-001836>.
- Perou, C.M. *et al.* (2000) 'Molecular portraits of human breast tumours', *Nature*, 406(6797), pp. 747–752. Available at: <https://doi.org/10.1038/35021093>.

- Piasecka, D. *et al.* (2018) ‘MicroRNAs in regulation of triple-negative breast cancer progression’, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 144(8), pp. 1401–1411. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2689-2>.
- Piccin, A., Murphy, W.G. and Smith, O.P. (2007) ‘Circulating microparticles : pathophysiology and clinical implications’, pp. 157–171. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.blre.2006.09.001>.
- Pisitkun, T., Shen, R.F. and Knepper, M.A. (2004) ‘Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(36), pp. 13368–13373. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0403453101>.
- Platten, M. *et al.* (2021) ‘A vaccine targeting mutant IDH1 in newly diagnosed glioma’, *Nature*, 592(7854), pp. 463–468. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03363-z>.
- Platten, M., Bunse, L. and Wick, W. (2021) ‘Emerging targets for anticancer vaccination: IDH’, *ESMO Open*, 6(4), p. 100214. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2021.100214>.
- Poggiana, C., Rossi, E. and Zamarchi, R. (2020) ‘Possible role of circulating tumor cells in early detection of lung cancer’, *Journal of Thoracic Disease*, 12(7), pp. 3821–3835. Available at: <https://doi.org/10.21037/jtd.2020.02.24>.
- Postel, M. *et al.* (2018) ‘Droplet-based digital PCR and next generation sequencing for monitoring circulating tumor DNA: a cancer diagnostic perspective’, *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 18(1), pp. 7–17. Available at: <https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1400384>.
- Pu, F. *et al.* (2020) ‘Information transfer and biological significance of neoplastic exosomes in the tumor microenvironment of osteosarcoma’, *OncoTargets and Therapy*, 13, pp. 8931–8940. Available at: <https://doi.org/10.2147/OTT.S266835>.
- Qian, B. *et al.* (2009) ‘High miR-21 expression in breast cancer associated with poor disease-free survival in early stage disease and high TGF- $\beta$ 1’, *Breast Cancer Research and Treatment*, 117(1), pp. 131–140. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0219-7>.
- Qu, F. and Cao, P. (2018) ‘Long noncoding RNA SOX2OT contributes to gastric cancer progression by sponging miR-194-5p from AKT2’, *Experimental Cell Research*, 369(2), pp. 187–196. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.05.017>.
- Del Re, M. *et al.* (2019) ‘Understanding the mechanisms of resistance in EGFR-positive NSCLC: From tissue to liquid biopsy to guide treatment strategy’, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16), pp. 1–16. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20163951>.

- Reddi, K.K. and Holland, J.F. (1976) 'Elevated serum ribonuclease in patients with pancreatic cancer', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(7), pp. 2308–2310. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.73.7.2308>.
- Reitman, Z.J. and Yan, H. (2010) 'Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: Alterations at a crossroads of cellular metabolism', *Journal of the National Cancer Institute*, 102(13), pp. 932–941. Available at: <https://doi.org/10.1093/jnci/djq187>.
- Revenfeld, A.L.S. *et al.* (2014) 'Diagnostic and prognostic potential of extracellular vesicles in peripheral blood', *Clinical Therapeutics*, 36(6), pp. 830–846. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2014.05.008>.
- Riaz, S.K. *et al.* (2018) 'Involvement of hedgehog pathway in early onset, aggressive molecular subtypes and metastatic potential of breast cancer', *Cell Communication and Signaling*, 16(1), p. 3. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12964-017-0213-y>.
- Rider, M.A., Hurwitz, S.N. and Meckes, D.G. (2016) 'ExtraPEG: A polyethylene glycol-based method for enrichment of extracellular vesicles', *Scientific Reports*, 6(April), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep23978>.
- Risom, T. *et al.* (2020) 'Deregulating MYC in a model of HER2+ breast cancer mimics human intertumoral heterogeneity', *Journal of Clinical Investigation*, 130(1), pp. 231–246. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI126390>.
- Rodrigues Filho, E.M. *et al.* (2014) 'Elevated cell-free plasma DNA level as an independent predictor of mortality in patients with severe traumatic brain injury', *Journal of Neurotrauma*, 31(19), pp. 1639–1646. Available at: <https://doi.org/10.1089/neu.2013.3178>.
- Roldo, C. *et al.* (2006) 'MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior', *Journal of Clinical Oncology*, 24(29), pp. 4677–4684. Available at: <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.5194>.
- Roth, C. *et al.* (2010) 'Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer', *Breast Cancer Research*, 12(6), pp. 6–13. Available at: <https://doi.org/10.1186/bcr2766>.
- Rupp, A.K. *et al.* (2011) 'Loss of EpCAM expression in breast cancer derived serum exosomes: Role of proteolytic cleavage', *Gynecologic Oncology*, 122(2), pp. 437–446. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.04.035>.

- Samsonov, R. *et al.* (2016) ‘Lectin-Induced Agglutination Method of Urinary Exosomes Isolation Followed by mi-RNA Analysis: Application for Prostate Cancer Diagnostic’, 79(September 2015), pp. 68–79. Available at: <https://doi.org/10.1002/pros.23101>.
- Santangelo, L. *et al.* (2016) ‘The RNA-Binding Protein SYNCRIP Is a Component of the Hepatocyte Exosomal Machinery Controlling MicroRNA Sorting’, *Cell Reports*, 17(3), pp. 799–808. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.031>.
- Sanwlani, R. *et al.* (2020) ‘Milk-derived extracellular vesicles in inter-organism, cross-species communication and drug delivery’, *Proteomes*, 8(2), pp. 1–26. Available at: <https://doi.org/10.3390/PROTEOMES8020011>.
- Scarff, R.W. and Handley, R.S. (1938) ‘PROGNOSIS IN CARCINOMA OF THE BREAST’, *The Lancet*, 232(6001), pp. 582–583. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)82767-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)82767-1).
- Scharadin, T.M. *et al.* (2011) ‘TIG3 Tumor Suppressor-Dependent Organelle Redistribution and Apoptosis in Skin Cancer Cells’, 6(8). Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023230>.
- Schetter, A.J. *et al.* (2008) ‘MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma’, *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 299(4), pp. 425–436. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.299.4.425>.
- Schumacher, T. *et al.* (2014) ‘A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity’, *Nature*, 512(7514), pp. 324–327. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature13387>.
- SEOM (2020) *Las cifras del cáncer en España 2020*.
- Shao, N. *et al.* (2012) ‘Sequential versus concurrent anthracyclines and taxanes as adjuvant chemotherapy of early breast cancer: A meta-analysis of phase III randomized control trials’, *Breast*, 21(3), pp. 389–393. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.breast.2012.03.011>.
- Shigeyasu, K. *et al.* (2017) ‘Emerging Role of MicroRNAs as Liquid Biopsy Biomarkers in Gastrointestinal Cancers’, *Clinical Cancer Research*, 23(10), pp. 2391–2399. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1676>.
- Shurtleff, M.J. *et al.* (2016) ‘Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction’, *eLife*, 5(AUGUST), pp. 1–23. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.19276>.

