



Laboratorio de
Biomarcadores
Moleculares



HOSPITAL DE CLINICAS
Dr. Manuel Quintela



Institut Pasteur
de Montevideo



CATEDRA DE ONCOLOGÍA CLÍNICA
LIBERAR + AYUDAR



AGENCIA NACIONAL
DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN

Evaluación de pequeños ARN circulantes como potenciales biomarcadores en cáncer de pulmón

Tesis de Maestría PRO.IN.BIO
Dra. Virginia Rodríguez Sande

Orientadores: Prof. Dr. Alfonso Cayota
Prof. Agdo. Dr. Mauricio Cuello
Asesor: Prof. Agdo. Dr. Sergio Bianchi

Laboratorio de Biomarcadores Moleculares del Hospital de Clínicas Dr. Manuel Quintela

Laboratorio de Genómica Funcional del Institut Pasteur de Montevideo

Tribunal: Dra. María Rosa García-Silva
Prof. Agda. Dra. Nora Artagaveytia
Prof. Agda. Dra. Sofia Grille



Programa para la Investigación Biomédica

Índice

Resumen

1. Introducción

2. Objetivos

3. Materiales y métodos

4. Resultados

5. Discusión

6. Conclusiones y perspectivas

7. Agradecimientos

8. Bibliografía

Resumen

El cáncer broncopulmonar es primero en mortalidad por cáncer, debido en parte al diagnóstico tardío, su agresividad inherente y la falta de marcadores específicos predictores de la respuesta a los tratamientos. Esto apoya la búsqueda de estrategias accesibles y poco invasivas para su detección precoz. Los pequeños ARN no codificantes (sRNA, del inglés *small*) son reguladores de la expresión génica involucrados en múltiples procesos biológicos, cuya expresión aberrante puede tener un rol central en la carcinogénesis. Estos pueden ser secretados al medio extracelular, circulando de forma estable en sangre y otros fluidos, donde son captados por células adyacentes o a distancia con funciones conservadas. Recientemente, se describieron nuevas clases de sRNA como las mitades derivadas de ARN de transferencia (tRNA-h, del inglés *halves*) y los Y-RNA (Y-ARN, nomenclatura universal en inglés). Su secreción al medio extracelular se ha vinculado a distintas respuestas regulatorias frente al estrés celular. El objetivo de este estudio fue caracterizar sRNA circulantes, 5'tRNA-h-Gly, 5'tRNA-h-Glu e Y4-RNA, como potenciales biomarcadores circulantes en el diagnóstico de cáncer de pulmón. Relacionar estos biomarcadores con determinadas características de la enfermedad. Los niveles de expresión relativa de cada marcador se cuantificaron mediante RT-qPCR, se construyeron curvas ROC para definir su valor como test diagnóstico. Se reclutaron 40 pacientes con cáncer de pulmón y 20 controles. Se observó una expresión tres veces mayor de 5'tRNA-h-Gly circulante en pacientes con cáncer broncopulmonar en comparación con controles. Solo este fragmento se comportó como un potencial biomarcador circulante diagnóstico con significancia estadística. Este fue un mejor biomarcador en estadios avanzados de la enfermedad, lo que no pudo demostrarse para estadios precoces. Se observó una fuerte tendencia al aumento de las 5'tRNA-h-Gly en cáncer de pulmón no células pequeñas y de los 5'tRNA-h-Glu en tumores de células pequeñas. Es el primer estudio en analizar el rol de las 5'tRNA-h-Gly, 5'tRNA-h-Glu y Y4-RNA como biomarcadores circulantes en el diagnóstico de cáncer broncopulmonar. Este es un tema que requiere mayor desarrollo, por lo que las primeras aproximaciones pueden ayudar a comprender mejor su rol como moléculas circulantes y sentar las bases para estudios a mayor escala, venciendo las dificultades encontradas hasta el momento. La capacidad diagnóstica de los fragmentos estudiados debe ser analizada en una cohorte de validación con un mayor tamaño. Consideramos importante realizar en una siguiente etapa secuenciado masivo de sRNA en suero de muestras seleccionadas con el fin de identificar nuevos sRNA candidatos que no fueron analizados en este estudio.

Palabras clave: Cáncer de pulmón – Pequeños ARN – Biomarcadores

1. Introducción

Resultados derivados a partir del Proyecto del Genoma Humano publicado en 2001, donde se logró por primera vez su secuenciación completa, aportaron grandes avances en el campo de la biología molecular. De los tres mil millones de pares de bases que comprenden el genoma existe un número relativamente pequeño de genes que codifican para proteínas (entre 25.000-30.000), que representan aproximadamente un 2% del genoma (1). Durante muchos años se consideró a esta porción no codificante del genoma humano como “ADN vestigial o basura” (*junk DNA* en inglés), sin funciones relevantes conocidas (2). Sin embargo, el proyecto ENCODE en 2012 indicó que al menos 80% del genoma humano es transcripcionalmente activo, incluyendo elementos regulatorios *cis* y *trans*, intrones, pseudogenes, secuencias repetidas y telómeros. De este modo, una porción mayor del mismo es transcrito a ARN que no codifica para proteínas (ARN no codificante o ncRNA en inglés) con funciones elementales en la expresión génica (3). Así, el transcriptoma, es definido como el conjunto de todas las moléculas de ARN (transcriptos) presentes en una célula o grupo de células en un momento dado. Comprende una fracción minoritaria de ARN mensajeros (mRNA en inglés), ncRNA constitutivos como los ARN ribosomales (rRNA en inglés) y ARN de transferencia (tRNA en inglés), más abundantes, conocidos y caracterizados; pero también una fracción menor de transcriptos regulatorios, los pequeños ARN no codificantes (sRNA por *small* en inglés) y ARN no codificantes largos, clasificados según su longitud de 18 a 200 nt (nucleótidos) o mayor a 200 nt respectivamente (1). Estos sRNA regulatorios son a los cuales nos referiremos en este trabajo.

1.1 Pequeños ARN no codificantes

En las últimas dos décadas el estudio de los ncRNA regulatorios ha cobrado mayor interés. Progresos en el conocimiento sobre su biogénesis y funciones permitieron observar un rol fundamental en casi todas las vías biológicas conocidas, implicándolos de este modo en múltiples patologías, como el cáncer (1,4). Sus funciones regulatorias a nivel de procesos celulares tan relevantes como la diferenciación, proliferación y muerte celular, la organización de la cromatina y la integridad del genoma, hacen difícil no imaginar un posible vínculo de estos transcriptos con la carcinogénesis y la progresión tumoral (1,4,5).

La familia de los sRNA regulatorios se ha expandido recientemente gracias a la posibilidad de realizar estudios a gran escala del transcriptoma. Clásicamente, se incluían en ella los microARN (miRNA), pequeños ARN de interferencia (siRNA del inglés *small interference*), pequeños ARN nucleares (snRNA), pequeños ARN nucleolares (snoRNA), y ARN interactuantes con Piwi (piRNA) (4,6–8).

El desarrollo del secuenciado de nueva generación (NGS, del inglés *next generation sequencing*) y nuevas tecnologías de bioinformática permitió el descubrimiento de nuevas clases de sRNA, aumentando el nivel de complejidad de este campo. Estos son sRNA de entre 20 y 40 nt que derivan mayoritariamente de moléculas con funciones canónicas preexistentes como los rRNA y los tRNA. Los mismos, han sido reconocidos como mediadores clave en la regulación de la expresión de genes a nivel transcripcional y postranscripcional, aunque queda mucho por caracterizar y comprender sobre ellos (4,6–8).

1.2 microARN y cáncer

Los miembros más estudiados de la familia de sRNA son los miRNA. Constituyen la porción predominante entre los de 18 a 25 nt a nivel intracelular, aproximadamente un 1 a 5% de todos los genes del genoma animal, lo que los hace una de las clases de reguladores de la expresión génica más abundantes dentro de la célula (1,7). Se cree que podrían regular más de 30% de los genes codificantes para proteínas por un mecanismo postranscripcional (1,7).

Dada su estructura pequeña pero compleja, un solo miRNA tendría cientos de ARNm como blanco, mientras que múltiples miRNA podrían regular el mismo blanco. La mayoría de los genes constitutivos están bajo presiones selectivas para evitar la regulación mediada por los miRNA (9). En contraste, los genes involucrados en procesos de desarrollo, proliferación celular, apoptosis, metabolismo, diferenciación celular y morfogénesis están enriquecidos de sitios de unión para estos transcritos. Por ello, cuando sus funciones biológicas fueron más claras, se pudo observar que su desregulación puede influir tanto en la iniciación como en la progresión tumoral y proceso metastásico (4,10). En uno de los primeros trabajos publicados que relacionan los miRNA y cáncer se demostró que aproximadamente 50% de los genes humanos que codifican para miRNA conocidos están localizados en sitios frágiles frecuentemente alterados en el cáncer. Posteriormente, se distinguieron diferentes firmas de miRNA entre tejido peritumoral normal y tejido tumoral en distintos tipos de cáncer (4,10). Actualmente, es ampliamente aceptado que los miRNA pueden promover o suprimir procesos tumorales de forma similar a los clásicos oncogenes y genes supresores de tumores dependiendo si se ve afectada su ganancia o pérdida de función, respectivamente. Esto los ha hecho fuente de estudio como nuevas terapias de blancos moleculares en cáncer (4,10). Varios miRNA tienen actividad tanto como oncogen como supresor tumoral dependiendo del tipo de cáncer o del contexto celular. Asimismo, se los ha vinculado al proceso metastásico y angiogénesis tumoral, incluyendo la regulación de la expresión de varias proteínas de adhesión, enzimas proteolíticas, factores de crecimiento, entre otros (11).

Respecto a su relación con el cáncer de pulmón, se cree que el humo de tabaco, compuesto por más de 70 carcinógenos bien establecidos, además de producir alteraciones mutagénicas y disfunciones a nivel epigenético (dadas principalmente por distintos perfiles de metilación del ADN y modificación de las histonas), podría alterar la expresión de los miRNA (9,12). Muchos de los miRNA desregulados en cáncer de pulmón se vieron asociados con el silenciamiento de genes supresores de tumores o regulación en más de oncogenes. Además, en varios trabajos los miRNA pudieron diferenciar distintos subtipos histológicos y estadios de cáncer de pulmón. Por lo que podrían tener valor pronóstico en cáncer broncopulmonar, por ejemplo, se ha observado que la expresión disminuida del miRNA let-7 se asoció de forma significativa con menor sobrevida. Asimismo, algunos miRNA se han asociado con resistencia a drogas utilizadas en oncología para el tratamiento de cáncer de pulmón, por ejemplo, el Cisplatino (9,12).

Más recientemente, varios reportes demostraron que los miRNA circulan en sangre y otros biofluidos, con estabilidad y resistencia a la degradación por RNAsas. Esto propició su estudio como biomarcadores circulantes tanto diagnósticos como pronósticos. Los niveles detectados de ciertos miRNA en suero fueron capaces de distinguir entre pacientes con cáncer y controles (13,14). En algunos casos perfiles específicos de miRNA se asociaron con diferente sobrevida libre de progresión. Distintas alteraciones de miRNA circulantes se han descrito en suero para pacientes con cáncer de pulmón, ovario, colorrecto, próstata y otra variedad de enfermedades, así como condiciones fisiológicas (1,4,13). Sin embargo, a pesar del gran número de publicaciones recientes sobre este tema, ningún biomarcador de miRNA circulante ha sido aún implementado en la práctica clínica, enfatizando así los desafíos asociados a este campo de investigación. Una de las dificultades hasta el momento es que la mayoría de los estudios apuntan a su potencial diagnóstico, pero se ha observado poca especificidad de los miRNA para un tipo de cáncer, en general el mismo miRNA se ve alterado en varios tumores. Una hipótesis es que podrían ser más útiles como biomarcadores del estatus de la enfermedad, como por ejemplo de la respuesta inmune antitumoral (14).

Hasta la fecha, numerosos miRNA han sido estudiados como posibles biomarcadores diagnósticos circulantes en cáncer de pulmón, muchos de ellos integrados en un conjunto de firmas moleculares o kits que intentan aumentar la validez diagnóstica. Mediante este método se ha alcanzado moderada sensibilidad y especificidad que rondan 78-87% y 75-81% respectivamente, según distintas series (9,12). A pesar de grandes esfuerzos para adaptar estos resultados a la práctica clínica, hasta el momento el mayor obstáculo ha sido la falta de reproducibilidad y estandarización de los diferentes estudios. Una de las razones podría ser una variabilidad interindividual de los niveles de miRNA en suero, y más importante la variación de aspectos técnicos entre los diferentes ensayos. Es importante destacar que pocas de estas

investigaciones han sido a gran escala, la mayoría se compone de un número limitado de casos (9,12,13). Uno de los estudios más grandes en cáncer de pulmón en plasma incluyó 870 pacientes sin cáncer de pulmón y 69 con cáncer de pulmón. Analizaron un conjunto de cuatro paneles con 24 miRNA identificados en un estudio previo para la determinación del riesgo de cáncer de pulmón en fumadores. Esta firma de miRNA alcanzó una sensibilidad de 87% y especificidad de 81% para la detección de cáncer de pulmón. Actualmente, existe un ensayo clínico con mayor número de pacientes donde buscan combinar esta firma con la tomografía computada de baja dosis como método de tamizaje (14,15).

En cuanto al estudio de miRNA como biomarcadores pronósticos circulantes, MiR-21 (elevado en cáncer de pulmón) y let-7 (regulado en menos en cáncer de pulmón) son los que tienen mayor evidencia y ambos son de mal pronóstico con pobre supervivencia (14). Dada la importancia fisiológica y la relativa simplicidad de su estructura, también se ha generado gran interés en utilizar estos pequeños transcriptos como blancos terapéuticos (9,13). La mayoría de las estrategias en estudio intentan bloquear la función del miRNA utilizando una inhibición clásica antisentido con oligonucleótidos sintéticos anti-miRNA. Existen estudios en etapa preclínica que necesitan mayor desarrollo, en los que buscan mejorar la capacidad de bloqueo, llegada al sitio de acción, vida media y reducción de la toxicidad. Sólo unos pocos han comenzado ensayos clínicos en etapa precoz (9,16).

1.3 Pequeños ARN derivados de tRNA

Los tRNA son ampliamente conocidos por su rol clave en la síntesis proteica al transferir las moléculas de aminoácidos a los ribosomas de forma específica, según la secuencia del ARNm. La misma es reconocida por un conjunto de tres nucleótidos presentes en el tRNA, denominado anticodón, que puede unirse a unos pocos codones específicos del ARNm indicando el aminoácido para el cual codifica. Posteriormente estos aminoácidos se unen por enlaces peptídicos para formar proteínas. Los tRNA son moléculas relativamente pequeñas de 70-80 nt que son transcriptos por la ARN polimerasa III como pre-tRNA. Tienen en su estructura un extremo 5' inicial y uno 3' final que son cortados durante su maduración por la ARNasa P y la ARNasa Z, respectivamente. Existen dos clases principales de sRNA derivados de tRNA, clasificados según su longitud relativa y biogénesis: los fragmentos derivados de tRNA (tRF) de 14 a 22 nt y las mitades derivadas de tRNA (tRNA-h del inglés *halves*) de 28 a 36 nt (4,7,17). Su biogénesis y clasificación se esquematiza en la Figura 1.

Aunque inicialmente fueron considerados como productos no específicos de degradación, los sRNA derivados de tRNA son ubicuos y altamente abundantes. Esta gran población de sRNA ha mostrado tener funciones regulatorias a nivel génico actuando a múltiples niveles en diferentes organismos, desde lo postranscripcional hasta lo traduccional. Actualmente, múltiples reportes indican que los sRNA derivados de tRNA juegan roles claves en diversos procesos biológicos bajo diferentes condiciones fisiológicas o patológicas incluyendo la regulación de la síntesis proteica, expresión génica, respuestas al estrés, respuestas inmunes, entre otras (5).

Si bien algunos de ellos se conocían, no se les había atribuido estas funciones hasta hace poco (7,17,18). Los sRNA derivados de tRNA pueden detectarse específicamente mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR) y también por *Northern blot*. Debido a su pequeño tamaño se debe tener mayor cuidado con el diseño de cebadores (*primers*) de amplificación específicos para poder distinguirlos de fragmentos de degradación aleatorios o de sus precursores (5).