- Sicklick, J.K. *et al.* (2006) 'Dysregulation of the Hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis', *Carcinogenesis*, 27(4), pp. 748–757. Available at: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi292>.
- Singh, R.R. (2020) 'Next-Generation Sequencing in High-Sensitive Detection of Mutations in Tumors: Challenges, Advances, and Applications', *Journal of Molecular Diagnostics*, 22(8), pp. 994–1007. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.04.213>.
- Siravegna, G. *et al.* (2017) 'Integrating liquid biopsies into the management of cancer', *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(9), pp. 531–548. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.14>.
- Sociedad española de oncología médica (2021) *Cifras del cancer en españa 2021, 2021*.
- Soliman, N.A. and Yussif, S.M. (2016) 'Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype'. Available at: <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0066>.
- Sorlie, T. *et al.* (2001) 'Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(19), pp. 10869–10874. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>.
- Sottoriva, A. *et al.* (2013) 'Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(10), pp. 4009–4014. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1219747110>.
- Spring, L.M. *et al.* (2020) 'Pathologic Complete Response after Neoadjuvant Chemotherapy and Impact on Breast Cancer Recurrence and Survival: A Comprehensive Meta-analysis', *Clinical Cancer Research*, 26(12), pp. 2838–2848. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-3492>.
- Sriram, K.B. *et al.* (2012) 'Pleural fluid cell-free DNA integrity index to identify cytologically negative malignant pleural effusions including mesotheliomas', *BMC Cancer*, 12. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-428>.
- Stahl, T. *et al.* (2015) 'Digital PCR to assess hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation', *Experimental Hematology*, 43(6), pp. 462-468.e1. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2015.02.006>.
- Stavrovskaya, A.A., Shushanov, S.S. and Rybalkina, E.Y. (2016) 'Problems of glioblastoma multiforme drug resistance', *Biochemistry (Moscow)*, 81(2), pp. 91–100. Available at: <https://doi.org/10.1134/S0006297916020036>.

- Stroun, M. *et al.* (2001) 'About the possible origin and mechanism of circulating DNA', *Clinica Chimica Acta*, 313(1–2), pp. 139–142. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00665-9](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00665-9).
- Stupp, R. *et al.* (2005) 'Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma', *New England Journal of Medicine*, 352(10), pp. 987–996. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>.
- Stupp, R. *et al.* (2009) 'Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial', *The Lancet Oncology*, 10(5), pp. 459–466. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70025-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70025-7).
- Stupp, R. *et al.* (2017) 'Effect of tumor-treating fields plus maintenance temozolomide vs maintenance temozolomide alone on survival in patients with glioblastoma a randomized clinical trial', *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 318(23), pp. 2306–2316. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.2017.18718>.
- Su, R. *et al.* (2017) 'Knockdown of SOX2OT inhibits the malignant biological behaviors of glioblastoma stem cells via up-regulating the expression of miR-194-5p and miR-122', *Molecular Cancer*, 16(1), pp. 1–22. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0737-1>.
- Sun, Y. *et al.* (2009) 'Expression profile of microRNAs in c-Myc induced mouse mammary tumors', *Breast Cancer Research and Treatment*, 118(1), pp. 185–196. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0171-6>.
- Sung, H. *et al.* (2021a) 'Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), pp. 209–249. Available at: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- Sung, H. *et al.* (2021b) 'Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), pp. 209–249. Available at: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- Swain, S.M. *et al.* (2020) 'Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA): end-of-study results from a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 study', *The Lancet Oncology*, 21(4), pp. 519–530. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30863-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30863-0).
- Syeda, Z.A. *et al.* (2020) 'Regulatory mechanism of microrna expression in cancer', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21051723>.

- Szajnik, M. *et al.* (2013) 'Exosomes in Plasma of Patients with Ovarian Carcinoma: Potential Biomarkers of Tumor Progression and Response to Therapy.', *Gynecology & obstetrics (Sunnyvale, Calif.)*, Suppl 4(2), p. 3. Available at: <https://doi.org/10.4172/2161-0932.S4-003>.
- Tabraue-Chávez, M. *et al.* (2019) 'A colorimetric strategy based on dynamic chemistry for direct detection of Trypanosomatid species', *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39946-0>.
- Takahashi, A. *et al.* (2017) 'Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells', *Nature Communications*, 8(May). Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms15287>.
- Tang, F. *et al.* (2012) 'MicroRNA-125b induces metastasis by targeting STARD13 in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells', *PLoS ONE*, 7(5). Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035435>.
- Tang, Y.T. *et al.* (2017) 'Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum', *International Journal of Molecular Medicine*, 40(3), pp. 834–844. Available at: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3080>.
- Taraboletti, G. *et al.* (2006) 'Bioavailability of VEGF in tumor-shed vesicles depends on vesicle burst induced by acidic pH 1', *Neoplasia*, 8(2), pp. 96–103. Available at: <https://doi.org/10.1593/neo.05583>.
- Taylor, D.D. and Gercel-Taylor, C. (2011) 'Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated immunosuppressive microenvironments', *Seminars in Immunopathology*, 33(5), pp. 441–454. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00281-010-0234-8>.
- Teng, F. and Fussenegger, M. (2021) 'Shedding Light on Extracellular Vesicle Biogenesis and Bioengineering', *Advanced Science*, 8(1), p. 2003505. Available at: <https://doi.org/10.1002/advs.202003505>.
- Tetta, C. *et al.* (2013) 'Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication', *Endocrine*, 44(1), pp. 11–19. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12020-012-9839-0>.
- Thakur, B.K. *et al.* (2014) 'Double-stranded DNA in exosomes: A novel biomarker in cancer detection', *Cell Research*, 24(6), pp. 766–769. Available at: <https://doi.org/10.1038/cr.2014.44>.
- Thayer, S.P. *et al.* (2003) 'Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis', *Nature*, 425(6960), pp. 851–856. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature02009>.

- Théry, C. *et al.* (2018) 'Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines', *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1). Available at: <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>.
- They, L. *et al.* (2019) 'Circulating Tumor Cells in Early Breast Cancer', *JNCI Cancer Spectrum*. Oxford University Press. Available at: <https://doi.org/10.1093/JNCICS/PKZ026>.
- Thierry, A.R. *et al.* (2016) 'Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology', *Cancer and Metastasis Reviews*, 35(3), pp. 347–376. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9629-x>.
- Tommasini-Ghelfi, S. *et al.* (2019a) 'Cancer-associated mutation and beyond: The emerging biology of isocitrate dehydrogenases in human disease', *Science Advances*, 5(5), pp. 1–18. Available at: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw4543>.
- Tommasini-Ghelfi, S. *et al.* (2019b) 'Cancer-associated mutation and beyond: The emerging biology of isocitrate dehydrogenases in human disease', *Science Advances*, 5(5), pp. 1–18. Available at: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw4543>.
- Treiber, T., Treiber, N. and Meister, G. (2019) 'Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(1), pp. 5–20. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0059-1>.
- Tsai, N.W. *et al.* (2011) 'The value of serial plasma nuclear and mitochondrial DNA levels in patients with acute ischemic stroke', *Clinica Chimica Acta*, 412(5–6), pp. 476–479. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.11.036>.
- Tschuschke, M. *et al.* (2020) 'Inclusion Biogenesis, Methods of Isolation and Clinical Application of Human Cellular Exosomes', *Journal of Clinical Medicine*, 9(2), p. 436. Available at: <https://doi.org/10.3390/jcm9020436>.
- Umu, S.U. *et al.* (2018) 'A comprehensive profile of circulating RNAs in human serum', *RNA Biology*, 15(2), pp. 242–250. Available at: <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1403003>.
- Untch, M. *et al.* (2019) 'NAB-Paclitaxel Improves Disease-Free Survival in Early Breast Cancer: GBG 69–GeparSepto', *Journal of Clinical Oncology*, 37(25), pp. 2226–2234. Available at: <https://doi.org/10.1200/JCO.18.01842>.
- Vagner, T. *et al.* (2018) 'Large extracellular vesicles carry most of the tumour DNA circulating in prostate cancer patient plasma', *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1). Available at: <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1505403>.

Verhaak, R.G.W. *et al.* (2010) ‘Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1’, *Cancer Cell*, 17(1), pp. 98–110. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>.

Villarroya-Beltri, C. *et al.* (2013) ‘Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs’, *Nature Communications*, 4, pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms3980>.

de Vlaminc, I. *et al.* (2014) ‘Circulating cell-free DNA enables noninvasive diagnosis of heart transplant rejection’, *Science Translational Medicine*, 6(241). Available at: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007803>.

de Vlaminc, I. *et al.* (2015) ‘Noninvasive monitoring of infection and rejection after lung transplantation’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(43), pp. 13336–13341. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1517494112>.

Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1999) ‘Digital PCR’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16), pp. 9236–9241. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.9236>.

Volinia, S. *et al.* (2006) ‘A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(7), pp. 2257–2261. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0510565103>.

Wan, J.C.M. *et al.* (2021) ‘Liquid biopsies for residual disease and recurrence’, *Med*, 2(12), pp. 1292–1313. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.medj.2021.11.001>.

Wang, B. *et al.* (2015) ‘MiR-194, commonly repressed in colorectal cancer, suppresses tumor growth by regulating the MAP4K4/c-Jun/MDM2 signaling pathway’, *Cell Cycle*, 14(7), pp. 1046–1058. Available at: <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1007767>.

Wang, F. *et al.* (2010) ‘Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor’, *Gynecologic Oncology*, 119(3), pp. 586–593. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.07.021>.

Wang, H. *et al.* (2018) ‘Circulating microRNAs as potential cancer biomarkers: The advantage and disadvantage’, *Clinical Epigenetics*, 10(1), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0492-1>.

Wang, H., Wang, Yushe and Wang, Yong (2022) ‘MiR-222-3p inhibits formation of medulloblastoma stem-like cells by targeting Notch2/c-myc signaling pathway’,

*Immunopharmacology and Immunotoxicology*, pp. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.1080/08923973.2022.2062381>.

Wang, W. *et al.* (2021) ‘Prognostic value of residual cancer burden and Miller-Payne system after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer’, *Gland Surgery*, 10(12), pp. 3211–3221. Available at: <https://doi.org/10.21037/ga-21-608>.

Warren, J.D. *et al.* (2011) ‘Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer’, *BMC Medicine*, 9(1), p. 133. Available at: <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-133>.

Watkins, D.N. *et al.* (2003) ‘Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer’, *Nature*, 422(6929), pp. 313–317. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature01493>.

Wei, R. *et al.* (2018) ‘The SOX2OT/miR-194-5p axis regulates cell proliferation and mobility of gastric cancer through suppressing epithelial-mesenchymal transition’, *Oncology Letters*, 16(5), pp. 6361–6368. Available at: <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9433>.

Weller, M. *et al.* (2021) ‘EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood’, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 18(3), pp. 170–186. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41571-020-00447-z>.