1.3.1 Fragmentos derivados de tRNA

La generación de los tRF hace uso, en cierta medida, de la maquinaria necesaria para la maduración de las moléculas de tRNA. Se han descrito al menos tres subgrupos de tRF según la región del tRNA maduro o inmaduro de la que derivan, a partir de su zona de clivaje: a- incluye aquellos tRF derivados del extremo 5' de un tRNA maduro o inmaduro (5'-tRF). b- tRF originados por la acción de la ARNasa Z a partir de la

secuencia 3' final de los pre-tRNA, la misma termina con un tramo de uracilos que es la señal de terminación de la ARN polimerasa III (3'-U-tRF). c-tRF formados por fragmentos de ARN que terminan con una secuencia CCA característica de los tRNA maduros en su extremo 3' (3'-CCA-tRF). La producción de estos últimos fragmentos es dependiente de Dicer (ribonucleasa, miembro de la familia de ARNasa III). Los tRF se encuentran casi exclusivamente en el citoplasma de la célula, algunos son producidos a dicho nivel, Dicer-dependientes, y otros son exportados desde el núcleo luego de su generación, Dicer-independientes. A pesar de que continúan existiendo dudas respecto a la biogénesis de los tRF, los investigadores concuerdan en que no constituyen simples productos de degradación (4,5,7). Datos de análisis por secuenciado masivo muestran claramente que los tRF son generados siguiendo un patrón específico de clivaje y que las secuencias que comprometen el bucle anticodón son virtualmente inexistentes (7,18).

En cuanto al rol de los tRF en células humanas, exhiben capacidad de silenciamiento similar a los miRNA y siRNA. Degradan ARNm blanco por actividad endonucleasa del complejo formado o reclutan otras proteínas que actúan sobre los ARNm para silenciarlos. En este sentido, aunque varían en su afinidad, se asocian con proteínas argonautas (Ago, proteínas de unión a ácidos nucleicos con función enzimática tipo ribonucleasa H) (4,7).

1.3.2 Mitades derivadas de tRNA

Las tRNA-h, un grupo de fragmentos de tRNA más largos que los tRF, han sido encontradas en una gran variedad de organismos desde procariotas a eucariotas, incluyendo humanos, lo que los hace una de las clases de sRNA reportada más conservada en la evolución. Ambos tipos de sRNA derivados de tRNA no son mutuamente excluyentes (7,17,18). Las tRNA-h son más abundantes y están producidas por un solo evento de clivaje específico a nivel del bucle anticodón que corta la molécula de tRNA maduro en una mitad 5' y una mitad 3' (5'-tRNA-h y 3'-tRNA-h). Datos de secuenciación sugieren que estas mitades no están presentes en cantidades iguales. Se ha observado que el clivaje del tRNA a este nivel es una respuesta conservada y citoprotectora al estrés celular que lleva a una reprogramación general en la traducción de proteínas (8,17,18). La ribonucleasa tipo A, también denominada Angiogenina, ha sido asociada en humanos con el clivaje de tRNA inducido por estrés tanto nutricional, biológico, como fisicoquímico. Por ello, algunos autores los denominan fragmentos derivados de tRNA inducidos por estrés (tRNAis) (7,19,20).

Estos tRNAis mostraron inhibir el inicio de la traducción al interferir con el reconocimiento 5'-CAP. También protegen a las células de apoptosis durante el estrés osmótico uniéndose al citocromo C, inducen una respuesta neuroprotectora al estrés y regulan la proliferación celular (20–22). Solo las 5'-tRNA-h pueden inhibir la traducción de forma independiente del factor de iniciación de la traducción 2 alfa (eIF2 α) e inducir el ensamblaje de gránulos bajo ciertas condiciones de estrés (7). Según varios estudios las tRNA-h inducidas también podrían dirigir la degradación específica de ARNm, por lo que participarían en la regulación postranscripcional de la expresión génica (7). Una teoría es que las 5'-tRNA-h guían a la ARNasa Z (endoribonucleasa) para cortar ARNm blancos con una secuencia de unión complementaria (4,23). También se ha sugerido que, bajo ciertas condiciones de estrés o estímulos, pueden guiar a la ARNasa Z a clivar miRNA regulando en menos los niveles de determinados miRNA específicos en la célula (5,7).

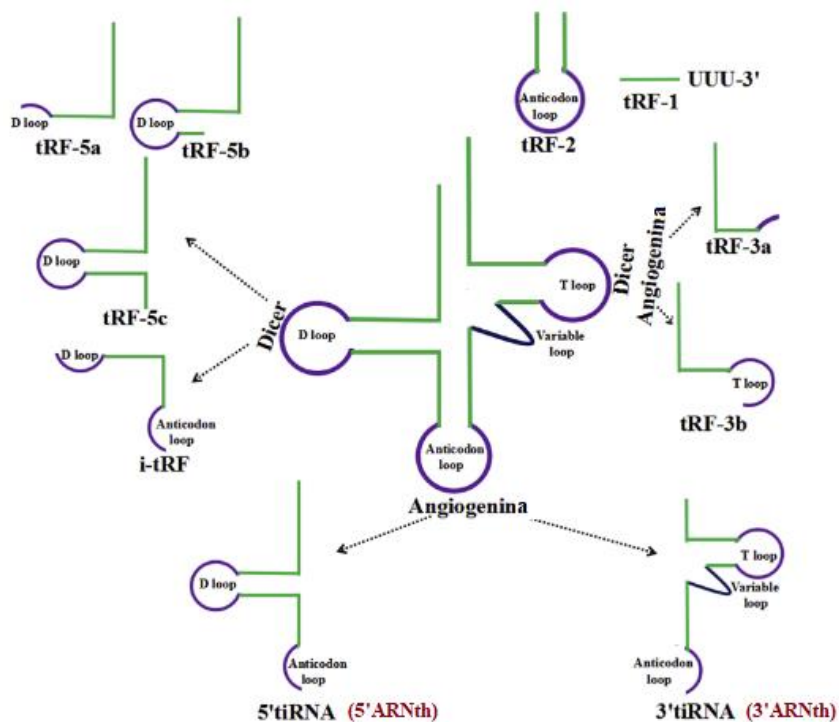


Figura 1. Biogénesis y clasificación esquemática de los fragmentos y mitades derivadas de tRNA (tRF y tRNA-h). Modificado a partir de (5). Las tRNA-h son generadas por clivaje biespecífico por la Angiogenina en el bucle anticodon del tRNA maduro.

Además de su presencia en tejidos normales en condiciones de estrés, las células tumorales también producen tRNA-h. En este sentido, existen tRNA-h dependientes de hormonas sexuales denominadas “SHOT-RNA”, y tRNA-h inducidas bajo condiciones de hipoxia (5,17). También influiría en la carcinogénesis y progresión tumoral la inestabilidad producida a nivel de ARNm y miRNA, la regulación de la transcripción inversa, la regulación de la eficiencia de la traducción y la regulación de la biogénesis de ribosomas, entre otros aspectos sobre la regulación de la expresión génica ya comentados. En este sentido, se reportó que la 5'-tRNA-h-Glu (con isoceptor de ácido glutámico) puede guiar a la ARNasa Z en el clivaje de miembros de la vía de señalización de p53 y de la apoptosis. Se cree que la regulación del proceso de traducción y de la biogénesis de ribosomas se produce por mecanismos versátiles, incluyendo pequeños cambios en la composición de los ribosomas, que podrían afectar la especificidad traduccional de un pool selectivo de ARNm. Cambios en la composición de sRNA derivados de tRNA (y tal vez de pequeños rRNA e Y-RNA) podrían resultar en esta heterogeneidad ribosomal alterada que dirija la célula a un estado funcional específico (24). En conjunto, en los últimos años estos conocimientos llevaron a mayor interés en el estudio de estos pequeños sRNA y su rol en el cáncer, a la vez que surgió la hipótesis de estos fragmentos como potenciales biomarcadores diagnósticos, pronósticos y predictivos en cáncer y otras enfermedades (5,7).

Varios estudios señalan que las cantidades totales de tRNA completos y funcionantes no cambian significativamente con la biogénesis de sRNA derivados de tRNA, sugiriendo que este fenómeno no afectaría el rol de los tRNA en la traducción de proteínas o involucraría tan solo a una pequeña porción del pool de tRNA maduros. Asimismo, se ha observado que, en células eucariotas las 5'- y 3'-tRNA-h son reclutadas por diferentes gránulos bien definidos de la célula, indicando que las mismas son necesarias para estructuras específicas del citoplasma (4,25). La generación de tRNA-h no está restringida a tRNA maduros específicos, dado que múltiples tRNA son sujetos de clivaje anticodón en diferentes grados. Igualmente, esto no debe interpretarse como un proceso al azar, no regulado, que tiene como blanco a cualquier tRNA (7,18). Hallazgos recientes demuestran que al menos algunos tRNA son metilados para protegerlos de este clivaje, y la generación de algunas tRNA-h luego del estrés es más pronunciada en

células que carecen de enzimas metiltransferasa. Esto apunta a que la biogénesis de tRNA-h podría tratarse de un proceso celular regulado (7,18).

Recientemente, la expresión anormal de tRF y tRNA-h ha sido observada en varios estudios vinculados a cáncer, desórdenes neurológicos, infecciones virales y enfermedades metabólicas, por lo que su potencial como biomarcadores ha comenzado a ser objeto de investigación (24). Además de las condiciones de estrés celular ya mencionadas, existen otras hipótesis sobre cómo pueden ser desregulados estos sRNA no canónicos en el cáncer. Una de ellas es la desregulación de los tRNA precursores, dado que la transcripción de tRNA completos por la ARN Polimerasa III se ve afectada por distintos protooncogenes y genes supresores de tumores promoviendo o suprimiendo su función (5).

En la actualidad, el conocimiento de los tRF y tRNA-h es un universo en expansión, sus funciones biológicas aún no están completamente dilucidadas. Sabemos que son altamente diversos, con diferencias en su origen, biogénesis, tamaño, especificidad de clivaje y algunos de los estímulos que inducen su producción. En cuanto a sus funciones, parecen estar involucrados en el control postranscripcional y traduccional, procesos relacionados con la regulación del ciclo celular, diferenciación celular y con otros ARN inhibitorios (4,5). Su presencia mantenida en toda la escala evolutiva resalta su importancia en vías regulatorias vinculadas con la supervivencia celular. Dado que son capaces de modular tanto el transcriptoma como el proteoma es fácil predecir que directa o indirectamente tienen roles importantes en vías oncogénicas que aún deben ser aclarados (5,7). La complejidad y posibles permutaciones de diferentes sRNA derivados de tRNA, así como de otros sRNA no canónicos como los pequeños rRNA y fragmentos de Y-RNA, podrían llevar a nuevas estrategias diagnósticas, con mayor especificidad, aportando información hasta el momento desconocida, aspectos importantes para distinguir enfermedades complejas como el cáncer (24).

1.4 Y-RNA y fragmentos derivados de Y-RNA

Los Y-RNA fueron descritos inicialmente en el contexto de enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico y el síndrome de Sjögren, formando parte de complejos ribonucleoproteicos con las proteínas Ro60 y La, ambas blanco de autoanticuerpos (26–28). Se trata de otro grupo de sRNA altamente conservados en las distintas especies, transcritos en el núcleo por la ARN polimerasa III. En humanos se conocen cuatro genes que codifican para Y-RNA (RNY1, RNY3, RNY4 y RNY5) ubicados en el cromosoma 7 (26,27). Sus transcritos se nombran como hY1 (112 nt de longitud), hY3 (101 nt), hY4 (93 nt) y hY5 (83 nt) respectivamente y se ubican principalmente en el citoplasma, excepto hY5 que se localiza a nivel nuclear (26,27). Sin embargo, la familia de Y-RNA no se limita solo a estos cuatro, también existen otros 966 pseudogenes de Y-RNA con sus respectivos transcritos en todos los cromosomas humanos (26,27). A pesar de su pequeño tamaño, los Y-RNA tienen estructuras complejas, incluyendo sectores doble hélice y bucles flexibles de una sola hebra (26,27). Difieren mínimamente en su estructura primaria y secundaria, todos los Y-RNA contienen una cadena larga formada por el emparejamiento de bases de los extremos 5' y 3' (26–28). Cada sector tendría un rol diferente; la cadena superior es importante para la replicación del ADN, el bucle terminal participa en la modulación de la cromatina, la unión a proteínas (es probable que cada Y-RNA pueda unirse a dos proteínas) y el clivaje para la formación de fragmentos derivados de Y-RNA (26). La estructura de los Y-RNA se esquematiza en la Figura 2.

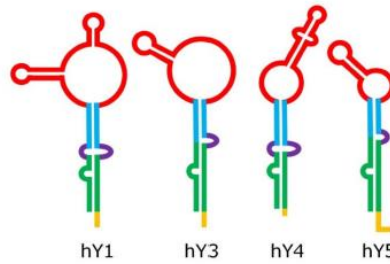


Figura 2. Estructura de los Y-RNA. Los dominios son: la cola 3'-oligouridina (amarillo), la cadena inferior (verde), la joroba (violeta), la cadena superior (azul) y el bucle (rojo). Extraído de (26).

La unión de la proteína La a la cola 3'-oligouridina de los Y-RNA media su retención nuclear y protege a los Y-RNA de su degradación. La unión de la proteína Ro60 a la región doble cadena de los Y-RNA aumenta su exportación desde núcleo y los estabiliza a nivel del citoplasma (27,28). Se cree que los Y-RNA tienen múltiples funciones dentro de las células, incluyendo el control de la expresión génica, lo que los hace potenciales blancos terapéuticos en cáncer (26,27). El papel de al menos algunos Y-RNA en el inicio de la replicación del ADN y la progresión del ciclo celular está bien establecido; en consonancia con una sobreexpresión hallada en algunos tumores sólidos (26). Los Y-RNA y sus fragmentos se han identificado en tejidos sanos y tumorales, presentando perfiles diferenciales (26–28). Se ha sugerido que los Y-RNA podrían tener funciones inmunomoduladoras, participando en los procesos de inflamación, inmunosupresión y establecimiento del microambiente tumoral (28).

1.5 Pequeños ARN no codificantes circulantes en biofluidos

Para lograr persistir en el espacio extracelular y participar de la comunicación célula-célula, los sRNA deben ser protegidos de ARNasas extracelulares ubicuas, dado que la columna vertebral de los mismos es susceptible a hidrólisis y clivajes enzimáticos (29,30). Ya se conocía que los miRNA a nivel de suero o plasma son protegidos de la degradación mediada por ribonucleasas mediante su inclusión en partículas provistas de membrana, denominadas vesículas extracelulares (VE) (13,30). El término VE incluye microvesículas, exosomas y cuerpos apoptóticos, que se diferencian por parámetros fisicoquímicos, tamaño, densidad y en su biogénesis. Estas VE han sido detectadas en varios fluidos biológicos incluyendo sangre periférica, orina, saliva y líquido de ascitis (4,31,32). Su función y composición depende de las células a partir de las cuales se originan. Se ha demostrado que la transferencia de miRNA mediada por exosomas representa un nuevo mecanismo de intercambio genético entre células, ya que el ARN transferido es totalmente funcional en las células receptoras. Esto plantea la hipótesis de que los miRNA circulantes y otros sRNA pueden ser relevantes en la oncogénesis y progresión del cáncer a través de esta forma de comunicación célula a célula. Aunque la función biológica de los miRNA extracelulares aun no es clara, estudios recientes sugieren que el desprendimiento de las VE es un proceso altamente regulado que ocurre en un amplio espectro de tipos celulares, y más frecuentemente en células tumorales (4,31,32). A partir de este conocimiento, los sRNA regulatorios extracelulares circulantes en distintos fluidos corporales han atraído gran atención desde el punto de vista fisiológico y por su uso prometedor como biomarcadores de enfermedad mínimamente invasivos. El potencial de perfiles de miRNA en plasma o suero ya ha sido analizado más arriba, no pudiendo lograrse pasar este conocimiento a la práctica clínica, al menos hasta el momento.

Además de la inclusión en VE para protegerlos de su degradación en el medio extracelular, los sRNA circulantes también han sido descritos formando complejos ribonucleoprotéicos (RNP) o unidos a partículas de lipoproteínas (LPP). Estas últimas son muy relevantes en ciertos biofluidos como plasma y suero sanguíneo donde superan en número a las VE. A pesar de esto, la fracción de RNP y LPP permanece siendo la menos estudiada (8,17,29,30).

Los mecanismos que subyacen a la secreción de sRNA circulantes y su selección a diferentes rutas biológicas aún no se comprende completamente. Algunos estudios han reportado que la secreción de miRNA es un proceso activo dependiente de ATP y que las células exportadoras seleccionan miRNA específicos para secretar (8). Otros autores han propuesto que los niveles extracelulares de miRNA son espejo de su abundancia intracelular y que la secreción ocurre sobre todo de una forma no selectiva. En este sentido, los sRNA extracelulares podrían ser nada más que una consecuencia de la muerte celular necrótica, liberando complejos argonauta/miRNA altamente estables. Las diferentes hipótesis respecto a la exportación selectiva o no de miRNA de las células y sus roles en la comunicación célula a célula permanecen siendo un tema de debate (8).

La mayor parte de lo que se conoce en la actualidad respecto a la secreción de sRNA circulantes aún se restringe a los miRNA; sin embargo, las familias de sRNA no canónicas también son secretadas al medio extracelular por ciertos tipos celulares. En este sentido, algunos reportes han resaltado la presencia de mitades 5' de tRNA, fragmentos de rRNA y fragmentos 5' derivados de Y-RNA como complejos solubles, libres de vesículas, muy abundantes en suero y plasma de humanos. Estas especies también se detectaron en VE derivadas de células inmunes, semen, entre otros tipos celulares (8,33–35). A pesar del hecho que la mayoría de las investigaciones de sRNA extracelulares han sido realizadas en humanos y algunos mamíferos, varios reportes se han enfocado en su potencial como mediadores de comunicación intercelular y de interacciones huésped-patógeno. Evidencia experimental reciente revela que la mayoría de las bacterias y microorganismos eucariotas liberan cantidades significativas de ARN en VE, configurando la idea de que este es un mecanismo de comunicación intercelular extendido a organismos en todos los dominios de la vida y también incluye a los sRNA no canónicos (17).