Weng, Y. *et al.* (2016) ‘Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling’, *Analyst*, 141(15), pp. 4640–4646. Available at: <https://doi.org/10.1039/c6an00892e>.

Wesolowski, J.R., Rajdev, P. and Mukherji, S.K. (2010) ‘Temozolomide (Temodar)’, *American Journal of Neuroradiology*, 31(8), pp. 1383–1384. Available at: <https://doi.org/10.3174/ajnr.A2170>.

Wieczorek, A.J. *et al.* (1987) ‘Diagnostic and prognostic value of RNA-proteolipid in sera of patients with malignant disorders following therapy: first clinical evaluation of a novel tumor marker.’, *Cancer research*, 47(23), pp. 6407–12.

Willms, E. *et al.* (2018) ‘Extracellular vesicle heterogeneity: Subpopulations, isolation techniques, and diverse functions in cancer progression’, *Frontiers in Immunology*, 9(APR). Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00738>.

World Health Organization (2020) ‘Global Health Estimates 2019: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019. Geneva, World Health Organization; 2020.’

- Wortzel, I. *et al.* (2019) 'Exosome-Mediated Metastasis: Communication from a Distance', *Developmental Cell*, 49(3), pp. 347–360. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.04.011>.
- Wu, D. *et al.* (2019) 'Profiling surface proteins on individual exosomes using a proximity barcoding assay', *Nature Communications*, 10(1), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11486-1>.
- Wu, X. *et al.* (2012) 'De novo sequencing of circulating miRNAs identifies novel markers predicting clinical outcome of locally advanced breast cancer', *Journal of Translational Medicine*, 10(1), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-42>.
- Xie, F. *et al.* (2019) 'Extracellular Vesicles in Cancer Immune Microenvironment and Cancer Immunotherapy', *Advanced Science*, 6(24). Available at: <https://doi.org/10.1002/advs.201901779>.
- Xing, A.Y. *et al.* (2021) 'Identification of miRNA Signature in Breast Cancer to Predict Neoadjuvant Chemotherapy Response', *Pathology and Oncology Research*, 27(April), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.3389/pore.2021.1609753>.
- Yamashita, J. and McCauley, L.K. (2006) 'The Activating Protein-1 Transcriptional Complex: Essential and Multifaceted Roles in Bone', *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*, 4(2), pp. 107–122. Available at: <https://doi.org/10.1385/BMM:4:2:107>.
- Yan, H. *et al.* (2021) 'Advances in Analytical Technologies for Extracellular Vesicles', *Analytical Chemistry*, 93(11), pp. 4739–4774. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00693>.
- Yan, L.X. *et al.* (2008) 'MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis', *Rna*, 14(11), pp. 2348–2360. Available at: <https://doi.org/10.1261/rna.1034808>.
- Yang, H. *et al.* (2012) 'IDH1 and IDH2 mutations in tumorigenesis: Mechanistic insights and clinical perspectives', *Clinical Cancer Research*, 18(20), pp. 5562–5571. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1773>.
- Yau, C. *et al.* (2022) 'Residual cancer burden after neoadjuvant chemotherapy and long-term survival outcomes in breast cancer: a multicentre pooled analysis of 5161 patients', *The Lancet Oncology*, 23(1), pp. 149–160. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00589-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00589-1).
- Ye, X. *et al.* (2014) 'Mir-221 promotes trastuzumab-resistance and metastasis in her2-positive breast cancers by targeting PTEN', *BMB Reports*, 47(5), pp. 268–273. Available at: <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2014.47.5.165>.

- Yen, K. *et al.* (2017) 'AG-221, a first-in-class therapy targeting acute myeloid leukemia harboring oncogenic IDH2 mutations', *Cancer Discovery*, 7(5), pp. 478–493. Available at: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-1034>.
- Ying, X. *et al.* (2016) 'Epithelial ovarian cancer-secreted exosomal miR-222-3p induces polarization of tumor-associated macrophages', *Oncotarget*, 7(28), pp. 43076–43087. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9246>.
- Yu, S. *et al.* (2022) 'Mesenchymal stem cell-derived exosome mir-342-3p inhibits metastasis and chemo-resistance of breast cancer through regulating ID4', *Genes & Genomics*, 44(5), pp. 539–550. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13258-021-01200-1>.
- Yuan, T. *et al.* (2016) 'Plasma extracellular RNA profiles in healthy and cancer patients', *Scientific Reports*, 6(August 2015), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep19413>.
- Yuana, Y., Sturk, A. and Nieuwland, R. (2013) 'Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions', *Blood Reviews*, 27(1), pp. 31–39. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.blre.2012.12.002>.
- Zarovni, N. *et al.* (2015) 'Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches', *Methods*, 87(June), pp. 46–58. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.05.028>.
- Zhang, H. *et al.* (2018) 'Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation', *Nature Cell Biology*, 20(3), pp. 332–343. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0040-4>.
- Zhang, S. *et al.* (2020) 'Serum miR-222-3p as a Double-Edged Sword in Predicting Efficacy and Trastuzumab-Induced Cardiotoxicity for HER2-Positive Breast Cancer Patients Receiving Neoadjuvant Target Therapy', *Frontiers in Oncology*, 10(April), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00631>.
- Zhang, S., Xiong, X. and Sun, Y. (2020) 'Functional characterization of SOX2 as an anticancer target', *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00242-3>.
- Zhang, Z. *et al.* (2020) 'Exosomal miR-1246 and miR-155 as predictive and prognostic biomarkers for trastuzumab-based therapy resistance in HER2-positive breast cancer', *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 86(6), pp. 761–772. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00280-020-04168-z>.

Zülch, K. (1979) *Histological typing of tumours of the central nervous system*. 1st editio. Geneva: World Health Organization (WHO).