Los tRNA son moléculas ancestrales con un rol clave en definir el código genético y el flujo de información genética. A pesar de su rol central en la biología molecular, el interés en los tRNA comenzó a declinar luego de la década del 70, presumiblemente porque su rol como adaptadores moleculares entre los mundos de ácidos nucleicos y proteínas parecía entenderse y ser estático. Más recientemente, se volvió claro que precisamente por su rol esencial como decodificadores genéticos, los tRNA participan en múltiples redes regulatorias génicas, incluyendo la traducción adaptativa durante el stress. Dado que la fragmentación de tRNA fue descrita en todos los dominios de la vida y su generación era inducida principalmente por el estrés celular agudo, se volvió claro que al menos algunos fragmentos derivados de tRNA son pequeños ARN regulatorios más que solo bioproductos sin función surgidos a partir de tRNA (17).

La presencia de fragmentos y mitades derivados de tRNA en sangre u orina había sido reportada en el pasado. Sin embargo, no fue hasta el descubrimiento de los sRNA regulatorios clásicos y la llegada de la era del secuenciado masivo que estos comenzaron a ser realmente identificados en una gran variedad de células, tejidos y organismos, así como posteriormente en biofluidos como el suero sanguíneo (17). A la fecha, los fragmentos y mitades derivados de tRNA han sido funcionalmente vinculados a una gran variedad de procesos moleculares incluyendo la regulación de la traducción, proliferación celular, apoptosis, formación de gránulos de estrés, estabilización de ARNm, aminoacetilación de tRNA, expresión de transposones, biogénesis ribosomal y la herencia de rasgos adquiridos (17).

El primer reporte que se dirigió específicamente al análisis de fragmentos y mitades derivados de tRNA circulantes en el torrente sanguíneo en ratones fue publicado en 2013. Además de los ya conocidos miRNA, en el medio extracelular se encontró un pico inesperado y mayoritario (67%) de secuencias que iban de 30-33 nt, que posteriormente fueron mapeadas como tRNA. Casi todas correspondieron a 5'-tRNA-h y fueron derivadas de tRNA-gly (con isoceptor de glicina) 46%, tRNA-val (con isoceptor de valina) 44%, tRNA-leu (con isoceptor de leucina) 8% y tRNA-his (con isoceptor de histidina) 1%. En concordancia con lo descrito previamente, la mayoría de las 5'-tRNA-h en suero no estaban asociadas a VE. Las 3'-tRNA-h fueron prácticamente indetectables en el medio extracelular, mientras que los tRNA completos sólo se encontraron en la fracción VE (5,17). Es así que se cree que muchas tRNA-h son originadas en el espacio extracelular por la fragmentación enzimática de tRNA de longitud completa que no son estables a dicho

nivel. Por ello, en muestras con alta actividad ARNasa como el suero, los tRNA solo son encontrados dentro de VE, mientras que las tRNA-h más estables se acumulan en el exterior (5,17,18). Estudios realizados en suero de otros mamíferos también confirmaron que las 5'-tRNA-h con los aceptores -gly, -glu, -val, e -his son los fragmentos circulantes más abundantes, especialmente los dos primeros (17). Para la reproducibilidad de estos estudios, debe tenerse en cuenta que el uso de EDTA al extraer plasma o suero modifica la purificación de ARN circulantes, disminuyendo su cantidad (17).

Aunque se desconocen con exactitud las vías que llevan a los sRNA derivados de tRNA a enriquecerse en la fracción no VE, no se explicaría únicamente por la asociación en complejos de RNP. Implicaría la existencia de un mecanismo que les confiere una estabilidad inusual contra la degradación por ribonucleasas, permitiéndoles existir funcionalmente tanto en el medio extracelular como intracelular (29,34). La posibilidad que los sRNA derivados de tRNA formen estructuras que les permitan ser más resistentes a la degradación ha sido menos estudiada. Sin embargo, recientemente se mostró que algunas tRNA-h, como tRNA-h-cys (con isoceptor de cisteína) y tRNA-h-ala (con isoceptor de alanina), contienen motivos terminales de oligoguanina que pueden formar tetrámeros intermoleculares (29,36). En cualquier caso, la evidencia se acumula a favor de que al menos algunos de estos fragmentos pueden jugar varios roles dentro o entre las células que no necesariamente se relacionan con la función molecular de sus tRNA precursores (37). En estudios realizados por varios grupos, incluyendo el nuestro, los fragmentos derivados de Y-RNA y sRNA derivados de tRNA mostraron patrones consistentes con una exportación selectiva (17). Recientemente nuestro grupo ha demostrado que algunos de los fragmentos y mitades derivados de tRNA más enriquecidos a nivel extracelular, las tRNA-h-gly y tRNA-h-glu, pueden formar dímeros de ARN que les confieren resistencia contra la degradación por ARNasas (38). En este mismo estudio, los perfiles de sRNA derivados de tRNA obtenidos dentro de las células fueron altamente heterogéneos. Consistentemente, utilizando las mismas técnicas de secuenciado, en el espacio extracelular se ve una disminución de la variabilidad y un marcado enriquecimiento de 5'-tRNA-h-gly y 5'-tRNA-h-glu. Esto también se observó en la fracción no vesicular y en suero (38). Es posible que la falta de correlación entre los perfiles de sRNA derivados de tRNA extracelulares e intracelulares pueda ser explicado por la combinación de distintos factores; incluyendo contaminación, biogénesis extracelular (ya descrita para miRNA) y diferente estabilidad extracelular, más que por una exportación selectiva de ARN (38). El hecho de que ciertas tRNA-h que pueden formar estructuras cuaternarias no se encuentren en abundancia en el espacio extracelular podría explicarse por la dificultad de su secuenciación. En suma, los mecanismos precisos para la secreción de sRNA al espacio extracelular permanece poco comprendida; ambos mecanismos, secreción selectiva y no selectiva, son reconocidos como vías posibles (39).

En cuanto a sus funciones a nivel extracelular, aún son desconocidas. Como sucede con los miRNA, considerando que las VE pueden mediar la transferencia de estas tRNA-h específicas entre células epiteliales humanas, se ha hipotetizado que pueden jugar un rol activo en la comunicación intercelular, especialmente durante las respuestas al estrés (17). De forma alternativa, la liberación de sRNA derivados de tRNA al espacio extracelular podría ser un camino para quitarle la represión a ARNm blancos de estos fragmentos, permitiendo a las células modificar la expresión génica y así su fenotipo. Asimismo, se han identificado autoanticuerpos contra tRNA en suero de pacientes con enfermedades autoinmunes. Esto sugiere que, al menos bajo condiciones patogénicas, los tRNA son capaces de dejar las células e interactuar con el sistema inmune. Un estudio mostró que las 5'-tRNA-h de -gly y -glu en suero fueron reguladas en aumento unas 20 y 40 veces, respectivamente, luego de la inyección de LPS (antígeno bacteriano) en ratones. Esto sugiere que la inflamación aguda como causa de estrés celular también altera los niveles de sRNA derivados de tRNA en la circulación. Esta debe ser una característica para tener en cuenta en el potencial uso de perfiles de sRNA derivados de tRNA circulantes como biomarcadores dado que pueden ser afectados por la inflamación asociada a la enfermedad o al tratamiento (17). Por otro lado, un reporte reciente mostró que las células T para activarse necesitan liberar fragmentos y mitades específicos derivados de tRNA porque normalmente inhiben vías intracelulares relacionadas con la activación celular T. La excreción y la comunicación intercelular no son mecanismos mutuamente excluyentes. Lo que una célula necesita liberar puede ser informativo para otras células de los alrededores (17). Sea cual sea su

función, procedencia y destino final, los sRNA derivados de tRNA son abundantes en el espacio extracelular, han sido detectados en múltiples biofluidos y tienen potencial de servir como biomarcadores circulantes útiles de enfermedad en biopsias líquidas (17).

Asimismo, los Y-RNA también pueden ser secretados al espacio extracelular; libres, unidos a complejos ribonucleoproteicos o en VE. Su secreción ocurre a partir de Y-RNA de longitud completa o luego de un clivaje específico que genera fragmentos de Y-RNA (26). Se cree que una vez en el espacio extracelular, los Y-RNA pueden internalizarse en células blanco para cumplir funciones adicionales de regulación y señalización a nivel local y a distancia, actuando como mensajeros intercelulares versátiles (26–28). La formación de pequeños fragmentos derivados de Y-RNA ocurriría durante la apoptosis celular, a partir de los cuatro Y-RNA por la acción de la caspasa-3, aunque se desconoce el desencadenante para este fenómeno (26,27). La función final de estos fragmentos aún es desconocida, pero algunos estudios apuntan a que podrían tener un rol importante en la regulación de la apoptosis y la inflamación mediada por macrófagos (27). Estos parecen carecer de la función de silenciamiento a nivel génico y se han encontrado desregulados en múltiples patologías como el cáncer (26,27). Son particularmente abundantes en plasma, suero y otros biofluidos, especialmente los derivados de Y4-RNA (hY4-RNA o Y4), donde circulan como complejos libres o en VE (26,27). Varios estudios han indicado que el transporte extracelular de Y-RNA es un proceso altamente eficiente empleado por múltiples tipos celulares (28). En este sentido, los Y-RNA son uno de los sRNA extracelulares más abundantes en el plasma humano (28). Un potencial desencadenante de la liberación extracelular de los Y-RNA es la señalización de los receptores tipo Toll (28). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los Y-RNA pueden unirse a múltiples proteínas, que también podrían ser capaces de regular su enriquecimiento (28).

En los últimos años, varios estudios han demostrado que la expresión de los Y-RNA y sus fragmentos está alterada en el cáncer (26,27). Aunque no siempre se observa una sobreexpresión de estas moléculas, en cierto modo sus niveles se modifican ante una proliferación celular anormal, cambiando su abundancia relativa tanto a nivel intracelular como en suero (26,27). Se ha observado que los niveles y patrones de expresión de Y-RNA varían dependiendo del tejido estudiado (26). Se cree que la expresión de hY1, hY3 y hY4 están vinculadas entre sí, mientras que la de hY5 es independiente, al menos en algunos tipos de cáncer, dato importante para analizar distintos perfiles de expresión para cada subtipo tumoral (26). En otro estudio, se observó que Y4-RNA y los fragmentos 5' derivados de Y4-RNA están presentes en abundancia en VE liberadas por células B leucémicas (40). Los Y4 no solo inducen efectos proinflamatorios como la liberación de CCL2, CCL4 y IL6 por los monocitos, sino que también inducen la expresión de PD-L1, que inhibe la activación de células T, lo que favorecería el crecimiento tumoral por evasión del sistema inmune (40). Mientras que los Y-RNA asociados a VE parecen inducir un amplio espectro de efectos inmunes, las RNP que contienen Y-RNA inducen predominantemente activación del sistema inmune (28). Muchos de estos efectos dependen de la activación de vías de señalización mediadas por los receptores tipo Toll (28).

Si bien la evidencia actual sugiere que los niveles extracelulares de Y-RNA se correlacionan con varias enfermedades inflamatorias, la aterosclerosis y el cáncer; son necesarios más estudios para conocer cómo se altera la liberación de Y-RNA en células enfermas y como esto afecta a otras células (28). Sin embargo, es notable el potencial de estas especies como posibles biomarcadores circulantes que podrían incidir a futuro en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de varias enfermedades, sobre todo aquellas en las que influye el sistema inmune, como el cáncer (28).

1.6 Nuevas especies de pequeños ARN como biomarcadores en cáncer

Varios estudios recientes han sugerido que los sRNA derivados de tRNA, además de formar parte de la carcinogénesis y progresión tumoral, pueden servir como biomarcadores en cáncer de pulmón, mama, ovario, próstata, colorrecto, entre otros. El cáncer de mama ha sido el más estudiado, citando algunos ejemplos, en este tumor se ha observado que ciertos fragmentos de tRNA están fuertemente asociados

con la progresión tumoral (41,42). Asimismo, se comprobó que algunos sRNA derivados de tRNA pueden exhibir una conducta supresora tumoral en tejido mamario al unirse a proteínas oncogénicas (43). Tanto en tejido como en suero de pacientes con cáncer de mama se vio una marcada alteración de varias tRNA-h y fragmentos de Y-RNA que se correlacionó significativamente con características clínicas y patológicas, como los subtipos de cáncer de mama (33,44). En otro estudio se observó que la expresión de algunos fragmentos específicos derivados de tRNA-gly aumentaban en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo en hipoxia. Los mismos estuvieron involucrados en la quimio resistencia inducida por la hipoxia, a través de la activación del factor de transcripción STAT3 (45). Respecto al cáncer de mama HER2 positivo, otros fragmentos derivados de tRNA se encuentran aumentados y se han asociado a resistencia al tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-HER2 Trastuzumab y a mal pronóstico evolutivo (46).

Respecto a cáncer de pulmón, hasta la fecha existe un número mucho menor de trabajos publicados. Sin embargo, se han reportado algunos sRNA derivados de tRNA regulados en menos en este tumor. Estos podrían tener funciones antitumorales dado que normalmente participan en la regulación de la apoptosis y la estabilidad de la cromatina (47,48). Asimismo, se observó que la tRNA-h-leu-CAG está regulada en más en cáncer de pulmón no células pequeñas, particularmente en etapas tardías de la enfermedad, y se asocia con la progresión del ciclo celular (49).

Resultados similares se han encontrado para otros tipos de cáncer. Esto apoya la hipótesis de que los fragmentos derivados de tRNA juegan un rol importante en la carcinogénesis y progresión tumoral. A la vez que apunta a continuar expandiendo el conocimiento en esta área y el análisis de su uso como posibles biomarcadores prometedores ya sea a nivel diagnóstico, pronóstico y/o predictivo de respuesta a tratamientos contra el cáncer (18)(14).

Por otra parte, el rol de los Y-RNA y fragmentos de Y-RNA en cáncer de pulmón ha sido analizado en tres estudios recientes (26). Los primeros estudiaron estas moléculas en el contexto de varios tipos tumorales. Uno de ellos, mostró que hY1, hY3 y sobre todo hY5, están sobreexpresados en tejido tumoral, mientras que hY4 no mostró diferencias significativas en comparación con células sanas en cultivo (50). Otro confirmó la sobreexpresión de hY1 y hY3 en tejido tumoral (51). Más recientemente, se estudió de forma específica la relación entre la expresión de Y-RNA y cáncer de pulmón no células pequeñas (52). Estos autores encontraron que al menos 50 fragmentos derivados de pseudogenes de hY4 estaban sobreexpresados en plasma de pacientes con cáncer de pulmón no células pequeñas, sugiriendo un potencial rol como biomarcadores (52). Sin embargo, se observó que los fragmentos derivados de hY4 están regulados en menos a nivel intracelular (52). Los estudios de viabilidad celular mostraron que una sobreexpresión de hY4 inhibe la proliferación celular en líneas celulares de cáncer de pulmón, sugiriendo que estos fragmentos podrían actuar como supresor tumoral (52). Esto coincide con los estudios previos que analizaron la expresión de Y-RNA a nivel tisular y podría explicarse hipotéticamente por una excreción selectiva de estos fragmentos hY4 inhibitorios al plasma para poder proliferar (26).

1.7 Antecedentes de nuestro equipo

En un trabajo publicado en 2015 se secuenció el contenido de sRNA intracelulares de cultivos de líneas celulares epiteliales de tejido mamario normal y tumoral, y se comparó con el contenido extracelular de sRNA. Se observó que la mayoría de los miRNA se comportaban dentro de un modelo de secreción no selectivo, con pocas excepciones. En contraste, las mitades 5' de tRNA y fragmentos 5' de Y4-RNA (5'-Y4-RNA) de 31 a 33 nt mostraron patrones de secreción preferencial. En la fracción asociada a ribonucleoproteínas hasta un 90% de las lecturas correspondieron a tRNA-h-gly-GCC y tRNA-h-glu-CUC. Las mismas mostraron un aumento de aproximadamente 20 veces de su abundancia relativa en comparación con el compartimiento intracelular. Esto mismo pudo comprobarse para otras líneas celulares, sugiriendo que la secreción de tRNA-h es un mecanismo general. Por ello se podría deducir que las diferentes familias de sRNA tienen patrones de secreción diferenciales y característicos, generando aún más preguntas sobre el significado biológico de estos sRNA no canónicos en el espacio extracelular (8).