## 8. Anexos

Anexo A. Tablas para la determinación del estadio tumoral en los tumores de mama.....	i
Anexo B. miARNs incluidos y distribución de estos en las diferentes placas de ensayo del análisis en biopsia líquida en cáncer de mama.....	iii
Anexo C. Resultados de los miARNs en biopsia líquida en cáncer de mama con p valor > 0,05 y < 0,1. ....	vi
Anexo D. Resultados de los análisis de las variables de confusión del en las diferentes cohortes cohortes de cáncer de mama.....	viii

### Anexo A. Tablas para la determinación del estadio tumoral en los tumores de mama

**Tabla A 8.1** Detalle de la determinación de la numeración “T” de los tumores de mama según la clasificación TNM.

Categoría	Subcategoría	Criterio/Definición
TX		No se puede establecer el tamaño del tumor primario
T0		No hay evidencias de tumor primario
Tis (CDIS)		Carcinoma ductal <i>In situ</i>
Tis (Paget)		Enfermedad de Paget de la mama sin tumoración adyacente.
T1		Tamaño tumoral ≤ 20 mm
	T1mi	Tamaño tumoral ≤ 1 mm
	T1a	Tamaño tumoral > 1 mm; ≤ 5 mm
	T1b	Tamaño tumoral > 5 mm; ≤ 10 mm
	T1c	Tamaño tumoral > 10 mm; ≤ 20 mm
T2		Tamaño tumoral > 20 mm; ≤ 50 mm
T3		Tamaño tumoral > 50 mm
T4		Tumores de cualquier tamaño con extensión a la pared torácica y/o a la piel.
	T4a	Extensión a pared torácica
	T4b	Ulceración/presencia macroscópica de nódulos satélites/edema (piel de naranja).
	T4c	Presenta T4a y T4b.
	T4d	Carcinoma inflamatorio.

**Tabla A 8.2** Detalle de la determinación de la numeración “N” de los tumores de mama según la clasificación TNM.

Categoría	Subcategoría	Criterio/Definición
NX		No se puede establecer la afectación ganglionar
N0		No se identifica metástasis en los nódulos linfáticos regionales
	N0(i+)	Se identifican clústeres de células tumorales aislados (CTA); clústeres < 0.2 mm
	N0(mol+)	Se encuentran evidencias tumorales por RT-PCR; No se encuentran CTA
N1		Micrometástasis o metástasis en 1 - 3 ganglios linfáticos axilares
	N1(mi)	Micrometástasis (200 células aprox., > 0.2 mm; < 2.0 mm)
	N1a	Metástasis en 1 - 3 nódulos linfáticos axilares; mínimo una metástasis > 2.0 mm

	N1b	Metástasis en nódulos ipsilaterales mamarios internos, no CTA
	N1c	Presencia de N1a y N1b
N2		Metástasis en 4 - 9 ganglios axilares o nódulos ipsilaterales mamarios positivos por imagen
	N2a	Metástasis en 4 - 9 ganglios axilares (mínimo una metástasis > 2.0 mm
	N2b	Metástasis por imagen en nódulos internos mamarios. Ganglios axilares negativos
N3		Metástasis en 10 o más nódulos linfáticos axilares o en ganglios infraclaviculares o uno o más nódulos internos ipsilaterales positivos por imagen o 3 o más nódulos axilares y micro o macrometástasis por biopsia en nódulos centinela o en nódulos supraclaviculares
	N3a	Metástasis en 10 o más ganglios linfáticos axilares (mínimo una metástasis > 2.0 mm) o metástasis en los nódulos infraclaviculares
	N3b	N1a o N2a con presencia de nódulos mamarios internos por imagen o N2a con N1b
	N3c	Metástasis en los nódulos ipsilaterales supraclaviculares

**Tabla A 8.3** Detalle de la determinación de la numeración “M” de los tumores de mama según la clasificación TNM.

Categoría	Criterio/Definición
M0	No hay evidencias clínicas ni patológicas que prueben metástasis distantes
M1	Metástasis distantes por imagen o histología o metástasis en nódulos no regionales (> 2,0 mm)

**Tabla A 8.4** Detalle de la determinación del estadio patológico de los tumores de mama según la clasificación TNM.

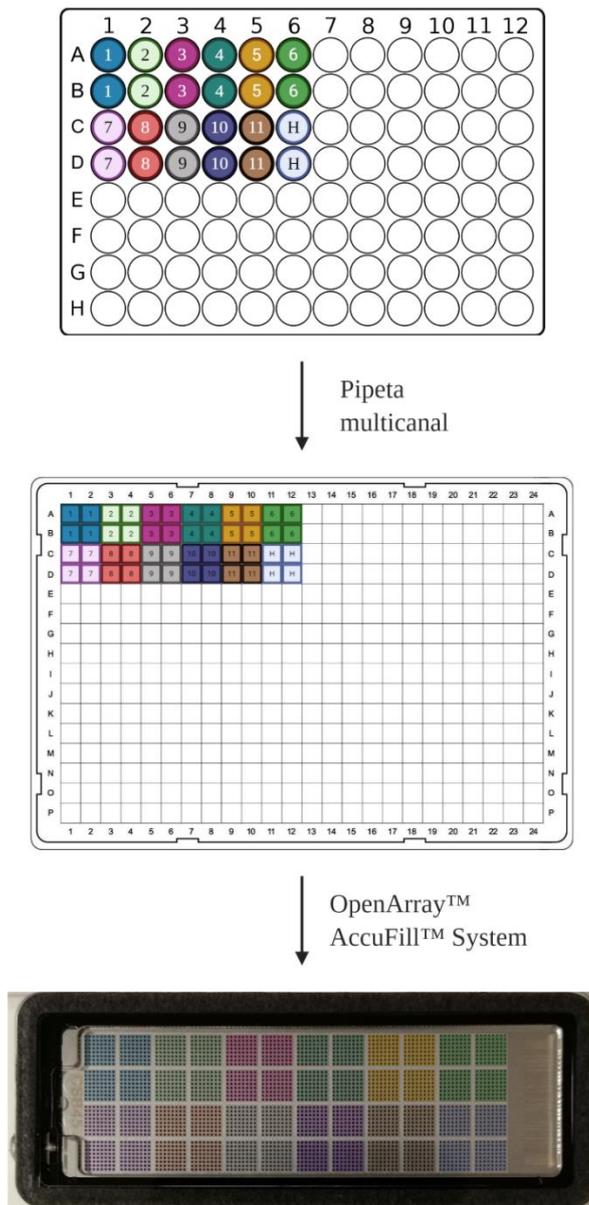
T	N	M	Grupo
Tis	N0	M0	0
T1	N0	M0	IA
T0	N1mi	M0	IB
T1	N1mi	M0	IB
T0	N1	M0	IIA
T1	N1	M0	IIA
T2	N0	M0	IIA
T2	N1	M0	IIB
T3	N0	M0	IIB
T0	N2	M0	IIIA
T1	N2	M0	IIIA
T2	N2	M0	IIIA
T3	N1	M0	IIIA
T3	N2	M0	IIIA
T4	N0	M0	IIIB
T4	N1	M0	IIIB
T4	N2	M0	IIIB
T-	N3	M0	IIIC
T-	N-	M1	IV