Posteriormente, se demostró que las 5'-tRNA-h-gly-GCC y 5'-tRNA-h-glu-CUC pueden formar homo- o heterodímeros en una solución que contenga ARNasas (29). Se especula que estas características estructurales también pueden ser funcionalmente relevantes. La estructura puede especificar interacciones de un modo similar a un aptámero o aumentar la vida media del ARN al permitirle ser menos susceptible a la degradación por ARNasas. Consecuentemente, se observó que la capacidad de las 5'-tRNA-h-gly para formar homodímeros se correlacionó con su estabilidad intracelular e *in vitro*, y podría explicar la estabilidad extracelular remarcable observada para estos sRNA (29).

Con lo analizado hasta el momento, serían al menos cuatro los escenarios no mutuamente excluyentes que expliquen el enriquecimiento de tRNA-h5'-gly-GCC y tRNA-h-5'-glu-CUC a nivel extracelular en la fracción no EV: 1- secreción selectiva de estos fragmentos; 2- secreción no selectiva y enriquecimiento por su elevada estabilidad extracelular; 3- secreción selectiva de tRNA completos de gly y glu, seguido de un procesamiento extracelular por Angiogenina; y 4- secreción no selectiva de tRNA completos, procesamiento extracelular y enriquecimiento de mitades 5' de gly y glu por su estabilidad extracelular diferencial (29).

Más recientemente, teniendo en cuenta datos que apoyan un rol específico de estas secuencias en las vías de comunicación intercelular mediadas por vesículas y su conexión con el estrés celular y la liberación de ARN, se estudiaron los mecanismos de secreción celular de estos sRNA derivados de tRNA (38). La evidencia experimental indicó que oligonucleótidos estables sintéticos son cargados a vesículas liberadas en una forma dependiente de concentración, sin importar su secuencia. Bajo estas condiciones, los mismos pueden ser fácilmente transferidos a otras células en cultivo. Por otra parte, los sRNA inestables también pueden ser transferidos entre las células, sin embargo, la eficiencia del proceso es mucho menor y sus niveles en las células receptoras pueden identificarse solamente utilizando tecnologías de muy alta sensibilidad como qPCR. La estabilidad es la clave de este proceso, ya que los sRNA incapaces de formar dímeros protectores de ARNasas no fueron capaces de enriquecerse en el espacio extracelular, aun siendo transfectados en las mismas concentraciones (38). Estos hallazgos no excluyen la posibilidad del transporte selectivo de sRNA específicos. Simplemente muestra que a altas concentraciones los sRNA no necesitan tener una secuencia o motivos específicos para ser secretados en VE. Este conocimiento podría utilizarse para obtener VE enriquecidas de un ARN específico para aplicaciones terapéuticas o biotecnológicas (38).

En 2020 otra publicación mostró una caracterización dinámica y completa del ARNoma no vesicular. La adición de un inhibidor de ribonucleasa recombinante (RI) aumentó en gran medida la complejidad de los perfiles de ARN extracelulares, logrando estabilizar incluso ribosomas extracelulares y tRNA maduros que se descomponen rápidamente a fragmentos derivados de rRNA y tRNA en ausencia de inhibidores de ARNasa. Acorde a estudios previos, se observó que algunos fragmentos son muy estables y pueden acumularse a pesar de alta actividad de ARNasa, incluso cuando están presentes en la fracción no VE. La biogénesis a nivel extracelular de algunos de los ARN extracelulares más abundantes demuestra que dicha abundancia no es un dato confiable para estimar las tasas de secreción de ARN. Por otro lado, también se observó que fracciones que contienen ribosomas extracelulares probablemente no sean silentes inmunológicamente y posiblemente podrían decodificarse como patrones moleculares asociados al daño (53).

Según la línea de trabajo de nuestro laboratorio, la degradación del ARN extracelular es una fuerza importante que desvía lo liberado por la célula al espacio extracelular hacia aquellas especies con mayor estabilidad extracelular. Es por ello por lo que especulamos que con la elaboración de perfiles de sRNA extracelulares no se logra capturar el conjunto completo de ARN liberados de las células al espacio extracelular, con intentos frustrados de inferir mecanismos de secreción de ARN a partir de comparaciones entre los perfiles de ARN intracelular y extracelular. Estos hallazgos pueden afectar el descubrimiento de biomarcadores en biofluidos que buscan esta simetría entre lo intra- y extracelular. Esta vista dinámica de

los RNA extracelulares impacta nuestra comprensión de los mecanismos de secreción de ARN y puede ofrecer una ventana a nuevas moléculas con potencial biomarcador, teniendo en cuenta la biogénesis extracelular de sRNA (17,38,53).

1.8 Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por patología oncológica y el segundo tumor maligno en incidencia para ambos sexos (54,55). En 2018 según datos del GCO (*Global Cancer Observatory*, plataforma de la Agencia Internacional en Investigación en Cáncer de la Organización Mundial de la Salud, IARC por sus siglas en inglés) se registraron más de 2 millones de casos en todo el mundo y más de 1.7 millones de decesos en relación directa con la enfermedad, 18% del total de las muertes por cáncer (54,55). Existen algunas variaciones epidemiológicas entre regiones que reflejan la influencia histórica del tabaquismo y los patrones diferenciales de su consumo y exposición, incluyendo la intensidad y duración, tipo de cigarrillos, y grado de inhalación (54,55). Aunque se estima que el tabaquismo es causa de aproximadamente el 85-90% de los cánceres de pulmón, sobre todo en países desarrollados, un amplio espectro de agentes físicos y químicos constituyen también factores de riesgo importantes (arsénico, ciertos metales, fibras como el asbesto, emisión de radón, entre otros) y muchos de ellos involucran riesgos ocupacionales. Sin embargo, en múltiples estudios epidemiológicos se ha observado que las tendencias del cáncer de pulmón están determinadas principalmente por la epidemia de tabaco (54–56).

El resultado clínico obtenido a partir de los tratamientos disponibles en el cáncer de pulmón no a células pequeñas (CPNCP) está directamente relacionado con la precocidad del diagnóstico (55). La sintomatología es un hallazgo tardío, el 75% de los pacientes al momento de la consulta se encuentran en estadios localmente avanzados o diseminados (estadios III y IV de la clasificación TNM 8ª edición de la AJCC y UICC) (55,57). Los estadios iniciales (estadios IA, IB, IIA y IIB, TNM 8ª edición) presentan una sobrevida global que varía entre 53 a 90% a los 5 años según el tamaño y subtipo histológico al diagnóstico, su tratamiento quirúrgico en pacientes correctamente seleccionados habitualmente es acompañado de excelentes resultados funcionales (55,57). En tanto, los estadios loco-regionalmente avanzados (estadios IIIA, IIIB y IIIC TNM 8ª edición) presentan una sobrevida global a 5 años de entre 13 a 36% dependiendo de la cantidad y localización de los ganglios linfáticos comprometidos al diagnóstico, requieren tratamientos más agresivos y combinados. Según este análisis, la sobrevida global a 5 años de pacientes metastásicos al diagnóstico varía entre 0 a 10% (estadio IVA y IVB TNM 8ª edición), *Figura 3*. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que en los pacientes elegibles para terapias dirigidas o inmunoterapia actualmente alcanzan mayores sobrevidas a 5 años que pueden rondar el 15 a 50% dependiendo del biomarcador (48). A pesar de ello, en total solo 19% de todos los pacientes con cáncer broncopulmonar sobreviven 5 años o más luego del diagnóstico, incluyendo células pequeñas y no pequeñas (55).

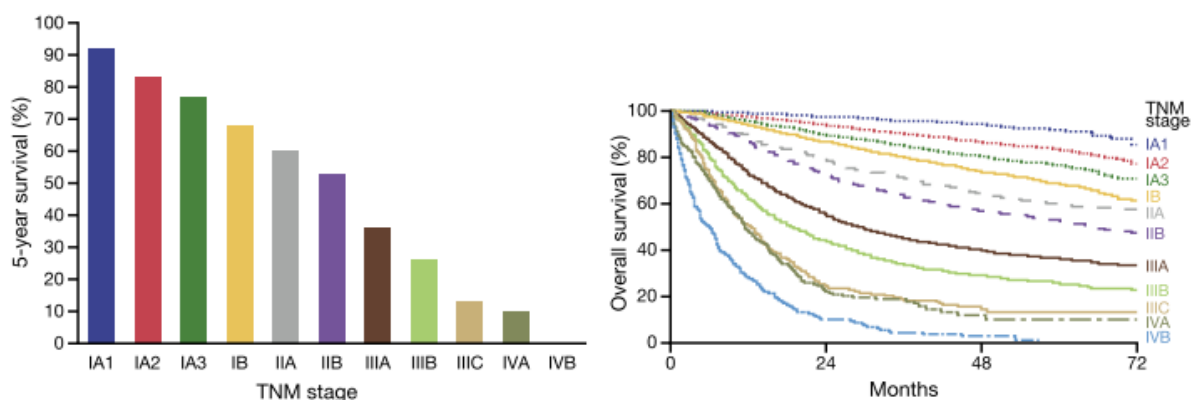


Figura 3. Sobrevida por estadio (TNM AJCC-UICC) para cáncer de pulmón no células pequeñas. Modificada de (58).

En nuestro país, de acuerdo con datos del registro nacional del cáncer en su último informe difundido por el Ministerio de Salud, las muertes por cáncer constituyen un 24% del total de las defunciones. Aun con las recientes medidas de salud pública tomadas respecto al tabaquismo, principal factor de riesgo, el cáncer de pulmón continúa teniendo una elevada incidencia en Uruguay (56,59). Asimismo, la mortalidad permanece muy alta, con más de 1300 muertes al año. Los patrones espaciales y las tendencias de la mortalidad son similares a aquellos correspondientes a la incidencia debido a su letalidad, se registran casi unos 1500 casos nuevos de cáncer de pulmón cada año, aproximadamente 1100 en hombres y unos 390 en mujeres (datos 2012-2016) (56,59). Las muertes por cáncer de pulmón para ambos sexos reunidos representan el 16.3% del total de las muertes por cáncer en Uruguay. Las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer de pulmón en nuestro país se encuentran entre las más altas del mundo (quintil superior) en hombres, y en el segundo quintil en mujeres (56,59). Si bien, las tasas de incidencia y mortalidad en nuestro país son más próximas a las de los países más desarrollados, la razón de mortalidad/incidencia es más desfavorable y similar a aquella de los países menos desarrollados (56,59). En cuanto a la división según sexos, en nuestro país el cáncer de pulmón es el segundo cáncer más frecuente en hombres, pero la primera causa de muerte por cáncer en este sexo. En mujeres, es el cuarto cáncer en incidencia y hace algunos años ocupa la tercera causa de mortalidad por cáncer, la cual ha ido en ascenso en los últimos años, reflejando el cambio en los perfiles del consumo tabáquico, tal cual ha sucedido en otros países (56,59). En este sentido, es claro que el cáncer de pulmón constituye un problema mayor de salud pública en el mundo y para nuestro país, por lo que los esfuerzos en su prevención y control, particularmente aquellos orientados a la prevención primaria (tabaquismo) y secundaria (diagnóstico precoz), están plenamente justificados.

La tomografía computada de baja dosis (TCBD) en población de alto riesgo como método de tamizaje para la detección precoz del cáncer broncopulmonar ha demostrado reducir la mortalidad por esta causa (60–62). Sin embargo, hasta la fecha su aplicabilidad extendida se ha dificultado incluso en países desarrollados. Esto se debe a que el entendimiento de esta técnica ha evolucionado con los subsiguientes estudios, el más reciente publicado en 2020 con resultados positivos. Si bien la literatura actual apunta a la necesidad de generar programas de tamizaje con TCBD, aún quedan algunas dudas debido a los costos. Aunque constituye una estrategia eficaz, debe tenerse en cuenta existe cierto porcentaje de resultados falsos positivos como nódulos o imágenes pulmonares indeterminadas (58,63). Aún se desconoce si este porcentaje puede aumentar en regiones endémicas de enfermedades como la tuberculosis. Es por esto que otros procedimientos, preferentemente no invasivos e incluso asociados con la TCBD para aumentar su sensibilidad y especificidad, podrían ser de valor para diagnosticar con mayor precisión los pacientes con cáncer de pulmón en estadio precoz (24,58).

1.9 Antecedente de la propuesta

En un estudio preliminar de nuestro laboratorio, se buscó identificar sRNA expresados diferencialmente en tejido tumoral y peritumoral de 3 pacientes con adenocarcinoma pulmonar, evaluando si dicha expresión diferencial podría reflejarse en suero/plasma (resultados no publicados). De los datos obtenidos por secuenciado masivo se identificaron 7 sRNA (incluyendo solo miRNA y sRNA derivados de tRNA) con diferencias a nivel tisular mayores a 1,5 veces: miR-21-5p, miR-100a-5p, miR-148a-3p y mitades 5' derivadas de los tRNA glu-TTC, his-GTG, gln-CTG, gly-GCC. Posteriormente, se buscó si alguno de ellos estaba aumentado en plasma de pacientes con cáncer de pulmón. Los 5'-tRNA-h derivadas de -gly-GCC y -glu-TTC fueron las únicas con diferencias significativas entre plasma de controles y de pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Este trabajo contó con un número de pacientes muy pequeño, pero establece las bases técnicas para poder diseñar un estudio a gran escala que permita validar estadísticamente el valor de sRNA circulantes en suero o plasma como potenciales

biomarcadores diagnósticos, pronósticos y/o predictivos en cáncer de pulmón, prestando especial atención a las 5'-tRNA-h-gly, 5'-tRNA-h-glu.

Además de la utilidad inherente a la búsqueda de biomarcadores de fácil acceso en el contexto de una patología muy prevalente y mortal. Con este estudio pretendemos aportar más información sobre estas pequeñas moléculas que hasta el momento han sido escasamente estudiadas y su rol en el cáncer de pulmón, evaluando la presencia de un número limitado de pequeños ARN no codificantes en un mayor número de pacientes portadores de cáncer de pulmón.

2. Objetivos

Objetivo general:

Caracterizar pequeños ARN circulantes derivados de tRNA-gly, tRNA-glu e Y4-RNA, como potenciales biomarcadores circulantes en el diagnóstico de pacientes con cáncer de pulmón.

Objetivos específicos:

-Analizar comparativamente la expresión de mitades 5' derivadas de tRNA de gly_GCC y glu_TTC y fragmentos 5' de Y4-RNA en suero de pacientes con cáncer de pulmón e individuos controles clínicamente sanos.

-Evaluar una posible relación entre los niveles de expresión y la evolución clínica de los pacientes, así como una eventual relación con características de la enfermedad.

3. Materiales y Métodos

3.1. Características de la población

En el presente estudio se incluyeron pacientes con diagnóstico anatomopatológico de cáncer broncopulmonar de células no pequeñas o de células pequeñas en cualquier estadio de la enfermedad, atendidos en el Hospital de Clínicas – Dr. Manuel Quintela durante el período de marzo de 2018 a diciembre de 2019, en forma previa al tratamiento quirúrgico, radio y/o quimioterapia, así como con terapias biológicas y/o inmunoterapia según la práctica clínica habitual del Servicio de Oncología Clínica del hospital, sin ninguna modificación.

En todos los casos, previo a su inclusión se firmó consentimiento informado de acuerdo con la normativa vigente y aprobado por el comité de ética del Hospital de Clínicas – Dr. Manuel Quintela. Se remarcó la confidencialidad de los datos obtenidos y que el estudio no impactará en su diagnóstico ni tratamiento.

Los pacientes fueron valorados por el equipo médico tratante, se realizó la revisión de historias clínicas y estudios paraclínicos disponibles, así como anamnesis y examen físico, asegurando la misma atención asistencial que los pacientes no incluidos.

La recolección de datos se realizó en una planilla electrónica, recabados de forma homogénea, aplicando definiciones operativas previamente definidas. Se dio especial importancia a variables como el sexo biológico, edad, perfil tabáquico, fecha del diagnóstico e inclusión al estudio, *performance estatus* (PS según escala ECOG), estadio según la clasificación TNM de la AJCC, subtipo histológico, fecha y tipo de cirugía en caso de requerirla, tratamiento oncoespecífico recibido, fecha y tipo de eventuales recidivas y fechas de extracciones de sangre periférica. Se analizó el seguimiento clínico por parte de la Unidad de Oncología Torácica valorando recaídas o progresiones locorregionales o a distancia.

Se excluyeron del estudio pacientes con mal estado general al diagnóstico dado por *Performance estatus* (PS) por escala ECOG 3-4, que hubieran iniciado tratamiento oncoespecífico previamente, con antecedente personal de cáncer activo en otro sitio anatómico o antecedente de enfermedades autoinmunes.

3.2. Obtención de suero a partir de sangre venosa periférica

Se tomaron muestras de sangre venosa periférica de los pacientes previo al inicio de cualquier tipo de tratamiento oncológico. Asimismo, se obtuvieron muestras de controles clínicamente sanos, pareados según sexo, edad y perfil tabáquico. De manera convencional, se identificaron las muestras provenientes de pacientes como Px y Cx correspondiente a los controles (donde x, es el número correlativo de inclusión al estudio).