**Anexo B.** miARNs incluidos y distribución de estos en las diferentes placas de ensayo del análisis en biopsia líquida en cáncer de mama.

**Tabla A 8.5** Detalle de los miARNs incluidos en el array del proyecto de cáncer de mama. Se detallan los posibles controles endógenos sugeridos por la casa comercial (ThermoFisher) y los spike-in.

Nº	miRNA	Función
1	477916_mir_hsa-miR-145-5p	Objetivo
2	477975_mir_hsa-miR-21-5p	Objetivo
3	477973_mir_hsa-miR-21-3p	Objetivo
4	477957_mir_hsa-miR-195-5p	Objetivo
5	478575_mir_hsa-let-7a-5p	Objetivo
6	477967_mir_hsa-miR-205-5p	Objetivo
7	477982_mir_hsa-miR-222-3p	Objetivo
8	477981_mir_hsa-miR-221-3p	Objetivo
9	478778_mir_hsa-miR-221-5p	Objetivo
10	478576_mir_hsa-let-7b-5p	Objetivo
11	479241_mir_hsa-miR-10a-5p	Objetivo
12	477851_mir_hsa-miR-130a-3p	Objetivo
13	478008_mir_hsa-miR-30c-5p	Objetivo
14	477935_mir_hsa-miR-182-5p	Objetivo
15	477887_mir_hsa-miR-126-3p	Objetivo
16	477888_mir_hsa-miR-126-5p	Objetivo
17	478043_mir_hsa-miR-342-3p	Objetivo
18	477857_mir_hsa-miR-181a-5p	Objetivo
19	479405_mir_hsa-miR-181a-3p	Objetivo
20	477934_mir_hsa-miR-181c-5p	Objetivo
21	478130_mir_hsa-miR-489-3p	Objetivo
22	478074_mir_hsa-miR-375	Objetivo
23	477956_mir_hsa-miR-194-5p	Objetivo
24	478078_mir_hsa-miR-382-5p	Objetivo
25	478459_mir_hsa-miR-376c-3p	Objetivo
26	478086_mir_hsa-miR-411-5p	Objetivo
27	479401_mir_hsa-miR-30c-2-3p	Objetivo
28	478216_mir_hsa-miR-99b-3p	Objetivo
29	478388_mir_hsa-miR-30e-3p	Objetivo
30	477995_mir_hsa-miR-26a-5p	Objetivo
31	477927_mir_hsa-miR-155-5p	Objetivo
32	477926_mir_hsa-miR-155-3p	Objetivo
33	478073_mir_hsa-miR-373-5p	Objetivo
34	478363_mir_hsa-miR-373-3p	Objetivo
35	478494_mir_hsa-miR-10b-5p	Objetivo
36	477868_mir_hsa-miR-10b-3p	Objetivo
37	477998_mir_hsa-miR-27a-5p	Objetivo
38	478384_mir_hsa-miR-27a-3p	Objetivo

<b>Nº</b>	<b>miRNA</b>	<b>Función</b>
39	477863_mir_hsa-miR-101-3p	Objetivo
40	478620_mir_hsa-miR-101-5p	Objetivo
41	478854_mir_hsa-miR-372-5p	Objetivo
42	478071_mir_hsa-miR-372-3p	Objetivo
43	477881_mir_hsa-miR-1246	Objetivo
44	477912_mir_hsa-miR-143-3p	Objetivo
45	478537_mir_hsa-miR-378e	Objetivo
46	477970_mir_hsa-miR-210-3p	Objetivo
47	480635_mir_hsa-miR-1266-5p	Objetivo
48	478048_mir_hsa-miR-34a-5p	Objetivo
49	478551_mir_hsa-miR-18a-5p	Objetivo
50	477910_mir_hsa-miR-142-3p	Objetivo
51	478293_mir_cel-miR-39-3p	<i>Spike-in</i>
52	478411_mir_ath-miR-159a	<i>Spike-in</i>
53	478594_mir_hsa-miR-320a	Control endógeno
54	478090_mir_hsa-miR-423-5p	Control endógeno
55	478644_mir_hsa-miR-1228-5p	Control endógeno
56	478308_mir_hsa-miR-484	Control endógeno



**Figura A 8.1** Esquema de la distribución de las muestras en las placas de 96 y 384 pocillos y su disposición final en las matrices OpenArray™.

**Anexo C.** Resultados de los miARNs en biopsia líquida en cáncer de mama con p valor > 0,05 y < 0,1.

**Tabla A 8.6** Resultados del análisis de la comparativa de expresiones relativas y del posterior análisis *in silico* y enriquecimiento de genes de los diferentes miARNs que resultaron tener una capacidad discriminativa significativa entre pacientes R y NR a la neoadyuvancia en los diferentes fenotipos y en la cohorte entera.