Para la obtención de suero, se colectaron 10 ml de sangre total en tubo seco y se dejó coagular por 30 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron las muestras a 1.800 g durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se extrajo el suero evitando el arrastre de la fase inferior, se obtuvo un promedio de 4-5 ml de suero por cada muestra. El suero se almacenó a -80°C en alícuotas de 1 ml.

El tiempo de procesado de las muestras no excedió en ningún caso las 6 horas y el protocolo se realizó por igual a todas las muestras.

3.3. Aislamiento de pequeños ARN a partir de suero

Se protocolizó la extracción de ARN y optimizaron las condiciones de manipulación en el laboratorio de modo que permitieron un mejor rendimiento y pureza del ARN extraído. Se agregó un inhibidor de ARNasas en etapas sensibles del procedimiento. Una vez puestas a punto estas técnicas, se recuperó una cantidad de ARN total adecuada para procedimientos de RT-qPCR.

La extracción y purificación de sRNA se realizó a partir de 100 µl de suero, mediante el uso del kit *MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kit* de Thermo Fischer Scientific siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante, con algunas modificaciones realizadas durante la puesta a punto de la técnica. Este kit está optimizado para la extracción de ARN total incluyendo sRNA tanto de muestras tisulares y células, como líquidos biológicos como el suero. Se basa en la purificación de ARN de alta pureza mediante el uso de su adsorción a nanopartículas magnéticas, que permiten su posterior purificación mediante soportes magnéticos, evitando el uso de solventes orgánicos tradicionales.

Posteriormente, se midieron las concentraciones de sRNA en cada muestra utilizando *Qubit 4 Fluorometer* de Invitrogen utilizando un kit de reactivos específicos para este tipo de pequeños ARN, denominado *Qubit microRNA Assay Kit*. Este último está diseñado para cuantificar pequeños ARN de entre 17-25 nt aún en presencia de contaminantes. El mismo es altamente selectivo para sRNA descartando rRNA o ARNm largos de más de 1000 pares de bases, y es capaz de cuantificar sRNA en muestras puras a niveles tan bajos como 0,5 ng. Detecta todo tipo de sRNA, incluyendo miRNA y siARN. A modo comparativo, también se midieron las concentraciones de ARN utilizando el espectrofotómetro *NanoDrop microvolume spectrophotometer* de Thermo Fisher Scientific y se analizó la relación de absorbancia a 260/280 nm para conocer la pureza del ARN.

3.4. Retrotranscripción y amplificación por qPCR

Luego de realizada la purificación de ARN y medidas sus concentraciones, se procedió a la retrotranscripción para cada muestra utilizando cebadores específicos previamente diseñados, para mitades 5' de tRNA de glu y de gly, así como para fragmentos 5' de Y4-RNA (de ahora en más nombrado como tRNA-h-glu_TTC, tRNA-h-gly_GCC y Y4-RNA o simplemente Glu y Gly). De la nomenclatura cabe aclarar que el signo "+" refiere a bases modificadas químicamente para aumentar la capacidad de hibridación usada para cebadores cortos en los que es necesario aumentar la temperatura de annealing.

PRIMERS de mitades 5' de tRNA^{Glu}

-Secuencia de Glu a analizar (TTC -)

TCC CTG GTG GTC TAG TGG TTA GGA TTC GGC GCT

-F-Glu (Forward primer de Glu)

T+CC+CTGGT+GGT (11 nt, Tm 58 °C IDT)

-RT-Glu (primer de Glu para la retrotranscripción)

TGCCATCCACCACCTGTTGCTGTAAGCGCCGAA (Tm ~ 46 °C)

-Primer reverso común (Reverso de Gly y Glu)

TCC ACC ACC CTG TTG C (Tm 59.7°C)

PRIMERS de mitades 5' de tRNA^{Gly}

-Secuencia de Gly a analizar (GCC -)

GCA TTG GTG GTT CAG TGG TAG AAT TCT CGC CT

-F-Gly (Forward primer de Gly)

G+CA+TTG+GTG+GTTC (13 nt, Tm 58°C)

-RT-Gly (primer de Gly para la retrotranscripción)

TGCCATCCACCACCCTGTTGCTGTAAGGCGAGAATT (Tm ~ 41 °C)

PRIMERS de fragmentos 5' de Y4-RNA

-Fragmento 5' de YARN-4 investigado

GGCTGGTCCGATGGTAGTGGGTTATCAGAACT (32 nt)

-Fragmento 3' de YARN-4 investigado

CCCCCACTGCTAAATTTGACTGGCTTT (28 nt)

-RT Stem loop (primer de Fragmento 5' de YARN-4 para la retrotranscripción)

5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA+G+TT+CT+GAT-3'

-Primer reverso Universal para qPCR

GTG CAG GGT CCG AGG T

-Primer Forward específico

GG+CT+G+GTCC

Para el estudio de los niveles séricos de mitades 5' de tRNA-glu_GCC y de tRNA-gly_TTC se realizó una RT-qPCR convencional asociando adaptadores 5'. En tanto para los niveles de fragmentos 5' de Y4-RNA se utilizó una stem-loop RT-qPCR. Esta última es una técnica específica para sRNA y consiste en utilizar un fragmento de ADN altamente específico (*stem-loop*) que hibridará con el ARN de interés. Este procedimiento se esquematiza en la *Figura 4*. En la retro transcripción se utilizó como *primer* el stem-loop que tiene en su extremo 3' 6 bases complementarias al extremo 3' del sARN que queremos amplificar. De esta manera, se sintetiza un fragmento de ADNc con nuestro fragmento de interés más el stem-loop ligado. A continuación, para la qPCR se utiliza un *primer forward* específico de nuestro ARN pequeño y un *primer reverso* "universal" que hibrida con el stem-loop.

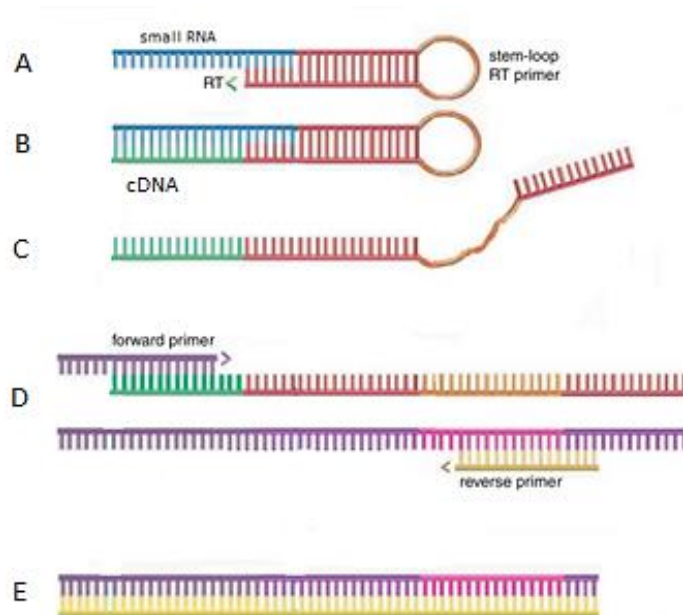


Figura 4. Esquema de una stem-loop RT-PCR. A) y B) unión (annealing) del extremo 5' del primer stem-loop al extremo 3' del sRNA (azul) durante la retrotranscripción y el cDNA resultante (verde). C) cDNA luego de la desnaturación mediada por calor. D) polimerización, el forward primer desde el extremo 5' y el reverse primer desde el extremo 3'. E) producto de PCR. Modificado a partir de (64).

Debido a la conocida baja concentración de los sRNA en suero, para la retrotranscripción, los volúmenes de todas las muestras de ARN extraído fueron normalizadas para 1 ng calculando un volumen total de 4 ul a completar con agua destilada, según las concentraciones de sARN obtenidas con *Qubit 4 Fluorometer* de Invitrogen. Para este procedimiento se utilizó la retrotranscriptasa *SuperScript II reverse transcriptase* de Thermo Fisher Scientific y el termociclador *Applied Biosystems Veriti* de 96 wells de Thermo Fisher Scientific.

Posteriormente se realizaron qPCR en el equipo *QuantStudio 3 PCR System* de Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific utilizando como fluoróforo Sybr-green, que se une inespecíficamente a ADN doble hebra. Se realizó mediante técnica estándar para una placa de 96 pocillos, con análisis de curva de melting y delta cT. Para la puesta a punto de la técnica se analizaron las curvas de melting para descartar la formación de dímeros de primers o productos secundarios. Se realizaron tres réplicas técnicas de cada muestra biológica y se utilizó un oligonucleótido sintético 168-scr (denominado *spike-in*), no presente en seres humanos, como normalizador y control positivo de la RT-qPCR. Se añadieron 6 ul de una solución 100 nM del oligonucleótido para cada muestra durante el aislamiento de ARN, por lo cual además funciona como predictor de calidad de la extracción de ARN y de la RT-qPCR. Como control negativo de la qPCR se utilizó NTC (del inglés *non template control*), una muestra con agua destilada, sin ADNc (ADN copia), para cada uno de los blancos Y4-RNA, gly_GCC, glu_TTC y 168-scr, necesario para descartar amplificación por algún contaminante.

Los resultados de RT-qPCR se estudiaron mediante una modificación del método de cuantificación relativa de la expresión de los transcritos o método comparativo de los Ct, descrito por T. D. Schmittgen y K. Livak (65,66). El mismo deriva de la ecuación $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y es utilizado frecuentemente en este tipo de estudios. Asume una eficiencia de la reacción similar para los marcadores o genes a analizar y el transcrito o gen de referencia. Como fue analizado previamente, en nuestro caso, el transcrito de referencia es el 168-scr (*spike-in*), un fragmento de oligonucleótidos generado sintéticamente que fue agregado a todas las muestras en una misma cantidad. En otros estudios es habitual utilizar genes de referencia de expresión conocida como por ejemplo GAPDH, beta-actina o el micro-ARN U6, que descartamos por tratarse de muestras de suero y no tisulares. El valor Ct representa el ciclo de amplificación a partir del cual la señal

fluorescente comienza a ser detectable. Esto implica que a mayor valor de Ct, menor concentración del ARN en la muestra (relación inversa). Esto fundamenta el signo negativo del exponente $-\Delta Ct$ para obtener una correlación directa entre los valores de Ct y niveles respectivos del biomarcador. El análisis con el método del Ct constituye una medida relativa de la concentración del marcador analizado en la reacción de qPCR y puede ser afectado por múltiples factores de la reacción además de la concentración del objetivo. En este sentido, la normalización con un transcripto o gen de referencia permite corregir los resultados sin que influyan posibles variaciones en la cantidad de los diferentes ARN en cada muestra, siguiendo el cálculo $\Delta Ct = Ct$ del marcador en estudio $- Ct$ del transcripto de referencia *spike-in*. Esto es especialmente importante para nuestro estudio donde contamos con cantidades muy pequeñas de sRNA en cada muestra. Por otra parte, dado que los datos fueron analizados de forma individual, para pasar los resultados obtenidos en las reacciones de qPCR expresados originalmente en una escala exponencial a una escala lineal que tome en cuenta estas diferencias usamos la fórmula $2^{-\Delta Ct}$.

3.5. Metodología para análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en el programa informático GraphPad Prism 9. 1. 0 (GraphPad Software, CA, USA). Se realizó un test de normalidad (Kolmogorov Smirnov y Shapiro Wilk) para analizar si el conjunto de datos se ajustó o no a una distribución normal. Se demostró que los datos no se distribuyen normalmente ($p < 0.001$), Tabla 1. Siguiendo esta afirmación, la comparación relativa de los niveles de expresión de Y4-RNA, gly_GCC y glu_TTC entre pacientes con cáncer de pulmón y controles clínicamente sanos fue analizada mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney para muestras no pareadas utilizando los valores de $2^{-\Delta Ct}$. Considerando que las variables no tienen distribución simétrica se analizaron las medianas como parámetro de tendencia central y percentiles 25 y 75 para estudiar la dispersión de los datos. También se muestran, a modo de completar el análisis, los valores expresados en valores absolutos y medias con sus respectivos desvíos estándares. Se consideraron estadísticamente significativos resultados con valores de $p < 0,05$.

El valor de Y4, gly y glu como biomarcadores en suero de cáncer de pulmón fue analizado mediante la construcción de curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*) para cada uno de los marcadores estudiando los datos según la fórmula $2^{-\Delta Ct}$. Se calculó el área debajo de la curva (AUC) y su intervalo de confianza al 95% para evaluar la capacidad discriminante global del test. Se consideró valores de AUC menores a 0,6 como una prueba de poco valor diagnóstico, de 0,6 a 0,75 como de moderado valor diagnóstico, e igual o mayor a 0,75 de buena capacidad discriminante global. El valor p resulta del contraste de hipótesis en el que la hipótesis nula es que el área debajo de la curva es = 0,5 y la hipótesis alternativa es que el área debajo de la curva es $> 0,5$. Se analizaron varios puntos de corte con sus valores de sensibilidad y especificidad para definir cuál sería el más adecuado para esta prueba. A su vez, se tuvieron en cuenta para cada punto de corte los valores de *likelihood ratio* positivo o LR + (razón de verosimilitud), definido como el cociente entre la probabilidad de observar un resultado positivo en los pacientes con la enfermedad y la probabilidad de tener ese mismo resultado en pacientes sin la enfermedad.

Test para distribución normal

Shapiro-Wilk test	P Gly	C Gly	P Y4	C Y4	P Glu	C Glu
<i>W</i>	0,3639	0,6083	0,3905	0,3593	0,3148	0,7397
<i>P value</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Kolmogorov-Smirnov test						
<i>KS distance</i>	0,3605	0,3103	0,4012	0,4846	0,3949	0,2771
<i>P value</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

<i>Number of values</i>	40	20	40	20	40	20
-------------------------	----	----	----	----	----	----

Tabla 1. Análisis de distribución normal para pacientes y controles de Gly, Y4 y Glu según test de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov.

4. Resultados

Características de la población

Las características clínicas e histopatológicas de la población con cáncer de pulmón y controles clínicamente normales se resumen en la tabla 2 y 3. Ambos grupos tuvieron características similares en cuanto a distribución etaria, sexo y comorbilidades. Todos los pacientes y controles eran tabaquistas. En cuanto a las características de la enfermedad, la mayoría fue diagnosticado en estadios locorregionalmente avanzado o metastásico, tan solo un 7,5% se encontró localizado al órgano. El subtipo histológico más representado fue el adenocarcinoma, en tanto hubo pocos pacientes con cáncer de pulmón a células pequeñas y/o grandes (6 pacientes). Debido a las características de la muestra, con el fin de facilitar el análisis de los datos según el estadio TNM (8va edición de la AJCC-UICC), se decidió agrupar a los pacientes del siguiente modo: pacientes con enfermedad en estadio potencialmente quirúrgico (estadios I, II y IIIA) que denominamos con fines prácticos “Estadios tempranos”, en comparación con estadios no quirúrgicos de inicio (IIIB, IIIC y IV) que denominamos “Estadios avanzados”.

	GRUPO CÁNCER DE PULMÓN (N=40)	GRUPO CONTROL (N=20)
EDAD		
MEDIA (RANGO)	61,97 (50 - 77)	58,45 (45 - 73)
SEXO		
FEMENINO	10 (25%)	5 (25%)
MASCULINO	30 (75%)	15 (75%)
PERFIL TABÁQUICO (EXPOSICIÓN PROLONGADA)		
SI	40 (100%)	20 (100%)
COMORBILIDADES *		
SI	30 (75%)	14 (70%)
NO	10 (25%)	6 (30%)

Tabla 2. Características clínicas. * Como comorbilidades se tomó en cuenta antecedentes de hipertensión arterial, cardiopatía isquémica, EPOC, consumo abusivo de alcohol, diabetes mellitus y distiroidismos.

Estadio TNM	N (%)
I y II	3 (7,5)
III A	8 (20)
III B y C	3 (7,5)
IV	21 (52,5)
Localizado *	1 (2,5)
Extendido *	3 (7,5)
Histopatología	N (%)
No células pequeñas	31 (77,5)
Adenocarcinoma	14 (45,2)
Escamoso	12 (38,7)
Indiferenciado / Mixto	5 (16,1)
Células pequeñas	5 (12,5)
Células grandes	1 (2,5)
Desconocido	3 (7,5)

Tabla 3. Estadios y características histopatológicas de los pacientes con cáncer de pulmón. El cáncer broncopulmonar se divide en no células pequeñas y células pequeñas con sus diferentes subtipos. *Los tumores de células pequeñas se estadifican según su extensión en localizado y extendido, no tiene el mismo valor la clasificación habitual TNM utilizada para los tumores no células pequeñas.

Se observó una mayor expresión de gly_GCC en pacientes con cáncer de pulmón

Se comparó la expresión relativa de las mitades 5' derivadas de tRNA de gly_GCC, glu_TTC y de Y4-RNA en pacientes con cáncer de pulmón con controles clínicamente sanos. El análisis de la distribución de los datos de $2^{-\Delta ct}$ para cada biomarcador se resume en la *tabla 3*. Se observó un aumento estadísticamente significativo de la expresión de gly_GCC en pacientes con cáncer broncopulmonar ($p=0,041$, Test de Mann-Whitney para dos colas). En tanto, para glu_TTC y los Y4-RNA no hubo diferencias significativas ($p=0,4187$ y $0,2907$ respectivamente, Test de Mann-Whitney para dos colas) entre pacientes y controles. Estos resultados se analizan en la *Figura 5*. Teniendo en cuenta la relación de las medianas de $2^{-\Delta ct}$ entre pacientes y controles ($0,020 / 0,0065$), la expresión de gly_GCC fue 3.08 veces mayor en pacientes con cáncer de pulmón que en los controles clínicamente normales.

Estadísticos descriptivos de $2^{-\Delta ct}$ para pacientes y controles							
Marcador		N	Media	Desvío Estándar	Mediana	Percentil 25	Percentil 75
Gly	Pacientes	40	,14360	,401850	0,0200	0,004	0,1203
	Controles	20	,03042	,054306	0,0065	0,002	0,0280
Y4	Pacientes	40	,00542	,015251	0,0004645	0,0001755	0,001888
	Controles	20	,00986	,031295	0,0002325	0,000081	0,001881
Glu	Pacientes	40	,03286	,102676	0,0050	0,00200	0,02175
	Controles	20	,01387	,019487	0,0030	0,00025	0,02500

Tabla 3. Estadísticos descriptivos. Se analizó la distribución de los datos de $2^{-\Delta ct}$ de pacientes con cáncer de pulmón y controles para cada uno de los biomarcadores según la media y su desvío estándar, mediana y percentiles 25 y 75.

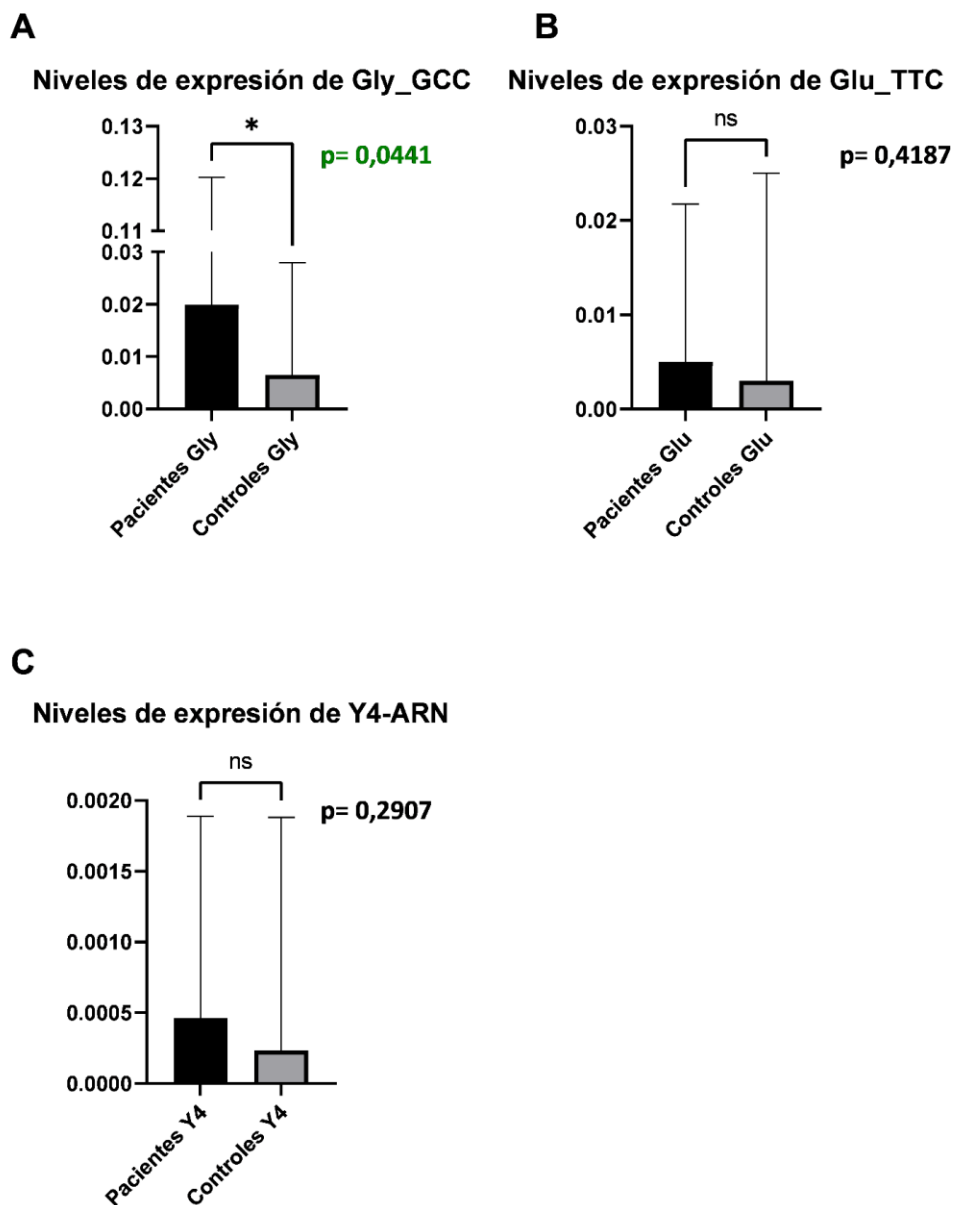


Figura 5. Comparación de los niveles de expresión de gly_GCC, Y4-RNA y glu_TTC entre pacientes con cáncer de pulmón y controles clínicamente sanos mediante test de Mann-Whitney para dos colas. Los datos se expresaron como medianas con sus rangos intercuartílicos.

Existe un posible rol de gly_GCC como biomarcador en suero para cáncer de pulmón

Cuando se compararon las medianas de los niveles de expresión entre pacientes y controles solo la diferencia de gly_GCC resultó significativamente elevada, *Figura 5*. Posteriormente, se analizó el potencial diagnóstico de gly_GCC, glu_TTC y Y4-RNA circulantes en cáncer de pulmón mediante representación gráfica de la sensibilidad frente a la especificidad diagnóstica (curvas ROC [*Receiver Operating Characteristic*]) para un sistema clasificador binario. Se demostró que gly_GCC podría ser un biomarcador circulante dada un área debajo de la curva (AUC) de 0,66 con una $p= 0,0447$. La *tabla 4* muestra la sensibilidad y especificidad para cuatro puntos de corte posibles. Podría alcanzarse una sensibilidad para la prueba diagnóstica de 70% sin comprometer la especificidad a menos del 55%. Una razón de verosimilitud (likelihood ratio o LR) menor a 2 no implicaría un gran cambio en la conducta clínica con el biomarcador por sí solo. Para los otros dos biomarcadores no se alcanzó la significancia

estadística por lo que no tendrían valor de discriminación entre ambos grupos. Los detalles de este análisis se muestran en la *Figura 6*.

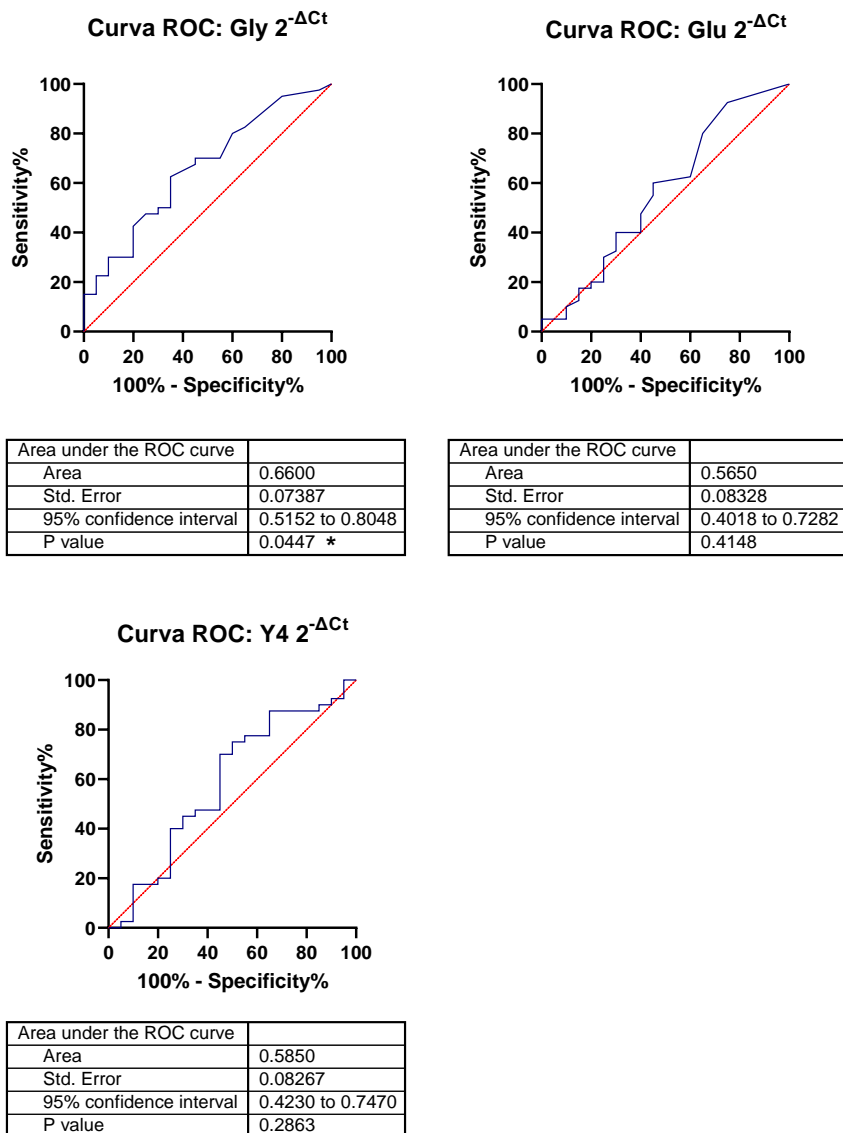


Figura 6. Análisis mediante la construcción de curvas ROC de gly_GCC, glu_TTC y Y4-RNA como biomarcadores circulantes en suero en pacientes con cáncer de pulmón. Para cada uno se muestra el área debajo de la curva y valor p.

	Sensibilidad	Especificidad	LR+
> 0.007500	70,00	55,00	1,556
> 0.009000	67,50	55,00	1,500
> 0.01100	62,50	65,00	1,786
> 0.01300	60,00	65,00	1,714
> 0.01500	57,50	65,00	1,643

Tabla 4. Selección de distintos puntos de corte para analizar la sensibilidad y especificidad para un posible test diagnóstico con gly_GCC. También se muestran los valores de likelihood ratio o LR + (razón de verosimilitud).

Relación de los biomarcadores con la etapa de la enfermedad

Se estudió la expresión de los tres biomarcadores tomando en cuenta el estadio de la enfermedad según la clasificación TNM. Los niveles de expresión de gly_GCC fueron significativamente mayores en pacientes con cáncer de pulmón en estadios avanzados en comparación con controles sanos ($p=0,0214$ Test de Mann-Whitney para dos colas), Figura 7. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en estadios precoces. Tampoco se encontró relación entre los niveles de glu_TTC y Y4-RNA y el estadio de la enfermedad. Se observó que gly_GCC podría ser un mejor biomarcador asociado a estadios avanzados de la enfermedad con un AUC de 0,7 en el análisis de curva ROC ($p= 0,0222$), en tanto esto no pudo ser demostrado para estadios más precoces. Es importante destacar el bajo número de pacientes en estadio precoz (11 pacientes), de los cuales la mayoría era estadio IIIA (8 pacientes). Estos datos se detallan en las Tablas 5 A y B.

A

Área debajo de la curva ROC para Estadios tempranos

	Gly	Y4	Glu
<i>Area</i>	0,5727	0,5045	0,5455
<i>Std. Error</i>	0,1086	0,112	0,1116
<i>95% confidence interval</i>	0,3599 to 0,7855	0,2846 to 0,7245	0,3268 to 0,7641
<i>P value</i>	0,5089	0,9671	0,6797
<i>Pacientes</i>	11	11	11
<i>Controles</i>	20	20	20

B

Área debajo de la curva ROC para Estadios avanzados

	Gly	Y4	Glu
<i>Area</i>	0,7021	0,6229	0,5963
<i>Std. Error</i>	0,08011	0,08925	0,09057
<i>95% confidence interval</i>	0,5451 to 0,8591	0,4480 to 0,7978	0,4187 to 0,7738
<i>P value</i>	0,0222 *	0,1643	0,2977
<i>Pacientes</i>	24	24	24
<i>Controles</i>	20	20	20

Tabla 5. Análisis del área debajo de la curva ROC para los biomarcadores gly_GCC, Y4ARN y gly_TTC según la etapa de la enfermedad.

Relación de los biomarcadores con la histopatología

Se estudió si existían diferencias en la expresión de gly_GCC, glu_TCC y Y4-RNA según el tipo histológico de cáncer de pulmón analizado (Figura 7). Los niveles de expresión de gly_GCC, glu_TCC y Y4-RNA no fueron capaces de discriminar entre subtipos histológicos (Test de Mann-Whitney para dos colas). Posteriormente, se analizó el rol como biomarcadores diagnósticos según el tipo histológico, si bien puede observarse una clara tendencia hacia la significancia estadística de gly_GCC para los cánceres de pulmón no células pequeñas ($p= 0,0698$) y de glu_TTC para los tumores de células pequeñas ($p= 0,0571$), ninguno de ellos alcanzó la significancia estadística. Es importante destacar el bajo número de pacientes con esta última histología (5 pacientes) Tabla 6 A y B. Tampoco se observaron diferencias significativas entre tumores escamosos y no escamosos (adenocarcinoma) Tabla 6 C y D. Cabe destacar que la mayoría de los adenocarcinomas se encontraban en los estadios definidos como avanzado (12

de 14 pacientes), mientras que esto ocurrió para la mitad de los tumores escamosos (6 de 12 pacientes).

A

Área debajo de la curva ROC para No células pequeñas

	Gly	Y4	Glu
<i>Area</i>	0,6516	0,5839	0,5524
<i>Std. Error</i>	0,07870	0,08673	0,08658
<i>95% confidence interval</i>	0,4974 to 0,8059	0,4139 to 0,7539	0,3827 to 0,7221
<i>P value</i>	0,0698	0,3158	0,5307
<i>Pacientes</i>	31	31	31
<i>Controles</i>	20	20	20

B

Área debajo de la curva ROC para Células pequeñas

	Gly	Y4	Glu
<i>Area</i>	0,6300	0,6000	0,7800
<i>Std. Error</i>	0,1681	0,1505	0,08991
<i>95% confidence interval</i>	0,3006 to 0,9594	0,3051 to 0,8949	0,6038 to 0,9562
<i>P value</i>	0,3771	0,4969	0,0571
<i>Pacientes</i>	5	5	5
<i>Controles</i>	20	20	20

C

Área debajo de la curva ROC para Adenocarcinomas

	Gly	Y4	Glu
<i>Area</i>	0,6250	0,5857	0,5857
<i>Std. Error</i>	0,09995	0,09883	0,09977
<i>95% confidence interval</i>	0,4291 a 0,8209	0,3920 a 0,7794	0,3902 a 0,7813
<i>P value</i>	0,2207	0,4010	0,4010
<i>Pacientes</i>	14	14	14
<i>Controles</i>	20	20	20

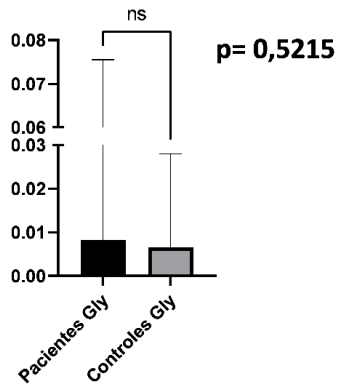
D

Área debajo de la curva ROC para Escamosos

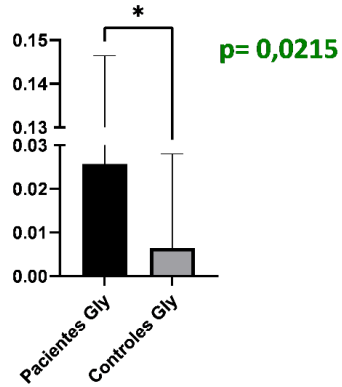
	Gly	Y4	Glu
<i>Area</i>	0,6917	0,6583	0,5375
<i>Std. Error</i>	0,09476	0,09585	0,1019
<i>95% confidence interval</i>	0,5059 a 0,8774	0,4705 a 0,8462	0,3378 a 0,7372
<i>P value</i>	0,0734	0,1391	0,7261
<i>Pacientes</i>	12	12	12
<i>Controles</i>	20	20	20

Tablas 6. Análisis del área debajo de la curva ROC para los biomarcadores gly_GCC, Y4-RNA y glu_TTC según el subtipo histológico de cáncer de pulmón. En A No células pequeñas y en B células pequeñas.