Fenotipo	miARN	p-valor	Estadístico	Expresión R vs NR	Procesos implicados en procesos biológicos relevantes en cáncer y relacionados con el miARN	Genes regulados por el miARN que actúan en los 3 procesos
<b>Global</b>	miR-145-5p	0,0708	U-Mann	↑	Regulación positiva migración celular. Vía señalización ErbB. Neoplasias mamarias.	<i>PTK2/FAK1</i> <i>EGFR</i>
	miR-194-5p	0,0677	U-Mann	↑	Metabolismo de fármacos. Vías tumorigénicas. Regulación negativa ciclo celular.	<i>PTGS2/COX-2</i> <i>MYC</i> <i>JUN</i>
<b>LumB HER2</b>	miR-130a-3p	0,0778	t-test	↓	Regulación negativa ciclo celular. Vía ErbB. Neoplasias mamarias.	<i>CDKN1B</i> <i>HRAS</i>
<b>HER2 LumB HER2</b>	miR-145-5p	0,059	t-test	↑	Regulación positiva migración celular. Vía señalización ErbB. Neoplasias mamarias.	<i>PTK2/FAK1</i> <i>EGFR</i>
	miR-221-3p	0,0679	t-test	↓	Regulación negativa muerte celular programada. Vías tumorigénicas. Neoplasias mamarias.	<i>CDKN1B</i> <i>PIK3R1</i> <i>TP53</i> <i>IL6</i>

Fenotipo	miARN	p-valor	Estadístico	Expresión R vs NR	Procesos implicados en procesos biológicos relevantes en cáncer y relacionados con el miARN	Genes regulados por el miARN que actúan en los 3 procesos
<b>HER2 LumB HER2</b>	miR-222-3p	0,0775	U-Mann	↑	Muerte celular programada. Regulación negativa proliferación celular. Neoplasias mamarias y metástasis.	<i>MYC</i> <i>TP53</i>
<b>HER2</b>	-	-	-		---	-
<b>TN</b>	mir-142-3P	0,0564	U-Mann	↓	Regulación negativa proliferación celular. Regulación positiva ciclo celular. Vías tumorigénicas.	<i>PRKCA</i>
	mir-21-5p	0,0801	t-test	↑	Regulación negativa ciclo celular. Detención ciclo celular. Neoplasias mamarias.	<i>BIRC5/SURVIVINA</i>
	miR-26a-5p	0,067	U-Mann	↑	Regulación negativa apoptosis. Detención ciclo celular. Neoplasias mamarias.	<i>MIF</i> <i>ATM</i> <i>BIRC5/SURVIVINA</i> <i>BARD1</i>
	miR-342-3p	0,0892	U-Mann	↑	Regulación negativa proliferación celular. Regulación positiva diferenciación celular. Vías tumorigénicas.	<i>JUN</i> <i>GLI3</i> <i>ITGB1</i>

Nota: Las flechas verdes (hacia arriba) significan sobreexpresión. Las flechas rojas (hacia abajo) significan expresión disminuida.

**Anexo D.** Resultados de los análisis de las variables de confusión del en las diferentes cohortes cohortes de cáncer de mama.

**Tabla A 8.7** Estudio de las variables de confusión continuas de la cohorte entera del proyecto de biopsia líquida en cáncer de mama.

<b>Variables continuas</b>	<b>Biogrupo</b>	<b>Media/DE<sup>a</sup></b>	<b>p-Valor</b>	<b>Estadístico</b>
Edad	R	52,10/10,98	0,535	T-test
	NR	50,84/12,2		
Peso	R	69,06/12,05	0,529	U Mann-Whitney
	NR	70,62/13,29		
Altura	R	159,5/7,23	0,152	T-test
	NR	161,7/8,11		
Tamaño tumor al diagnóstico	R	30,61/20,95	0,070	U Mann-Whitney
	NR	33,51/13,23		
<b>Variables binarias</b>	<b>Biogrupo</b>	<b>Proporción Sí/No</b>	<b>p-Valor</b>	<b>Estadístico</b>
Antecedentes oncológicos	R	55/29	0,850	Fisher
	NR	30/18		
Antecedentes gestacionales	R	68/14	>0,999	Fisher
	NR	37/8		
Menopausia	R	44/40	0,362	Fisher
	NR	20/27		
Diabetes	R	6/80	>0,999	Fisher
	NR	3/47		
HTA	R	15/71	0,819	Fisher
	NR	10/40		
Hiperlipemia	R	8/78	>0,999	Fisher
	NR	5/45		
Tiroidismo	R	4/82	0,288	Fisher
	NR	5/45		

*Nota:* N = 137; R: pacientes respondedoras al tratamiento de quimioterapia neoadyuvante, NR: pacientes no respondedoras al tratamiento de quimioterapia neoadyuvante

<sup>a</sup> Desviación estándar.

**Tabla A 8.8** Estudio de las variables de confusión continuas de la cohorte HER2 del proyecto de biopsia líquida en cáncer de mama.

<b>Variables continuas</b>	<b>Biogrupo</b>	<b>Media/DE<sup>a</sup></b>	<b>p-Valor</b>	<b>Estadístico</b>
Edad	R	52,14/9,98	0,771	T-test
	NR	53,27/11,48		
Peso	R	69,67/12,39	0,386	U Mann-Whitney
	NR	66,90/14,75		
Altura	R	158,5/8,80	0,191	T-test
	NR	162,7/6,36		
Tamaño tumor al diagnóstico	R	27,86/13,85	0,095	U Mann-Whitney
	NR	34,18/13,83		
<b>Variables binarias</b>	<b>Biogrupo</b>	<b>Proporción Sí/No</b>	<b>p-Valor</b>	<b>Estadístico</b>
Antecedentes oncológicos	R	14/8	0,714	Fisher
	NR	6/5		
Antecedentes gestacionales	R	14/8	0,704	Fisher
	NR	5/4		
Menopausia	R	13/8	0,701	Fisher
	NR	5/5		
Diabetes	R	3/19	0,534	Fisher
	NR	0/11		
HTA	R	4/18	>0,999	Fisher
	NR	2/9		
Hiperlipemia	R	3/19	0,199	Fisher
	NR	0/11		
Tiroidismo	R	6/16	0,077	Fisher
	NR	0/11		

*Nota:* N = 33; R: pacientes respondedoras al tratamiento de quimioterapia neoadyuvante, NR: pacientes no respondedoras al tratamiento de quimioterapia neoadyuvante

<sup>a</sup> Desviación estándar.

**Tabla A 8.9** Estudio de las variables de confusión continuas de la cohorte TN del proyecto de biopsia líquida en cáncer de mama.