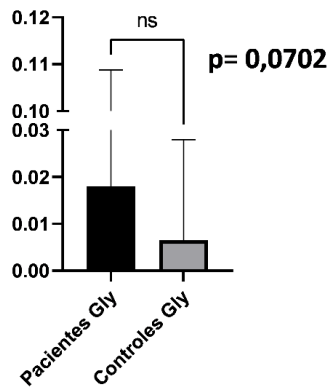
A Estadios tempranos Gly_GCC



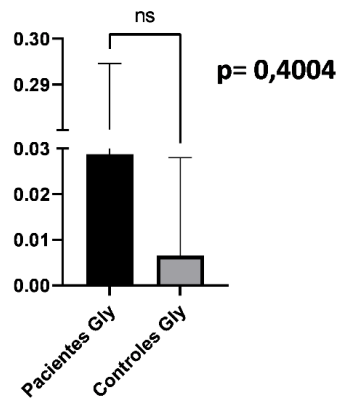
Estadios avanzados Gly_GCC



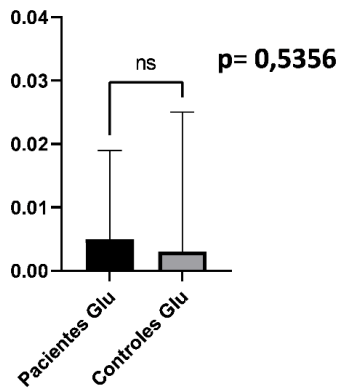
B No células pequeñas Gly_GCC



Células pequeñas Gly_GCC



C No células pequeñas Glu_TTC



Células pequeñas Glu_TTC

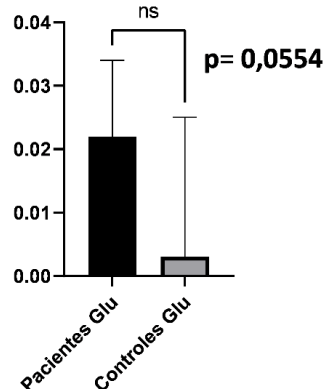


Figura 7. Comparación de los niveles de expresión de gly_GCC y glu_TTC entre pacientes con cáncer de pulmón y controles clínicamente sanos mediante test de Mann-Whitney para dos colas. Los datos se expresaron como medianas con sus rangos intercuartílicos.

5. Discusión

El cáncer de pulmón ocupa el primer lugar en mortalidad por cáncer para ambos sexos, esto se debe en parte al diagnóstico en etapas tardías, su agresividad inherente y la falta de marcadores más específicos para predecir la respuesta a los tratamientos disponibles (54,55). Estas características apoyan la búsqueda de nuevas estrategias para su detección precoz y caracterización de distintos perfiles biomoleculares. Como se describió previamente, estudios recientes en tejido, encontraron que algunos fragmentos y mitades derivadas de tRNA están asociadas con el proceso de inicio y progresión del cáncer broncopulmonar (48). Dado que gran parte de las células del organismo, incluyendo las células tumorales, son capaces de secretar sRNA al medio extracelular, recientemente los mismos han sido objeto de estudio como potencial biomarcadores circulantes en cáncer (18,67). Un biomarcador circulante de utilidad médica en cáncer debería incidir en la conducta clínica. Respecto a su posible rol como método de tamizaje o diagnóstico precoz debe ser un método accesible, mínimamente invasivo, reproducible, y poco costoso (14,18,67). Hasta el momento, la tomografía de baja dosis constituye el estándar como método imagenológico de tamizaje en población de alto riesgo. La misma, resultó ser eficaz en disminuir la mortalidad por cáncer de pulmón mediante el diagnóstico precoz, pero aún resulta poco accesible y sus costos son elevados (58,63). Si bien la tasa de falsos positivos en los distintos reportes fue baja y en los últimos reportes incluso ha disminuido gracias a la estandarización de los resultados y mayor conocimiento de la técnica, en el primer ensayo clínico publicado (NLST) alcanzó un 13% basal, descendiendo a 5% con los subsiguientes controles anuales (similar a la de la mamografía) (58,61–63). Esto marca la importancia de poder contar con un biomarcador circulante que ayude en la toma de decisiones ante imágenes dudosas (por ejemplo, clasificando nódulos más pequeños o imágenes en vidrio deslustrado), aumentando la sensibilidad y especificidad del estudio de imagen por sí solo. Asimismo, podría ayudar a incluir pacientes que no están catalogados como alto riesgo y que desarrollarán la enfermedad. De este modo, un nuevo método mediante biopsia líquida de biomarcadores circulantes solos o asociados a la tomografía de baja dosis podría ser de gran valor para seleccionar y diagnosticar con mayor precisión los pacientes con cáncer de pulmón en estadio precoz (58,68).

Algunos trabajos recientes han demostrado perfiles diferenciales de expresión de sRNA derivados de tRNA y de fragmentos de Y-RNA para distintos tipos de tumores (5,18,67). La mayoría de ellos analizaron los niveles de expresión en tejido tumoral en comparación con tejido peritumoral sano (5). Sin embargo, el rol de los sRNA utilizados en este trabajo como biomarcadores circulantes es un campo todavía más nuevo del cual existen pocos trabajos publicados a la fecha.

En este trabajo analizamos el potencial diagnóstico de tRNA-h-gly_GCC y tRNA-h-glu_TTC y fragmentos 5' de Y4-RNA como biomarcadores circulantes de cáncer de pulmón mediante RT-qPCR. Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de expresión a nivel sérico de tRNA-h-gly_GCC entre pacientes con cáncer broncopulmonar y controles clínicamente sanos ($p=0,041$, Test de Mann-Whitney para dos colas). Los niveles de este fueron globalmente 3 veces mayores en individuos enfermos. Nuestros resultados muestran que las tRNA-h-gly_GCC se comportan como posibles biomarcadores circulantes estadísticamente significativos de cáncer broncopulmonar, de acuerdo con el análisis de la curva ROC con un AUC cercana a 0,7 ($p=0,045$). Se alcanzó una sensibilidad de 70% y especificidad de 55% como test diagnóstico. Por otro lado, los niveles de tRNA-h-glu_TTC y 5'-Y4-RNA no fueron capaces de discriminar entre población con cáncer de pulmón y control. Basados en estos valores, este biomarcador podría comportarse como un buen método de tamizaje o "screening" en poblaciones de alto riesgo dados los valores de sensibilidad, permitiendo justificar un estudio imagenológico.

Al analizar los datos según el estadio de la enfermedad (TNM 8va edición de la AJCC y UICC), la significancia estadística para tRNA-h-gly_GCC se alcanzó para los estadios avanzados (estadios IIIB, IIIC y IV), con un AUC de 0,7 ($p=0,022$). Los niveles de expresión fueron significativamente mayores en comparación con los controles ($p=0,0215$, Test de Mann-Whitney para dos colas). Si bien no se obtuvieron resultados significativos para estadios tempranos, debe tenerse en cuenta que el número de pacientes incluidos en

este estudio en estadio I y II fue muy pequeño. Solo un 7,5% (3/40) de los tumores de células no pequeñas y 2,5% (1/40) de los de células pequeñas analizados estaban localizados al pulmón, lo que podría haber influido en los resultados para este subconjunto de pacientes. Esto nos permite concluir que las mitades 5' de tRNA-gly_GCC son útiles como biomarcadores diagnósticos para etapas más avanzadas, aunque no podemos determinar su valor en estadios iniciales.

El valor diagnóstico según los tipos histopatológicos mostró que las mitades 5' de tRNA-gly_GCC no son capaces de discriminar significativamente entre los distintos tipos histológicos de cáncer de pulmón no células pequeñas (adenocarcinoma y escamoso). Sin embargo, observamos que las mitades 5' de tRNA-glu_TTC tienen una fuerte tendencia a aumentar en los tumores de células pequeñas. Debe tenerse en cuenta que sólo 5 pacientes tenían este subtipo histológico, lo que representa un número bajo para concluir sobre su valor diagnóstico. Este dato es, al menos, interesante y generador de hipótesis dado que este tipo de tumores son una entidad completamente diferente en cuanto a su evolución clínica y pronóstico, por lo que este biomarcador podría tener una expresión diferencial lo cual deberá ser validado en cohortes con un tamaño muestral adecuado.

En la actualidad existen muy pocos trabajos publicados similares al nuestro. Ninguno de ellos analiza el rol de las tRNA-h-gly, tRNA-h-glu y Y4-RNA como biomarcadores circulantes en el diagnóstico de cáncer broncopulmonar. Un trabajo analizó especies de sRNA a nivel de vesículas extracelulares extraídas de plasma mediante secuenciación y RT-qPCR (52). Se encontró un aumento marcado de la expresión de 5'-YARN-hy4 en pacientes con cáncer de pulmón no células pequeñas en comparación con controles (51 y 56% de las especies encontradas para adenocarcinoma y escamosos versus 17 % de los controles sanos), las mismas fueron las especies más representada junto con distintos miRNA (52). Según un ensayo de viabilidad celular, estos fragmentos podrían influir en la inhibición de la proliferación de las células tumorales actuando como supresores tumorales (52). Si bien las tRNA-h no resultaron las especies más representada a nivel de las VE según estos autores, se observó un aumento en 3 veces para las mismas en tumores escamosos en comparación con adenocarcinomas y controles (52). Debe tenerse en cuenta que este trabajo utilizó una metodología diferente a la nuestra analizando las VE en plasma, además, en esta etapa no buscó la eficacia diagnóstica de las especies estudiadas. Tiene como debilidad el bajo número de casos y sus hallazgos no se correlacionaron con características clínicas de los pacientes (52). Otro estudio, que sí tuvo un diseño similar al nuestro, mostró un aumento de la 5'-tRNA-h-leu_CAG (tRNA-h-leu_CAG) en suero de pacientes con cáncer de pulmón en comparación con controles, por lo que podría funcionar como biomarcador diagnóstico circulante (49). Para el análisis en suero se incluyeron 34 controles, 23 pacientes en estadio I, 16 en estadio II, 41 en estadio III y 53 en estadio IV (49). Tal como demostramos para tRNA-h-gly_GCC, para este biomarcador también encontraron un aumento significativo de los niveles relativos de expresión respecto a los controles para estadios avanzados III y IV (test-t, $p < 0,001$) y no así para estadios precoces (49). De acuerdo con el análisis de curva ROC que valoró capacidad diagnóstica de tRNA-h-leu_CAG en estadio IV el AUC fue de 0,7, resultado que se asemeja mucho a lo encontrado en nuestro estudio para tRNA-gly_GCC (49). Estos resultados, en conjunto con los obtenidos por nuestro grupo, apoyan el uso potencial de estos fragmentos como biomarcadores diagnósticos en un futuro cercano. A diferencia de nuestro trabajo, Shao et al. seleccionaron a tRNA-h-leu_CAG para su estudio como biomarcador circulante por ser que más se sobreexpresó a nivel de tejido tumoral en comparación con tejido peritumoral (49). Esto es importante dado que no fueron analizadas otras especies similares en suero que podrían tener un rol relevante, como por ejemplo las incluidas en nuestro estudio (49). Cabe destacar, que el secuenciado de ARN realizado por estos autores a partir de tejido de cáncer de pulmón y tejido peritumoral sano mostró que, después de tres tRNA-h-leu con tres isoaceptores diferentes, la siguiente especie más representada a nivel tumoral fue tRNA-h-gly_GCC con un incremento de 2 veces mayor ($p = 0,00014$) (49). Esto es interesante, debido a que en una etapa previa de nuestro estudio el análisis por secuenciado sobre tejido tumoral y peritumoral mostró a la tRNA-h-gly con dos isoaceptores diferentes como la especie más sobreexpresada en tejido enfermo (tesis de maestría de Lic. Julia Sanguinetti). Por otro lado, estos autores proponen que estas tRNA-h-leu_CAG estarían involucradas en la progresión de la enfermedad, así como también progresión del ciclo celular de la fase

G0 a G1 (49). En otro trabajo se desarrolló una firma molecular diagnóstica a partir de células mononucleares de sangre periférica en humanos utilizando sRNA no canónicos derivados de tRNA, rRNA y Y-RNA, denominada TRY-RNA (24). Mediante secuenciado masivo se observaron niveles de expresión elevados de las tRNA-h derivadas de -ala, -asp, -leu, -lys y -tyr en pacientes con cáncer de pulmón en relación con controles y pacientes con tuberculosis pulmonar ($p < 0,05$, test-t) (24). En cuanto a otras especies, los rRNA-5S estuvieron regulados en más, mientras que fragmentos de Y-RNA-RNY1 regulados en menos ($p < 0,05$, test-t) (24). Esta firma logró discriminar de forma significativa entre controles, cáncer de pulmón y tuberculosis pulmonar y alcanzó un AUC de 0,93 como test diagnóstico para discriminar entre pacientes con cáncer de pulmón y sin cáncer (24). Estos resultados apoyan la idea de buscar y validar firmas que incluyan varios biomarcadores con el fin de aumentar la sensibilidad y la especificidad alcanzada. Asimismo, se estudió la asociación de la expresión de estos sRNA no canónicos con el estadio de la enfermedad, tipo histológico, estatus ganglionar, estatus metastásico e historia de tabaquismo, sin observarse diferencias significativas (24). Si bien todos estos hallazgos no establecen una causalidad, sugieren que las mitades 5' de tRNA circulantes y fragmentos de Y-RNA posiblemente participen en la progresión tumoral. Se necesitan estudios a mayor escala para evaluar adecuadamente su rol como potenciales biomarcadores circulantes. La variabilidad encontrada en estos estudios puede deberse a la no estandarización de las técnicas utilizadas, diferencia en el uso de suero o plasma, diferencia en los criterios de selección de los sRNA circulantes a analizar, entre otros, como sucedía con los miRNA en sus comienzos.

Recientemente, también se ha analizado la expresión de mitades y fragmentos derivados de tRNA e Y-RNA como biomarcadores circulantes en otros tipos de cáncer. En este contexto, el más estudiado ha sido el cáncer de mama. En tres estudios se analizó la expresión de mitades 5' de tRNA en pacientes con cáncer de mama en comparación con controles (33,69,70). Se observó que estas especies eran abundantes en ambos grupos, pero el diagnóstico de cáncer de mama se asoció a cambios en los niveles de algunos subtipos de tRNA-h específicos (33,69,70). En uno de los estudios se logró correlacionar los perfiles de expresión de tRNA-h con el pronóstico de la enfermedad y su asociación con determinadas características histopatológicas y subtipos moleculares del cáncer de mama (33). Un estudio similar, con pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pancreático mostró que ciertas tRNA-h con niveles aumentados en la circulación de enfermos en combinación con el marcador tumoral conocido CA-19.9 lograron incrementar la sensibilidad y especificidad de este último en el diagnóstico de esta patología. (71). También se analizó la expresión de tRNA-h y de fragmentos de Y-RNA en suero de pacientes con carcinoma escamoso de cavidad oral en comparación con controles, encontrándose diferencias significativas. (72). Asimismo, otros autores encontraron una firma de 3 biomarcadores circulantes de tRNA-h en tumores escamosos de cabeza y cuello que deberá ser validada. También se vieron alterados los niveles de ciertas especies de fragmentos 5'-Y-RNA (73). La expresión de tRNA-h-val también vio aumentada en suero de pacientes con cáncer colorrectal en comparación con controles sanos (74).

Como debilidad nuestro estudio presenta un número bajo de pacientes incluidos. Por otro lado, los controles pareados por edad y perfil tabáquico se seleccionaron en cuanto estaban clínicamente sanos, pero no contaban con estudio imagenológico que confirmara que no tuvieran la enfermedad. Este dato es relevante dado que muchos de los controles compartían los mismos factores de riesgo para cáncer de pulmón que los pacientes. No se realizó secuenciación en busca de otras especies de sRNA circulantes posibles para su detección como biomarcadores diagnósticos. Los sRNA derivados de tRNA analizados se seleccionaron en base a un estudio previo de nuestro laboratorio que incluyó pacientes con adenocarcinoma de pulmón y todos fueron diagnosticados en una etapa locorregionalmente avanzada, lo que podría haber subestimado el rol de otros sRNA en estadios precoces u otras histologías. Además, inicialmente se descartaron sRNA que no tuvieran una expresión diferencial en tejido tumoral y peritumoral. Actualmente, existe evidencia de que los niveles de expresión a nivel intracelular no siempre se reflejan a nivel de la circulación (17). Asimismo, el aumento de la liberación de un sRNA puede estar dada como una respuesta en células adyacentes al crecimiento tumoral y no liberadas por el propio tumor. Como fortaleza debemos destacar que es uno de los pocos estudios que analizan la presencia de

fragmentos o mitades derivadas de tRNA como biomarcadores en suero en pacientes con cáncer en general y el tercero para cáncer broncopulmonar. El rol de los sRNA circulantes como biomarcadores en cáncer es un tema que requiere mayor desarrollo, por lo que estas primeras aproximaciones pueden ayudar a comprender mejor su rol como moléculas circulantes y sentar las bases para estudios a mayor escala, venciendo las dificultades encontradas hasta el momento.

6. Conclusiones y perspectivas

Se obtuvieron resultados originales y prometedores, de acuerdo con la literatura actual. De nuestro análisis surge que sólo las mitades 5' de tRNA-gly-GCC se comportaron como un potencial biomarcador de cáncer de pulmón con significación estadística. A su vez, existe una tendencia de gly-GCC y de glu-TTC a asociarse a los tipos histológicos de células no pequeñas y de células pequeñas respectivamente. Su capacidad diagnóstica debería ser analizada en cohortes de un mayor tamaño poblacional. Asimismo, consideramos importante reclutar mayor número de pacientes con enfermedad en estadio localizado para poder definir fehacientemente su rol en estadios precoces. Con estos datos, consideramos importante realizar un secuenciado masivo de sRNA en suero de muestras seleccionadas con el fin de identificar no sólo diferentes tamaños de estos biomarcadores, lo que permitiría diseñar RT-qPCR más específicas, sino también poder identificar nuevos pequeños ARN candidatos que no fueron analizados en este estudio. Analizar la evolución de los niveles de estos biomarcadores antes y después de realizado algún tipo de tratamiento oncológico para conocer cómo se modifican sus niveles de expresión. También sería importante analizar en una siguiente etapa la correlación entre los niveles de expresión y la evolución clínica de los pacientes con el fin de analizar su rol pronóstico. Consideramos que estos aspectos deberían analizarse en un nuevo estudio antes de validar estas biomoléculas como biomarcadores diagnósticos en cáncer broncopulmonar. Otro aspecto interesante podría ser el estudio de sRNA como factores predictivos de respuesta a los diferentes tratamientos con especial énfasis en inmunoterapia dada su comunicación demostrada con el sistema inmune.

7. Agradecimientos

Dr. Alfonso Cayota por su confianza, ser un excelente mentor y por los conocimientos adquiridos en esta etapa formativa.

Dr. Sergio Bianchi por el apoyo incondicional, compañía de largas horas en el laboratorio y todas sus enseñanzas.

Dr. Mauricio Cuello por participar en este proyecto y acompañarme en mi crecimiento como profesional desde que era estudiante de medicina.

Dra. Mariela Garau por su colaboración y correcciones fundamentales para el correcto el análisis estadístico de los resultados.

Dra. Dahiana Amarillo por el apoyo y participación conjunta en la obtención de muestras de pacientes y controles sanos para nuestros proyectos.

Dra. Clara Rodríguez y Dr. Siul Salisbury por su colaboración en el reclutamiento de pacientes.

Compañeros del Laboratorio de Genómica Funcional del Instituto Pasteur por su cálido recibimiento y ayuda en el laboratorio.

Compañeros del Depto. Básico de Medicina.

Al Programa para la Investigación Biomédica (ProInBio), a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), al Hospital de Clínicas, al Servicio de Oncología Clínica y al Instituto Pasteur de Montevideo.

A mi familia y amigos

8. Referencias bibliográficas

1. Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C. et al. International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860–921.
2. Elgar G, Vavouri T. Tuning in to the signals: noncoding sequence conservation in vertebrate genomes. *Trends Genet.* 2008;24(7):344–52.
3. Encode Consortium, Carolina N, Hill C. ENCODE Project Writes Eulogy For Junk DNA. *Science* (80-). 2012;337.
4. Rovira C, Güida MC, Cayota A. MicroRNAs and other small silencing RNAs in cancer. *IUBMB Life.* 2010;62(12):859–68.
5. Zhu L, Ge J, Li T, Shen Y, Guo J. tRNA-derived fragments and tRNA halves: The new players in cancers. *Cancer Lett [Internet].* 2019;452(February):31–7.
6. Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: An expanding universe. *Nat Rev Genet.* 2009;10(2):94–108.
7. Garcia-Silva MR, Cabrera-Cabrera F, Güida MC, Cayota A. Hints of tRNA-derived small RNAs role in RNA silencing mechanisms. *Genes (Basel).* 2012;3(4):603–14.
8. Tosar JP, Gámbaro F, Sanguinetti J, Bonilla B, Witwer KW, Cayota A. Assessment of small RNA sorting into different extracellular fractions revealed by high-throughput sequencing of breast cell lines. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(11):5601–16.
9. Wu KL, Tsai YM, Lien CT, Kuo PL, Hung JY. The roles of microRNA in lung cancer. *Int J Mol Sci.* 2019;20(7):1–24.
10. Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Med.* 2009;60:167–79.
11. Hurst DR, Edmonds MD, Welch DR. Metastamir: The field of metastasis-regulatory microRNA is spreading. *Cancer Res.* 2009;69(19):7495–8.
12. Iqbal MA, Arora S, Prakasam G, Calin GA, Syed MA. MicroRNA in lung cancer: role, mechanisms, pathways and therapeutic relevance. *Mol Aspects Med [Internet].* 2019;70(July):3–20.
13. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: A new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci.* 2010;101(10):2087–92.
14. Schaffner F, Merlin J-L, Bubnoff N von. Tumor liquid biopsies. 2019. 189 p.
15. Sestini S, Boeri M, Marchiano A, Pelosi G, Verri C, Suatoni P, et al. miRNA in lung cancer. *Oncotarget*, 2015, 6(32).
16. Balatti V, Croce CM. MicroRNA dysregulation and multi-targeted therapy for cancer treatment. *Adv Biol Regul [Internet].* 2020;75(August):100669.
17. Tosar JP, Cayota A. Extracellular tRNAs and tRNA-derived fragments. *RNA Biol [Internet].* 2020;17(8):1149–67.
18. Jia Y, Tan W, Zhou Y. Transfer RNA-derived small RNAs: potential applications as novel biomarkers for disease diagnosis and prognosis. *Ann Transl Med.* 2020;8(17):1092–1092.
19. Fu H, Feng J, Liu Q, Sun F, Tie Y, Zhu J, et al. Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells. *FEBS Lett [Internet].* 2009;583(2):437–42.
20. Yamasaki S, Ivanov P, Hu GF, Anderson P. Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. *J Cell Biol.* 2009;185(1):35–42.
21. Pavel Ivanov, Mohamed M. Emar, Judit Villen, Steven P. Gygi and PA. Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation. *Bone [Internet].* 2011;23(1):1–7.
22. Saikia M, Jobava R, Parisien M, Putnam A, Krokowski D, Gao X-H, et al. Angiogenin-Cleaved tRNA Halves Interact with Cytochrome c, Protecting Cells from Apoptosis during Osmotic Stress. *Mol Cell Biol.* 2014;34(13):2450–63.
23. Elbarbary RA, Takaku H, Uchiumi N, Tamiya H, Abe M, Takahashi M, et al. Modulation of gene expression by human cytosolic tRNase ZL through 5'-half-tRNA. *PLoS One.* 2009;4(6).
24. Gu W, Shi J, Liu H, Zhang X, Zhou JJ, Li M, et al. Peripheral blood non-canonical small non-coding RNAs as novel biomarkers in lung cancer. *Mol Cancer.* 2020;19(1):4–9.

25. Garcia-Silva MR, Frugier M, Tosar JP, Correa-Dominguez A, Ronalte-Alves L, Parodi-Talice A, et al. A population of tRNA-derived small RNAs is actively produced in *Trypanosoma cruzi* and recruited to specific cytoplasmic granules. *Mol Biochem Parasitol* [Internet]. 2010;171(2):64–73.
26. Gullà C, Signore F, Gaffi M, Gigli S, Votino R, Nucciotti R, et al. Y RNA: An overview of their role as potential biomarkers and molecular targets in human cancers. *Cancers (Basel)*. 2020;12(5):1–21.
27. Guglas K, Kołodziejczak I, Kolenda T, Kopczyńska M, Teresiak A, Sobocińska J, et al. YRNAs and YRNA-derived fragments as new players in cancer research and their potential role in diagnostics. *Int J Mol Sci*. 2020;21(16):1–12.
28. Driedonks TAP, Nolte-T’Hoen ENM. Circulating Y-RNAs in extracellular vesicles and ribonucleoprotein complexes; Implications for the immune system. *Front Immunol*. 2019;10(JAN):1–15.
29. Tosar JP, Gámbaro F, Darré L, Pantano S, Westhof E, Cayota A. Dimerization confers increased stability to nucleases in 5 halves from glycine and glutamic acid tRNAs. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(17):9081–93.
30. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 2011;13:423–33.
31. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9(6):654–9.
32. Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D’Souza-Schorey C. Microvesicles: Mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci*. 2010;123(10):1603–11.
33. Dhahbi JM, Spindler SR, Atamna H, Boffelli D, Martin DIK. Deep Sequencing of Serum Small RNAs Identifies Patterns of 5’ tRNA Half and YRNA Fragment Expression Associated with Breast Cancer. *Biomark Cancer*. 2014;6:BIC.S20764.
34. Dhahbi JM, Spindler SR, Atamna H, Yamakawa A, Boffelli D, Mote P, et al. 5’ tRNA halves are present as abundant complexes in serum, concentrated in blood cells, and modulated by aging and calorie restriction. *BMC Genomics*. 2013;14(1):1–14.
35. Dhahbi JM, Spindler SR, Atamna H, Boffelli D, Mote P, Martin DIK. 5-YRNA fragments derived by processing of transcripts from specific YRNA genes and pseudogenes are abundant in human serum and plasma. *Physiol Genomics*. 2013;45(21):990–8.
36. Lyons SM, Gudanis D, Coyne SM, Gdaniec Z, Ivanov P. Identification of functional tetramolecular RNA G-quadruplexes derived from transfer RNAs. *Nat Commun*. 2017;8(1).
37. Schimmel P. RNA Processing and Modifications: The emerging complexity of the tRNA world: Mammalian tRNAs beyond protein synthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(1):45–58.
38. Gámbaro F, Li Calzi M, Fagúndez P, Costa B, Greif G, Mallick E, et al. Stable tRNA halves can be sorted into extracellular vesicles and delivered to recipient cells in a concentration-dependent manner. *RNA Biol* [Internet]. 2020;17(8):1168–82.
39. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018;7(1).
40. Haderk F, Schulz R, Iskar M, Cid LL, Worst T, Willmund K V., et al. Tumor-derived exosomes modulate PD-L1 expression in monocytes. *Sci Immunol*. 2017;2(13):1–12.
41. Nicole Guzman, Kitty Agarwal, Dilip Asthagiri, Lianbo Yu, Motoyasu Saji, Matthew D. Ringel and MEP. Breast Cancer-Specific miR Signature Unique to Extracellular Vesicles includes “microRNA-like” tRNA Fragments. *Mol Cancer Res*. 2015;13(5):891–901.
42. Aristeidis G, Telonis and Isidore Rigoutsos. Race disparities in the contribution of miRNA isoforms and tRNA-derived fragments to triple-negative breast cancer. *Cancer Res*. 2018;78(5):1140–54.

43. Goodarzi H, Liu X, Nguyen HCB, Zhang S, Fish L, Tavazoie SF. Endogenous tRNA-derived fragments suppress breast cancer progression via YBX1 displacement. *Cell*. 2015;161(4):790–802.
44. Wang X, Yang Y, Tan X, Mao X, Wei D, Yao Y, et al. Identification of tRNA-Derived Fragments Expression Profile in Breast Cancer Tissues. *Curr Genomics*. 2019;20(3):199–213.
45. Cui Y, Huang Y, Wu X, Zheng M, Xia Y, Fu Z, et al. Hypoxia-induced tRNA-derived fragments, novel regulatory factor for doxorubicin resistance in triple-negative breast cancer. *J Cell Physiol*. 2019;234(6):8740–51.
46. Sun C, Yang F, Zhang Y, Chu J, Wang J, Wang Y, et al. TRNA-Derived Fragments as Novel Predictive Biomarkers for Trastuzumab-Resistant Breast Cancer. *Cell Physiol Biochem*. 2018;49(2):419–31.
47. Pekarskya Y, Balatti V, Palamarchuk A, Rizzotto L, Veneziano D, Nigita G, et al. Dysregulation of a family of short noncoding RNAs, tsRNAs, in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(18):5071–6.
48. Balatti V, Nigita G, Veneziano D, Drusco A, Stein GS, Messier TL, et al. tsRNA signatures in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(30):8071–6.
49. Shao Y, Sun Q, Liu X, Wang P, Wu R, Ma Z. tRF-Leu-CAG promotes cell proliferation and cell cycle in non-small cell lung cancer. *Chem Biol Drug Des*. 2017;90(5):730–8.
50. Christov CP, Trivier E, Krude T. Noncoding human Y RNAs are overexpressed in tumours and required for cell proliferation. *Br J Cancer*. 2008;98(5):981–8.
51. Meiri E, Levy A, Benjamin H, Ben-David M, Cohen L, Dov A, et al. Discovery of microRNAs and other small RNAs in solid tumors. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(18):6234–46.
52. Li C, Qin F, Hu F, Xu H, Sun G, Han G, et al. Characterization and selective incorporation of small non-coding RNAs in non-small cell lung cancer extracellular vesicles. *Cell Biosci [Internet]*. 2018 Jan 10 [cited 2021 Jun 2];8(1).
53. Tosar JP, Segovia M, Castellano M, Gámbaro F, Akiyama Y, Fagúndez P, et al. Fragmentation of extracellular ribosomes and tRNAs shapes the extracellular RNAome. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(22):12874–88.
54. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394–424.
55. The National Comprehensive Cancer Network. Non-Small Cell Lung. Guidelines. 2021;
56. Barrios E, Garau M. Cáncer : magnitud del problema en el mundo y en Uruguay , aspectos epidemiológicos. *AnFaMed*. 2017;4(1):9–46.
57. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WEE, et al. The IASLC lung cancer staging project: Proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM Classification for lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2016;11(1):39–51.
58. Sands J, Tammemägi MC, Couraud S, Baldwin DR, Borondy-Kitts A, Yankelevitz D, et al. Lung Screening Benefits and Challenges: A Review of The Data and Outline for Implementation. *J Thorac Oncol*. 2021;16(1):37–53.
59. Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer. Situación Epidemiológica del Uruguay en relación al Cáncer. *Regist Nac del Cáncer, Com Honor Lucha Contra el Cáncer*. 2019;1–61.
60. The National Lung Screening Trial Research Team. Reduced Lung-Cancer Mortality with Low-Dose Computed Tomographic Screening. *N Engl J Med*. 2011;365(5):395–409.
61. The National Lung Screening Trial Research Team. Lung Cancer Incidence and Mortality with Extended Follow-up in the National Lung Screening Trial. *J Thorac Oncol*. 2019;14(10):1732–42.
62. de Koning HJ, van der Aalst CM, de Jong PA, Scholten ET, Nackaerts K, Heuvelmans MA, et al. Reduced Lung-Cancer Mortality with Volume CT Screening in a Randomized Trial. *N Engl J Med*. 2020;382(6):503–13.
63. National Comprehensive Cancer Network. Lung Cancer Screening. *NCCN Clin Pract Guid Oncol*. 2021.

64. Kramer MF. Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Curr Protoc Mol Biol*. 2011;(SUPPL. 95):1–15.
65. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101–8.
66. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
67. Zeng T, Hua Y, Sun C, Zhang Y, Yang F, Yang M, et al. Relationship between tRNA-derived fragments and human cancers. *Int J Cancer*. 2020;147(11):3007–18.
68. Kan CFK, Unis GD, Li LZ, Gunn S, Li L, Soyer HP, et al. Circulating Biomarkers for Early Stage Non-Small Cell Lung Carcinoma Detection: Supplementation to Low-Dose Computed Tomography. *Front Oncol*. 2021;11(April):1–11.
69. Wang J, Ma G, Ge H, Han X, Mao X, Wang X, et al. Circulating tRNA-derived small RNAs (tsRNAs) signature for the diagnosis and prognosis of breast cancer. *npj Breast Cancer*. 2021;7(1):2–6.
70. Wang J, Ma G, Li M, Han X, Xu J, Liang M, et al. Plasma tRNA Fragments Derived from 5' Ends as Novel Diagnostic Biomarkers for Early-Stage Breast Cancer. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 2020;21(September):954–64.
71. Xue M, Shi M, Xie J, Zhang J, Jiang L, Deng X, et al. Serum tRNA-derived small RNAs as potential novel diagnostic biomarkers for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Cancer Res [Internet]*. 2021;11(3):837–48.
72. Dhahbi J, Nunez Lopez YO, Schneider A, Victoria B, Saccon T, Bharat K, et al. Profiling of tRNA Halves and YRNA Fragments in Serum and Tissue From Oral Squamous Cell Carcinoma Patients Identify Key Role of 5' tRNA-Val-CAC-2-1 Half. *Front Oncol*. 2019;9 (September).
73. Martinez BV, Dhahbi JM, Nunez Lopez YO, Lamperska K, Golusinski P, Luczewski L, et al. Circulating small non coding RNA signature in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(22):19246–63.
74. Li S, Shi X, Chen M, Xu N, Sun D, Bai R, et al. Angiogenin promotes colorectal cancer metastasis via tiRNA production. *Int J Cancer*. 2019;145(5):1395–407.