<b>Variables continuas</b>	<b>Biogrupo</b>	<b>Media/DE<sup>a</sup></b>	<b>p-Valor</b>	<b>Estadístico</b>
Edad	R	49,89/12,18	0,524	T-test
	NR	52,04/13,33		
Peso	R	68,44/10,81	0,233	T-test
	NR	72,44/12,02		
Altura	R	159,7/6,95	0,633	T-test
	NR	160,7/7,38		
Tamaño tumor al diagnóstico	R	35,59/27,58	0,929	U Mann-Whitney
	NR	32,32/11,41		
<b>Variables binarias</b>	<b>Biogrupo</b>	<b>Proporción Sí/No</b>	<b>p-Valor</b>	<b>Estadístico</b>
Antecedentes oncológicos	R	25/10	>0,999	Fisher
	NR	15/7		
Antecedentes gestacionales	R	25/10	0,330	Fisher
	NR	18/3		
Menopausia	R	16/19	>0,999	Fisher
	NR	10/12		
Diabetes	R	2/35	>0,999	Fisher
	NR	2/21		
HTA	R	8/29	>0,999	Fisher
	NR	6/17		
Hiperlipemia	R	4/33	0,642	Fisher
	NR	1/21		
Tiroidismo	R	2/35	0,362	Fisher
	NR	3/20		

*Nota:* N = 60; R: pacientes respondedoras al tratamiento de quimioterapia neoadyuvante, NR: pacientes no respondedoras al tratamiento de quimioterapia neoadyuvante

<sup>a</sup> Desviación estándar.

**Tabla A 8.10** Estudio de las variables de confusión continuas de la cohorte LumB HER2 del proyecto de biopsia líquida en cáncer de mama.

<b>Variables continuas</b>	<b>Biogrupo</b>	<b>Media/DE<sup>a</sup></b>	<b>p-Valor</b>	<b>Estadístico</b>
Edad	R	55,00/9,66	0,022*	T-test
	NR	47,44/10,91		
Peso	R	69,36/13,64	0,391	U Mann-Whitney
	NR	71,00/14,46		
Altura	R	160,2/6,26	0,464	T-test
	NR	162,3/10,85		
Tamaño tumor al diagnóstico	R	26,18/13,17	0,064	U Mann-Whitney
	NR	34,69/15,7		
<b>Variables binarias</b>	<b>Biogrupo</b>	<b>Proporción Sí/No</b>	<b>p-Valor</b>	<b>Estadístico</b>
Antecedentes oncológicos	R	16/11	>0,999	Fisher
	NR	9/6		
Antecedentes gestacionales	R	25/2	0,330	Fisher
	NR	12/3		
Menopausia	R	15/13	0,336	Fisher
	NR	10/15		
Diabetes	R	1/26	>0,999	Fisher
	NR	1/15		
HTA	R	3/24	>0,999	Fisher
	NR	2/14		
Hiperlipemia	R	3/24	>0,999	Fisher
	NR	2/14		
Tiroidismo	R	0/27	0,133	Fisher
	NR	2/14		

*Nota:* N = 44; R: pacientes respondedoras al tratamiento de quimioterapia neoadyuvante, NR: pacientes no respondedoras al tratamiento de quimioterapia neoadyuvante

<sup>a</sup> Desviación estándar.

\* Valores estadísticamente significativos

**Tabla A 8.11** Estudio de las variables de confusión continuas de la cohorte HER2 LumB HER2 del proyecto de biopsia líquida en cáncer de mama.

<b>Variables continuas</b>	<b>Biogrupo</b>	<b>Media/DE<sup>a</sup></b>	<b>p-Valor</b>	<b>Estadístico</b>
Edad	R	53,74/9,80	0,117	T-test
	NR	49,81/11,31		
Peso	R	69,50/12,94	0,933	U Mann-Whitney
	NR	69,05/14,39		
Altura	R	159,4/7,48	0,146	T-test
	NR	162,5/8,78		
Tamaño tumor al diagnóstico	R	26,92/13,36	0,009*	U Mann-Whitney
	NR	34,48/14,69		
<b>Variables binarias</b>	<b>Biogrupo</b>	<b>Proporción Sí/No</b>	<b>p-Valor</b>	<b>Estadístico</b>
Antecedentes oncológicos	R	30/19	0,808	Fisher
	NR	15/11		
Antecedentes gestacionales	R	41/7	0,518	Fisher
	NR	19/5		
Menopausia	R	28/21	0,220	Fisher
	NR	10/15		
Diabetes	R	4/45	0,650	Fisher
	NR	1/26		
HTA	R	7/42	>0,999	Fisher
	NR	4/23		
Hiperlipemia	R	4/45	0,444	Fisher
	NR	4/23		
Tiroidismo	R	2/47	0,612	Fisher
	NR	2/25		

*Nota:* N = 77; R: pacientes respondedoras al tratamiento de quimioterapia neoadyuvante, NR: pacientes no respondedoras al tratamiento de quimioterapia neoadyuvante

<sup>a</sup> Desviación estándar.

\* Valores estadísticamente significativos

**Anexo E.** Comparativa de los resultados de la detección de la mutación *IDH1*<sup>R132H</sup> obtenidos con la combinación de las técnicas *TT-fast-COLD-PCR* y *DGL-Tech*<sup>TM</sup> en biopsia líquida con los resultados de la tinción contra *IDH1* R132H mediante *IHQ* en tejido.

**Tabla A 8.12** Resultados del análisis comparativo entre la combinación de *TT-fast-COLD-PCR* y *DGL-Tech*<sup>TM</sup> en biopsia líquida y la tinción por *IHQ* en tejido parafinado en la detección de la mutación *R132H* en *IDH1*.

	<b>IHQ+</b>	<b>IHQ-</b>	
<b>M+</b>	2	1	3
<b>M-</b>	17	52	69
<b>Total</b>	20	55	72
<b>Sensibilidad:</b>	10,53%	<b>VPP:</b>	66,67%
<b>Especificidad:</b>	98,11%	<b>VPN:</b>	75,36%

VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo