

# VNIVERSIDAD D SALAMANCA

Programa de Doctorado en Cirugía y Odontoestomatología

Departamento de cirugía

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells  
containing PTCSC3 mitigate erlotinib resistance in lung  
adenocarcinoma cells through modulation of the Wnt/ $\beta$ -Catenin  
signaling pathway

BOHÁNG CHEN

Salamanca, 2025





# VNiVERSiDAD D SALAMANCA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIRUGIA Y  
ODONTOESTOMATOLOGIA

DEPARTAMENTO DE CIRUGIA

FACULTAD DE MEDICINA

## TESiS DOCTORAL

**Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells  
containing PTCSC3 mitigate erlotinib resistance in lung  
adenocarcinoma cells through modulation of the Wnt/ $\beta$ -Catenin  
signaling pathway**

Autor:

**Bohang Chen**

Director:

**Profa. Dra. M<sup>a</sup> Begoña García Cenador**

Firmado por GARCIA CENADOR  
MARIA BEGOÑA - [REDACTED] el  
día 20/06/2025 con un  
certificado emitido por AC  
FNMT Usuarios

Salamanca, 2025

Firmado por ALCAZAR  
MONTERO JOSE ANTONIO -  
[REDACTED] el día  
23/06/2025 con un  
certificado emitido  
por AC FNMT Usuarios



**Dña. M<sup>a</sup> Begoña García Cenador, Profesora Titular de Universidad del  
Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca.**

**CERTiFiCA:**

Que el trabajo presentado por Dña. Bohang Chen ha sido realizado bajo mi dirección y reúne los requisitos necesarios para su presentación y defensa ante el Tribunal Calificador.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente documento a ??? de junio de 2025.

Fdo. Profa. M<sup>a</sup> Begoña García Cenador



## AGRADECIMIENTOS

A lo largo de este camino académico, muchas personas han contribuido de manera significativa a la realización de esta tesis doctoral. A todas ellas, les expreso mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar, a mi directora de tesis, la Dra. María Begoña García Cenador, por su guía constante, su experiencia científica, su paciencia inquebrantable y su apoyo en cada etapa del proyecto. Su orientación ha sido fundamental para el desarrollo de este trabajo.

Agradezco profundamente al Departamento de Cirugía y Odontoestomatología de la Universidad de Salamanca, por brindarme el entorno académico necesario para llevar a cabo esta investigación, así como por su apoyo institucional.

A mis compañeros de laboratorio y del entorno clínico, por su colaboración, su ayuda técnica y sus valiosos consejos durante los procedimientos experimentales. Vuestra compañía ha hecho este proceso mucho más enriquecedor y llevadero.

A mi familia, especialmente a mis padres, por su amor incondicional, su comprensión a la distancia y por ser mi principal fuente de fortaleza y motivación.

También quiero expresar mi gratitud a todas las personas que, de forma directa o indirecta, han hecho posible esta tesis, ya sea mediante apoyo moral, técnico o científico. Cada uno de vosotros ha dejado una huella en este trabajo.

Gracias de todo corazón.



## GLOSARiO

| <b>TÉRMINO</b>         | <b>DEFINICIÓN</b>                                                                                                                             |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Exosomas               | Vesículas extracelulares de 30–150 nm secretadas por células, que transportan proteínas, lípidos y ARN para mediar comunicación intercelular. |
| hBMSCs                 | Células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana, con propiedades regenerativas e inmunomoduladoras.                               |
| PTCSC3                 | ARN largo no codificante con función supresora tumoral, implicado en la modulación de vías de señalización como Wnt/ $\beta$ -Catenina.       |
| LUAD                   | Adenocarcinoma pulmonar, el subtipo más común de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC).                                                     |
| Erlotinib              | Inhibidor de tirosina quinasa dirigido contra EGFR, utilizado en el tratamiento del cáncer de pulmón con mutaciones activadoras de EGFR.      |
| Wnt/ $\beta$ -Catenina | Vía de señalización celular que regula la proliferación, diferenciación y apoptosis; frecuentemente alterada en tumores.                      |
| GW4869                 | Inhibidor de la biogénesis de exosomas mediante la inhibición de la neutral esfingomielinasa.                                                 |
| qRT-PCR                | Técnica de amplificación de ADNc que permite la                                                                                               |

|                                              |                                                                                                                                      |
|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                              | cuantificación de ARN en tiempo real mediante fluorescencia.                                                                         |
| Western Blot                                 | Técnica de laboratorio para detectar proteínas específicas en una muestra mediante anticuerpos.                                      |
| Transfección lentiviral                      | Método de transferencia genética basado en vectores virales derivados de lentivirus para expresar o silenciar genes.                 |
| NTA (Análisis por nanopartículas)            | Técnica para medir el tamaño y concentración de partículas en suspensión, como exosomas.                                             |
| TEM (Microscopía electrónica de transmisión) | Técnica de imagen de alta resolución para observar la morfología ultraestructural de células y vesículas.                            |
| CCK-8                                        | Ensayo colorimétrico para evaluar la viabilidad celular basado en la actividad metabólica.                                           |
| Apoptosis                                    | Muerte celular programada, proceso fundamental en la homeostasis tisular y respuesta a fármacos antitumorales.                       |
| Eje PTCSC3/Wnt/ $\beta$ -Catenina            | Mecanismo molecular propuesto en la tesis por el cual los exosomas derivados de hBMSCs revierten la resistencia a Erlotinib en LUAD. |
| YAP                                          | Proteína asociada a Yes; un coactivador de transcripción implicado en la regulación del crecimiento celular y la tumorigénesis.      |
| TAZ                                          | Transductor con dominio WW relacionado con YAP; regula la proliferación, diferenciación y mantenimiento de células madre.            |



# ÍNDICE

|                                                                                                     |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>RESUMEN .....</b>                                                                                | <b>1</b>  |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                                               | <b>3</b>  |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>                                                                           | <b>5</b>  |
| <b>1. Epidemiología del adenocarcinoma pulmonar .....</b>                                           | <b>6</b>  |
| 1.1 Incidencia global y carga de mortalidad .....                                                   | 6         |
| 1.2 Características de la distribución por población .....                                          | 6         |
| 1.3 Tendencias temporales y efectos de la prevención .....                                          | 7         |
| 1.4 Análisis de factores de riesgo .....                                                            | 7         |
| 1.5 Carga de la enfermedad y desafíos políticos .....                                               | 8         |
| <b>2. Tratamiento del LUAD .....</b>                                                                | <b>8</b>  |
| 2.1 LUAD en etapa temprana .....                                                                    | 8         |
| 2.2 Cáncer de pulmón no microcítico en estadio III (NSCLC) .....                                    | 10        |
| 2.3 Cáncer de pulmón no microcítico metastásico (MNSCLC) .....                                      | 12        |
| 2.4 Quimioterapia .....                                                                             | 14        |
| 2.5 Inmunoterapia .....                                                                             | 17        |
| 2.6 Identificación y manejo de los efectos adversos relacionados con la inmunoterapia (iRAEs) ..... | 18        |
| <b>3. LncRNA .....</b>                                                                              | <b>21</b> |
| 3.1 Mecanismos de resistencia terapéutica mediada por LncRNAs .....                                 | 27        |
| 3.2 Resistencia a fármacos .....                                                                    | 28        |
| 3.3 Resistencia a terapias dirigidas .....                                                          | 30        |
| 3.4 Resistencia a la radioterapia .....                                                             | 33        |
| 3.5 Resistencia a inhibidores de puntos de control inmunitarios .....                               | 35        |
| 3.6 ARN no codificantes como biomarcadores para la resistencia terapéutica .....                    | 38        |
| 3.7 Resistencia a la quimioterapia .....                                                            | 40        |
| 3.8 Estrategias para dirigir la resistencia terapéutica .....                                       | 44        |
| <b>4. Células madre mesenquimatosas / Células estromales .....</b>                                  | <b>55</b> |
| 4.1 Visión general de las Células Madre Mesenquimatosas (MSCs) .....                                | 55        |

|                                                                                                                                     |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.2 Vías de señalización reguladas por las MSCs .....                                                                               | 58         |
| 4.3 Propiedades de Homing Tumoral de las Células Madre Mesenquimatosas (MSCs) .....                                                 | 66         |
| 4.4 Estrategias de Tratamiento del Cáncer Basadas en Células Madre Mesenquimatosas de Médula Ósea .....                             | 67         |
| <b>5 Biogénesis y Aislamiento de Exosomas .....</b>                                                                                 | <b>74</b>  |
| 5.1 Biogénesis .....                                                                                                                | 74         |
| 5.2 Aislamiento .....                                                                                                               | 75         |
| 5.3 Contenido de los exosomas .....                                                                                                 | 76         |
| 5.4 Proteínas Exosomales .....                                                                                                      | 77         |
| 5.5 ARN no codificante exosomal .....                                                                                               | 79         |
| 5.6 Relación entre los Exosomas y el Microambiente Tumoral (TME) .....                                                              | 83         |
| 5.7 Estrategias de Supresión Tumoral Basadas en Exosomas .....                                                                      | 93         |
| <b>6. Significado del tema de investigación .....</b>                                                                               | <b>96</b>  |
| <b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>                                                                                                  | <b>99</b>  |
| 1. Hipótesis de trabajo .....                                                                                                       | 100        |
| 2. Objetivo general .....                                                                                                           | 100        |
| 3. Objetivos específicos .....                                                                                                      | 100        |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>                                                                                                   | <b>102</b> |
| <b>1. Materiales experimentales .....</b>                                                                                           | <b>103</b> |
| 1.1 Muestras clínicas .....                                                                                                         | 103        |
| 1.2 Líneas celulares .....                                                                                                          | 103        |
| 1.3 Materiales e instrumentos principales .....                                                                                     | 103        |
| <b>2. Métodos Experimentales .....</b>                                                                                              | <b>106</b> |
| 2.1 Cultivo Celular .....                                                                                                           | 106        |
| 2.2 Establecimiento de líneas celulares de LUAD resistentes a erlotinib .....                                                       | 107        |
| 2.3 Ensayo de Viabilidad Celular .....                                                                                              | 108        |
| 2.4 Experimento de PCR cuantitativa en tiempo real .....                                                                            | 109        |
| 2.5 Construcción del Vector .....                                                                                                   | 114        |
| 2.6 Construcción del plásmido de sobreexpresión de LncRNA PTCSC3 y su transfección en células de LUAD resistentes a erlotinib ..... | 118        |
| 2.7 Aislamiento e Identificación de Exosomas .....                                                                                  | 121        |

|                                                                                                                                                                                 |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.8 Ensayo BCA para la determinación de la concentración de exosomas y proteínas .....                                                                                          | 124        |
| 2.9 Ensayo de Captación de Exosomas .....                                                                                                                                       | 127        |
| 2.10 Ensayo de inhibición de Exosomas con GW4869 .....                                                                                                                          | 127        |
| 2.11 Transducción Lentiviral .....                                                                                                                                              | 128        |
| 2.12 Ensayo Transwell .....                                                                                                                                                     | 128        |
| 2.13 Análisis de Apoptosis por Citometría de Flujo con Tinción Doble Annexina V-FITC / PI .....                                                                                 | 130        |
| 2.14 Ensayo de Formación de Colonias en Dos Dimensiones (2D) .....                                                                                                              | 131        |
| 2.15 Análisis por Western Blot .....                                                                                                                                            | 132        |
| 2.16 Análisis Estadístico .....                                                                                                                                                 | 134        |
| <b>RESULTADOS .....</b>                                                                                                                                                         | <b>136</b> |
| <b>1. La lncRNA PTCSC3 se encuentra regulada a la baja en tejidos de adenocarcinoma pulmonar (LUAD) resistentes a erlotinib .....</b>                                           | <b>137</b> |
| <b>2. Establecimiento de líneas celulares de LUAD resistentes a Erlotinib .....</b>                                                                                             | <b>137</b> |
| <b>3. LncRNA PTCSC3 está disminuido en células de LUAD resistentes a erlotinib .....</b>                                                                                        | <b>139</b> |
| <b>4. La sobreexpresión de PTCSC3 puede revertir la resistencia de las células de LUAD a erlotinib .....</b>                                                                    | <b>140</b> |
| <b>5. La sobreexpresión de PTCSC3 inhibe la invasión y migración de células de LUAD resistentes a erlotinib .....</b>                                                           | <b>141</b> |
| <b>6. La sobreexpresión de PTCSC3 aumenta la apoptosis en células de LUAD resistentes a erlotinib .....</b>                                                                     | <b>142</b> |
| <b>7. Aislamiento, Cultivo, e identificación de células madre mesenquimales humanas de médula ósea (hBMSCs) .....</b>                                                           | <b>143</b> |
| <b>8. Extracción e identificación de exosomas derivados de hBMSCs .....</b>                                                                                                     | <b>144</b> |
| <b>9. Los exosomas derivados de hBMSCs pueden encapsular lncRNA PTCSC3 y ser absorbidos por células de LUAD .....</b>                                                           | <b>144</b> |
| <b>10. GW4869 inhibe la liberación de exosomas derivados de BMSCs, reduciendo la absorción de lncRNA PTCSC3 por células de LUAD y promoviendo su migración e invasión .....</b> | <b>145</b> |
| <b>11. Transducción lentiviral exitosa de células BMSC .....</b>                                                                                                                | <b>146</b> |

|                                                                                                                                                         |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 12. Impacto de los exosomas derivados de hBMSCs que contienen PTCSC3 sobre células LUAD resistentes a erlotinib .....                                   | 147 |
| 13. Impacto de la co-cultivación con hBMSCs sobre la expresión de PTCSC3 y el eje Wnt / $\beta$ -Catenina en células LUAD resistentes a erlotinib ..... | 149 |
| 14. El impacto de la alteración en la expresión del lncRNA PTCSC3 sobre las células LUAD resistentes a erlotinib .....                                  | 150 |
| 15. Impacto de las alteraciones en la expresión del lncRNA PTCSC3 sobre el eje Wnt / $\beta$ -Catenina .....                                            | 152 |
| 16. Impacto de la vía Wnt / $\beta$ -Catenina en las células de LUAD resistentes a erlotinib .                                                          | 153 |
| 17. Las hBMSCs revierten la resistencia al erlotinib de las células de LUAD a través del eje PTCSC3 / Wnt / $\beta$ -Catenina .....                     | 153 |
| DISCUSIÓN .....                                                                                                                                         | 155 |
| CONCLUSIÓN .....                                                                                                                                        | 161 |
| CONCLUSION .....                                                                                                                                        | 163 |
| BIBLIOGRAFÍA .....                                                                                                                                      | 165 |
| ABREVIACIÓN .....                                                                                                                                       | 272 |



## **RESUMEN**

La resistencia adquirida a inhibidores de tirosina quinasa (TKIs), como el erlotinib, representa un desafío clínico importante en el tratamiento del adenocarcinoma pulmonar (LUAD). Este estudio evalúa el uso de exosomas derivados de células madre mesenquimales de médula ósea humana (hBMSCs), cargados con el ARN largo no codificante PTCSC3, como estrategia para revertir dicha resistencia. Los análisis funcionales mostraron una disminución en la actividad de  $\beta$ -catenina y de sus dianas oncogénicas, restaurando la sensibilidad al fármaco. Estos resultados proponen una nueva vía terapéutica basada en la modulación epigenética mediante exosomas, con potencial aplicación clínica previa validación in vivo.

Palabras clave: adenocarcinoma pulmonar, resistencia a erlotinib, exosomas, PTCSC3, señalización Wnt /  $\beta$ -catenina, lncRNA

## **ABSTRACT**

Lung adenocarcinoma (LUAD) patients frequently develop resistance to tyrosine kinase inhibitors (TKIs), such as erlotinib, limiting treatment efficacy. In this study, we investigated the potential of exosomes derived from hBMSCs, loaded with the long non-coding RNA PTCSC3, to reverse erlotinib resistance. Functional assays revealed that these exosomes downregulated  $\beta$ -catenin and its downstream targets, restoring drug sensitivity in LUAD cells. Our findings highlight a novel therapeutic strategy using exosomal PTCSC3 to target the Wnt /  $\beta$ -Catenina signaling pathway and overcome acquired resistance. Further in vivo validation is needed to explore its clinical application.

Keywords: lung adenocarcinoma, erlotinib resistance, exosomes, PTCSC3, Wnt /  $\beta$ -Catenina, lncRNA

# **INTRODUCCIÓN**

## **1. Epidemiología del adenocarcinoma pulmonar**

### ***1.1 Incidencia global y carga de mortalidad***

El adenocarcinoma pulmonar (LUAD) representa un desafío significativo para la salud pública mundial, siendo la principal causa de incidencia y mortalidad por cáncer a nivel mundial. Según los datos de 2020 de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), se registraron aproximadamente 2.2 millones de nuevos casos de cáncer de pulmón en todo el mundo, lo que representa el 11.4% de todos los casos de cáncer, y alrededor de 1.8 millones de muertes (18.0%), ambos los más altos entre los tumores malignos <sup>[1]</sup>. Cabe destacar que la tasa de mortalidad por cáncer de pulmón (18.6 por cada 100,000) es significativamente más alta que la tasa de incidencia (22.4 por cada 100,000), lo que refleja su pronóstico desfavorable. Geográficamente, Europa del Este (por ejemplo, Hungría, Serbia) y Asia Oriental (por ejemplo, China, Mongolia) son áreas de alta incidencia, con tasas de incidencia estandarizadas por edad (ASIR) superiores a 40 por cada 100,000, mientras que las regiones de África Occidental (por ejemplo, Níger) tienen tasas inferiores a 5 por cada 100,000 <sup>[1]</sup>. Estas disparidades están estrechamente relacionadas con la prevalencia del tabaquismo, los niveles de industrialización y la contaminación del aire.

### ***1.2 Características de la distribución por población***

Diferencias de sexo. Tradicionalmente, la tasa de incidencia en hombres es significativamente más alta que en mujeres (ASIR hombres: 31.5 vs. mujeres: 14.6), pero la tasa de incidencia en mujeres ha aumentado significativamente en los últimos años. En algunos países desarrollados (por ejemplo, Estados Unidos), la tasa de mortalidad por cáncer de pulmón en

mujeres ha superado la del cáncer de mama <sup>[2]</sup>.

Tendencias por edad. La incidencia máxima ocurre entre los 60 y 75 años, representando más del 70% de los casos totales, pero la tasa de incidencia en personas menores de 50 años está aumentando, posiblemente relacionada con mutaciones genéticas (por ejemplo, EGFR) y nuevas exposiciones ambientales <sup>[3]</sup>.

Estratificación socioeconómica. Los grupos de bajos ingresos tienen tasas de mortalidad más altas que los grupos más acomodados (2-3 veces más altas) debido a exposiciones ocupacionales (minería, construcción) y un acceso limitado a servicios de salud <sup>[1]</sup>.

### ***1.3 Tendencias temporales y efectos de la prevención***

Los países desarrollados han logrado resultados significativos a través de políticas de control del tabaco: la tasa de mortalidad por cáncer de pulmón en hombres en Estados Unidos ha disminuido un 54% desde 1990, y en mujeres un 30% desde 2002 <sup>[4]</sup>.

Por el contrario, las tasas de tabaquismo siguen siendo altas en los países en desarrollo (por ejemplo, la tasa de tabaquismo en hombres chinos es del 52.1%), lo que lleva a un aumento continuo de la carga del cáncer de pulmón. Las innovaciones en la tecnología de cribado (por ejemplo, la tomografía computarizada de baja dosis) han incrementado la tasa de diagnóstico temprano al 24%, pero la cobertura global de cribado sigue siendo inferior al 15%, especialmente en áreas con pocos recursos <sup>[5]</sup>.

### ***1.4 Análisis de factores de riesgo***

Tabaquismo. Sigue siendo la causa principal, contribuyendo al 85% de las muertes por cáncer de pulmón, pero la proporción de cáncer de pulmón en no fumadores ha aumentado al 10-25%, siendo especialmente significativa en mujeres asiáticas <sup>[6]</sup>.

Exposición ambiental. Por cada aumento de  $10\mu\text{g} / \text{m}^3$  en  $\text{PM}_{2.5}$ , el riesgo de cáncer de pulmón aumenta en un 9% [7].

Susceptibilidad genética. Los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS) han encontrado que los loci *CHRNA3* y *TERT* aumentan significativamente el riesgo [8].

### ***1.5 Carga de la enfermedad y desafíos políticos***

El cáncer conduce a más de 34 millones de años de vida ajustados por discapacidad (DALYs) globalmente cada año, con una carga económica que supera los 180,000 millones de dólares.

Aunque la Convención Marco de la OMS para el Control del Tabaco se ha implementado en 182 países, la tasa de implementación de políticas en los países de ingresos bajos y medianos es inferior al 40%.

Además, las disparidades regionales en la prevalencia de terapias dirigidas (por ejemplo, las tasas de detección de EGFR alcanzan el 80% en Europa y América, pero menos del 10% en África) agravan las desigualdades en la supervivencia (tasa de supervivencia a 5 años: 22% en Estados Unidos frente al 3.7% en India).

## **2. Tratamiento del LUAD**

### ***2.1 LUAD en etapa temprana***

El estándar de tratamiento para los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) en etapas I y II, así como para algunos pacientes seleccionados con etapa IIIA, es la resección quirúrgica. Tras la resección, los pacientes pueden recibir terapia sistémica adyuvante. En el meta-análisis de la Evaluación de Cisplatino Adyuvante en Cáncer de Pulmón (LACE), los



pacientes con NSCLC completamente resecados recibieron terapia sistémica adyuvante con cisplatino. El beneficio de la terapia adyuvante varía, con una reducción del 3% en el riesgo de muerte a los 5 años para pacientes con estadio IB (tumores  $\geq 4$  cm). Cabe señalar que el beneficio para los pacientes con estadio IB solo aplica a aquellos con alto riesgo de recurrencia. La quimioterapia adyuvante muestra un beneficio del 13% en el cáncer de pulmón en estadio III en comparación con la falta de quimioterapia <sup>[9]</sup>. La quimioterapia adyuvante generalmente consiste en cuatro ciclos de quimioterapia combinada con cisplatino, aplicada a NSCLC completamente resecado en estadio IB (alto riesgo) hasta estadio IIIA <sup>[10]</sup>.

A pesar del uso de quimioterapia postoperatoria, aproximadamente la mitad de los pacientes con estadio IB (tumores  $\geq 4$  cm) y aproximadamente tres cuartas partes de los pacientes con cáncer de pulmón en estadio IIIA experimentan recurrencia con enfermedad metastásica <sup>[9]</sup>. Antes de 2020, no había ningún tratamiento sistémico adicional tras la quimioterapia adyuvante. Recientemente, los datos sobre terapia adyuvante adicional con inmunoterapia o inhibidores orales de tirosina quinasa (TKIs) han puesto en cuestión el estándar de tratamiento actual.

Osimertinib, un inhibidor de tirosina quinasa oral de tercera generación, se une selectivamente a las mutaciones impulsadas por EGFR y a las mutaciones de resistencia T790M de EGFR <sup>[11]</sup>. Está aprobado para el tratamiento adyuvante de NSCLC completamente resecado en estadio II y III. El ensayo fase III ADAURA evaluó el papel del tratamiento adyuvante con osimertinib frente a placebo durante hasta 3 años <sup>[11]</sup>. Los pacientes deben haber tenido NSCLC completamente resecado en estadio IB (tumores  $>3$  cm) hasta estadio IIIA con delecciones en el exón 19 de EGFR o mutaciones en el exón 21 L858R. El estudio reportó una mejora absoluta del 37% en la supervivencia libre de enfermedad (DFS) a los 2 años y una mejora relativa del 80% en la DFS a los 2 años <sup>[12]</sup>. Dada la eficacia de la inmunoterapia en enfermedades en estadio III y

IV, hay un creciente interés en su aplicación en el contexto adyuvante. IMpower010 demostró la eficacia de atezolizumab adyuvante en pacientes con NSCLC de estadio IB (tumores  $\geq 4$  cm) a estadio IIIA que se sometieron a cirugía y hasta cuatro ciclos de quimioterapia adyuvante [12]. En un análisis preliminar de pacientes con NSCLC en estadio II-IIIA y aquellos con  $\geq 1\%$  de células tumorales de PD-L1, 16 ciclos de atezolizumab resultaron en una mejora relativa del 44% en la DFS a los 3 años en comparación con el mejor tratamiento de apoyo [13]. Varios otros ensayos clínicos que evalúan TKIs orales o inmunoterapia adyuvante están en curso. El estudio más esperado en Canadá es BR31, un ensayo fase III controlado con placebo que investiga durvalumab adyuvante en NSCLC completamente resecado [14].

Aunque los datos de supervivencia global (OS) de ADAURA y IMpower010 aún no han sido reportados, la quimioterapia como único tratamiento adyuvante para NSCLC completamente resecado en estadio IB (tumores  $\geq 4$  cm) hasta estadio IIIA podría estar quedando obsoleta. Todos los clínicos que tratan cáncer de pulmón resecable deben tener la oportunidad de inscribir a los pacientes en ensayos clínicos que evalúen el papel de la inmunoterapia adyuvante o la terapia con TKI oral.

## ***2.2 Cáncer de pulmón no microcítico en estadio III (NSCLC)***

El NSCLC en estadio III representa aproximadamente el 20% de los casos en el diagnóstico inicial y se refiere a cualquier tumor que se haya metastatizado a los ganglios linfáticos mediastínicos (cualquier estadio T, N2) o tumores grandes que puedan involucrar ganglios linfáticos regionales (T3N1 y T4N0) [15]. El NSCLC en estadio III es una enfermedad heterogénea, y el tratamiento varía dependiendo de la carga tumoral, los síntomas y los factores del paciente. La cirugía para el NSCLC en estadio III es controvertida. El tratamiento llamado "trimodalidad", que incluye quimioterapia neoadyuvante y radioterapia seguida de cirugía, puede

considerarse en un subconjunto de pacientes con afectación de ganglios linfáticos mediastínicos unilaterales. En el estudio Intergroup 0139, los pacientes cuya enfermedad era susceptible a lobectomía mostraron un beneficio significativo de supervivencia con la adición de cirugía después de quimioterapia y radioterapia preoperatorias. Los pacientes que requerían neumonectomía no demostraron el mismo beneficio debido a la mayor mortalidad perioperatoria [16]. La selección de pacientes para cirugía es crítica y debe realizarse preferiblemente en un formato multidisciplinario.

La mayoría de los pacientes con NSCLC en estadio III se consideran irresecables debido a la selección de pacientes, la carga tumoral o los malos resultados quirúrgicos. El tratamiento multimodal, que incluye quimioterapia y radioterapia, administrados de manera concurrente o secuencial, ofrece a los pacientes las mejores oportunidades de supervivencia a largo plazo. La supervivencia es mejor con quimioterapia y radioterapia concurrentes que con administración secuencial [17]. Los pacientes deben tener un buen estado de salud y ser capaces de tolerar múltiples modalidades de tratamiento. Los efectos secundarios comunes incluyen esofagitis, toxicidad hematológica y neumonitis. Para los pacientes con un estado de salud límite, una alternativa es el tratamiento secuencial con quimioterapia seguido de radioterapia. Con este enfoque, la tasa de supervivencia a 5 años es aproximadamente del 10% [17].

Durante muchos años, la investigación ha intentado mejorar la quimioterapia combinada con radioterapia para el NSCLC en estadio III irresecable. Aumentar el número de ciclos de quimioterapia y las dosis de radioterapia no ha mejorado la supervivencia global en esta población de pacientes [18, 19]. Se demostró por primera vez que la inmunoterapia para pacientes que completaron quimioterapia y radioterapia concurrentes podría mejorar la supervivencia global. Los últimos avances del ensayo PACIFIC mostraron que el tratamiento de

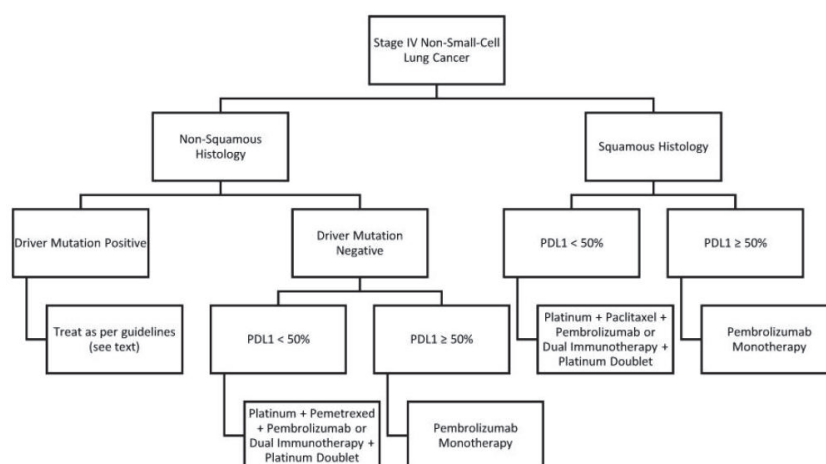
consolidación con un año de durvalumab redujo el riesgo de muerte en un 29% en comparación con el placebo. La tasa de supervivencia global a los 4 años fue del 49.6% para los pacientes que recibieron inmunoterapia frente al 36.3% para los pacientes que no recibieron inmunoterapia [20]. Se debe realizar una tomografía computarizada de referencia después de la quimioterapia / radioterapia para descartar neumonitis por radiación y progresión de la enfermedad. El tratamiento debe iniciarse dentro de los 42 días posteriores a la finalización de la quimioterapia y la radioterapia. Después de la inmunoterapia, existe un mayor riesgo de disfunción tiroidea y un pequeño, pero clínicamente relevante, riesgo de neumonitis [21]. Durvalumab se administra cada dos semanas, pero algunas provincias han aprobado la administración en un ciclo de 28 días para reducir la carga de viajes y la posible exposición durante la pandemia de COVID-19.

Dado el mal pronóstico y la alta tasa de recurrencia local en el NSCLC en estadio III, hay un renovado interés en las estrategias neoadyuvantes. Por ejemplo, los pacientes con NSCLC en estadio III que involucran ganglios linfáticos mediastínicos unilaterales o múltiples han recibido inmunoterapia con durvalumab neoadyuvante y quimioterapia seguida de cirugía. Se logró una respuesta patológica mayor, definida como menos del 10% de células tumorales viables en el momento de la cirugía, en el 62% de los pacientes. Un 10% adicional de pacientes tuvo una respuesta patológica completa [22]. Estos puntos finales se correlacionan con la supervivencia global, y muchos otros estudios están en curso investigando la incorporación de inmunoterapia en el contexto neoadyuvante.

### ***2.3 Cáncer de pulmón no microcítico metastásico (MNSCLC)***

La mayoría de los pacientes con cáncer de pulmón presentan metástasis a distancia, y muchos otros experimentan recurrencia temprana o enfermedad avanzada localmente hacia un entorno metastásico. Los objetivos del tratamiento para el cáncer de pulmón no microcítico

metastásico son mejorar o mantener la calidad de vida y prolongar la supervivencia global. Se ha demostrado que la integración temprana de cuidados paliativos no solo mejora la calidad de vida y reduce la depresión, sino que también mejora la supervivencia global [23]. En cuanto a la terapia sistémica, las opciones de tratamiento incluyen quimioterapia, terapia dirigida e inmunoterapia. Todos los tumores no de células escamosas deben someterse a pruebas de mutación de conductores. Estas mutaciones de conductores deben sospecharse en aquellos con antecedentes de tabaquismo leves o nulos. Los tumores de histología escamosa diagnosticados en individuos sin antecedentes de tabaquismo pueden considerar mutaciones de conductores caso por caso. En general, la terapia dirigida es preferida sobre otras terapias para pacientes con mutaciones de EGFR, ALK o ROS1 debido a que es más eficaz y menos tóxica. La Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón recomienda probar al menos EGFR, ALK y ROS1, y las pautas actualizadas también recomiendan probar BRAF, KRAS, MET, NTRK y RET [24, 25]. Esta revisión se enfoca en mutaciones de conductores comunes con objetivos accionables. Para pacientes sin mutaciones de genes conductores, las opciones de tratamiento incluyen inmunoterapia con agente único, regímenes de inmunoterapia combinada o solo quimioterapia. Un resumen del tratamiento de NSCLC metastásico se muestra en la Figura 1 [26].



**Figura 1. Tratamiento de primera línea para el cáncer de pulmón no microcítico metastásico.**

## **2.4 Quimioterapia**

La quimioterapia sigue siendo una opción de primera línea para los pacientes que no son candidatos para regímenes de inmunoterapia de agente único o combinación. Estos pacientes pueden tener contraindicaciones para la inmunoterapia, como enfermedades autoinmunes preexistentes, o pueden tener preocupaciones sobre el estado funcional y los riesgos de toxicidad de la inmunoterapia combinada. Los dobles de platino son comúnmente utilizados en este contexto. Para el NSCLC, un ejemplo típico es el carboplatino o cisplatino con pemetrexed durante 4-6 ciclos, seguido de mantenimiento con pemetrexed hasta que ocurra la progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable. Para el NSCLC escamoso metastásico, un doble de platino puede consistir en carboplatino o cisplatino con paclitaxel o gemcitabina.

### **2.4.1 Mutaciones de EGFR**

Las mutaciones de EGFR están presentes en aproximadamente el 10% de los casos de NSCLC en América del Norte y Europa Occidental, y en el 30-50% de los individuos en Asia Oriental [27]. En el NSCLC avanzado, la presencia de una mutación de EGFR predice fuertemente la respuesta a los EGFR-TKIs. Los EGFR-TKIs deben ser utilizados como tratamiento de primera línea, independientemente del estatus de PD-L1, ya que la inmunoterapia tiene tasas de respuesta muy bajas en pacientes con mutaciones de EGFR. Desde 2017, osimertinib es el tratamiento de primera línea para pacientes con NSCLC avanzado con mutaciones sensitizadoras comunes de EGFR en el exón 21 L858R y deleciones en el exón 19, con o sin la mutación T790M. El ensayo clínico FLAURA comparó la eficacia de osimertinib frente a gefitinib o erlotinib en el tratamiento de NSCLC avanzado sin tratamiento previo con mutaciones de EGFR, mostrando una mejora relativa del 54% en la supervivencia libre de progresión (PFS) y un beneficio absoluto de 6.8 meses en la supervivencia global (OS) [28]. Este

tratamiento también demostró una mayor eficacia intracraneal y mejor tolerabilidad, con la conveniencia de la administración oral diaria. El osimertinib se asocia con prolongación del QTc y disminución de la fracción de eyección, efectos que son reversibles tras la interrupción [29]. Para pacientes con mutaciones raras de EGFR, afatinib ha sido el tratamiento más estudiado.

#### **2.4.2 Reordenamientos de ALK**

Los reordenamientos del gen ALK se detectan en el 2-5% de todos los casos de NSCLC [30]. Estos reordenamientos son sensibles a los ALK-TKIs, con pronósticos medidos en años, momento en el cual el tratamiento adecuado debe ser iniciado de inmediato. Las metástasis cerebrales y la enfermedad leptomeningea son comunes en pacientes con NSCLC avanzado positivo para ALK; por lo tanto, el tratamiento de primera línea con actividad en el sistema nervioso central es ventajoso [31]. Los ALK-TKIs deben utilizarse en el tratamiento de primera línea, independientemente del estatus de PD-L1. Se recomiendan alectinib, brigatinib o lorlatinib para el tratamiento de primera línea, siendo cada uno de estos fármacos superior en PFS y actividad en el SNC en comparación con los ALK-TKIs anteriores como crizotinib [31].

Tres estudios compararon la eficacia de alectinib y crizotinib en el entorno metastásico de primera línea. El estudio japonés J-ALEX, el estudio asiático ALESIA y el estudio global ALEX mostraron reducciones relativas en el riesgo de progresión o muerte del 66%, 78% y 53%, respectivamente [32,33]. Los datos de OS siguen siendo inmaduros, con un OS medio no alcanzado para alectinib en el análisis interino de 5 años del ALEX, mientras que el OS medio fue de 54.7 meses para crizotinib [34].

#### **2.4.3 Reordenamientos de ROS1**

ROS1, una tirosina quinasa receptora de la familia del receptor de insulina, está presente

en aproximadamente el 1-2% de los pacientes con NSCLC <sup>[35]</sup>. Estos reordenamientos son sensibles al inhibidor ROS1 / MET crizotinib. La evidencia que respalda el uso de crizotinib para NSCLC positivo para ROS1 se basa en ensayos clínicos tempranos, que mostraron una tasa de respuesta objetiva (ORR) del 72% y una duración media de la respuesta de 25 meses <sup>[36]</sup>. Lorlatinib ha sido aprobado para NSCLC positivo para ALK y parece superar la resistencia adquirida a crizotinib en pacientes con NSCLC positivo para ROS1 <sup>[37]</sup>. Entrectinib, un inhibidor oral de ROS1 / TRK, también ha sido aprobado en Canadá para el tratamiento de NSCLC positivo para ROS1.

#### **2.4.4 Mutaciones de KRAS**

Las mutaciones del oncogén Kirsten rat sarcoma viral (KRAS) se encuentran en varios tipos de cáncer. Es la mutación conductora más común en el cáncer de pulmón. Las mutaciones en el codón 12 (mutaciones KRAS G12C) representan casi el 50% de las mutaciones de KRAS y suelen ocurrir en individuos con antecedentes de tabaquismo en comparación con otras mutaciones <sup>[38]</sup>. Considerada anteriormente como un objetivo intratable, los inhibidores emergentes de KRAS han mostrado promesas en el tratamiento del NSCLC metastásico <sup>[38]</sup>. Sotorasib es el primer fármaco dirigido desarrollado contra la mutación KRAS G12C. Inhibe específicamente e irreversiblemente KRAS G12C al bloquearlo en un estado inactivo unido a GDP. En un estudio fase I de pacientes con NSCLC previamente tratados por mutaciones KRAS G12C, sotorasib mostró una ORR del 32% y una tasa de control de la enfermedad del 88% <sup>[38]</sup>. Los eventos adversos más comunes fueron pruebas de función hepática anormales, diarrea, anemia, hepatitis y hiponatremia. El ensayo CodeBreak 200 evaluará la eficacia de sotorasib frente a docetaxel en pacientes con NSCLC que hayan recibido al menos una terapia sistémica, y los tratamientos previos deben incluir quimioterapia basada en platino e inhibidores de puntos de



control inmunitarios <sup>[39]</sup>.

## **2.5 Inmunoterapia**

La inmunoterapia ha cambiado significativamente el panorama del tratamiento para los pacientes con NSCLC metastásico. En 2015, el estudio de fase II Checkmate 063 reportó el primer gran estudio que demostró la actividad de la inmunoterapia en NSCLC. En pacientes con tratamiento previo intensivo, nivolumab mostró beneficios significativos y toxicidad aceptable <sup>[40]</sup>. En los pocos años posteriores, se han desarrollado múltiples estrategias de inmunoterapia. Algunos pacientes con NSCLC metastásico pueden lograr supervivencia a largo plazo, lo que se conoce como "la cola de la curva de supervivencia" <sup>[41]</sup>.

La respuesta a la inmunoterapia depende de la expresión de PD-L1 en el tumor. La expresión de PD-L1 se divide aproximadamente en tres grupos: PD-L1 negativo (<1% de las células tumorales expresan PD-L1), PD-L1 bajo positivo (1-49%) y PD-L1 positivo (>50%). La supervivencia y la duración de la respuesta aumentan con la mayor expresión de PD-L1. Para los pacientes con tumores PD-L1 positivos, la inmunoterapia de agente único ha demostrado ser consistentemente superior a la quimioterapia en términos de toxicidad y mejora de la supervivencia. En el estudio KEYNOTE-024, pembrolizumab tuvo una supervivencia media de 26.3 meses, y notablemente, el 31.9% de los pacientes lograron supervivencia a los cinco años, el nivel más alto en un estudio de fase III hasta la fecha <sup>[42]</sup>. Estudios similares en pacientes PD-L1 positivos han mostrado que los medicamentos de inmunoterapia atezolizumab y cemiplimab son más efectivos que la quimioterapia <sup>[43,44]</sup>. Estos estudios demostraron por primera vez que la quimioterapia podría evitarse para algunos pacientes con NSCLC metastásico.

Para pacientes con tumores PD-L1 negativos (<1%) o PD-L1 (1-49%), nuevas estrategias combinadas se han convertido en el tratamiento estándar de primera línea. El estudio

KEYNOTE-189 asignó aleatoriamente a pacientes con NSCLC no escamoso metastásico a carboplatino y pemetrexed o el mismo régimen más pembrolizumab. La combinación de quimioterapia e inmunoterapia resultó en una supervivencia total de 22 meses y una reducción del 44% en el riesgo de muerte en comparación con la quimioterapia sola [45]. De manera similar, en el estudio KEYNOTE-407, el uso combinado de quimioterapia y pembrolizumab redujo el riesgo de muerte en un 36% en pacientes con NSCLC escamoso metastásico. En este estudio, la quimioterapia incluyó carboplatino y taxano [46]. También se han informado ensayos de combinaciones de inmunoterapia dual en NSCLC metastásico. En el estudio Checkmate-9LA, los pacientes con histología no escamosa o escamosa fueron asignados aleatoriamente a recibir un doblete de platino o ipilimumab y nivolumab, más dos ciclos de terapia con doblete de platino. El grupo de inmunoterapia dual-quimioterapia tuvo una supervivencia global media de 15.8 meses y una reducción del 28% en el riesgo de muerte en comparación con la quimioterapia sola [47]. Las combinaciones de inmunoterapia dual no se han comparado directamente con las combinaciones de quimioterapia-inmunoterapia, y aún está por verse si ciertos subgrupos se beneficiarán más de un régimen u otro con un seguimiento más largo.

## ***2.6 Identificación y manejo de los efectos adversos relacionados con la inmunoterapia (iRAEs)***

A medida que la inmunoterapia se incorpora en todas las etapas del tratamiento del cáncer de pulmón, el reconocimiento y manejo de la toxicidad de la inmunoterapia merecen una atención especial. La toxicidad de la quimioterapia difiere de la de los iRAEs en tres aspectos importantes.

Primero, los tipos de toxicidad de la inmunoterapia son diferentes. Los iRAEs más comunes de la inmunoterapia de agente único son erupciones, prurito, diarrea y disfunción

tiroidea <sup>[48]</sup>. Para las erupciones leves que no afectan la calidad de vida, generalmente se continúa la inmunoterapia y se trata con corticosteroides tópicos de fuerza moderada (por ejemplo, hidrocortisona al 1-2.5%, dos veces al día). Las erupciones moderadas a graves que son sintomáticas o cubren una gran superficie deben tratarse con un ciclo de esteroides de dos semanas (por ejemplo, prednisona 0.5 a 1mg / kg). Las erupciones graves que causan descamación deben tratarse de inmediato con esteroides intravenosos (por ejemplo, metilprednisolona 1mg / kg) y hospitalización para cuidados de apoyo <sup>[49]</sup>. La disfunción tiroidea es común con los fármacos de inmunoterapia y generalmente se puede continuar con un reemplazo adecuado de tiroides. A menudo, se observa un período de tiroiditis asintomática con niveles bajos de TSH antes de que se desarrolle hipotiroidismo. El tratamiento para el hipertiroidismo con inmunoterapia es mucho menos común. La función tiroidea debe ser revisada cada 3-6 semanas durante el tratamiento. Si tanto los niveles de TSH como de T4 son bajos, se debe considerar la causa primaria del hipotiroidismo, como la hipofisitis.

Los iRAEs graves merecen ser mencionados porque pueden llevar a la muerte. Afortunadamente, los eventos fatales son raros, oscilando entre el 0.36% para la inmunoterapia de agente único y el 1.23% para la inmunoterapia combinada. Los dos iRAEs más comunes que conducen a la muerte son colitis y neumonitis <sup>[50]</sup>. El reconocimiento temprano y la administración oportuna de esteroides pueden reducir el riesgo de eventos fatales. Se debe sospechar de colitis si un paciente tiene al menos cuatro evacuaciones más que su valor base, a veces con calambres, distensión abdominal o heces sanguinolentas. Para síntomas moderados, deben prescribirse corticosteroides orales, y si el paciente no responde al tratamiento dentro de las 48 horas, puede ser necesario un inmunosupresor adicional con un inhibidor de TNF- $\alpha$  <sup>[51]</sup>. Diagnosticar neumonitis es complicado porque los síntomas son relativamente inespecíficos y

pueden imitar la progresión de la enfermedad, neumonía, embolia pulmonar o neumonitis por radiación. La tos seca y la disnea progresiva son los síntomas más comunes <sup>[52]</sup>. La combinación de síntomas y opacidades en vidrio esmerilado u otros cambios difusos en las tomografías computarizadas fuera del campo de radiación generalmente es suficiente para establecer el diagnóstico. Algunos expertos abogan por broncoscopia para descartar otras causas, pero el diagnóstico es clínico y no existe una histopatología definitiva <sup>[53]</sup>. El manejo es similar a otros iRAEs. Los síntomas moderados pueden ser tratados con esteroides orales, y los síntomas graves que requieran hospitalización pueden ser tratados con esteroides intravenosos. Se recomienda una disminución lenta de al menos 6 semanas, así como seguimiento por imágenes en aproximadamente el mismo momento para asegurar la resolución o estabilidad de los hallazgos <sup>[53]</sup>. Existen múltiples guías para el tratamiento de iRAEs, incluidas las guías canadienses publicadas por el Centro de Cáncer de Atención, mencionadas a continuación <sup>[54]</sup>. ASCO y ESMO también han publicado guías de práctica clínica que detallan estrategias específicas de manejo para los eventos adversos relacionados con la inmunoterapia <sup>[53]</sup>.

En segundo lugar, la previsibilidad de los iRAEs es menor que la de la quimioterapia. La inmunoterapia puede afectar prácticamente cualquier órgano. Es importante estar alerta a cualquier cambio en los síntomas o cambios bioquímicos en los pacientes que reciben inmunoterapia, ya que la toxicidad puede ocurrir en cualquier momento. La mayoría de las toxicidades de los iRAEs ocurren en los primeros tres meses de tratamiento, pero la toxicidad también puede ocurrir más tarde, y es muy probable que el primer iRAE ocurra incluso después de suspender la inmunoterapia. Las toxicidades que a menudo ocurren al principio del tratamiento incluyen erupciones, prurito y diarrea / colitis. Las toxicidades posteriores incluyen hipofisitis y hepatitis <sup>[49]</sup>. La adición de un inhibidor de CTLA4, como ipilimumab, aumenta el

riesgo de iRAEs graves y prolonga la duración de la toxicidad, lo que podría requerir una reducción más prolongada de los esteroides [53]. Los inhibidores de CTLA4, en particular, aumentan el riesgo de colitis e hipofisitis [55].

Finalmente, el tratamiento de la toxicidad de la inmunoterapia es un proceso activo. Para manejar los efectos secundarios de la quimioterapia, los oncólogos a menudo utilizan formas pasivas de manejo, como la reducción de la dosis, la interrupción del tratamiento y el manejo de apoyo. Los fármacos de inmunoterapia tienen una vida media larga y no suelen reducirse en dosis ni interrumpirse solo con el propósito de manejar los efectos secundarios. Para los pacientes con iRAEs graves, la inmunosupresión oportuna es crítica para reducir la morbilidad y, en algunos casos, incluso la mortalidad. A medida que crece la experiencia con la inmunoterapia, nuevos datos sugieren que algunos pacientes con iRAEs pueden tener mejores resultados de supervivencia que aquellos sin iRAEs. Aunque estos datos son principalmente retrospectivos, puede haber un grupo de pacientes que desarrollen iRAEs graves o múltiples que no requieran más tratamiento y tengan un pronóstico a largo plazo muy bueno [56-57].

### **3. LncRNA**

El catálogo de ARN no codificantes largos (lncRNAs) está experimentando una transformación significativa. Los hallazgos recientes destacan que numerosos transcritos de ncRNA pueden codificar micropeptidos (menos de 100 aminoácidos) que desempeñan roles funcionales tanto en procesos normales como patológicos, incluido el cáncer [58]. Estos nuevos datos sugieren que al menos algunos ncRNAs poseen capacidades funcionales tanto codificantes como no codificantes, o de hecho, son transcritos que codifican péptidos no canónicos. Esto plantea la pregunta de qué constituye un ncRNA.

Actualmente, los tipos más estudiados de "ncRNAs clásicos" son los microARNs

(miRNAs), los ARN no codificantes largos (lncRNAs) <sup>[59]</sup> y los ARN circulares (circRNAs) <sup>[60]</sup>. Los miRNAs son ARN cortos derivados de estructuras de bucles con tallo más largos que pueden unirse a y inhibir los ARNm <sup>[61]</sup>. La biogénesis de los miRNAs es un proceso en múltiples pasos <sup>[62]</sup>. Los miRNAs se transcriben como miARN primarios (pri-miRNA) y son procesados en el núcleo por Drosha y Dgcr8 en pre-miARNs (pre-miRNAs). Después de ser exportados al citoplasma, los pre-miRNAs se escinden para formar un dúplex miRNA / miRNA. Solo uno de los dos miRNAs formados ejercerá su efecto inhibidor, mientras que el otro se degrada <sup>[63]</sup>. Se han reportado varias funciones no canónicas de los miRNAs, incluidos la unión e inhibición de proteínas, la activación de receptores tipo Toll, la codificación de péptidos, la activación de la traducción de ARNm, la inhibición de los transcritos mitocondriales, el desencadenamiento de la transcripción y la inhibición de los ncRNAs nucleares, lo que hace que los miRNAs sean moléculas complejas y multifuncionales <sup>[64]</sup>. El número total de miRNAs humanos conocidos está en constante expansión y actualmente incluye 1917 precursores y 2654 moléculas maduras (miRBase, versión 22.1) <sup>[65]</sup>. También se han descubierto muchos otros miRNAs, en su mayoría con distribuciones específicas de tejido <sup>[66]</sup>. La mayoría de estos genes están conservados a través de las especies <sup>[67]</sup>.

El papel de los miRNAs en el cáncer se reveló en 2002 cuando se encontró que MIR15 y MIR16 se eliminaban con frecuencia y sus transcritos se desregulaban en la leucemia linfocítica crónica (CLL) <sup>[68]</sup>. Actualmente, se informa que los miRNAs están desregulados en cada cáncer estudiado <sup>[69-71]</sup>. La complejidad de los mecanismos de acción de los miRNAs y la diversidad de sus objetivos dificultan que los investigadores traduzcan sus hallazgos a la práctica clínica, y es necesario comprender mejor su papel en oncología <sup>[72]</sup>.

Los lncRNAs son, con mucho, el tipo más complejo de ncRNAs, definidos

arbitrariamente como moléculas de ARN de más de 200 nucleótidos que generalmente no se traducen en proteínas. Desafortunadamente, esta definición es vaga. Por ejemplo, algunos miRNAs importantes se consideran lncRNAs debido a su longitud si tienen sus propias funciones, y entre todos los ncRNAs, los lncRNAs tienen el mayor potencial para codificar péptidos (lo que se ha confirmado en múltiples ocasiones). La biogénesis de los lncRNAs es similar a la de los ARNm, con muchos de ellos siendo empalmados, capados y poliadenilados. La complejidad de estos transcritos surge de su estructura tridimensional multifacética, que cambia rápidamente, permitiéndoles realizar múltiples funciones <sup>[73-74]</sup>. Los lncRNAs tienen funciones tanto cis (que realizan funciones cerca del sitio de transcripción) como trans (que realizan funciones lejos del sitio de transcripción) <sup>[75]</sup>. Las funciones típicas cis están relacionadas con la transcripción de ADN, modificación de cromatina y ciclo cromosómico. Las funciones trans bien definidas incluyen la unión a ARNm y la alteración de su estabilidad, la unión a proteínas y la alteración de su función, la interacción con otros ncRNAs y la promoción del ensamblaje de espliceosomas <sup>[76-77]</sup>. La investigación sobre los lncRNAs aumentó después del descubrimiento de la implicación de MALAT1 en la metástasis de NSCLC en 2003 <sup>[78]</sup>. Similar a los miRNAs, el papel de los lncRNAs en el cáncer ahora está bien estudiado, pero rara vez se traduce en práctica clínica, con la excepción de PCA3 como biomarcador para el cáncer de próstata <sup>[79]</sup>.

Un enfoque complementario es clasificar los lncRNAs desde una perspectiva filogenética. Los lncRNAs pueden ser transcritos de elementos ultraconservados que son idénticos en ratones, ratas y humanos <sup>[80]</sup>. Estos lncRNAs se denominan regiones ultraconservadas transcripcionalmente y se espera que tengan funciones esenciales debido a su alto grado de conservación <sup>[81]</sup>. Por otro lado, los transcritos recientemente emergidos son lncRNAs específicos

de primates, que a menudo contienen condensinas transcritas en su estructura <sup>[82-83]</sup>. Las condensinas son motivos cortos de ADN específicos de primates, a menudo ubicados en sitios frágiles del ADN, y se transcriben como parte de los lncRNAs <sup>[84]</sup>. Los niveles de expresión de estos lncRNAs que contienen condensinas son bajos en las células normales; sin embargo, sus niveles de expresión aumentan en las células malignas e inmunitarias, lo que los convierte en candidatos ideales para terapias futuras <sup>[85]</sup>.

Los circRNAs son la tercera clase principal de ncRNAs, caracterizados por su estructura específica. Los circRNAs son bucles covalentemente cerrados e interrumpidos donde los extremos 3' y 5' se unen <sup>[86]</sup>. Debido a esta estructura, los circRNAs son más estables que otros tipos de ARN <sup>[86]</sup>. Los circRNAs tienen una biogénesis compleja y multifacética, y se han descrito múltiples mecanismos en los últimos años. Los circRNAs pueden generarse a través de mecanismos de omisión de exón, desramificación de lariats de intrón, emparejamiento de intrones y ARN <sup>[87]</sup>. Las funciones de los circRNAs están solo parcialmente caracterizadas. Se describe que los circRNAs son super esponjas, capaces de unirse a docenas de moléculas de miRNA e inhibir su función <sup>[88-89]</sup>. Sin embargo, solo unos pocos circRNAs pueden unirse a múltiples moléculas de miRNA. Similar a los lncRNAs y miRNAs inmaduros, los circRNAs pueden codificar micropeptidos. Además, los circRNAs se unen a proteínas y regulan su función, y pueden controlar la traducción <sup>[90]</sup>. Estas funciones a menudo se consideran excepciones más que la regla, y el papel mecanicista de los ARN circulares requiere más investigación. Su papel en el cáncer se reveló inicialmente mediante análisis de secuenciación profunda, observando que muchos transcritos circulares eran abundantes y se expresaban de manera diferencial en múltiples líneas celulares cancerosas en 2013 <sup>[91]</sup>. Esta observación fue confirmada pronto en muestras de pacientes.



Las tres clases de ncRNAs están ampliamente asociadas con diferentes procesos malignos, incluida la resistencia a diversas terapias contra el cáncer. Curiosamente, el mismo miRNA puede ser un oncogén en un cáncer y un gen supresor de tumores en otro. Por lo tanto, los miRNAs desempeñan un papel dependiente del contexto en la tumorigénesis. Es bien sabido que los lncRNAs pueden regular todas las características del cáncer, y debido a su estructura tridimensional, los polimorfismos de nucleótido único y las mutaciones pueden inducir importantes cambios funcionales, que solo recientemente han comenzado a caracterizarse [92]. Los circRNAs son la "adición más nueva" y también están asociados con todas las características del cáncer, y su función en el cáncer se explica principalmente por la absorción de miRNA. Para descubrir objetivos clave que puedan revertir la resistencia al tratamiento contra el cáncer, es necesario revelar los importantes centros de esta red.

En los últimos años, hemos sido testigos de varios estudios de alto rendimiento (como la secuenciación del genoma, transcriptómica, proteómica) que investigan el papel de las mutaciones, las anomalías de transcripción y traducción en la resistencia [93]. Sin embargo, en muchos casos, aún no se ha encontrado una comprensión profunda de la falta de respuesta al tratamiento. Creemos que el número creciente de ncRNAs, incluidos otros tipos como el ARN de transferencia (tRNA), el ARN ribosomal (rRNAs), el ARN interactuante con piwi (piRNA), el ARN nuclear pequeño (snRNAs) y el ARN nucleolar pequeño (snoRNAs), podría ser el elemento faltante necesario para entender la resistencia terapéutica [94]. Primero, los niveles de ncRNA cambian rápidamente y varían enormemente entre tumores con subtipos tisulares similares. Esto hace que los ncRNAs sean difíciles de utilizar como biomarcadores de detección y diagnóstico, pero son biomarcadores interesantes para subclasificar tipos de tumores y herramientas útiles para la medicina personalizada. Estos cambios rápidos (explosiones) en la

expresión que observamos, en muchos casos de no detectados (es decir, no expresados) a altamente expresados, pueden explicar el fenómeno de resistencia adquirida, un fenómeno que a veces ocurre muy rápidamente y es difícil de comprender en el contexto de eventos lentos con mecanismos complejos de ocurrencia, como mutaciones, cambios en la traducción o alteraciones epigenéticas.

En segundo lugar, los ncRNAs son muy versátiles. Las tres clases de ncRNAs tienen múltiples funciones, y el surgimiento de fenómenos de resistencia no es a través de cambios en los niveles de transcripción, sino a través de cambios en la función. Los "cambios funcionales" no se han estudiado bien en el contexto de la resistencia terapéutica, pero están bien documentados en varios mecanismos patológicos de los tres tipos de ncRNAs. El cambio funcional mejor estudiado es el cambio funcional de los miRNAs; por ejemplo, miR-21-5p puede unirse a TLR8 e inducir una respuesta inflamatoria tumorigénica, y pri-miR-200a y -200b pueden convertirse en polipéptidos que inhiben la transición epitelio-mesénquima <sup>[95]</sup>. Esto sugiere que en algunos casos, no se requieren cambios en la expresión para inducir cambios fenotípicos, sino solo un cambio funcional. Los cambios funcionales probablemente dependan de la localización subcelular de los ncRNAs, y creemos que estos mecanismos se comprenderán mejor con el desarrollo de la transcriptómica espacial de ncRNA. Finalmente, como ya mencionamos, existen interacciones complejas entre las diferentes clases de ncRNAs, ya que cada tipo de ncRNA puede unirse a cualquier otro tipo, formando una red compleja, y los cambios en un ncRNA pueden causar un efecto dominó, alterando así un gran número de moléculas <sup>[96-97]</sup>.

Por lo tanto, creemos que los ncRNAs son marcadores potenciales que pueden predecir respuestas personalizadas al tratamiento e incluso pueden aumentar los adyuvantes que responden al tratamiento convencional.

### ***3.1 Mecanismos de resistencia terapéutica mediada por LncRNAs***

La resistencia terapéutica puede clasificarse en resistencia intrínseca o adquirida según el momento de su aparición <sup>[98]</sup>. La resistencia intrínseca se refiere a una resistencia preexistente o de desarrollo rápido antes o poco después del inicio del tratamiento. Esto significa una falta de respuesta a la terapia inicial. Por otro lado, la resistencia adquirida se desarrolla después de un periodo de tratamiento <sup>[99]</sup>. En este escenario, el cáncer inicialmente responde al tratamiento, pero posteriormente progresa.

La resistencia intrínseca suele ser impulsada por varios mecanismos: (1) anormalidades genéticas inherentes que conducen a respuestas pobres a varios tratamientos contra el cáncer. Por ejemplo, el NSCLC con nuevas mutaciones T790M de EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) no responde a los inhibidores de tirosina quinasa (TKIs) de primera y segunda generación <sup>[100]</sup>, y los cánceres que carecen de receptores de estrógeno o progesterona no se benefician de la terapia endocrina <sup>[101]</sup>; (2) heterogeneidad tumoral, donde las subpoblaciones resistentes preexistentes sobreviven a la terapia anticancerosa. Por ejemplo, las células madre cancerosas con capacidades de autorrenovación y diferenciación sobreviven y contribuyen a la regeneración y crecimiento tumoral <sup>[102]</sup>; (3) protección inducida por la activación de vías intrínsecas que defienden contra sustancias extrañas, como la activación de transportadores de eflujo de la familia ATP-binding cassette o el sistema glutatión / glutatión S-transferasa, que lleva al eflujo de fármacos quimioterapéuticos <sup>[103]</sup>.

La resistencia adquirida también surge a través de múltiples mecanismos: (1) modificaciones en los oncogenes conductores, como el desarrollo de mutaciones T790M de EGFR, se observa en aproximadamente el 50% de los pacientes con NSCLC tratados con TKIs de primera y segunda generación, sin alteraciones nuevas, lo que lleva a la progresión tumoral;

(2) activación de vías paralelas de señalización pro-supervivencia independientes, como la proliferación celular, la apoptosis o la autofagia, y la señalización del metabolismo celular <sup>[104]</sup>;

(3) adaptación del microambiente tumoral después del inicio del tratamiento. Cabe destacar que estos mecanismos que desarrollan resistencia intrínseca y adquirida a menudo coexisten y conducen a la progresión tumoral; por lo tanto, comprender los mecanismos subyacentes exactos del desarrollo de la resistencia es más práctico que buscar conocimientos sobre la resistencia intrínseca y adquirida por separado. Los lncRNAs coordinan finamente estos mecanismos subyacentes, modulando directa o indirectamente la sensibilidad al tratamiento. La sobreexpresión de algunos lncRNAs puede actuar como oncogenes conductores del tumor, promoviendo la quimiorresistencia intrínseca, mientras que otros lncRNAs se sobreexpresan después de la inducción del tratamiento, luego regulan señales de supervivencia para promover la re-proliferación tumoral, lo que lleva a la resistencia adquirida. Esta sección proporcionará una visión general de los roles de los ncRNAs más estudiados en la resistencia terapéutica intrínseca o adquirida y sus mecanismos potenciales.

### ***3.2 Resistencia a fármacos***

Numerosos factores pueden inducir la quimiorresistencia, pero la heterogeneidad tumoral es probablemente el más significativo <sup>[105]</sup>. Para la resistencia intrínseca, la heterogeneidad intertumoral juega un papel crucial, con variaciones genéticas (variaciones germinales) entre los pacientes con tumores del mismo tipo histológico que explican por qué solo algunos tumores responden a un determinado fármaco quimioterapéutico. Para la resistencia adquirida, la heterogeneidad espacial y temporal dentro del tumor es un factor clave, con la quimioterapia induciendo la selección de poblaciones celulares tumorales resistentes <sup>[105]</sup>. Uno de los mecanismos clave detrás de la heterogeneidad intratumoral es la inestabilidad cromosómica

(CIN), la repetición continua y la eliminación de regiones cromosómicas durante la división celular cancerosa.

El CCAT2 (un lncRNA ubicado en la región amplificada frecuentemente 8q24) se ha conocido por estar sobreexpresado en los cánceres y asociado con CIN durante la última década [106]. Recientemente, se han revelado los mecanismos moleculares relacionados con su papel en CIN. El CCAT2 se une a BOP1 y AURKB, dos proteínas conocidas por estar asociadas con CIN, y aumenta el número de aberraciones cromosómicas. Como era de esperar, esto induce mitosis anormal tanto in vitro como in vivo. No es sorprendente que los niveles altos de CCAT2 en líneas celulares de CRC estén asociados con la resistencia a 5-fluorouracilo (5-FU) y oxaliplatino, dos fármacos quimioterapéuticos principales utilizados en los cánceres gastrointestinales [107]. Al estudiar el papel de las células madre mesenquimatosas (MSCs) en el cáncer, He et al. demostraron que su papel en la quimiorresistencia es mediado por el lncRNA MACC1-AS1. Los investigadores encontraron que las MSCs inducen desecación y quimiorresistencia al secretar el factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1, que induce la sobreexpresión de SMAD2 y SMAD3 en líneas celulares cancerosas, lo que a su vez activa la expresión de MACC1-AS1. MACC1-AS1 se une a y inhibe miR-145-5p, liberando elementos clave de la vía de oxidación de ácidos grasos (CPT1 y ACS). Los experimentos in vivo mostraron que la inhibición de la vía de oxidación de ácidos grasos restauró la sensibilidad del cáncer al régimen FOLFOX, que incluye 5-FU, oxaliplatino y leucovorina [108].

Al comparar líneas celulares de cáncer de vejiga resistentes al cisplatino y sensibles al cisplatino, Drayton et al. detectaron las características de los miRNAs desregulados asociados con el desarrollo de resistencia. Para caracterizar mejor el mecanismo de resistencia, los autores analizaron si la resistencia era mediada por cambios metabólicos celulares antes de la formación

de aductos de ADN o por mecanismos de reparación de daño en el ADN después de la producción de aductos. Inesperadamente, observaron que la resistencia al cisplatino en cáncer de vejiga se inducía por un metabolismo alterado del cisplatino, con una mayor producción de glutatión y SLC7A11. Es importante señalar que el glutatión intracelular se une al cisplatino y desintoxica el entorno intracelular. Uno de los miRNAs que se encontró que estaba desregulado en la pantalla inicial, miR-27a, se une directamente a SLC7A11 e inhibe la producción de glutatión. Por lo tanto, los bajos niveles de miR-27a son la causa de la resistencia al cisplatino en cáncer de vejiga. Finalmente, en muestras clínicas, los autores confirmaron que los altos niveles de SLC7A11 y los bajos niveles de miR-27a estaban asociados con un mal pronóstico <sup>[109]</sup>.

Para entender los mecanismos de resistencia al cisplatino en el cáncer, se observó que los pacientes que adquirieron resistencia tenían niveles significativamente más altos de circAKT3, y los altos niveles de circAKT3 se asociaron con una supervivencia global más corta. Indirectamente, los niveles altos de circAKT3 aumentaron la inestabilidad genómica al interferir con la proteína de reparación de daño en el ADN BRCA1. Además, circAKT3 inhibe la función de miR-198, que inhibe la oncoproteína PIK3R1, la cual a su vez activa la bien conocida vía oncogénica PI3K / AKT <sup>[110]</sup>.

### ***3.3 Resistencia a terapias dirigidas***

El desarrollo de terapias dirigidas ha sido posible gracias a la evolución de los métodos empíricos de descubrimiento de fármacos hacia enfoques racionales, en los que se apuntan mutaciones dominantes anormales, amplificación génica o translocaciones oncogénicas que impulsan el crecimiento tumoral <sup>[111]</sup>. Una característica de las terapias dirigidas, especialmente para tumores sólidos, es que solo algunos tumores dependen de la sobreactivación del gen diana para evolucionar <sup>[111]</sup>. En los pacientes con resistencia intrínseca, no se inicia la terapia dirigida

porque el análisis molecular indica la falta de factores conductores. Para los pacientes aptos para la terapia dirigida, la respuesta generalmente no es permanente, sino temporal. La resistencia adquirida se desarrolla después de la fase inicial de respuesta.

Sunitinib, un agente terapéutico dirigido comúnmente utilizado, es un TKI aprobado para el tratamiento de tumores estromales gastrointestinales (GIST), tumores neuroendocrinos pancreáticos y carcinomas de células renales (RCC). Desafortunadamente, hasta el 20% de los pacientes con RCC muestran resistencia intrínseca al sunitinib, mientras que la mayoría de los demás pacientes desarrollan resistencia durante el tratamiento <sup>[112]</sup>. Qu et al. utilizaron algoritmos de selección in vitro e in vivo para identificar nuevas vías asociadas con la resistencia al sunitinib <sup>[113]</sup>. Observaron que el lncRNA previamente no identificado lncARSR (lncRNA activado en enfermedad renal con resistencia al sunitinib) se sobreexpresaba después del desarrollo de la resistencia. Observaron en múltiples muestras clínicas que los pacientes con enfermedad progresiva tenían niveles más altos de lncARSR circulante en plasma, y los niveles altos estaban asociados con una supervivencia global más corta. Mecánicamente, se observó que la proteína de unión a ARN hnRNPA2B1 empaquetaba lncARSR en exosomas, que se transfieren entre células, propagando la resistencia al sunitinib. Además, al inyectar exosomas de células resistentes al sunitinib en tumores naïf en ratones, indujeron resistencia al sunitinib in vivo. Encontraron que a nivel intracelular, lncARSR se une a miR-34a y miR-449, lo que aumenta indirectamente la regulación de AXL y c-MET. Finalmente, en un experimento de prueba de concepto, los autores restauraron la resistencia al sunitinib in vivo al dirigir lncARSR utilizando inhibidores complementarios de ácidos nucleicos cerrados <sup>[113]</sup>.

Después de establecer un modelo 3D de resistencia al inhibidor de EGFR cetuximab, Lu et al. encontraron que los eventos transcripcionales más significativos adquiridos por el modelo

recién desarrollado fueron la sobreexpresión del transcrito primario MIR100HG y dos miRNAs maduros, miR-100 y miR-125b. Fenotípicamente, estos dos miRNAs desempeñan un papel oncogénico tanto in vitro como in vivo y median la resistencia al cetuximab. Mecánicamente, miR-100 y miR-125b inhiben cinco reguladores negativos de la vía de señalización Wnt: DKK1, DKK3, ZNRF3, RNF43 y APC2, estimulando así este circuito pro-cáncer. La expresión ascendente del lncRNA MIR100HG está negativamente regulada por el factor de transcripción GATA6 y se desregula en la resistencia al cetuximab y en el cáncer colorrectal avanzado. Además, miR-125b se une al 3'UTR de GATA6, induciendo su inhibición post-transcripcional y produciendo un bucle de retroalimentación negativa doble. Los datos clínicos mostraron que MIR100HG y sus miRNAs incrustados aumentaron significativamente durante la progresión de la enfermedad durante el tratamiento con cetuximab, y GATA6 disminuyó <sup>[114]</sup>.

Sorafenib, un inhibidor multi-quinasa, ha sido aprobado para el tratamiento de carcinoma renal avanzado, carcinoma hepatocelular (HCC) y cáncer de tiroides. Una gran cantidad de pacientes con HCC responden mal al sorafenib, mientras que los pacientes que responden a menudo desarrollan resistencia en los primeros 6 meses de tratamiento <sup>[115]</sup>. Partiendo de la observación de que los altos niveles de miR-541 están asociados con una mayor supervivencia global en HCC, Xu et al. investigaron la función anticancerígena de este miRNA. miR-541 tiene como objetivo directo la proteína relacionada con Ras RAB1B y el gen relacionado con la autofagia 2A (ATG2A), inhibiendo fuertemente la autofagia tanto in vitro como in vivo. Más importante aún, los altos niveles de miR-541 mejoraron el efecto anti-tumoral de sorafenib de manera aditiva. Este fenómeno probablemente está mediado por la inhibición de RAB1B y ATG2A. Los datos clínicos respaldan firmemente estos hallazgos; los pacientes con altos niveles de miR-541 que recibieron tratamiento con sorafenib tuvieron una supervivencia



significativamente más larga que los pacientes con altos niveles de miR-541 que no recibieron tratamiento con sorafenib <sup>[116]</sup>. Otro estudio realizado por Xu et al. mostró que los ARN circulares también afectan la resistencia al sorafenib. CircRNA SORE (un ARN circular sobrerregulado en células de HCC resistentes al sorafenib) no solo se sobrerregula en múltiples líneas celulares resistentes al sorafenib, sino que también es un factor clave para mantener la resistencia. A nivel molecular, circRNA SORE se une directamente a la oncoproteína YBX1 en el citoplasma y prolonga su vida media bloqueando su transferencia al núcleo para la degradación por PRP19. Similar a lncARSR, circRNA SORE se transfiere de células resistentes a células naïf a través de exosomas e induce una resistencia generalizada al sorafenib. Al tratar ratones con xenoinjertos derivados de pacientes resistentes al sorafenib con ARN pequeño interferente (siRNA) dirigido a circRNA SORE, los autores mostraron que inhibir circRNA podría restaurar la resistencia al sorafenib <sup>[117]</sup>.

### ***3.4 Resistencia a la radioterapia***

Se cree generalmente que la radioresistencia está controlada por factores intrínsecos producidos por las células tumorales, principalmente las características de inestabilidad genómica de muchos tumores <sup>[118]</sup>, o por factores extrínsecos representados por múltiples componentes del microambiente tumoral (es decir, componentes inmunitarios, vasculares y la matriz pro-fibrótica) <sup>[119]</sup>.

Comenzando con la observación de que linc00312 estaba desregulado en carcinoma nasofaríngeo en comparación con rinitis crónica, Guo et al. investigaron su papel en el cáncer. Encontraron que el lncRNA estaba mucho más alto en los pacientes con respuesta completa a la radioterapia en comparación con los pacientes con respuesta parcial y enfermedad progresiva / radioresistencia. Los experimentos in vitro confirmaron la función supresora tumoral de

linc00312 nuclear, que inhibe la proliferación, activa la apoptosis y hace que las células cancerosas sean radiosensibles. A nivel molecular, linc00312 se une directamente a la subunidad catalítica de la quinasas dependiente de ADN, inhibiendo su interacción con la subunidad Ku80 después de los cortes de doble hebra de ADN. Por lo tanto, parece que linc00312 mejora la radioterapia al bloquear los mecanismos de reparación del ADN <sup>[120]</sup>.

Al comparar pacientes con cáncer que recurrieron después de radioterapia con aquellos sin recurrencia, se observó un conjunto de desregulación de miRNAs. En particular, miR-139-5p estaba desregulado en los pacientes con mal pronóstico, y su sobreexpresión estuvo asociada con una alta sensibilidad a la radioterapia in vitro. Mecánísticamente, se observó que este miRNA dirigía varios genes que juegan un papel importante en la reparación del ADN y la defensa contra especies reactivas de oxígeno (ROS), incluidos MAT2A, POLQ, TOP1 y TOP2A. Al sobreexpresar miR-139-5p en células radioresistentes, los mecanismos de reparación del ADN fueron bloqueados y se indujo la apoptosis. A través de un gran estudio de cohortes de pacientes, se confirmó que los altos niveles de miR-139-5p y los bajos niveles de POLQ, TOP1 y RAD54L estaban asociados con una mejor supervivencia, pero solo para los pacientes que recibieron radioterapia. Finalmente, miR-139-5p demostró ser un potente radiosensibilizador mediante el uso de un mimético de miR-139-5p en un experimento in vivo de prueba de concepto <sup>[121]</sup>.

Yuan et al. encontraron que los altos niveles de miR-410 inducían resistencia a la radioterapia en NSCLC acelerando la reparación del daño en el ADN. A nivel molecular, miR-410 se une e inhibe la traducción del supresor tumoral PTEN, lo que a su vez activa la vía de señalización PI3K / mTOR. Además, miR-410 también activa la transición epitelio-mesenquimal (EMT) a través de la vía PI3K / mTOR. Las observaciones clínicas confirmaron estos hallazgos: miR-410 estaba sobreexpresado en tumores EMT y

mesenquimatosos y estaba asociado con bajos niveles de PTEN <sup>[122]</sup>.

Un cambio de paradigma está ocurriendo con respecto al significado no codificante. Estudios recientes han mostrado una disminución en los niveles de circAKT3 mencionado anteriormente en glioblastoma multiforme. Pero aún más sorprendentemente, este ARN circular codifica la proteína AKT3-174aa, que tiene 174 aminoácidos de largo y desempeña un importante papel en la lucha contra el tumor. AKT3-174aa interactúa con la vía RTK / PI3K / AKT, inhibiendo la fosforilación de AKT en Thr308. Desde una perspectiva terapéutica, la sobreexpresión de AKT3-174aa restaura la sensibilidad de las células de glioblastoma a la radioterapia. Por lo tanto, podemos imaginar que en un futuro cercano, las proteínas / péptidos ectópicos codificados por ncRNAs serán entregados como nuevos adyuvantes para restaurar la sensibilidad a la radioterapia <sup>[123]</sup>.

### ***3.5 Resistencia a inhibidores de puntos de control inmunitarios***

Los inhibidores de puntos de control inmunitarios (ICIs), anticuerpos monoclonales que apuntan a moléculas de puntos de control inmunitarios como PD-1, PD-L1 y CTLA-4, son las últimas incorporaciones a la terapia contra el cáncer. Estos medicamentos son verdaderos agentes transformadores en el tratamiento del cáncer, induciendo un control duradero de la enfermedad y respuestas a largo plazo. Desafortunadamente, no todos los pacientes que reciben tratamiento producen respuestas efectivas <sup>[124]</sup>. Los mecanismos de resistencia a la terapia de puntos de control inmunitarios pueden dividirse en (1) producción insuficiente de células T anti-tumorales, (2) mala función efectora de las células T anti-tumorales y (3) desarrollo defectuoso de la memoria de células T <sup>[125]</sup>. Además, la resistencia a los ICIs está asociada con otras células inmunitarias, como las células asesinas naturales (NK) y las células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs).

Hu et al. describieron el papel de este lncRNA en la resistencia intrínseca a los ICIs, comenzando con la observación de que el lncRNA LINK-A se sobreexpresaba en pacientes que no respondían a pembrolizumab y estaba negativamente correlacionado con la expresión de células T CD8<sup>+</sup> y células presentadoras de antígeno. Los autores utilizaron un modelo existente de cáncer en ratones en el cual sobreexpresaron LINK-A y encontraron que inducía un fenotipo agresivo de cáncer triple negativo que se metastatizaba a los pulmones. Mecánicamente, LINK-A promovió la interacción entre fosfatidilinositol-(3,4,5)-trisfosfato (PtdIns(3,4-5)P3) y receptores acoplados a proteínas G, reduciendo la fosforilación de TRIM71. El resultado de esta interacción llevó al aumento de la degradación de TP53, Rb y complejos cargados de péptidos antigénicos. Además, esta cascada molecular redujo el número de células T CD8<sup>+</sup> y células NK granza B en el entorno peritumoral <sup>[126]</sup>.

Otro factor asociado con la resistencia a los ICI es MDSCs, cuyos niveles elevados pueden estar asociados con la resistencia a los ICI <sup>[127]</sup>. Huber et al. encontraron que las células de melanoma liberan múltiples miRNAs, como miR-146a, miR-155, miR-125b, miR-100, let-7e, miR-125a, miR-146b y miR-99m, a través de vesículas extracelulares (EVs). Por lo tanto, los EVs que contienen este conjunto de miRNAs se internalizan en células mieloides, que a su vez adquieren el fenotipo MDSC. Los datos clínicos mostraron que los altos niveles de este conjunto de miRNAs circulantes estaban asociados con una supervivencia global más corta en pacientes con melanoma en estadio IV tratados con ICIs nivolumab o ipilimumab. Por lo tanto, podemos imaginar que combinar la terapia con ncRNA con los ICIs podría superar la resistencia <sup>[128]</sup>.

Huang et al. utilizaron un enfoque clásico para estudiar la resistencia terapéutica en HCC; primero analizaron los genes ubicados en el amplificador 7q21-7q31 que estaban asociados con malos resultados. Observaron que circMET estaba ubicado en esta región, se sobreexpresaba en

HCC y estaba asociado con malos resultados. A nivel fenotípico, notaron que la sobreexpresión de circMET inducía EMT y mejoraba el microambiente tumoral inmunosupresor. Inmunológicamente, circMET reducía la densidad de células T CD8<sup>+</sup> en el tejido tumoral. A nivel molecular, circMET adsorbía miR-30-5p y regulaba indirectamente la expresión del factor de transcripción Snail. Snail activa la expresión de DPP4, lo que a su vez inhibe la quimiocina CXCL10, bloqueando así el transporte de células inmunitarias CD8<sup>+</sup>. Finalmente, los estudios in vivo mostraron que la resistencia a la terapia anti-PD-1 ocurría si se activaba este eje [129].

Se analizó el papel de otro ARN circular (circular ubiquitin-like PHD y dominio de dedo anillo 1 RNA (circUHRF1)) en la resistencia anti-PD-1 en HCC, mostrando que las células NK también juegan un papel importante. Al igual que circMET, circUHRF1 está sobreexpresado en HCC, y los niveles elevados están asociados con una clase T avanzada, reducción de células NK circulantes, invasión microvascular y una corta supervivencia libre de recurrencia después de la cirugía. Curiosamente, circUHRF1 es secretado por las células de HCC en exosomas, y sus niveles plasmáticos son mucho más altos antes de la cirugía y durante la recurrencia en comparación con después de la cirugía o controles sanos. A nivel inmunológico, los exosomas circUHRF1 derivados de las células de HCC inhiben la función de las células NK. En las células NK, circUHRF1 se une e inhibe la función biológica de miR-449c-5p y regula indirectamente la expresión del punto de control inmunitario—la proteína que contiene el dominio de inmunoglobulina y mucina de células T 3 (TIM-3). Un análisis clínico adicional mostró que la alta expresión de circUHRF1 estaba asociada con enfermedad progresiva en pacientes con HCC tratados con anti-PD-1 y estaba negativamente correlacionada con las células NK en el tejido tumoral. Los estudios in vivo confirmaron este resultado: los ratones tratados con anti-PD-1 más circUHRF1 shRNA tuvieron una supervivencia global significativamente más larga que los

ratones tratados solo con anti-PD-1 <sup>[130]</sup>.

### ***3.6 ARN no codificantes como biomarcadores para la resistencia terapéutica***

Un biomarcador viable del cáncer se expresa en tipos específicos de células tumorales, se expresa diferencialmente en comparación con los tejidos normales o cambia dinámicamente durante la progresión del cáncer o el tratamiento <sup>[131-132]</sup>. Se han identificado importantes biomarcadores candidatos como proteínas (por ejemplo, citoquinas y receptores) y ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARN), incluidos los ácidos ribonucleicos no codificantes <sup>[133]</sup>. Una gran cantidad de evidencia indica que algunos ARN no codificantes son biomarcadores preferidos para diagnosticar ciertos tipos de cáncer, especialmente cuando se combinan de manera integral con otros biomarcadores <sup>[134-135]</sup>. Los patrones de expresión específicos de tejidos, células y etapas de desarrollo hacen que los ribonucleótidos no codificantes sean de gran valor como biomarcadores clínicos en ciertas células, tejidos y enfermedades. La anotación de la expresión génica en 16 tejidos por parte del consorcio GENCODE reveló los patrones de expresión de 14,880 lncRNAs. En contraste con los genes codificadores de proteínas (el 65% de los cuales se detectaron en todos los tejidos humanos), solo el 11% de los lncRNAs fueron detectados en estos tejidos, lo que sugiere que los lncRNAs exhiben patrones de expresión más específicos de tejidos <sup>[136]</sup>. La expresión de lncRNAs en líneas celulares T es un buen ejemplo de sus patrones de expresión específicos de células y etapas de desarrollo. Hu et al. realizaron una comparación por pares entre los genes codificadores de proteínas y los lncRNAs en diferentes etapas del desarrollo de células T. Sus resultados mostraron que la expresión de los ARNm era similar entre diferentes subconjuntos de células T, mientras que los lncRNAs eran significativamente diferentes entre los diversos subconjuntos de células T. El análisis cuantitativo mostró que el 48-57% de los lncRNAs se expresaban específicamente en varios

subconjuntos de células T, en comparación con el 6-8% de los genes codificadores <sup>[137]</sup>. Otros estudios han demostrado aún más esto. Al analizar la expresión de lncRNA en subconjuntos de células T CD8<sup>+</sup> humanas y murinas, los investigadores encontraron que el lncRNA-Snhg1 exhibía un patrón de expresión de efector naïve-no memoria, desempeñando un papel crucial en el establecimiento de células T CD8<sup>+</sup> de memoria. Por lo tanto, el lncRNA-Snhg1 puede ser un biomarcador único para identificar este subconjunto de células T <sup>[138]</sup>. Algunos ncRNAs también son biomarcadores candidatos para predecir la resistencia terapéutica.

Se ha prestado considerable atención al uso de métodos no invasivos, como biopsias líquidas, para analizar biomarcadores en fluidos corporales (por ejemplo, sangre, saliva, orina). La confiabilidad y la reproducibilidad de estos métodos para detectar y caracterizar tumores son de gran valor y tienen una significancia clínica de largo alcance. Se han logrado avances significativos en la predicción de las respuestas al tratamiento del cáncer utilizando biomarcadores en fluidos corporales, lo que permite seleccionar opciones de tratamiento apropiadas <sup>[139]</sup>. Las células tumorales circulantes, las proteínas circulantes, el ADN y el ARN, incluidos los ncRNA, son biomarcadores fácilmente disponibles en fluidos corporales. El ARN circulante es secretado principalmente por células y, por lo tanto, puede indicar enfermedades y procesos biológicos, incluidas las respuestas al tratamiento. Utilizar el papel de ciertos ARN no codificantes en la resistencia terapéutica intrínseca y adquirida y estudiarlos como biomarcadores puede predecir los resultados del tratamiento para pacientes específicos antes, durante o después del tratamiento. Esta asociación depende parcialmente de las propiedades de los ncRNAs en la comunicación intercelular, mediando la resistencia a los fármacos <sup>[140]</sup>.

Los ncRNAs pueden ser transmitidos en fluidos corporales en tres formas diferentes: unidos a proteínas, unidos a lipoproteínas o dentro de pequeños EVs. El mecanismo de los

miRNAs está particularmente bien descrito. Los ncRNAs forman complejos ARN-proteína que pueden ser liberados por las células, posiblemente como un mecanismo principal de comunicación intercelular. El complejo Argonaute, un componente clave del complejo de silenciamiento inducido por miRNA formado intracelularmente, ayuda a estabilizar los miRNAs plasmáticos al unirse a ellos <sup>[141]</sup>. Las lipoproteínas, como la lipoproteína de alta densidad y la lipoproteína de baja densidad (HDL y LDL), son inherentemente solubles y tienden a incrustar sustancias insolubles en agua dentro de su núcleo, lo que les permite transportar ácidos nucleicos entre las células y proteger los miRNAs de la degradación por RNasa <sup>[142-143]</sup>. Estos miRNAs se transfieren a las células receptoras y pueden regular la expresión génica downstream. Otra forma interesante de comunicación intercelular es mediada por los EVs. Los exosomas, la subclase más pequeña de los EVs, han sido estudiados extensamente en la etiología del cáncer <sup>[144]</sup>. Son producidos por la exocitosis de cuerpos multivesiculares que encierran varios tipos de moléculas, incluidos los ncRNAs, y se secretan en el espacio intersticial circulando en los fluidos corporales. La señalización celular, incluidos los fenotipos resistentes a los fármacos, puede ser transmitida entre las células a través de la endocitosis de los ncRNAs encapsulados en los exosomas de células receptoras cercanas o remotas. <sup>[145]</sup>.

### ***3.7 Resistencia a la quimioterapia***

El tratamiento multidisciplinario del cáncer se está aplicando de manera efectiva en todo el mundo. Aunque la quimioterapia es uno de los métodos estándar tradicionales para el tratamiento del cáncer, solo una pequeña proporción de pacientes tendrá una respuesta clínica objetiva a varios regímenes de quimioterapia. Por lo tanto, caracterizar nuevos biomarcadores para distinguir a los pacientes con resistencia intrínseca a la quimioterapia planificada evitará efectos secundarios adversos innecesarios. El 5-FU y el oxaliplatino son dos fármacos



quimioterapéuticos esenciales y son componentes de los regímenes de quimioterapia más comunes para el CRC y otros cánceres gastrointestinales, como FOLFOX, FOLFIRI y XELOX. Al seleccionar miRNAs con expresión diferencial en 20 muestras de suero emparejadas de CRC con o sin respuesta objetiva a la quimioterapia basada en oxaliplatino, Zhang et al. identificaron cinco miRNAs—miR-20a, miR-130, miR-145, miR-216 y miR-372—que estaban significativamente desregulados en los respondedores en comparación con los no respondedores. En los conjuntos de entrenamiento y validación, que consistían en 40 y 173 muestras, los valores de área bajo la curva característica del receptor (AUC) para este conjunto de miRNAs fueron 0.841 (IC 95%: 0.707-0.975) y 0.918 (IC 95%: 0.871-0.963), respectivamente. Esta firma de miRNA también tuvo un mejor desempeño que los biomarcadores tumorales tradicionales como CEA (AUC = 0.689, IC 95%: 0.618-0.760) y CA19-9 (AUC = 0.746, IC 95%: 0.682-0.851) en la predicción de resistencia a la quimioterapia <sup>[146]</sup>. Sin embargo, no está claro si las muestras de suero se obtuvieron antes o después del inicio del tratamiento.

De manera similar, miR-130b, miR-106a y miR-484 se expresaron más altamente en pacientes con CRC metastásico resistentes a la quimioterapia de primera línea 5-FU / oxaliplatino en comparación con los respondedores. Estos datos se validaron aún más en otro grupo de 150 pacientes <sup>[147]</sup>. Cabe destacar que las muestras plasmáticas se obtuvieron antes del tratamiento, lo que sugiere que estos miRNAs plasmáticos podrían servir como biomarcadores no invasivos para predecir la resistencia intrínseca a la quimioterapia basada en 5-FU y oxaliplatino en pacientes con cáncer colorrectal metastásico. En otro estudio, entre 742 miRNAs analizados en pacientes con CRC metastásico que respondieron y no respondieron a XELOX / FOLFOX, la alta expresión de miR-625-3p se asoció con una mala respuesta; este hallazgo fue validado en una cohorte de 94 pacientes (OR = 6.25, IC 95%: 1.8–21.0). Sin embargo,

miR-625-3p no se asoció con el pronóstico, lo que sugiere que miR-625-3p puede ser solo un biomarcador para predecir la respuesta. En comparación con las células parentales, miR-625-3p también se sobreexpresó en la línea celular HCT116 inducida por resistencia al oxaliplatino <sup>[148]</sup>. Es posible que la señalización MAP2K6-p38 esté involucrada en la inducción de esta resistencia <sup>[149]</sup>.

MiR-20a, miR-145 y miR-106a también se consideran ampliamente miRNAs clave en la resistencia a la quimioterapia <sup>[150-151]</sup>. MiR-20a-5p regula la quimiosensibilidad a la gemcitabina al dirigir la subunidad M2 de la ribonucleótido reductasa en el cáncer, con un valor predictivo satisfactorio (AUC = 0.89) <sup>[152]</sup>. La sobreexpresión de miR-20a y la desregulación de miR-451 predijeron la resistencia al tratamiento en cánceres HR+ / HER2- (AUC = 0.80) después del segundo ciclo de quimioterapia neoadyuvante, que se usa ampliamente para tratar el cáncer de mama localmente avanzado <sup>[153]</sup>. Aunque miR-20a está asociado con la resistencia a la quimioterapia y la resistencia a la radioterapia en estudios *in vitro* e *in vivo*, estos hallazgos no se han validado en cohortes independientes de pacientes <sup>[154-156]</sup>. En una pequeña cohorte de pacientes con cáncer triple negativo (n = 32) que recibieron quimioterapia neoadyuvante basada en cisplatino / doxorrubicina, miR-145-5p se desreguló en los pacientes que lograron una respuesta patológica completa. El AUC para miR-145-5p como predictor de respuesta en esta cohorte fue 0.7899 (IC 95%: 0.6382-0.9416). MiR-145 puede inhibir la proliferación celular al dirigir TGFβ <sup>[157]</sup>. En otro estudio, que incluyó a 57 pacientes con cáncer luminal que recibieron quimioterapia neoadyuvante, los niveles de miR-145 fueron significativamente más bajos en los respondedores que en los no respondedores <sup>[158]</sup>. Lim et al. realizaron secuenciación de miRNA en 1362 muestras de leucemia mieloide aguda pediátrica, que incluyeron 1303 muestras primarias, 22 muestras refractarias y 37 muestras de recaída. Al aplicar un análisis de expresión

diferencial, encontraron que miR-106a-3p y miR-106a-5p podrían ser biomarcadores de resistencia al tratamiento, ya que estos dos miRNAs estaban consistentemente sobreexpresados en muestras resistentes al tratamiento (es decir, muestras refractarias o de recaída) y muestras primarias de pacientes con fallos en la inducción. Un análisis integrado de miRNA:ARNm encontró que miR-106a dirige genes asociados con la fosforilación oxidativa, que se inhibe bajo condiciones resistentes <sup>[159]</sup>. Además, miR-9-5p, miR-9-3p, miR-433-3p, miR-21 y miR-200c pueden tener roles predictivos potenciales en la resistencia a la quimioterapia en cáncer gástrico y cáncer esofágico (EC) <sup>[160-162]</sup>.

Los lncRNAs también están involucrados en el desarrollo de la resistencia a la quimioterapia y pueden ser biomarcadores potenciales para el CRC. En una cohorte de 140 pacientes con CRC, el lncRNA XIST se sobreexpresó en pacientes que no respondieron a 5-FU en comparación con aquellos que sí lo hicieron. Estos hallazgos se validaron en muestras de suero de 120 pacientes con CRC de la misma cohorte, con AUC, sensibilidad diagnóstica y especificidad de 0.756, 71.7% y 68.3%, respectivamente. Mecanísticamente, los estudios in vivo han mostrado que XIST inhibe la citotoxicidad inducida por 5-FU al promover la síntesis de timidilato (un objetivo clave de 5-FU) <sup>[163]</sup>. De manera similar, tanto el MEG3 en tejido como en suero fueron desregulados en pacientes con CRC resistentes al oxaliplatino. MEG3 mostró el potencial de identificar a los no respondedores, con un AUC de 0.784, una sensibilidad diagnóstica de 72.86% y una especificidad de 61.43% <sup>[164]</sup>. En estos estudios, se investigaron los niveles de expresión de los lncRNAs en tejidos y las correspondientes muestras de suero, demostrando su capacidad pronóstica y consistencia como biomarcadores candidatos. En un estudio de análisis integral que incluyó a 1102 pacientes en los conjuntos de entrenamiento y prueba, se identificó una firma de tres lncRNAs (AK291479, U79293 y BC032585) para

predecir la respuesta patológica completa después de la quimioterapia neoadyuvante para el cáncer de mama <sup>[165]</sup>. Liu et al. asignaron diferentes pesos a los niveles de expresión de ocho lncRNAs expresados en 258 pacientes con cáncer de ovario seroso de alto grado en el Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) y generaron con éxito una fórmula de riesgo para predecir la quimiosensibilidad <sup>[166]</sup>.

### ***3.8 Estrategias para dirigir la resistencia terapéutica***

#### **3.8.1 Inhibidores de la angiogénesis**

MiR-126, expresado específicamente en células endoteliales, desempeña un papel crucial en la regulación de la integridad vascular, lo que podría influir en la terapia antiangiogénica <sup>[167]</sup>. Hansen et al. informaron un aumento de MiR-126 en plasma durante el tratamiento de pacientes con CRC metastásico resistentes a la quimioterapia de primera línea XELOX combinada con bevacizumab, lo que sugiere que MiR-126 es un biomarcador predictivo para la resistencia adquirida a la quimioterapia o al bevacizumab <sup>[168]</sup>. Si la quimioterapia o el bevacizumab, o ambos, están regulados por MiR-126 sigue siendo incierto, ya que las terapias antiangiogénicas a menudo se utilizan con otras terapias combinadas en lugar de solas. También se ha informado que MiR-126 participa en la resistencia a múltiples fármacos a través de varios mecanismos, como la promoción de la resistencia a sorafenib <sup>[169]</sup>. Se sabe que MiR-126 confiere quimiorresistencia a las células madre leucémicas. Se sobreexpresa significativamente en los blastos de recaída en comparación con las muestras diagnósticas emparejadas, así como después de la quimioterapia de inducción o de rescate en pacientes con leucemia mieloide aguda <sup>[170]</sup>. Por el contrario, existe una correlación negativa entre los niveles de miR-126 y la resistencia adquirida al dabrafenib en melanoma y al tamoxifeno en cáncer de mama positivo para el

receptor de estrógenos, lo que sugiere que el mismo miRNA tiene múltiples roles en diferentes tratamientos [171-172].

Rinnerthaler et al. dividieron a los pacientes con cáncer que recibieron bevacizumab o no en grupos de respondedores y no respondedores según la duración de la supervivencia libre de progresión, y luego seleccionaron los miRNAs diferencialmente expresados entre los dos grupos. Al identificar los miRNAs que fueron diferencialmente expresados y que tenían capacidad pronóstica en estas dos cohortes, seleccionaron 12 miRNAs que proporcionaron información sobre la supervivencia. Finalmente, en una cohorte de validación de 230 pacientes de un ensayo aleatorio, confirmaron que la baja expresión de miR-20a-5p era el único predictor del beneficio de la terapia que contenía bevacizumab [173]. Curiosamente, la reducción de la expresión del mismo miRNA miR-20a en CRC se correlacionó positivamente con la respuesta al tratamiento con quimioterapia basada en oxaliplatino, lo que indica la especificidad de los miRNAs para el tratamiento y el estado de la enfermedad, lo cual puede ser atribuido a los mecanismos moleculares que controlan la enfermedad y el sitio de acción. Sin embargo, se necesita más investigación sobre los indicadores predictivos, como AUC, sensibilidad y especificidad utilizando estos miRNAs.

### **3.8.2 Inhibidores de tirosina quinasa**

El cáncer de pulmón, especialmente el NSCLC, tiene características histológicas y moleculares únicas que ofrecen un considerable potencial para la medicina precisa y personalizada en el tratamiento multidisciplinario del cáncer. Esto ha sido posible gracias a los grandes esfuerzos para desentrañar los mecanismos moleculares subyacentes, particularmente el descubrimiento de mutaciones y / o alteraciones en genes como EGFR, ALK y ROS1. Aunque los EGFR-TKIs dirigen selectivamente los NSCLC mutados en EGFR y tienen respuestas

terapéuticas significativas, entre el 20-30% de los pacientes no responden o tienen un tiempo de respuesta inferior a 3 meses; al analizar diferentes miRNAs en muestras sensibles y resistentes a gefitinib con mutaciones en EGFR, se identificaron miR-25, miR-122, miR-195, miR-21 y miR-125b como predictores de sensibilidad a gefitinib en NSCLC mutado en EGFR <sup>[174]</sup>. El AUC (0.869) de esta combinación de miRNAs plasmáticos mostró la capacidad de discriminar las mutaciones en EGFR. Esto puede ser una indicación para el uso del análisis de ADN libre de células plasmáticas para detectar el estado de mutación de EGFR cuando no es posible obtener muestras de tejido para detectar el estado de mutación de EGFR. Sin embargo, el valor predictivo de este panel de miRNAs en la predicción de resistencia intrínseca a los EGFR-TKIs aún no ha sido validado. Además de su papel en la inducción de la resistencia al oxaliplatino en CRC, también se ha informado que miR-625-3p induce resistencia adquirida a T790M activando la vía TGF- $\beta$  / Smad y la EMT in vitro <sup>[175]</sup>.

La resistencia secundaria al imatinib es una causa importante del fracaso del tratamiento en los tumores del estroma gastrointestinal (GIST) y representa un desafío clínico significativo. Los niveles de miR-518e-5p en suero fueron más altos en pacientes con GIST y resistencia secundaria al imatinib que en pacientes con GIST sensibles al imatinib. El AUC, la sensibilidad y la especificidad de miR-518e-5p para predecir la respuesta al imatinib fueron 0.9938, 99.8% y 82.1%, respectivamente, lo que indica su capacidad satisfactoria para distinguir tumores resistentes <sup>[176]</sup>. Aproximadamente el 65% de los pacientes tienen resistencia intrínseca al bortezomib y no responden a esta terapia dirigida, ampliamente utilizada para el mieloma múltiple <sup>[177]</sup>. El AUC de la expresión integrada de miR-215-5p, miR-181a-5p y miR-376c-3p fue de 0.95 (IC 95%: 0.84-1.00), lo que podría distinguir entre pacientes con mieloma múltiple refractarios y sensibles tratados con bortezomib <sup>[178]</sup>. El modelo de firma de miRNA identificado

en este estudio puede utilizarse para mejorar el éxito del tratamiento.

### **3.8.3 Resistencia a la radioterapia**

Los pacientes con cáncer esofágico (EC) que no pueden someterse a esofagectomía reciben quimiorradioterapia concurrente como tratamiento estándar alternativo, pero solo el 30-50% de los pacientes logran una respuesta permanente. La radioresistencia está asociada con la sobreexpresión de miR-193b, lo que aumenta la proporción de células en la fase G0 / G1. Los niveles de miR-193b en suero fueron significativamente más bajos en los pacientes con remisión completa que en los pacientes con remisión parcial después de la radioterapia, y tuvo un buen valor predictivo para detectar a los pacientes con EC que lograron remisión completa (AUC = 0.710, IC 95%: 0.580–0.839) <sup>[179]</sup>. Además del propio nivel de expresión, los polimorfismos de nucleótido único de los ncRNAs o las regiones reguladoras relacionadas también están asociados con la radiosensibilidad. Por ejemplo, el rs4938723 en la región promotora de miR-34b / c está asociado con la respuesta a la quimiorradioterapia en EC. Los datos de 175 pacientes mostraron que los pacientes con el genotipo CC rs4938722 tuvieron una mejor respuesta a la quimiorradioterapia que los pacientes con los genotipos TT o TC. El modelo predictivo mostró AUC, sensibilidad y especificidad de 0.777, 85.1% y 71.3%, respectivamente, lo que es prometedor para los pacientes con EC <sup>[180]</sup>.

En pacientes con adenocarcinoma rectal localmente avanzado, se validó una firma de lncRNA que contenía lnc-KLF7-1, lnc-MAB21L2-1 y LINC00324 para predecir la respuesta a la quimiorradioterapia neoadyuvante con un buen rendimiento (AUC = 0.93) <sup>[181]</sup>.

### **3.8.4 Resistencia a la inmunoterapia**

Identificar biomarcadores clínicos que puedan predecir con precisión la respuesta a la

inmunoterapia sigue siendo un desafío importante para el uso generalizado de los inhibidores de puntos de control inmunitarios (ICIs). Dependiendo del tipo de ICI, la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 / PD-1 en células tumorales y células inmunitarias, así como la carga mutacional tumoral (TMB), se han convertido en biomarcadores prometedores para predecir la respuesta a la inmunoterapia. La Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU. (FDA) ha aprobado la expresión de PD-L1 en muestras tumorales mediante inmunohistoquímica como estándar para el uso de ciertos ICIs, como el pembrolizumab para el tratamiento de NSCLC metastásico. Sin embargo, su aplicación está limitada por la heterogeneidad dentro del tumor, la necesidad de biopsias y la evaluación imprecisa de los resultados. Por lo tanto, los ncRNAs, especialmente los ARN circulantes que dirigen directa e indirectamente las moléculas de puntos de control inmunitarios (como PD-1 / PD-L1, TIM3, CTLA-4, B7-H3 y LAG-3), también podrían considerarse como biomarcadores con gran potencial [182-185].

En el CRC metastásico con inestabilidad de microsatélites (MSI-alta), existe una correlación entre la alta TMB y la respuesta a los ICIs. Con la implementación de los ICIs, la supervivencia de los pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello recientemente se ha prolongado. Por lo tanto, Xia et al. exploraron si un clasificador basado en 25 miRNAs en la base de datos TCGA para carcinoma escamoso de cabeza y cuello podría predecir los niveles de TMB para identificar a los pacientes que realmente se benefician de los ICIs. Este modelo de firma basado en 25 miRNAs predijo el estado de TMB con un AUC de 0.822 en el conjunto de entrenamiento, 0.702 en el conjunto de prueba y 0.774 en el conjunto total [186]. De manera similar, en cáncer endometrial del cuerpo uterino, el AUC de la firma de 26 miRNAs para predecir TMB fue de 0.869 en el conjunto de entrenamiento, 0.904 en el conjunto de validación



y 0.820 en el conjunto total. Este patrón de señalización de miRNA también estuvo asociado con PD-1 y PD-L1, genes relacionados con la reparación de errores de emparejamiento (como MLH1 y MSH6) y genes de reparación de ruptura de ADN de doble hebra (como BRCA1 y BRCA2) [187]. Un estudio similar se reportó en LUAD [188]. Al analizar los datos de TCGA de cáncer, se estableció una señal de múltiples lncRNAs que incluye 14 lncRNAs para predecir los niveles de TMB. Comparado con las características clínicas tradicionales, este clasificador combinado tuvo mejor eficiencia para predecir TMB, con niveles de AUC de 0.70, 0.71 y 0.71 en los tres conjuntos de validación, respectivamente [189]. Otro clasificador basado en lncRNA se desarrolló en adenocarcinoma gástrico para predecir TMB, con excelente desempeño [190].

Además de identificar TMB, los miRNAs también se han utilizado como biomarcadores indirectos para la respuesta al tratamiento con ICIs. Un estudio de fase 2 sobre la eficacia del inhibidor de PD-1 nivolumab en cáncer escamoso de esófago mostró que los niveles de miR-1233-5p en suero (AUC = 0.895) y los niveles de miR-6885-5p, miR-4698 y miR-128-2-5p (AUC de 0.93, 0.97 y 0.93, respectivamente) antes y después del inicio del tratamiento con nivolumab predijeron la respuesta a los ICIs [191]. Aunque este fue un estudio pequeño, la evidencia sugiere que los ncRNAs pueden ser utilizados en futuros ensayos clínicos prospectivos. Al estudiar las diferencias en los miRNAs circulantes previos al tratamiento entre respondedores y no respondedores en pacientes con NSCLC que recibieron inmunoterapia anti-PD-1, Shukuya et al. desarrollaron una firma predictiva de respuesta compuesta por miR-199a-3p, miR-21-5p y miR-28-5p. Esta combinación tuvo mejor eficiencia para predecir la respuesta a la inmunoterapia anti-PD-1, con un AUC de 0.925, que fue superior a la puntuación de expresión de PD-L1 medida por inmunohistoquímica (AUC = 0.575) [192].

El microambiente tumoral consiste en varios tipos de células inmunitarias: células T,

macrófagos, MDSCs y células NK, que regulan la respuesta a la inmunoterapia. Los ncRNAs que afectan la función de estas células inmunitarias esenciales pueden estar relacionados con la predicción de la respuesta a la inmunoterapia <sup>[193]</sup>. Al dirigirse al regulador clave de las células T efectoras, el factor de transcripción T cell factor 1 (TCF1), miR-24 regula la respuesta inmunitaria al controlar la producción de citoquinas de las células T. Además, durante el reconocimiento de antígenos, algunos miRNAs pueden intercambiarse entre las células T y las células presentadoras de antígenos a través de exosomas para mediar interacciones inmunitarias y coordinar las respuestas inmunitarias. Es razonable sugerir que estos miRNAs pueden servir como candidatos alternativos para predecir la respuesta a la inmunoterapia <sup>[194]</sup>.

### **3.8.5 Estrategias terapéuticas dirigidas a los ácidos ribonucleicos no codificantes para superar la resistencia terapéutica**

Se han desarrollado diversas terapias basadas en ARN, algunas de las cuales han sido aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU. (FDA). Cabe destacar que todas estas terapias apuntan a ARNm específicos para regular a la baja la expresión de los genes correspondientes. Aunque los lncRNAs han sido el foco de investigaciones recientes, ninguno de ellos ha sido estudiado clínicamente como objetivos terapéuticos. La viabilidad de las terapias basadas en miRNA ha sido desarrollada en ensayos clínicos de fase 2 y 3. Los enfoques terapéuticos dirigidos a los ncRNAs generalmente emplean una de dos estrategias: la primera es inhibir la expresión de una molécula de ncRNA específico cuando está sobrerregulado, y la segunda es sobreexpresar un ncRNA supresor de tumores <sup>[195]</sup>.

Los inhibidores de ncRNA incluyen antinucleótidos antisentido (ASOs), antagonistas, siRNAs, ARN con horquilla corta (shRNAs), esponjas de miRNA (incluidas esponjas de circRNA), edición genética basada en CRISPR / Cas9 e inhibidores de pequeñas moléculas de

ncRNAs. Los ASOs y los antagonistas son inhibidores que se dirigen a miRNAs, que son ampliamente utilizados en estudios in vitro e in vivo. Los ASOs son moléculas de ARN de cadena simple que se unen a secuencias de ARN complementarias con buen apareamiento de bases, bloqueando e inhibiendo su función, e induciendo su degradación mediante escisión mediada por RNase-H <sup>[196]</sup>. Además, los ASOs han demostrado especificidad y efectividad en la reducción de los niveles de lncRNA en estudios preclínicos in vivo. Los antagomirs son ASOs anti-miRNA que muestran una mejora en la entrega intracelular cuando se conjugados con colesterol. Los antagomirs funcionan al unirse de forma complementaria a los miRNAs, evitando que interactúen con los genes diana <sup>[197]</sup>. Los ácidos nucleicos cerrados son otra modificación química comúnmente utilizada en los ASOs anti-miRNA. Miravirsén (SPC3649) es un ácido nucleico cerrado modificado que es complementario a miR-122 y ha sido estudiado en un ensayo clínico de fase 2 para el tratamiento de la hepatitis C crónica <sup>[198]</sup>. La interferencia de ARN es otra estrategia comúnmente utilizada para degradar y eliminar ácidos ribonucleicos no infecciosos <sup>[199]</sup>. Los siRNAs son moléculas de ARN de doble cadena sintetizadas artificialmente de aproximadamente 20 nucleótidos de largo que ejercen interferencia de ARN al unirse de forma complementaria al objetivo, lo que conduce al silenciamiento transitorio de la expresión génica <sup>[200]</sup>. Los shRNAs superan la principal desventaja de la corta vida útil de los siRNAs sintéticos y, por lo tanto, son ampliamente utilizados en el cribado de genes y como un método común de interferencia de ARN en la terapia génica <sup>[201]</sup>. CRISPR / Cas9, un nuevo método de edición genética, se ha utilizado para inhibir ncRNAs en estudios preclínicos in vivo e in vitro con considerable éxito <sup>[202]</sup>. Las esponjas artificiales de miRNA son construcciones que contienen múltiples sitios de unión antisense de miRNA de alta afinidad que se dirigen a uno o varios miRNAs específicos <sup>[203]</sup>. Aunque la eficiencia de las esponjas de miRNA se ha

demostrado en estudios *in vivo*, su utilidad clínica sigue siendo insuficiente. Las pequeñas moléculas inhiben directamente los ncRNAs o, indirectamente, se dirigen a genes o proteínas específicos que regulan la expresión o función de los ncRNAs, a menudo involucrados en su biosíntesis y maduración. Luciferasa / GFP puede ser una estrategia efectiva para seleccionar inhibidores de pequeñas moléculas que se unan a miRNAs maduros y bloqueen su unión a los elementos de respuesta de miRNA [204-205]. Esta interacción llevará a la activación de luciferasa / GFP, y la afinidad puede determinarse preliminarmente por la intensidad relativa de la actividad de luciferasa. Dado que los lncRNAs ejercen sus efectos regulatorios mediante la interacción con proteínas de unión a ARN, los inhibidores de pequeñas moléculas interfieren con las interacciones lncRNA-proteína y bloquean la función de los lncRNAs.

La segunda estrategia para dirigir los ncRNAs es restaurar la función normal de los ncRNAs que están desregulados cuando ocurre la resistencia terapéutica. La función se puede restaurar reemplazando o sustituyendo los ncRNAs faltantes con moléculas sintéticas similares a los ncRNAs, como los miméticos de miRNA, que son una alternativa ampliamente utilizada y efectiva en estudios *in vivo* [206]. A pesar de los avances significativos en el campo de las terapias basadas en ncRNA, aún existen muchos desafíos que deben abordarse, especialmente el problema de los efectos secundarios causados por efectos fuera del objetivo. El bien conocido mimético de miR-34, MRX34, causó eventos adversos significativos en 5 pacientes, con 1 paciente desarrollando síndrome de liberación de citoquinas, lo que llevó a la suspensión de un ensayo clínico de fase 1 del tratamiento del cáncer. B, y luego desencadenó la transcripción y liberación de citoquinas proinflamatorias, incluyendo IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- $\alpha$  [207]. Otros efectos secundarios fuera del objetivo no inmunológicos, debidos a un apareamiento de bases desajustado con ARNm que no son el objetivo de interés. Otro obstáculo en la terapia basada en

ARN, especialmente cuando el fármaco se administra de manera sistémica, es el efecto inesperado de objetivo en tejidos normales en lugar de tejidos tumorales. Por ejemplo, el ASO AEG35156, que se dirige al gen inhibidor de apoptosis ligado al cromosoma X, también indujo neuropatía periférica patológica debido al efecto de objetivo en las células del sistema nervioso en lugar de en las células cancerosas <sup>[208]</sup>. Por lo tanto, la especificidad, entrega y tolerancia de los tratamientos que usan ncRNAs deben mejorarse aún más.

Los sistemas de entrega de tejidos seguros y efectivos para terapias basadas en ARN, sin efectos secundarios graves, siguen siendo un desafío importante que limita su aplicación traslacional. Como se mencionó anteriormente, los antagonistas son ASOs anti-miRNA conjugados con colesterol, los cuales tienen una mayor afinidad para la entrada intracelular al objetivo. Dichas modificaciones químicas en el esqueleto, nucleótido, ribosa y / o sustituciones en 2-ribosa pueden mejorar la estabilidad y eficacia de los oligonucleótidos terapéuticos. Sin embargo, aún se necesita un sistema de entrega adicional para mejorar la afinidad de los oligonucleótidos <sup>[209]</sup>. Las nanopartículas lipídicas son el sistema de entrega más comúnmente utilizado, con alta biocompatibilidad y baja toxicidad <sup>[210]</sup>. Los liposomas son vesículas nanopartículas esféricas compuestas por una bicapa de fosfolípidos similar a la estructura de las membranas celulares. Los liposomas se utilizan ampliamente para encapsular fármacos hidrofílicos o lipofílicos que se dirigen a tejidos específicos <sup>[211]</sup>. Al evitar la degradación por nucleasas y la eliminación renal del fármaco recubierto, los liposomas aumentan la captación celular del fármaco entregado. Los liposomas compuestos por lípidos ionizables, fosfatidilcolina, colesterol o conjugados de PEG-lípido se han utilizado con éxito en ensayos clínicos, incluidos el mimético de miRNA MRX34 y patisiran. Este último fármaco está diseñado para tratar la amiloidosis hereditaria mediada por transtiretina <sup>[212]</sup>.

Recientemente se ha desarrollado un sistema de entrega de nanopartículas sensible a estímulos que libera el fármaco objetivo de manera sensible a estímulos (desencadenado por enzimas, pH, glutatión, temperatura específica, hipoxia, ROS, etc.) para mejorar la especificidad de la entrega del fármaco al tejido objetivo <sup>[213]</sup>. Este sistema tiene grandes ventajas en el aumento de la distribución uniforme y la acumulación del fármaco dentro del tejido tumoral objetivo, reduciendo así los efectos fuera del objetivo. Además, se han adoptado modificaciones físicas y químicas para mejorar aún más su biocompatibilidad y control espacial. Las nanopartículas sensibles a estímulos de oro son fáciles de sintetizar, flexibles en tamaño y son transportadores ideales para oligonucleótidos. Los miméticos de miR-124-5p <sup>[214]</sup> y miR-145 <sup>[215]</sup> han sido recientemente explorados para ser encapsulados con estas nanopartículas y se ha demostrado que son efectivos para dirigirse a células cancerosas. La liberación de estos miméticos de miRNA se inicia mediante la escisión de cistamina y luego es desencadenada por la alta concentración de glutatión en el citoplasma. Además de los miméticos de miRNA, se ha explorado el circFoxo3 para ser encapsulado en nanopartículas de oro y entregado a células de melanoma para inducir su apoptosis. El ligando N-acetilgalactosamina (GalNAc) puede unirse altamente de forma selectiva al receptor de asialoglicoproteína 1, que se expresa en gran cantidad en el hígado, lo que hace que GalNAc sea un sistema ideal de entrega dirigido al hígado. Cuando GalNAc se conjuga con oligonucleótidos o siRNAs, GalNAc promueve la captación de estos fármacos ARN por hepatocitos mediante endocitosis altamente selectiva <sup>[216]</sup>. Por ejemplo, el siRNA givosiran conjugado con GalNAc se dirige y regula a la baja la 5-aminolevulinato sintasa 1 para tratar la porfiria hepática aguda. Su eficacia ha sido confirmada en un ensayo clínico de fase 3 <sup>[217]</sup>. Además, los anticuerpos, aptámeros o péptidos pueden ser conjugados con siRNAs o ASOs para entrega dirigida. El uso de química de clic para conjugación de oligonucleótidos con

anticuerpos facilita la degradación del complejo después de entrar en las células diana, seguida de la liberación de ASOs [218].

Los exosomas—EVs con un diámetro de aproximadamente 40 a 160 nanómetros—tienen un origen endosomal y contienen proteínas, ADN y moléculas de ARN. Las células cancerosas secretan exosomas, que se entregan a células distantes para transmitir información intercelular. Esta comunicación intercelular mediada por exosomas que contienen ncRNAs ha demostrado regular la resistencia de varios cánceres. Dado que los exosomas tienen mejor biocompatibilidad y biodistribución que los métodos de entrega sintéticos, manipular los exosomas puede convertirse en una estrategia de entrega en la clínica. Los exosomas son nanopartículas biológicas naturales con biocompatibilidad inigualable, una característica que ha sido utilizada para tratar a pacientes con enfermedad injerto contra huésped refractaria grave, en los cuales los exosomas provenientes de MSCs se entregan de manera segura sin causar respuestas inmunológicas graves [219]. Por lo tanto, cada una de las estrategias de entrega mencionadas anteriormente podría ser una candidata potencial para distribuir fármacos basados en ncRNA para superar la resistencia terapéutica. Sin embargo, se debe señalar que el diseño único de un sistema de entrega específico debe basarse de manera integral en el ncRNA objetivo, el tipo de tumor y otros factores clínico-patológicos, ya que estas características son clave para lograr la eficiencia deseada sin causar efectos fuera del objetivo o toxicidad grave.

#### **4. Células madre mesenquimatosas / Células estromales**

##### ***4.1 Visión general de las Células Madre Mesenquimatosas (MSCs)***

Las células madre mesenquimatosas (MSCs) fueron identificadas por primera vez en 1976 y se encuentran entre las células más distribuidas en el cuerpo humano. En general, las

MSCs se caracterizan como células madre multipotentes capaces de diferenciarse en osteoblastos, condrocitos, adipocitos y otros linajes celulares. Hasta la fecha, se han aislado MSCs de una variedad de tejidos, incluidos pólipos endometriales, cordones umbilicales, sangre menstrual y médula ósea. En general, las MSCs derivadas de la médula ósea humana expresan marcadores como CD90, CD73 y CD105 [220]. Sin embargo, los perfiles de marcadores superficiales de las MSCs de diferentes tejidos varían ligeramente. Por ejemplo, las MSCs derivadas de la médula ósea son positivas para CD73, CD90, CD105 y STRO-1, pero negativas para CD14, CD34, CD45 y HLA-DR. Además de los marcadores positivos o negativos descritos para las MSCs derivadas de la médula ósea, las MSCs derivadas del tejido adiposo también son positivas para marcadores adicionales como CD29, CD44, CD71, CD13 y CD166, pero negativas para el CD31 adicional. Además, las MSCs en sangre periférica expresan CD44, CD90, CD105 y HLA-ABC, pero no CD45 ni CD133. La Tabla 1 resume las características detalladas y los inmunofenotipos de las MSCs de diferentes fuentes de tejidos [220].

**Tabla 1 Biomarcadores y características de las MSCs derivadas de diferentes fuentes**

| MSCs aisladas de diferentes fuentes | Presencia                                                                                | Ausencia                                    | Características                                                    |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Médula ósea                         | CD13, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, STRO-1                                             | CD14, CD34, CD45, HLA-DR                    | Seguridad confirmada                                               |
|                                     |                                                                                          |                                             | Capacidad de diferenciación en hepatocitos                         |
| Tejido adiposo                      | CD71, CD9, CD13, CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166, HLA I, STRO-1 | CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD133, HLA-DR | Presencia abundante en tejido adiposo                              |
|                                     |                                                                                          |                                             | Posibilidad de diferenciación menor hacia osteocitos y condrocitos |
| Tejidos derivados del               | CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146                                                     | CD14, CD34, CD45                            | Tasa de proliferación relativamente alta                           |



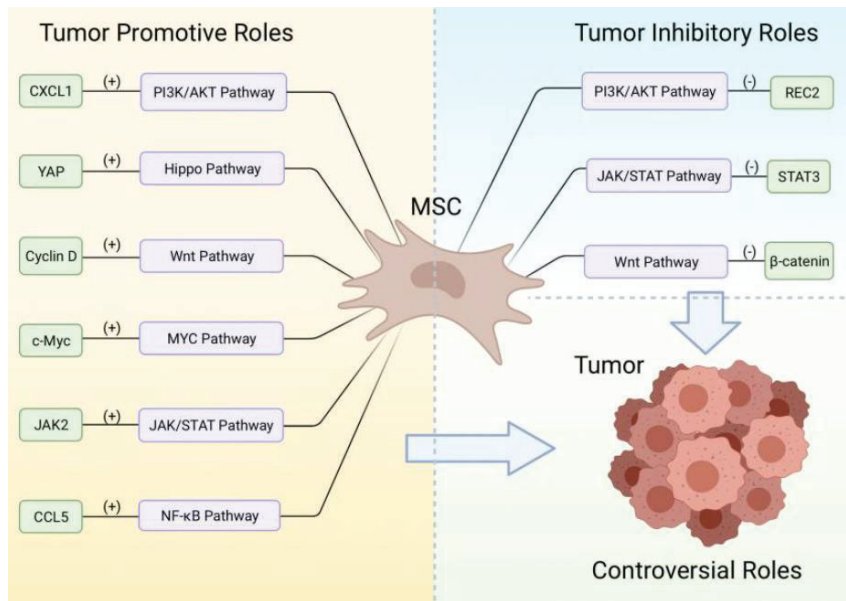
|                   |                                         |                        |                                                                                                     |
|-------------------|-----------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| nacimiento        |                                         |                        |                                                                                                     |
|                   |                                         |                        | Producen más insulina que las células madre mesodérmicas (CMS) de médula ósea                       |
| Pulpa dental      | CD29, CD44, CD90, CD105                 | CD14, CD34, CD45       | Tienen propiedades odontoesteogénicas                                                               |
|                   |                                         |                        | Se ubican dentro de la corona dental                                                                |
| Sangre periférica | CD44, CD54, CD90, CD105, CD166, HLA-ABC | CD14, CD34, CD45, CD31 | Manifiestan inmunofenotipos y potencial de diferenciación similares a los de las CMS de médula ósea |
|                   |                                         |                        | Gran volumen de sangre                                                                              |
| Endometrio        | CD73, CD90, CD105, CD146                | CD34, CD45             | Posibilidad de diferenciación de linaje mesodérmico                                                 |
|                   |                                         |                        | Producen altos niveles de factores inhibidores de la leucemia                                       |
| Piel              | CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, CD29    | CD34, CD45, HLA-DR     | Tienen una tasa de proliferación mayor que la de las CMS adiposas                                   |

Es importante destacar que una cantidad sustancial de evidencia indica que las MSCs exhiben potentes efectos inmunomoduladores y la capacidad de migrar hacia sitios de inflamación y tumores <sup>[222]</sup>. Las capacidades inmunomoduladoras de las MSCs son fundamentales, desempeñando un papel significativo en la modulación de las respuestas inmunitarias e influyendo en la progresión de diversas enfermedades. El cáncer, una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, representa una grave amenaza para la salud humana. Es importante señalar que las MSCs están implicadas en el inicio, desarrollo, progresión y metástasis del cáncer. Además, debido a sus propiedades de migración hacia los tumores, las MSCs se consideran vectores prometedores para la entrega precisa y selectiva de fármacos anticancerígenos. Investigaciones recientes han elucidado mecanismos adicionales mediante los cuales las MSCs promueven o inhiben el desarrollo del cáncer, lo que ha llevado al surgimiento de terapias anticancerígenas basadas en MSCs. Sin embargo, ciertas limitaciones de las MSCs, como su potencial para promover la metástasis y facilitar la evasión de la vigilancia inmune,

dificultan su aplicación clínica adicional, a pesar de su promesa como herramienta terapéutica para el tratamiento del cáncer. Por lo tanto, se necesita una evaluación exhaustiva de las terapias anticancerígenas basadas en MSCs, basada en sus mecanismos terapéuticos y las posibles vías de señalización, para acelerar el desarrollo de terapias celulares antitumorales basadas en MSCs para su aplicación clínica y mejorar la calidad de vida de los pacientes con cáncer.

#### ***4.2 Vías de señalización reguladas por las MSCs***

El inicio, la progresión y la metástasis del cáncer están estrechamente relacionados con una amplia variedad de vías de señalización. Evidencia convincente indica que la actividad de varias vías clave asociadas al cáncer es modulada hacia arriba o hacia abajo por las MSCs. En consecuencia, un examen exhaustivo de las redes de señalización que conectan las MSCs con el cáncer es esencial para obtener una comprensión completa de los posibles efectos anticancerígenos de las terapias basadas en MSCs. En esta sección, basándonos en los datos publicados, hemos seleccionado las vías críticas relacionadas con el cáncer que son influenciadas por las MSCs y proporcionamos una evaluación profunda de sus roles pro-tumorigénicos o anti-tumorigénicos (Figura 2) <sup>[223]</sup>.



**Figura 2.** Representación esquemática de las vías de señalización involucradas en la interacción entre las MSC y el tumor. Las MSC desempeñan roles tanto pro-tumorales como anti-tumorales mediante la regulación hacia arriba o hacia abajo de la actividad de las vías de señalización relacionadas con el cáncer.

#### 4.2.1 Vía de señalización PI3K / AKT

La vía PI3K / AKT muestra una activación tanto aumentada como disminuida en una variedad de tipos de cáncer. Estas anomalías dentro de la vía PI3K / AKT están implicadas en la adquisición de características específicas del tumor, como la proliferación celular acelerada, la resistencia a los fármacos y los fenotipos similares a los de las células madre <sup>[224]</sup>. Como miembro de la familia de las quinasas lipídicas heterodiméricas, PI3K es activada por una variedad de factores ascendentes, incluidos citoquinas, quimioquinas, antígenos y factores de crecimiento <sup>[225]</sup>. Cabe destacar que AKT, una quinasa de serina / treonina, es reconocida como uno de los efectores más críticos a nivel descendente de PI3K <sup>[226]</sup>. Además, la vía PI3K / AKT está asociada con una multitud de moléculas de señalización y cascadas que han demostrado

participar en el desarrollo del cáncer. Por ejemplo, investigaciones han indicado que la inhibición del gen que codifica la subunidad catalítica  $\beta$  de PI3K (PI3KCB) acelera la tasa de proliferación y reduce la apoptosis en células de glioblastoma <sup>[227]</sup>. En el cáncer de tiroides, la sobreexpresión de la vía PI3K / AKT suprime epigenéticamente la expresión del gen REC8, inhibiendo así la proliferación y las capacidades de formación de colonias de las células cancerosas <sup>[228]</sup>. Además, Li et al. revelaron que la sobreexpresión de la vía PI3K / AKT promueve la expresión del factor de crecimiento placentario (PlGF) y del ligando 1 de quimioquina con motivo C-X-C (CXCL1) en células madre de cáncer de pulmón, lo que estimula aún más la angiogénesis <sup>[229]</sup>. Los ligandos de los receptores que activan la vía PI3K / AKT son homólogos a los factores paracrinos secretados por las MSCs. En consecuencia, las MSCs pueden influir en el crecimiento y la metástasis del tumor a través de la vía PI3K / AKT. En un estudio experimental previo, se propuso que las MSCs asociadas al cáncer de mama podrían promover la producción de mamósferas y proporcionar un microambiente "amigable con el tumor" modulando la actividad de la vía PI3K / AKT <sup>[230]</sup>. Además, se observó que el medio de cultivo celular (medio condicionado por MSC) incubado con MSCs derivadas de médula ósea durante 48 horas aumentó significativamente la progresión de los cánceres de cabeza y cuello mediante la activación de la vía de señalización PI3K / AKT. Por lo tanto, con base en los conocimientos actuales, dirigir la vía PI3K / AKT podría ser un enfoque efectivo para inhibir los efectos pro-tumorigénicos de las MSCs.

#### **4.2.2 Vía de señalización JAK / STAT**

La vía de señalización Janus quinasa / activador de transcripción (JAK / STAT) es una cascada de señalización evolutivamente conservada <sup>[231]</sup>. Al regular la activación de una gran cantidad de moléculas funcionales, como factores de crecimiento y citoquinas, la vía JAK /

STAT está estrechamente asociada con diversas trayectorias del desarrollo de los tejidos <sup>[232]</sup>. En consecuencia, la disfunción anómala de esta vía está vinculada al desarrollo de diversas enfermedades, incluido el cáncer <sup>[233]</sup>. Por ejemplo, la sobreexpresión de STAT3, un miembro de la familia STAT3, se asocia con la tumorigénesis de las células madre similares a células de glioma <sup>[234]</sup>. Además, se ha demostrado que la desregulación de JAK3 promueve la invasividad del linfoma de células NK extranodales <sup>[235]</sup>. Además, los niveles elevados de expresión de Stat5a / b se consideran marcadores predictivos para el cáncer de próstata recurrente <sup>[236]</sup>.

Se han realizado varios estudios para evaluar cómo las MSCs interactúan con los tumores a través de la vía JAK / STAT. Sin embargo, se han observado diferentes roles de las MSCs con respecto a su impacto en el desarrollo del cáncer. Se ha informado que la IL-6 secretada por MSCs derivadas del cáncer colorrectal puede activar la señalización JAK2 / STAT3, promoviendo la progresión del cáncer colorrectal <sup>[237]</sup>. Además, en un estudio reciente, se observó que la exposición crónica a MSCs contribuyó a la selección de células de cáncer de próstata metastásico que son más resistentes a los efectos apoptóticos, lo que se asocia con un cambio en la señalización IL-28 / STAT desde la cascada pro-apoptótica IL-28-STAT1 hacia la cascada anti-apoptótica IL-28-STAT3 <sup>[238]</sup>. Por el contrario, también se han documentado los efectos anti-tumorales de las MSCs mediadas por la vía JAK / STAT. He et al. demostraron que el medio condicionado por MSC inhibe los niveles de STAT3 en células de cáncer de mama y suprime la progresión tumoral, lo que indica que los factores solubles paracrinamente secretados por las MSCs pueden regular la señalización JAK / STAT e inhibir el crecimiento de tumores de mama <sup>[239]</sup>. Por lo tanto, la futura investigación debe centrarse en los mecanismos moleculares específicos de la interacción entre MSCs y tumores mediada por JAK / STAT.

#### 4.2.3 Vía de señalización Wnt

La vía Wnt incluye una gran cantidad de proteínas que actúan como moléculas de señalización mediadoras del desarrollo de tejidos y la homeostasis [240-241]. Además, esta vía también ha sido descrita como un regulador clave del desarrollo del cáncer y la “stemness” de las células tumorales [242-245]. El papel de la señalización Wnt en varios cánceres ha sido bien estudiado [246]. En el cáncer colorrectal, las células cancerosas secretan ligandos Wnt, como Wnt3, que contribuyen al mantenimiento de la actividad Wnt [247]. Además, Luis et al. han demostrado que una señalización Wnt bien regulada es esencial para mantener la hematopoyesis normal, mientras que su desregulación puede acelerar el desarrollo de leucemia. En células de melanoma, se ha encontrado que la proteína Wnt WNT5A induce la liberación de exosomas que contienen factores proangiogénicos VEGF e IL-6 [248]. Además, la señalización Wnt se considera ampliamente como un mediador clave de la quiescencia de las células madre cancerosas [249]. Mecánicamente,  $\beta$ -catenina, como molécula de señalización clave en la vía Wnt, puede mejorar la expresión de la transcriptasa reversa de la telomerasa (TERT), una ribonucleoproteína que previene la pérdida de telómeros en las células madre cancerosas [250].

Aunque se ha descrito que las MSCs pueden regular la señalización Wnt en el cáncer [251], la cuestión de si esta regulación inhibe o promueve el desarrollo del cáncer sigue siendo controvertida. En el colangiocarcinoma, Wang et al. revelaron los efectos pro-tumorigénicos mediados por MSCs humanas derivadas de cordón umbilical (UC MSCs) [252]. Trataron un modelo de tumor xenoinjertado utilizando células de colangiocarcinoma con UC MSCs y luego observaron la sobreexpresión de genes diana de Wnt como la ciclina D1 y c-Myc. Además, se encontraron metástasis y quimiorresistencia aumentadas en el colangiocarcinoma después del tratamiento con UC MSCs. Por el contrario, otro grupo informó que las MSCs secretan proteína

relacionada con dickkopf 1 (DKK-1), un antagonista soluble de Wnt, para regular la señalización Wnt y reducir la tasa de proliferación de las células cancerosas leucémicas <sup>[253]</sup>. Por lo tanto, los cambios en la señalización Wnt mediada por las MSCs pueden desempeñar un papel dual en la progresión del cáncer, y esta diferencia puede atribuirse a las diferencias en el tipo de cáncer, la fuente de MSCs y el estado de activación de las proteínas Wnt.

#### **4.2.4 Vía de señalización Hippo**

La vía Hippo desempeña un papel central en la proliferación celular y el crecimiento de órganos <sup>[254]</sup>. En los últimos años, ha habido una creciente evidencia de que esta vía contribuye al desarrollo del cáncer <sup>[255]</sup>. La red de la vía Hippo consta de varias proteínas, incluidos la proteína asociada a Yes / regulador de transcripción con dominio WW (YAP / TAZ), el supresor tumoral grande 1 / 2 (LATS1 / 2) y las quinasas Ste20-like 1 / 2 (MST1 / 2) <sup>[256]</sup>. Cabe destacar que, como supresores tumorales, la activación de la vía Hippo está asociada con la inhibición de la actividad de YAP / TAZ. Por lo tanto, YAP / TAZ se considera un oncogen, ya que se sobreexpresa en una gran cantidad de cánceres <sup>[257-258]</sup>. La desregulación de la vía Hippo conduce a la tumorigénesis. En el colangiocarcinoma, la sobreexpresión de YAP se asocia con la enfermedad metastásica y un mal pronóstico <sup>[259]</sup>. Además, se ha encontrado que la vía Hippo se suprime durante el desarrollo del cáncer, lo que contribuye aún más a la metástasis tumoral <sup>[260]</sup>.

En cuanto a la terapia contra el cáncer basada en MSC, hay pruebas limitadas que sugieren que las MSC pueden regular la vía Hippo para afectar los procesos tumorales <sup>[261]</sup>. Sin embargo, se ha demostrado que las MSC secretan prostaglandina E2 (PGE2) para activar YAP en los hepatocitos, promoviendo así la proliferación de los hepatocitos <sup>[262]</sup>. Además, Liu et al. han mostrado que, bajo condiciones hipóxicas, las MSC promueven el crecimiento del carcinoma hepatocelular a través de mecanismos moleculares similares <sup>[263]</sup>. Sin embargo, se necesitan más

estudios para comprender de manera más completa el papel de la vía Hippo en la interacción entre las MSC y los tumores.

#### **4.2.5 Vía de señalización MYC**

MYC es una familia de genes que codifica tres factores de transcripción: c-MYC, n-MYC y l-MYC. Entre ellos, c-Myc es un oncogen importante y se considera un objetivo ideal para la terapia anticancerígena <sup>[264]</sup>. El efecto estimulante de MYC sobre la progresión del cáncer ha sido ampliamente estudiado <sup>[265-266]</sup>. Por ejemplo, se ha informado que la sobreexpresión de c-Myc induce la EMT en células de mama, lo que puede mejorar la motilidad de las células cancerosas. Además, se ha informado que los altos niveles de expresión de c-Myc en pacientes con linfoma difuso de células B grandes están asociados con una supervivencia global comprometida <sup>[267]</sup>. Más importante aún, se ha observado que la expresión anormal de c-Myc está presente en más del 70% de los cánceres humanos <sup>[268]</sup>.

En los últimos años, varios informes han indicado que las MSC regulan la progresión del cáncer y la resistencia a los fármacos a través de la vía de señalización MYC. En particular, los estudios han demostrado que la galectina-3 expresada por las MSC en el microambiente tumoral de la leucemia mieloide aguda (LMA) activa la expresión de MYC y contribuye a la adhesión celular entre las MSC y los tumores de LMA, promoviendo así la supervivencia de las células cancerosas <sup>[269]</sup>. Además, se observó que el medio condicionado por MSC derivado de médula ósea promueve el crecimiento de tumores gástricos mediante la sobreexpresión de c-Myc <sup>[270]</sup>. Además, en un estudio previo, se demostró que el contacto intercelular entre MSCs y células de LMA impide la apoptosis de las células cancerosas y promueve la resistencia a los fármacos en LMA <sup>[271]</sup>. Por lo tanto, c-Myc puede considerarse un objetivo prometedor para la terapia anticancerígena, ya que inhibir esta vía no solo inhibe el desarrollo de tumores, sino que también



interrumpe las vías pro-tumorigénicas controladas por las MSCs.

#### **4.2.6 Vía de señalización NF- $\kappa$ B**

El factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) es una familia de factores de transcripción descubierta por Sen et al. en 1986 <sup>[272]</sup>. Esta familia consta de cinco miembros: RelA, RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1 / p50 y NF- $\kappa$ B2 / p52, todos ellos implicados en la regulación de la expresión de múltiples genes <sup>[273]</sup>. Durante el desarrollo del cáncer, la vía de señalización de NF- $\kappa$ B desempeña un papel importante <sup>[274]</sup>. Por ejemplo, en un estudio preliminar, se descubrió que la inhibición de la señalización de NF- $\kappa$ B reducía la incidencia de cáncer asociado a colitis <sup>[275]</sup>. Además, en el cáncer, la activación de la señalización de NF- $\kappa$ B contribuye a la EMT y la metástasis tumoral. De manera similar, en el cáncer, la sobreexpresión de la señalización de NF- $\kappa$ B se asocia con una mayor agresividad tumoral y también se considera un marcador pronóstico para pacientes con cáncer <sup>[276]</sup>.

Existe evidencia sólida que sugiere que los efectos protumorigénicos de las MSC están parcialmente mediados por la vía de NF- $\kappa$ B. Por ejemplo, en condiciones ácidas, la IL-6 secretada por las MSC asociadas al cáncer sobreexpone NF- $\kappa$ B, promoviendo la quiescencia y la quimiorresistencia de las células de osteosarcoma <sup>[277]</sup>. Además, Wu et al. han demostrado que un medio acondicionado con MSC puede inducir la activación de mTOR y la señalización de NF- $\kappa$ B en el cáncer colorrectal y promover la progresión del cáncer <sup>[278]</sup>. Asimismo, las MSC en un entorno inflamatorio sobreexpone la señalización de NF- $\kappa$ B tras activar el eje C-C quimiocina ligando 5 / C-C quimiocina receptor 5 (CCL5 / CCR5), que desempeña un papel prometastático <sup>[279]</sup>. Por lo tanto, es concebible que la inhibición de NF- $\kappa$ B sea un enfoque eficaz para inhibir los efectos pro-tumorigénicos de las MSC.

#### ***4.3 Propiedades de Homing Tumoral de las Células Madre Mesenquimatosas (MSCs)***

Debido a las numerosas similitudes entre el desarrollo del cáncer y la cicatrización de heridas, los tumores también se conocen como "heridas que no sanan" [280]. Procesos biológicos como el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, la activación de fibroblastos y la remodelación de la matriz extracelular (ECM) están asociados con el crecimiento tumoral y la cicatrización de heridas [281]. Es importante destacar que se ha demostrado que las MSCs tienen la capacidad de dirigirse a sitios lesionados o inflamados [282]. En 2003, después de la infusión sistémica en babuinos, se observó que las MSCs se distribuían espontáneamente en diversos tejidos, lo que sugiere que las MSCs pueden migrar selectivamente hacia ciertas ubicaciones [283]. Posteriormente, en 2004, Jeanmarie et al. demostraron que las MSCs podían ser implantadas en sitios tumorales en modelos de cáncer [284], lo que indica la capacidad de las MSCs para dirigirse hacia los tumores.

Sin embargo, aunque se ha observado que las MSCs infundidas pueden localizarse en sitios tumorales en diversos tipos de cáncer [285], los mecanismos subyacentes no están claros. Según el conocimiento actual, la capacidad de homing tumoral de las MSCs está principalmente mediada por la acción sinérgica de citoquinas, quimioquinas y otras moléculas funcionales [286]. En primer lugar, las citoquinas están involucradas en la adhesión y el tránsito de las MSCs circulantes a través del endotelio vascular. Los estudios han demostrado que el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-6, IL-1 $\beta$  e interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) participan en este proceso [287-289]. En segundo lugar, las quimioquinas pueden estimular la quimiotaxis celular, lo que lleva a la migración celular hacia tejidos o sitios específicos [290]. Por ejemplo, el factor derivado de las células estromales-1 (SDF1) se expresa en gran medida en la superficie de las células tumorales [291]. Se ha observado que las MSCs pueden expresar el receptor para SDF1, el receptor de

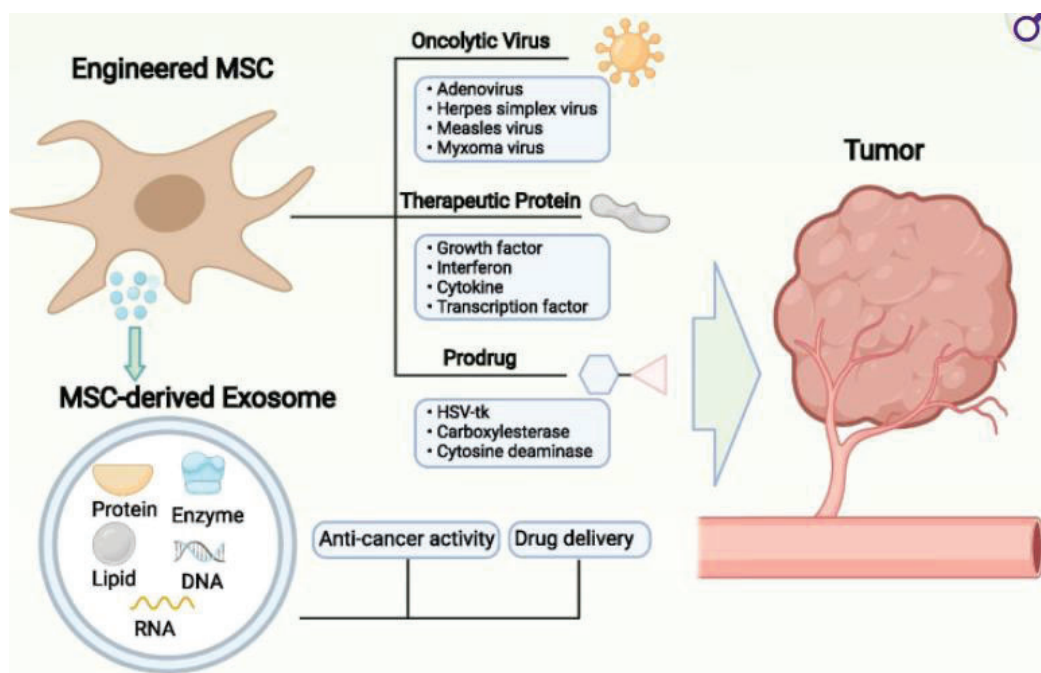
quimioquinas CXC 4 (CXCR4). El eje CXCR4-SDF1 desempeña un papel importante en inducir que las MSCs migren hacia los tumores [292]. En tercer lugar, otras moléculas funcionales, como factores de crecimiento e inductores de hipoxia (HIF), también se han encontrado como mediadores del homing tumoral de las MSCs. Mientras que los factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), pueden afectar la capacidad de migración de las MSCs [293], los HIF pueden inducir la expresión de CXCL10 y su receptor homólogo, el receptor de quimioquinas CXC 3 (CXCR3), en las MSCs y las células de cáncer de mama, respectivamente [294]. Aunque el mecanismo por el cual las MSCs migran hacia los sitios tumorales no se comprende completamente, el tropismo tumoral de las MSCs se ha utilizado para desarrollar terapias anticancerígenas más específicas y eficaces [295].

#### ***4.4 Estrategias de Tratamiento del Cáncer Basadas en Células Madre Mesenquimatosas de Médula Ósea***

Los complejos patrones de interacción entre las MSCs y los tumores han llevado a los investigadores a ser cautelosos sobre el uso de las MSCs en la terapia anticancerígena. Sin embargo, el rápido desarrollo de la tecnología de ingeniería genética ha hecho posible cargar fármacos con efectos antitumorales reconocidos en las MSCs utilizando vectores virales, vectores no virales u otras herramientas de transfección [296]. Además, el tropismo tumoral de las MSCs les permite liberar los fármacos de manera precisa cerca de los sitios tumorales, lo que teóricamente mejora la seguridad y la eficacia del tratamiento. Además, un número creciente de estudios ha mostrado que los exosomas derivados de las MSCs pueden ser utilizados como una poderosa terapia anticancerígena libre de células.

#### 4.4.1 Las MSCs como Vehículos para la Entrega Terapéutica

Como portadores de fármacos antitumorales, las células madre mesenquimales (MSCs) pueden ser modificadas genéticamente para expresar o secretar una variedad de agentes terapéuticos que inhiben el crecimiento y la progresión del cáncer [297]. Estos agentes se pueden clasificar en tres categorías principales: proteínas terapéuticas, genes suicidas y virus oncolíticos. (Figura 3).



*Figura 3. Ilustración esquemática de las terapias antitumorales actuales basadas en células madre mesenquimatosas (MSC) y exosomas derivados de MSC.*

#### 4.4.2 Entrega de proteínas terapéuticas

Una variedad de proteínas, incluidas las citoquinas [298-299] y los factores de crecimiento [300], han sido identificadas como potentes reguladores del desarrollo del cáncer. Las proteínas terapéuticas que inhiben el crecimiento tumoral o actúan como inhibidores de factores pro-tumorigénicos representan una nueva clase de agentes anticancerígenos. Las MSCs son

consideradas portadores ideales para la entrega de tales proteínas. Por ejemplo, los interferones se consideran agentes antitumorales efectivos porque se ha demostrado que inhiben la proliferación de las células tumorales y modulan las respuestas inmunológicas <sup>[301]</sup>. En modelos animales, las estrategias que vinculan el IFN- $\beta$  con anticuerpos específicos de tumores <sup>[302]</sup> o agentes quimioterapéuticos convencionales <sup>[303]</sup> han demostrado controlar de manera efectiva la progresión del cáncer. Se ha informado que las MSCs modificadas genéticamente para producir IFN- $\beta$  exhiben efectos antiproliferativos y pro-apoptóticos sobre las células tumorales <sup>[304]</sup>. Además, la IL-12 se considera otra proteína prometedora para la inmunoterapia del cáncer porque estimula la activación de células T y células NK citotóxicas <sup>[305]</sup>. Los resultados mostraron que las MSCs que expresan IL-12 podían inhibir el crecimiento tumoral en modelos de ratón de carcinoma de células renales y tumores cervicales <sup>[306-307]</sup>. Kanehira et al. demostraron que las MSCs que expresan NK4, un inhibidor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), pueden inhibir de manera efectiva la progresión de metástasis pulmonares <sup>[308]</sup>. Además, las MSCs modificadas genéticamente que pueden secretar una variante de trombospondina (TSP)-1, una proteína que inhibe la angiogénesis, inhibieron significativamente la angiogénesis en el sitio tumoral y redujeron la tasa de crecimiento tumoral en un modelo de glioma <sup>[309]</sup>. Sin embargo, los estudios han demostrado que TSP-1 acelera la tasa de proliferación de las MSCs a través de la señalización de TGF- $\beta$  <sup>[310]</sup>. Por lo tanto, la seguridad de esta terapia debe ser rigurosamente evaluada, ya que el trasplante de células madre está a menudo asociado con el riesgo potencial de formación de teratomas <sup>[311]</sup>. Además, los efectos anticancerígenos de las MSCs que expresan la proteína pro-apoptótica tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) han sido analizados en una serie de estudios. Los datos mostraron que las MSCs que expresan TRAIL inducen apoptosis en células tumorales en varios

tipos de cáncer, incluidos cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer cerebral, cáncer cervical y cáncer colorrectal. <sup>[312-314]</sup>.

#### 4.4.3 Entrega de Genes Suicidas

Además de expresar citoquinas anticancerígenas, las MSCs también han sido modificadas genéticamente para secretar genes suicidas, los cuales pueden convertir agentes no tóxicos en fármacos antitumorales tóxicos <sup>[315]</sup>. Por ejemplo, en un modelo de cáncer de próstata, las MSCs que expresan el "gen suicida" citosina deaminasa::uracil fosforribosiltransferasa (CD::UPRT) inhibieron de manera efectiva el crecimiento tumoral <sup>[316]</sup>. El CD::UPRT puede convertir la 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco antitumoral tóxico 5-fluorouracilo <sup>[317]</sup>. También se ha demostrado que las MSCs que secretan CD::UPRT son efectivas en modelos de ratón de cáncer colorrectal y melanoma <sup>[318-319]</sup>. En un estudio reciente, Liu et al. se inspiraron en la correlación entre el tumor y la rigidez del tejido para desarrollar un sistema preciso de entrega de fármacos utilizando MSCs, denominado Sistema de Respuesta Mecanosenible (MRCS, por sus siglas en inglés). Para establecer este sistema, las MSCs fueron modificadas para expresar YAP / TAZ y un gen suicida que codifica la citosina deaminasa (CD) <sup>[320]</sup>. Se ha informado que YAP / TAZ es un mediador importante que puede detectar la rigidez del tejido <sup>[321]</sup>. Dado que los tumores y los sitios metastásicos están asociados con la linealización extensiva del colágeno, lo que lleva a un aumento de la rigidez de la matriz <sup>[322]</sup>, YAP / TAZ localizado en el tumor en MRCS será activado y luego estimulará la expresión de CD. El sistema ha sido evaluado en un modelo de metástasis pulmonar de tumor de mama y ha mostrado una buena eficiencia en la inhibición de la metástasis con efectos secundarios mínimos. <sup>[320]</sup>.

#### 4.4.4 Entrega de Virus Oncolíticos

Además, los virus oncolíticos (OVs), que pueden matar selectivamente las células cancerosas, también se consideran uno de los posibles fármacos anticancerígenos <sup>[323]</sup>. Al dirigirse a proteínas superficiales en las células cancerosas, los OV's reconocen y se unen a las células cancerosas, lo que lleva a la lisis tumoral <sup>[324]</sup>. En un estudio reciente, se observó que el virus del herpes simple oncolítico-1 modulaba el microambiente tumoral (TME) al reducir el porcentaje de macrófagos antiinflamatorios y aumentar el número de linfocitos infiltrantes del tumor. Además, se encontró que la combinación del virus del herpes simple oncolítico-1 y los reguladores de puntos de control inmunitarios prolongaba significativamente la supervivencia de los ratones portadores de tumores <sup>[325]</sup>. Sin embargo, la eficiencia de la administración directa de OV's es generalmente baja porque los mecanismos de defensa del huésped pueden eliminar los virus extraños <sup>[326]</sup>. Por lo tanto, las MSCs se implementan como portadoras para transportar y proteger los OV's <sup>[327]</sup>. Además, las propiedades de migración hacia los tumores de las MSCs pueden mejorar la especificidad de la entrega de fármacos, evitando así posibles ataques a los tejidos normales. En modelos animales, se ha demostrado que la administración de OV's mediada por MSC es efectiva en el tratamiento de gliomas malignos, carcinoma hepatocelular y metástasis pulmonares de cáncer de mama <sup>[328-330]</sup>. Además de las citoquinas, los genes suicidas y los OV's, algunos otros fármacos, como los antagonistas de factores de crecimiento, proteínas pro-apoptóticas y agentes antiangiogénicos, también se consideran proteínas terapéuticas potenciales que pueden ser sobreexpresadas por las MSCs después de la modificación genética <sup>[331-333]</sup>.

En resumen, la capacidad de migración hacia los tumores es uno de los mecanismos terapéuticos más importantes de las MSCs y se ha utilizado para desarrollar fármacos de

precisión para el tratamiento del cáncer. Esta propiedad inherente de las MSCs hace posible entregar específicamente múltiples tipos de fármacos anticancerígenos al área patológica. Sin embargo, aún existen varios problemas potenciales con esta terapia. Primero, después de erradicar las células tumorales, las MSCs modificadas genéticamente restantes pueden causar problemas inesperados <sup>[334]</sup>. Segundo, las proteínas terapéuticas transportadas por las MSCs pueden afectar la proliferación de las MSCs trasplantadas, lo que aumenta el riesgo de formación de teratomas. Tercero, la efectividad de la migración hacia el tumor de las MSCs a veces está limitada por la insuficiente expresión de moléculas de migración, lo que puede llevar a problemas fuera del objetivo.

#### **4.4.5 Exosomas derivados de MSC**

Los exosomas son nanopartículas producidas por los cuerpos multivesiculares celulares, con un diámetro de aproximadamente 50-200nm <sup>[335]</sup>. Además, los exosomas son secretados globalmente por todo tipo de células y son abundantes en los fluidos corporales <sup>[336]</sup>. Como importantes transductores de señales entre células, los exosomas contienen una considerable cantidad de moléculas biológicamente funcionales, tales como ADN, enzimas, proteínas, ARN y lípidos, que juegan diferentes roles en las interacciones célula-célula a través de diversos mecanismos <sup>[337]</sup>. Por lo tanto, es concebible que los exosomas derivados de células puedan ser utilizados para aplicaciones terapéuticas. Cabe destacar que las MSCs son uno de los tipos de células humanas más eficientes para producir exosomas <sup>[338]</sup>, lo que hace que los exosomas derivados de MSCs sean un enfoque prometedor para tratar enfermedades, incluido el cáncer <sup>[339]</sup>. Pascucci et al. encontraron que los exosomas derivados de MSCs podían captar PTX después de que las MSCs fueran tratadas con paclitaxel (PTX), lo que sugiere que los exosomas derivados de MSCs son un nuevo método de entrega de fármacos <sup>[340]</sup>. Además, se ha informado que la



entrega de microARN terapéutico (anti-miR-9) a través de exosomas derivados de MSCs a glioblastoma multiforme quimiorresistente es más efectiva que la comunicación directa célula-célula entre las MSCs y las células cancerosas <sup>[341]</sup>. Además, los exosomas derivados de MSCs también exhiben actividad antiangiogénica. En 2013, Lee et al. mostraron que los exosomas derivados de MSCs podían inhibir la angiogénesis reduciendo la expresión de VEGF en un modelo de cáncer de mama <sup>[342]</sup>. Recientemente, un grupo de investigación de la Universidad de Teherán demostró que los exosomas sobreexpresando miR-34a (un microARN supresor de tumores) en células madre mesenquimatosas de la pulpa dental podían inhibir el crecimiento tumoral in vitro. Recientemente, Zhou et al. demostraron que los exosomas derivados de MSCs de médula ósea podían inducir la polarización de macrófagos anti-tumorales y desencadenar la contratación de linfocitos citotóxicos, mejorando así la inmunoterapia contra el cáncer pancreático in vivo <sup>[343]</sup>. Por el contrario, se ha informado que los exosomas derivados de MSCs contribuyen al desarrollo de la quimiorresistencia en cáncer. Después del tratamiento de ratones con doxorrubicina (un agente quimioterapéutico estándar), se observó un aumento en los niveles de expresión de exosomas derivados de MSCs, seguido de la inducción de la expresión del factor anti-apoptótico S100A6 en células de cáncer de mama <sup>[344]</sup>.

En resumen, la terapia con exosomas derivados de MSCs es un enfoque prometedor para mejorar aún más la eficacia y seguridad de las terapias convencionales contra el cáncer. La evidencia emergente sugiere que los exosomas de MSCs son métodos superiores de entrega de fármacos en términos de capacidad de transferencia genética, biocompatibilidad, inmunogenicidad y estabilidad <sup>[345]</sup>. Sin embargo, la complejidad del contenido de los exosomas hace que sea una tarea desafiante dilucidar completamente el mecanismo de la interacción exosoma-tumor. Además, la investigación futura podría centrarse en el desarrollo de técnicas de

ingeniería genética que puedan modificar la superficie y el contenido de los exosomas para mejorar la especificidad de la orientación. <sup>[346]</sup>.

## **5 Biogénesis y Aislamiento de Exosomas**

### **5.1 Biogénesis**

Los exosomas, un subconjunto de vesículas extracelulares (EVs) que van de 40 a 160nm de diámetro (con un promedio de 100nm), están rodeados por una bicapa lipídica y son secretados por la mayoría de las células eucariotas <sup>[347]</sup>. Inicialmente identificados como desechos celulares a finales de la década de 1980 <sup>[348]</sup>, los exosomas ahora son reconocidos como mediadores de la comunicación intercelular, participando en una amplia variedad de procesos biológicos en la salud y la enfermedad, incluido el cáncer <sup>[349]</sup>. La función biológica de los exosomas depende de su carga bioactiva, como lípidos, metabolitos, proteínas y ácidos nucleicos, que pueden ser entregados a las células objetivo <sup>[350-353]</sup>. La creciente evidencia subraya el papel crucial de los exosomas derivados de tumores (TEX) en el cáncer, siendo los exosomas y su carga potencialmente marcadores pronósticos, objetivos terapéuticos e incluso vehículos de entrega de fármacos <sup>[354]</sup>.

Los exosomas se originan en la vía endocítica <sup>[355]</sup>. El proceso canónico de formación de exosomas implica: (i) la invaginación de la membrana plasmática para formar endosomas tempranos; (ii) la posterior gemación hacia el interior de la carga, formando vesículas intraluminales (ILVs) dentro del endosoma, un proceso conocido como biogénesis de cuerpos multivesiculares (MVB); (iii) la maduración de los endosomas tardíos mediante acidificación; y (iv) finalmente, la liberación de las ILVs como exosomas hacia el espacio extracelular a través de la fusión con la membrana plasmática <sup>[356]</sup>. Se sabe que el complejo de clasificación

endosomal necesario para el transporte (ESCRT) desempeña un papel crucial en la biogénesis de MVB y ILV. Los ESCRT, que comprenden aproximadamente 20 proteínas, están compuestos por cuatro complejos—ESCRT-0, -I, -II y -III—junto con proteínas asociadas, como la proteína 2 de unión al gen relacionado con la apoptosis (ALIX, codificada por PDCD6IP), la vesícula de transporte 1 (VTA1), la proteína asociada al proceso de clasificación de proteínas vacuolares 4 (VPS4), y la proteína del gen de susceptibilidad tumoral 101 (TSG101) <sup>[357-358]</sup>. Durante la biogénesis de MVB, el complejo ESCRT-0 recluta la carga ubiquitinada a la membrana endosomal, una señal primaria específica de la vía en la biogénesis de MVB; los componentes de ESCRT-I y -II deforman la membrana para brotar y aislar la carga; posteriormente, el complejo ESCRT-III separa las vesículas de la membrana citoplasmática <sup>[359-360]</sup>. Además, se han identificado mecanismos independientes de ESCRT que influyen en la formación de exosomas, como la vía dependiente de la esfingomielinasa neutra 2, la vía dependiente de ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas, la modificación post-transcripcional del extremo 3' de miRNA, y las vías asociadas al complejo de silenciamiento inducido por ARN. <sup>[361]</sup>

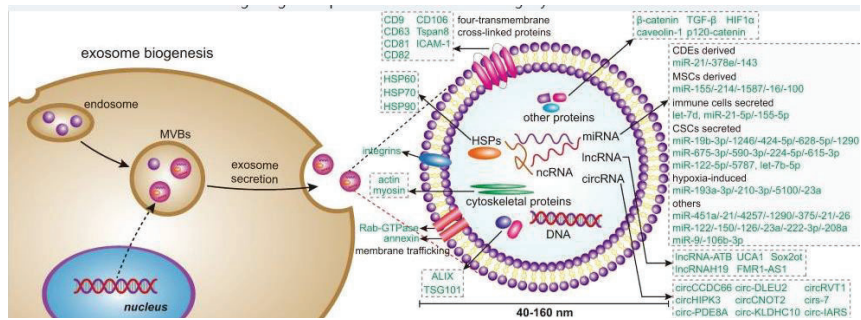
## **5.2 Aislamiento**

Los exosomas son ubicuos en organismos sanos o patológicos. Se ha confirmado la presencia de exosomas en la orina, suero, plasma, linfa o líquido cefalorraquídeo de individuos sanos o pacientes con cáncer <sup>[362-363]</sup>. Se han reportado varios métodos clásicos para aislar exosomas de fluidos corporales o sobrenadantes de cultivos celulares, tales como ultracentrifugación, ultrafiltración y técnicas de captura por afinidad inmunológica <sup>[364]</sup>. Para mejorar aún más la pureza y eficiencia del aislamiento de exosomas, se han aplicado varias tecnologías interdisciplinarias emergentes en la preparación de exosomas. Una de estas tecnologías es la plataforma de aislamiento de exosomas basada en microfluidos, que aprovecha

las propiedades físicas y bioquímicas de los exosomas a la escala microscópica. Además de los métodos estándar, como la separación por tamaño, densidad y afinidad inmunológica, se han empleado mecanismos de clasificación novedosos, como la manipulación acústica y electromagnética [365-366]. Con estas plataformas de aislamiento, la recolección de exosomas será más fácil, y el consumo de muestras, reactivos y tiempo durante el proceso de aislamiento se reducirá considerablemente.

### ***5.3 Contenido de los exosomas***

Según la lista más reciente actualizada de la base de datos de exosomas, los exosomas están compuestos por una variedad de sustancias, que incluyen 9769 proteínas, 3408 ARNm, 2838 microARN y 1116 lípidos ([http: / / www.exocarta.org](http://www.exocarta.org)) [367]. Sus componentes pueden actuar como factores autocrinos y / o paracrinos, incluidos lípidos específicos, proteínas, ADN, ARNm y ARN no codificante (Figura 4). La abundancia de estos exosomas puede servir como un marcador pronóstico y / o base de estadificación para la progresión del cáncer. Además, modulan el crecimiento tumoral, la metástasis, la angiogénesis y median la resistencia a los fármacos en las células tumorales. Las siguientes secciones describirán algunos procesos de investigación que involucran componentes de los exosomas, como proteínas y ARN no codificante.



**Figura 4. Biogénesis de los exosomas y su contenido.** Los exosomas se originan a partir de los cuerpos multivesiculares (MVBs), que contienen muchos tipos de proteínas, como transportadores de membrana, HSPs, entre otros. Además, también contienen una gran cantidad de ARN no codificante, incluyendo miARN, lncARN y circARN. Estos componentes desempeñan un papel importante en el desarrollo tumoral. MVBs: cuerpos multivesiculares; CDEs: exosomas derivados de fibroblastos asociados al cáncer; MSCs: células madre mesenquimatosas; CSCs: células madre cancerosas.

#### 5.4 Proteínas Exosomales

Los exosomas, como miembros de las vesículas extracelulares (EVs), participan en procesos fisiológicos y patológicos mediante la entrega de una variedad de moléculas señalizadoras, incluyendo ARNm, miARN, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas. Las proteínas exosomales poseen una característica específica denominada ubiquitinación, que permite que las proteínas sean reconocidas por ESCRT-0, y la desubiquitinación es un paso clave en su clasificación dentro de las vesículas intraluminales (ILVs) [368]. Las proteínas exosomales incluyen: (i) proteínas relacionadas con el transporte de membrana y la fusión, como las anexinas, Rab GTPasas (proteína GTPasa relacionada con Ras-Rab) y las proteínas de choque térmico (HSPs), incluyendo Hsp60, Hsp70 y Hsp90; (ii) tetraspaninas (también conocidas como proteínas de cruce transmembrana cuádruple), incluyendo CD9, CD63, CD81, CD82, CD106,

Tspan8 e ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular); (iii) proteínas relacionadas con los MVBs, como ALIX y TSG101 (biomarcadores típicos de exosomas); (iv) otras proteínas, como integrinas (proteínas relacionadas con la adhesión celular), actina y miosina (involucradas en la construcción del citoesqueleto) <sup>[369-371]</sup>. Las proteínas mencionadas desempeñan funciones fundamentales en los exosomas. Se ha demostrado que el tetrahidrofolato facilita la incorporación de cargas específicas en los exosomas, y CD9 media la carga de la metaloproteínasa CD10 en los exosomas <sup>[372]</sup>. Como miembros de las proteínas relacionadas con los MVBs, ALIX y TSG101 son componentes conocidos del mecanismo ESCRT, que clasifican proteínas cargadas en las ILVs reconociendo proteínas ubiquitinadas y organizándolas en la membrana plasmática como componentes de los exosomas <sup>[373]</sup>. Las proteínas de choque térmico, como chaperonas moleculares, promueven el plegamiento proteico y el equilibrio entre inhibición y proteólisis de proteínas, desempeñando un papel antiapoptótico en los tumores <sup>[374]</sup>. Entre las proteínas de choque térmico, la proteína Hsp90 es la principal chaperona intercelular, asegurando el correcto plegamiento y función de proteínas mediante su interacción con una amplia variedad de proteínas intracelulares. La alta expresión de Hsp90 en diversas células cancerosas se debe al estrés continuo de las células tumorales bajo condiciones de hipoxia, acidosis, alteraciones metabólicas y deficiencia nutricional. Hsp90 desempeña un papel crucial en la promoción del crecimiento y la metástasis tumoral en cáncer de mama, cáncer de próstata (PC) y leucemia, y está estrechamente relacionada con un mal pronóstico tumoral <sup>[375]</sup>. Además, en cuanto a funciones relacionadas con los exosomas, un estudio reciente ha demostrado que la deformabilidad de membrana mediada por Hsp90 facilita la fusión de membranas entre los MVBs y el plasma <sup>[376]</sup>. Los exosomas que carecen de Hsp90 $\alpha$  extracelular (un subtipo clave de Hsp90) pierden la capacidad de realizar una comunicación intercelular importante desde las

células tumorales hacia las células del estroma, promoviendo así la motilidad celular <sup>[377]</sup>.

## **5.5 ARN no codificante exosomal**

### **5.5.1 MicroARNs**

Los microARNs (miARNs), como miembros importantes de los ARN pequeños no codificantes con longitudes entre 20 y 22 nucleótidos, median el silenciamiento génico postranscripcional al unirse a la región no traducida 3' o al marco de lectura abierto del ARNm diana, y han sido ampliamente estudiados en diversos procesos fisiológicos y patológicos <sup>[378-379]</sup>. Durante el desarrollo del cáncer, los miARNs contenidos en exosomas pueden servir como biomarcadores potenciales para el pronóstico y / o estadificación del cáncer. Se ha encontrado que el miR-451a, miR-21 y miR-4257 exosomales están anormalmente sobreexpresados en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, lo cual se relaciona estrechamente con la progresión tumoral, la recurrencia y un mal pronóstico <sup>[380-381]</sup>. El análisis de muestras de vesículas extracelulares (EVs) plasmáticas de pacientes con cáncer de próstata mostró que let-7a-5p se encontraba significativamente reducido en las EVs plasmáticas de pacientes con puntuaciones altas de Gleason (GS), en comparación con aquellos con GS bajo <sup>[382]</sup>. Se ha reportado que el análisis combinado de los miR-1290 y miR-375 exosomales puede predecir la supervivencia global en pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración. En un mismo período de seguimiento de 20 meses, la tasa de mortalidad global en pacientes con niveles elevados de ambos miARNs fue del 80%, mientras que la tasa de mortalidad en pacientes con concentraciones normales de ambos miARNs fue solo del 10% <sup>[383]</sup>. Sun et al. aislaron y analizaron exosomas secretados por células madre cancerosas (CSCs) y sus células parentales correspondientes, y descubrieron que seis miARNs (miR-1246, miR-424-5p, miR-628-5p,

miR-1290, miR-675-3p y miR-590-3p) estaban sobreexpresados, mientras que cinco miARNs (miR-224-5p, let-7b-5p, miR-615-3p, miR-122-5p y miR-5687) estaban subexpresados, lo cual sugiere que podrían convertirse en biomarcadores potenciales para predecir pacientes con cáncer de alto riesgo y para el diagnóstico precoz del cáncer <sup>[384-386]</sup>.

Además, los miARNs pueden ser detectados en exosomas aislados de fluidos corporales (como saliva, sangre o suero), lo que indica las ventajas potenciales del uso de miARNs exosomales como nuevos biomarcadores no invasivos <sup>[387]</sup>. Diversos miARNs, incluyendo miR-21, miR-26, miR-122 y miR-150, han sido identificados como biomarcadores sanguíneos para el diagnóstico no invasivo del colangiocarcinoma <sup>[388]</sup>. En la investigación del cáncer de pulmón, Hu et al. resumieron los miARNs presentes en exosomas pulmonares como biomarcadores para el diagnóstico, la predicción y el pronóstico <sup>[389]</sup>. En un estudio que analizó exosomas aislados del plasma de 45 pacientes con cáncer de pulmón no microcítico y 31 controles, se observó que el miR-126 exosomal estaba sobreexpresado, lo que podría ser un biomarcador diagnóstico para este tipo de cáncer <sup>[390]</sup>. Niveles elevados de miR-23a exosomal circulante se encontraron en el suero de pacientes con cáncer de pulmón, y el miR-23a se correlacionó positivamente con la actividad proangiogénica <sup>[391]</sup>. Además de biomarcadores diagnósticos, el miR-222-3p exosomal también puede ser utilizado como biomarcador predictivo de sensibilidad a la gemcitabina (GEM) <sup>[392]</sup>, y el miR-208a exosomal como biomarcador predictivo de respuesta a la radioterapia <sup>[393]</sup>.

Los miARNs presentes en exosomas también pueden promover la progresión tumoral de diversas maneras. El miR-9 contenido en exosomas derivados de células de cáncer de mama triple negativo puede estimular la migración de células tumorales mediante la regulación negativa de la E-cadherina en fibroblastos normales (NFs) y promover la transformación de estas



células en fibroblastos asociados al cáncer <sup>[394]</sup>. Los exosomas tumorales (TEX) pueden promover el desarrollo tumoral mediante la transferencia mediada por miARNs de inestabilidad del receptor de  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>[395]</sup>. Además, se ha demostrado que los miARNs contenidos en exosomas derivados de MSCs o fibroblastos pueden ser entregados directamente a las células tumorales, promoviendo la progresión del cáncer e induciendo resistencia en el mieloma múltiple (MM), el cáncer colorrectal y otras células cancerosas <sup>[396-398]</sup>.

### **5.5.2 ARN largos no codificantes (lncRNAs)**

Los ARN largos no codificantes (lncRNAs) son transcritos con una longitud superior a 200 nucleótidos y carecen de marcos de lectura abiertos significativos. Desempeñan un papel importante en muchas actividades vitales, como la compensación de dosis, la regulación del ciclo celular, la regulación epigenética y la diferenciación celular <sup>[399]</sup>. Se trata de una clase emergente de ARN reguladores que pueden ser empaquetados selectivamente en exosomas y actuar como mensajeros en la comunicación intercelular, regulando el crecimiento tumoral, la metástasis, la angiogénesis y remodelando el microambiente tumoral (TME) <sup>[400-401]</sup>. Por ejemplo, el lncRNA-ATB es un nuevo lncRNA relacionado con el cáncer que se expresa de manera anómala en el carcinoma hepatocelular (HCC), el cáncer colorrectal (CCR) y el cáncer de pulmón, principalmente mediante la unión competitiva a miARNs (familia miR-200) para inducir la transición epitelio-mesénquima (EMT) <sup>[402]</sup>. Conigliaro et al. descubrieron que los exosomas secretados por células CD90 y células madre cancerosas (CSCs) pueden inducir angiogénesis en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs). Estos exosomas pueden ser absorbidos por las células endoteliales y entregar el lncRNA H19 a las células diana correspondientes al adherirse a células CD90 y HUVECs, estimulando la angiogénesis mediante la síntesis y liberación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) <sup>[403]</sup>. Los lncRNAs

también desempeñan un papel relevante en la resistencia tumoral a los fármacos <sup>[404]</sup>. UCA1 (un lncRNA) activa la vía de señalización Wnt y promueve la resistencia al cisplatino en células de cáncer de vejiga al aumentar la expresión de Wnt6. Por lo tanto, la vía UCA1 / Wnt6 representa un posible objetivo terapéutico frente a la resistencia en cáncer de vejiga <sup>[405]</sup>.

### **5.5.3 ARN circulares (circRNAs)**

Otro tipo de ARN presente en los exosomas, el ARN circular (circRNA), constituye una nueva familia de ARN endógenos no codificantes presente en todas las células eucariotas. Presenta patrones de expresión específicos por tejido y tipo celular, bloquea covalentemente biomoléculas endógenas, y su biogénesis está regulada por elementos cis-activos y factores trans-activos específicos <sup>[406]</sup>. El ARN circular se produce mediante un mecanismo específico denominado "back-splicing" o empalme inverso, formando una clase especial de ARN no codificante con estructura circular y sin cola poliadenilada ni polaridad 5'-3', lo que le confiere resistencia intrínseca a nucleasas que actúan sobre los extremos 5' y 3' <sup>[407-408]</sup>. Se ha demostrado que el circRNA puede unirse competitivamente a miARNs como ARN endógeno, inhibiendo el proceso mediante el cual el miARN dirige al ARNm <sup>[409]</sup>. Muchos circRNAs ejercen funciones biológicas importantes actuando como inhibidores competitivos de miARNs para regular funciones proteicas o su propia traducción, como se ha descrito en circCCD66, circHIPK3, circPVT1 y circ-7 en diversos tipos de cáncer. El circRNA presenta múltiples funciones y puede actuar como regulador de la expresión génica y de miARNs, participando en la proliferación, invasión, metástasis y progresión de las células tumorales en varios tipos de cáncer.

La expresión de circIARS está aumentada en los exosomas plasmáticos de pacientes con cáncer pancreático (PC) in situ y metastásico. La sobreexpresión de circIARS reduce significativamente los niveles de miR-122 y ZO-1, aumenta los niveles de RhoA y RhoA-GTP,

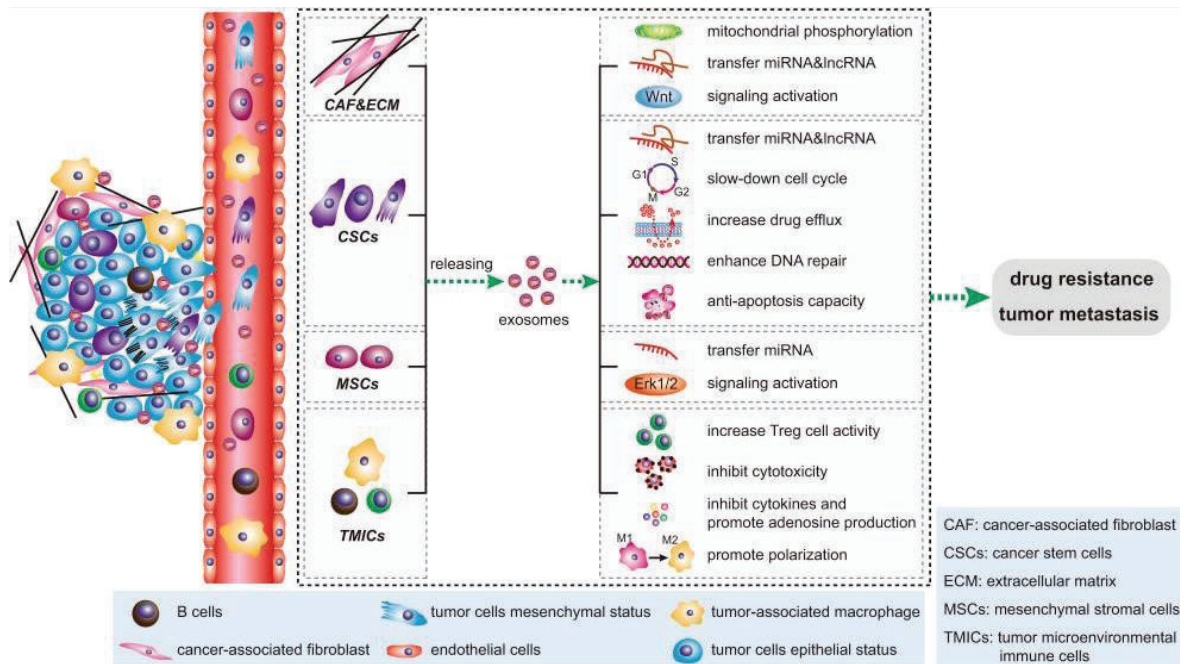
incrementa la expresión y adhesión de F-actina, mejora la permeabilidad endotelial y promueve la invasión y metástasis tumoral <sup>[410]</sup>. Además, la sobreexpresión de circ-DLEU2 promueve la expresión de PRKACB mediante la inhibición de la expresión de miR-496, lo que favorece la proliferación in vitro de células leucémicas, bloquea la apoptosis y facilita la formación de tumores de leucemia mieloide aguda <sup>[411]</sup>.

En resumen, dado que los niveles de expresión del ARN circular suelen estar relacionados con características clinicopatológicas, estos ARN pueden servir como biomarcadores con valor diagnóstico, pronóstico y predictivo. Además, la alta estabilidad del circRNA puede permitir su detección no invasiva en fluidos corporales. Por ejemplo, se ha demostrado que el circCNOT2 en cáncer primario es detectable en el plasma de pacientes con cáncer de mama <sup>[412]</sup>, lo que sugiere que circCNOT2 puede utilizarse como un biomarcador útil para seleccionar estrategias terapéuticas adecuadas o para la monitorización del progreso mediante métodos mínimamente invasivos <sup>[413]</sup>.

### ***5.6 Relación entre los Exosomas y el Microambiente Tumoral (TME)***

El microambiente tumoral (TME, por sus siglas en inglés) está compuesto por la matriz extracelular, células del estroma (incluyendo fibroblastos, células madre mesenquimatosas —MSCs—, pericitos, adipocitos ocasionales, redes vasculares y linfáticas), y células inmunitarias (incluyendo linfocitos T y B, células asesinas naturales y macrófagos asociados al tumor) <sup>[414]</sup>. El TME desempeña un papel indispensable en la biología tumoral, participando en la tumorigenia, la progresión del tumor y la respuesta al tratamiento. Los exosomas constituyen un componente importante del TME <sup>[415]</sup>. Actúan como moléculas de señalización eficaces entre las células cancerosas y las células circundantes que conforman el microambiente tumoral <sup>[416]</sup>. En la figura siguiente, se muestran las células clave del TME y sus principales interacciones con los

exosomas (Figura 5).



**Figure 5. Vía de transducción de señales de los exosomas en el microambiente tumoral.** Las células más importantes en el microambiente tumoral incluyen principalmente CAFs, CSCs, MSCs, TMICs, etc. Estos cuatro tipos de células utilizan exosomas para promover la EMT, la metástasis tumoral y la resistencia a fármacos a través de diversos mecanismos. CAFs: fibroblastos asociados al cáncer; CSCs: células madre cancerosas; MSCs: células madre mesenquimatosas; TMICs: células inmunitarias del microambiente tumoral.

### 5.6.1 Exosomas derivados de fibroblastos asociados al cáncer (CAFs)

Los CAFs representan un componente celular principal del microambiente tumoral (TME) en la mayoría de los cánceres sólidos <sup>[417]</sup>. Los exosomas derivados de CAFs (CDEs) son contribuyentes clave en la transformación oncogénica <sup>[418]</sup>. Los CDEs promueven el crecimiento de las células cancerosas al inhibir la fosforilación oxidativa mitocondrial, lo que incrementa la glucólisis y la carboxilación reductiva dependiente de glutamina en las células tumorales. En

pacientes con cáncer de mama, los CDEs presentan niveles más altos de miR-21, miR-378e y miR-143 en comparación con los fibroblastos normales (NFs). La transfección de estas tres miARNs en células cancerosas promueve la capacidad de células madre y la transición epitelio-mesénquima (EMT) <sup>[419]</sup>. Los CDEs no solo favorecen el crecimiento tumoral, sino que también contribuyen a la resistencia a fármacos y a la metástasis <sup>[420]</sup>. Por ejemplo, los CDEs pueden fomentar la angiogénesis tumoral y la progresión del cáncer colorrectal (CCR), así como inducir la dediferenciación de células tumorales a través de la vía Wnt, promoviendo así la quimiorresistencia en CCR <sup>[421-422]</sup>. Investigaciones han demostrado que los CAFs presentan una resistencia intrínseca a la gemcitabina (GEM), quimioterapia estándar para el adenocarcinoma ductal pancreático. La exposición de CAFs a GEM incrementa significativamente la liberación de exosomas, lo cual potencia la proliferación y supervivencia de las células epiteliales cancerosas receptoras <sup>[423]</sup>. Además, los CAFs producen exosomas con niveles elevados de TGF- $\beta$ 1 <sup>[424]</sup>, lo cual puede inducir la metástasis tumoral mediante la regulación de la expresión de lncRNAs <sup>[425]</sup>. Yu et al. informaron que el TGF- $\beta$ 1 es la citocina más abundantemente secretada por los CAFs, siendo crítica para la EMT inducida por CAFs y la metástasis en células de cáncer de mama. El medio condicionado derivado de CAFs aumentó significativamente la expresión de HOTAIR, promoviendo la EMT en células de cáncer de mama. Sin embargo, esto puede ser revertido mediante tratamiento con el inhibidor de TGF- $\beta$ 1 SB451332 o pirfenidona. Además, la eliminación de HOTAIR en el modelo animal in situ con MDA-MB-231 inhibió el crecimiento tumoral y la metástasis pulmonar inducidos por CAFs <sup>[426]</sup>. En el carcinoma hepatocelular (HCC), la sobreexpresión del lncRNA ATB promueve aún más la metástasis de células hepáticas cancerosas mediante la inducción de EMT e invasión <sup>[427]</sup>.

### 5.6.2 Exosomas y células madre cancerosas (CSCs)

Las células madre cancerosas (CSCs), también conocidas como células iniciadoras de cáncer, representan una pequeña población heterogénea de células dentro del tejido tumoral. Las CSCs poseen un potencial ilimitado de autorrenovación y diferenciación, y desempeñan un papel crucial en la iniciación tumoral, recurrencia, metástasis y resistencia terapéutica <sup>[428]</sup>. En calidad de portadores de información, los exosomas participan en la conversión entre CSCs y células no-CSC, así como en el mantenimiento de la homeostasis de las CSCs y sus mecanismos asociados. El lncRNA FMR1-AS1 presente en exosomas puede mantener el estado dinámico de interconversión de las CSCs activando la señal TLR7-NFκB <sup>[429]</sup>. Los exosomas derivados de CSCs transfieren miR-19b-3p a células de carcinoma de células renales claras, iniciando así la EMT para promover la metástasis tumoral <sup>[430]</sup>. En contraste, la p120-catenina contenida en los exosomas secretados por células de HCC (carcinoma hepatocelular) inhibe la proliferación, metástasis y expansión de las CSCs <sup>[431]</sup>. Los exosomas también son actores importantes en la resistencia farmacológica de las CSCs, implicando múltiples mecanismos, entre ellos una mayor eficiencia de reparación del ADN, capacidad antiapoptótica, progresión lenta del ciclo celular, eflujo de fármacos y expresión de enzimas detoxificantes <sup>[432]</sup>. Por ejemplo, en el cáncer pancreático (PC), los exosomas derivados de BxR-CSCs (células BxPC-3 resistentes a GEM) inducen resistencia a GEM, inhiben el arresto del ciclo celular inducido por GEM y antagonizan la apoptosis inducida por GEM. También promueven la formación de tubos y la migración celular en células BxS (células BxPC-3 sensibles a GEM) y PANC-1 <sup>[433]</sup>. En el cáncer de mama, RAB27B favorece la transferencia de exosomas desde las células del estroma hacia las células tumorales mediante la transferencia de exosomas con ARN trifosfatado en 5', activando la señal RIG-I (gen inducible por ácido retinoico) en las células diana, lo que a su vez activa los genes

IRDS (firma de resistencia al daño del ADN relacionada con interferón) y la vía NOTCH3, regulando así la expansión de células iniciadoras de tumores resistentes al tratamiento, conocidas como CSCs [434].

### **5.6.3 Exosomas y células madre mesenquimatosas (MSCs)**

Las MSCs son consideradas como una de las células madre más prometedoras en la ingeniería tisular debido a que son fácilmente accesibles y poseen características de pluripotencia para diferenciarse en adipocitos, osteoblastos, cardiomiocitos y neuronas [435]. Los exosomas derivados de MSCs en el TME contribuyen a la transformación de células no-CSCs en CSCs. Los exosomas liberados por MSCs confieren un fenotipo de célula madre colorrectal mediante la activación de la vía de señalización Wnt, incluida la formación de esferas tumorales in vitro y la tumorigenicidad in vivo, aumentando el porcentaje de CSCs y activando ERK1 / 2 (quinasas reguladas por señales extracelulares 1 / 2), promoviendo así el crecimiento y la progresión tumoral [436]. Por ejemplo, las MSCs derivadas de médula ósea liberan exosomas que contienen miR-214, el cual, mediante la silenciamiento de CaMKII, inhibe el daño por estrés oxidativo en CSCs, favoreciendo así la progresión tumoral [437]. Los exosomas provenientes de MSCs asociadas a tumores contienen niveles elevados de miR-155, que al ser absorbidos por células tumorales atípicas teratoides / rabdoides, pueden inhibir el gen supresor tumoral SMARCA4 (un gen diana directo de miR-155) y potenciar la capacidad migratoria de estos tumores [438]. Además, las MSCs humanas asociadas a gliomas son un nuevo componente estromal potencial en gliomas, capaces de impulsar la invasividad de las células madre de glioma (GSCs), y se han identificado como un nuevo objetivo terapéutico para este tipo de tumor [439]. Los exosomas derivados de MSCs humanas relacionadas con miR-1587 en gliomas promueven la proliferación y la formación clonal de GSCs mediante la regulación negativa del supresor tumoral NCOR1

(correpresor nuclear de receptores) en las GSCs <sup>[440]</sup>. Sin embargo, de manera interesante, los exosomas de MSCs también contienen miARNs antiangiogénicos, como miR-16 y miR-100, los cuales inhiben la angiogénesis al dirigirse contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en células de cáncer de mama dentro del TME <sup>[441-443]</sup>. Además, los exosomas derivados de MSCs también desempeñan un papel importante en la reparación tisular y en las respuestas inflamatorias <sup>[444]</sup>.

#### **5.6.4 Exosomas y células inmunitarias en el microambiente tumoral**

Las células inmunitarias en el microambiente tumoral incluyen principalmente células mieloides (macrófagos asociados al tumor, células dendríticas (DCs), células supresoras derivadas de mieloides, etc.) y linfocitos (células T y B) <sup>[445]</sup>. Los exosomas derivados de células tumorales son una buena fuente de componentes celulares que estimulan respuestas inmunitarias, tales como alarminas (ARNm, proteínas transmembrana, incluidos CD9, CD63 y CD81, HSPs, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I) y antígenos asociados al tumor <sup>[446]</sup>. Las propiedades de presentación antigénica y estimulación inmunitaria de los exosomas derivados de tumores (TEXs) les permiten desencadenar respuestas antitumorales y contribuir al reclutamiento y la reestructuración de los componentes del TME <sup>[447]</sup>. Por ejemplo, los TEXs derivados del carcinoma oral de células escamosas y del linfoma histiocítico pueden inducir inmunosupresión mediante la señalización del receptor CD95 (Fas) y los exosomas FasL<sup>+</sup> sobre células T CD8<sup>+</sup> activadas <sup>[448-449]</sup>. Los exosomas derivados del cáncer pancreático transforman la diferenciación de macrófagos hacia el fenotipo M2, promoviendo así la inmunosupresión y la metástasis a través de HIF-1 $\alpha$  o HIF-2 $\alpha$  <sup>[450-451]</sup>. Los exosomas derivados del cáncer de pulmón de Lewis o del cáncer de mama 4T1 impiden que las células progenitoras mieloides se diferencien en DCs CD11c<sup>+</sup> e inducen su apoptosis <sup>[452]</sup>. Bajo condiciones hipóxicas, las células



tumorales liberan exosomas con TGF- $\beta$ , lo cual también puede promover la actividad de células T reguladoras (Tregs) e inhibir la citotoxicidad de las células NK, contribuyendo a un entorno inmunosupresor <sup>[453-454]</sup>. Las células inmunitarias del TME también producen exosomas. Las células Tregs participan en la iniciación y el desarrollo tumoral al evitar la maduración de las células presentadoras de antígenos mediante la expresión de CTLA-4 o al producir citocinas inhibitoras y adenosina para contrarrestar la inmunidad antitumoral <sup>[455]</sup>. Los exosomas derivados de Tregs también están asociados con funciones inmunosupresoras <sup>[456-457]</sup>. El miARN Let-7d contenido en exosomas de células Tregs inhibe fuertemente la actividad de las células Th1 al inhibir la producción de IFN- $\gamma$  mediada por COX-2 <sup>[458]</sup>. Los macrófagos son las principales células inmunitarias reguladoras de la inflamación en el TME, incluyendo dos fenotipos amplios: M1 y M2. Los macrófagos M1 pueden eliminar virus y bacterias mediante la secreción de factores inflamatorios IL-12 e IL-23. Los macrófagos M2 pueden promover la angiogénesis, el crecimiento tumoral y la metástasis <sup>[459]</sup>. En el CCR, los exosomas secretados por macrófagos M2 expresan altamente miR-21-5p y miR-155-5p para regular la migración e invasión de células tumorales <sup>[460]</sup>.

#### **5.6.5 Los exosomas influyen en la EMT, la invasión y la migración**

Las señales de los exosomas pueden inducir la producción de CSCs en el TME a través de la EMT, creando condiciones favorables para la resistencia terapéutica <sup>[461]</sup>. La EMT es un proceso biológico en el que las células epiteliales se transforman en células con un fenotipo mesenquimal a través de un programa específico. La regulación de la EMT requiere un mecanismo transcripcional complejo, compuesto principalmente por factores de transcripción del desarrollo, que pueden dividirse en tres categorías: la familia SNAIL de factores de transcripción con dedos de zinc (SNAIL / SLUG), la familia ZEB1 / ZEB2-ZEB (zinc finger E-box binding

homeobox) y la familia TWIST1 / TWIST2 <sup>[462]</sup>. Además de los factores de transcripción, la regulación de la EMT también implica diversos inductores de ARN no codificante, incluidos los miARNs y los lncARNs <sup>[463-465]</sup>. Los TEXs individuales pueden transportar estas moléculas inductoras para promover el proceso de EMT.

Al estudiar las funciones biológicas de los exosomas provenientes de células de cáncer de pulmón altamente metastásicas y de cáncer de pulmón avanzado humano, los investigadores encontraron que estos exosomas pueden aumentar la expresión de Vimentina, promoviendo así la EMT, la invasión y la migración de las células diana <sup>[466]</sup>. El miR-106b-3p exosomal derivado de células de CCR es abundante en el suero de pacientes con CCR metastásico y se asocia con mal pronóstico. Estudios adicionales han demostrado que el miR-106b-3p exosomal puede aumentar la metástasis pulmonar de células de CCR al dirigirse al gen DLC-1 (deleted in liver cancer-1), mediante la regulación positiva de Vimentina y N-cadherina, y la regulación negativa de E-cadherina <sup>[467]</sup>. En el carcinoma ductal pancreático (PDAC), se identificó el lncRNA-Sox2ot en células PDAC altamente invasivas, y la expresión de Sox2ot exosomal en plasma se relaciona estrechamente con el estadio TNM y la supervivencia global de los pacientes. El Sox2ot exosomal, como un ARN competitivo endógeno (ceRNA), puede unirse competitivamente a la familia de miR-200 para regular la expresión de SOX2, promoviendo así la EMT y características tipo célula madre, e impulsando la invasión y metástasis del PDAC <sup>[468]</sup>. Se ha informado que los exosomas derivados de células PDAC, circ-PDE8A, como ceRNA de miR-338, regulan MACC1 y estimulan el crecimiento invasivo mediante la vía MACC / MET / ERK o AKT. Además, la expresión de circ-PDE8A exosomal en el plasma de pacientes con PDAC se relaciona con la progresión y el pronóstico, lo que sugiere que puede desempeñar un papel importante en la invasión tumoral y podría ser un marcador potencial para el diagnóstico o

la progresión del PDAC [469].

Los TEXs pueden transportar proteínas como TGF- $\beta$ , caveolina-1, HIF1 $\alpha$  y  $\beta$ -catenina, que mejoran la capacidad de invasión y migración de las células diana y contribuyen a la remodelación de la matriz y la formación del nicho tumoral [470]. Los exosomas derivados de células tumorales pueden inducir la diferenciación de MSCs derivadas de cordón umbilical humano en CAFs mediante la transferencia de TGF- $\beta$  y la activación de la vía de señalización TGF- $\beta$  / Smad, lo que contribuye a la formación del nicho tumoral [471-472]. Se ha demostrado que la presencia de caveolina-1 en exosomas derivados de cáncer de próstata induce eficazmente el fenotipo CSC y el proceso de EMT a través de la señalización NF- $\kappa$ B [473]. Los exosomas con alta expresión de caveolina-1 pueden promover la migración e invasión de células tumorales que carecen de caveolina-1 [474]. Aga et al. detectaron HIF1 $\alpha$  endógeno en exosomas derivados de carcinoma nasofaríngeo y descubrieron que el tratamiento con exosomas del oncoproteína principal del VEB, LMP1 (latent membrane protein 1) [475]. Además, los exosomas liberados por células de CHC contienen  $\beta$ -catenina, y el supresor tumoral clásico Vps4A puede inhibir la liberación exosomal de  $\beta$ -catenina al suprimir la señal de  $\beta$ -catenina, inhibiendo así la EMT y la motilidad celular en el CHC [476]. Las células de CCR que secretan exosomas pueden transferir proteínas  $\beta$ -catenina mutadas a células receptoras, activando la señalización Wnt y aumentando la carga tumoral en modelos murinos de xenoinjerto [477].

Las vías de señalización TGF- $\beta$  y WNT /  $\beta$ -catenina son reguladores clave de la EMT [478-480]. Los exosomas derivados de células de CHC pueden mediar la EMT mediante la activación de la vía TGF- $\beta$  / Smad, induciendo una disminución de la expresión de E-cadherina y un aumento de Vimentina, promoviendo así la migración e invasión de células diana [481]. La vía TGF- $\beta$ 1 / Smads es un mecanismo importante mediante el cual las MSCs derivadas de médula

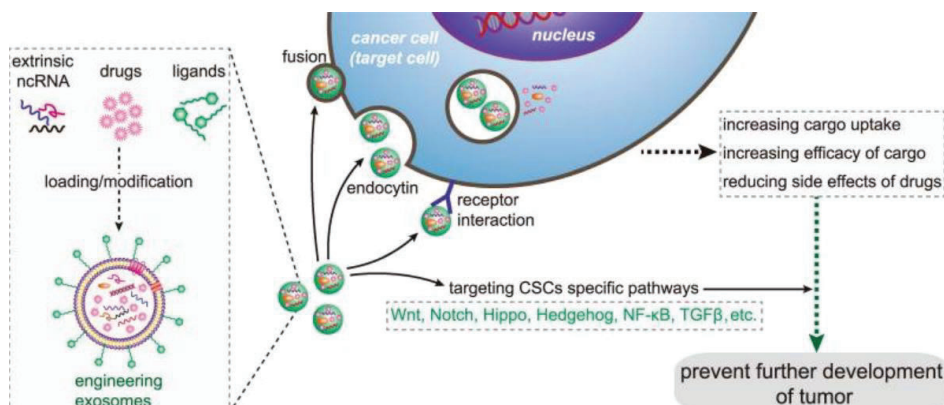
ósea inducen la EMT en células cancerosas <sup>[482]</sup>. La vía de señalización WNT /  $\beta$ -catenina y la actividad de WNT se asocian con la clasificación del cáncer de ovario, la EMT, la quimiorresistencia y el mal pronóstico. Además, la subfamilia de proteínas ERK contribuye en gran medida a la EMT y se encuentra sobreexpresada y sobreactivada en diversos tipos de cáncer <sup>[483]</sup>. Las células estrelladas pancreáticas se activan con frecuencia en el adenocarcinoma ductal pancreático, y los exosomas derivados de estas células aumentan la expresión de ERK1 / 2 (quinasas reguladas por señales extracelulares 1 / 2) en células PDAC, promoviendo así la migración celular, la EMT y aumentando la actividad de metaloproteinasas de matriz-2 / 9 <sup>[484]</sup>. Los exosomas derivados de células de CHC altamente metastásicas MHCC97H pueden comunicarse con células de CHC de baja metastatización, aumentando posteriormente su migración, invasión, quimiotaxis y EMT mediante la señalización ERK <sup>[485]</sup>.

Resulta muy interesante que la hipoxia sea un factor clave en la regulación de la EMT mediada por exosomas. Los exosomas derivados de MSCs de médula ósea en condiciones hipóxicas median la transferencia de miARNs (incluidos miR-193a-3p, miR-210-3p y miR-5100) desde MSCs hacia células de cáncer de pulmón, aumentando la expresión total y fosforilada de STAT3, lo que induce la EMT mediante la activación de la vía de señalización STAT3 <sup>[486]</sup>. Esto promueve la invasión de las células de cáncer de pulmón. Los exosomas derivados de CCR inducidos por hipoxia (que contienen miR-23a) pueden provocar la regulación negativa de PDH1 / 2 al aplicarse a células CCR, lo que finalmente regula positivamente HIF-1 $\alpha$ , activando de manera independiente la EMT <sup>[487]</sup>.

## 5.7 Estrategias de Supresión Tumoral Basadas en Exosomas

### 5.7.1 Exosomas como Transportadores de Fármacos para la Inhibición Dirigida de Células Tumorales

Para mejorar la eficacia del tratamiento del cáncer, la administración precisa de fármacos a las células tumorales es crucial. Clínicamente, los sistemas de administración de fármacos basados en nanotecnología representan una de las herramientas más prometedoras para lograr este objetivo. Los exosomas, aprovechando su capacidad intrínseca de entrega, se han empleado con éxito como vehículos de transporte de fármacos y ARN funcionales en el tratamiento del cáncer <sup>[488]</sup>. Los exosomas pueden ser internalizados por las células y transferir de forma estable fármacos, como microARN terapéuticos y proteínas (Figura 6) <sup>[489]</sup>.



**Figura 6. Dirigir con precisión el tumor utilizando exosomas diseñados como vehículos de administración.** Los exosomas son vehículos con capacidad natural de entrega, que poseen características de direccionamiento preciso y alta biodisponibilidad. Una vez cargados en los exosomas, los fármacos antitumorales y / o ARNnc exógenos pueden dirigirse directamente a las vías específicas de las células cancerosas o de las CSCs, y prevenir el desarrollo posterior de los tumores. Además, las superficies de los exosomas también pueden modificarse con ligandos correspondientes a receptores sobreexpresados en la superficie de las células cancerosas, lo que

*mejora la eficiencia de captación celular de los exosomas por parte de las células tumorales.*

*ARNnc: ARN no codificante; CSCs: células madre cancerosas.*

En comparación con los nanomateriales liposomales, metálicos y poliméricos, los exosomas, como vehículos de administración de fármacos, pueden superar las limitaciones de la baja biodisponibilidad, reduciendo la citotoxicidad fuera del objetivo y la inmunogenicidad [490-491]. Los exosomas contienen proteínas transmembrana y ancladas a membrana que mejoran la endocitosis, facilitando así la transferencia de sus contenidos [492]. Por ejemplo, Kim et al. descubrieron que los exosomas derivados de macrófagos cargados con paclitaxel aumentaban significativamente la captación celular en la línea celular de cáncer de pulmón de Lewis de ratón 3LL-M227 en comparación con los liposomas cargados con paclitaxel [493-494]. La administración quimioterapéutica mediada por exosomas puede potenciar los efectos del fármaco en comparación con los fármacos libres en modelos animales de tumores. Por ejemplo, el fármaco quimioterapéutico antimitótico paclitaxel puede cargarse en exosomas mediante sonicación. Estos exosomas cargados mostraron una citotoxicidad 50 veces mayor contra células cancerosas resistentes al fármaco in vitro en comparación con el paclitaxel libre [494]. Además, las plataformas de administración basadas en exosomas pueden reducir significativamente los efectos secundarios en comparación con los fármacos libres. Los estudios han demostrado que los exosomas recubiertos con diferentes fármacos quimioterapéuticos, cuando se transportan a tejidos tumorales en ratones, pueden inhibir el crecimiento tumoral sin los efectos secundarios equivalentes observados con los fármacos libres [495]. El uso de exosomas modificados que contienen construcciones esponja de miR-21 tiene el potencial de reducir la expresión de miR-21 en las líneas celulares de glioma U87-MG y C6, aumentando así la expresión de los genes diana de miR-21, PDCD4 y RECK, previniendo su comportamiento maligno [496]. Estudios recientes

han demostrado que la modificación de la superficie de los exosomas se realiza utilizando métodos de conjugación de oligonucleótidos. Esta carga puede no solo alterar la función celular, sino también el transporte intercelular <sup>[497]</sup>. El cáncer de mama triple negativo es un subtipo caracterizado por la metástasis y recurrencia más agresivas. Li et al. modificaron la superficie de los exosomas con un péptido dirigido al gen del factor de transición mesénquima-epitelial (c-Met), un receptor tirosina quinasa para el factor de crecimiento hepatocitario o scatter factor, que se sobreexpresa en la superficie de las células de cáncer de mama triple negativo <sup>[498-499]</sup>.

Los exosomas también pueden afectar a las células madre del cáncer (CSCs) al dirigirse a vías de señalización específicas de CSCs, como las vías Wnt, Notch, Hippo, Hedgehog, NF- $\kappa$ B y TGF- $\beta$ . Estas vías son cruciales para mantener una serie de funciones biológicas de las CSCs, incluyendo la autorrenovación, diferenciación y tumorigenicidad <sup>[500]</sup>. Se considera factible el uso de exosomas cargados con inhibidores (miARN o siARN) para dirigirse selectivamente a las CSCs a través de las vías mencionadas. Las células del subpoblado lateral de linfoma regulan el equilibrio de las poblaciones de células tumorales exportando el agonista de la vía Wnt, Wnt3a, a células vecinas a través de exosomas.

### **5.7.2 Vacunas antitumorales utilizando el sistema exocrino**

Los exosomas derivados de tumores (TEX) presentan un doble impacto sobre el sistema inmunológico, abarcando tanto efectos inmunosupresores como inmunoestimuladores. Numerosos estudios indican que los TEX pueden interferir con la maduración de las células dendríticas (DCs), disminuir la activación de las células asesinas naturales (NK), inducir células supresoras derivadas de mieloides y transformar los macrófagos hacia un fenotipo protumoral <sup>[501-503]</sup>. Las células T efectoras CD8<sup>+</sup> activadas en la circulación de pacientes con cáncer sufren apoptosis inducida por TEX, lo que representa uno de los muchos mecanismos

inmunosupresores de los TEX, suprimiendo así el sistema inmunológico sistémico de los pacientes <sup>[504]</sup>. En un modelo murino de melanoma, el tratamiento con exosomas cargados con  $\alpha$ -galactosilceramida / ovoalbúmina indujo respuestas tempranas de células T y finalmente ralentizó el crecimiento tumoral en comparación con el grupo control. Los exosomas producidos por carcinoma hepatocelular (HCC) in vitro, ricos en alfa-fetoproteína, pueden estimular la función presentadora de antígenos de las DCs, promover la proliferación de células T CD8+, modular la secreción de citocinas inflamatorias (reduciendo la secreción de IL-10 y TGF- $\beta$  mientras se aumenta la de IFN- $\gamma$  e IL-2) y potenciar la apoptosis inducida por la inmunidad <sup>[505-507]</sup>. Según Xie et al., las vacunas desarrolladas a partir de exosomas son eficaces en la inmunidad antitumoral. En su estudio, se utilizaron exosomas de células de mieloma múltiple (MM) para estimular respuestas inmunes antitumorales y generar inmunidad profiláctica en líneas celulares de MM <sup>[508-509]</sup>. La recuperación y el enriquecimiento de TEX a partir del suero de pacientes probablemente proporcionen una fuente optimizada de antígenos específicos individuales para la vacunación con DCs <sup>[510]</sup>. Se necesita más investigación para aprovechar completamente las ventajas de los TEX, eludir sus desventajas y regular la inmunidad tumoral, lo cual presenta un gran potencial en la aplicación de terapias dirigidas contra el cáncer <sup>[511]</sup>.

## **6. Significado del tema de investigación**

Este proyecto de investigación se centrará en el papel de PTCSC3 en la resistencia a fármacos en el adenocarcinoma pulmonar (LUAD), particularmente su relación con la resistencia a erlotinib en LUAD. PTCSC3, como un ARN largo no codificante (lncRNA) con potencial función supresora tumoral, ha demostrado inhibir la proliferación e invasión celular en varios tipos de cáncer. Sin embargo, su papel específico en LUAD y su relación con la resistencia a erlotinib aún no están claros. Por lo tanto, este estudio tiene como objetivo explorar la



importancia de PTCSC3 en la resistencia a fármacos en LUAD a través de los siguientes aspectos: (1) Revelar el patrón de expresión de PTCSC3 en LUAD: comparar los niveles de expresión de PTCSC3 en tejidos de LUAD y tejidos pulmonares normales para aclarar su patrón de expresión en LUAD; (2) Investigar el efecto de PTCSC3 sobre la resistencia a fármacos en células de LUAD: mediante la construcción de líneas celulares de LUAD resistentes a erlotinib que sobreexpresen PTCSC3, en combinación con el tratamiento con erlotinib, observar los efectos de PTCSC3 sobre la proliferación, invasión y migración de las células de LUAD, así como sus cambios en la sensibilidad al erlotinib; (3) Elucidar más a fondo los mecanismos moleculares mediante los cuales PTCSC3 afecta la resistencia a fármacos en LUAD: revelar las vías de señalización y moléculas clave reguladas por PTCSC3, y esclarecer sus mecanismos moleculares que influyen en la resistencia a fármacos en LUAD.

La importancia de este estudio radica en proporcionar: (1) Nuevas perspectivas sobre los mecanismos de resistencia a fármacos en LUAD: al revelar el papel de PTCSC3 en dicha resistencia, se ofrecen nuevas ideas para comprender en profundidad la base molecular de la resistencia a fármacos en LUAD; (2) Nuevos objetivos para el tratamiento de LUAD: PTCSC3, como un lncRNA supresor tumoral potencial, cuya expresión anormal puede estar estrechamente relacionada con la aparición y resistencia a fármacos en LUAD. Por lo tanto, PTCSC3 puede convertirse en un nuevo objetivo terapéutico, proporcionando una base teórica para el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales; (3) Promover la aplicación en profundidad de los lncRNAs en la investigación del cáncer: este estudio fomentará aún más la aplicación de lncRNAs en el campo de la investigación oncológica, especialmente en la investigación de la resistencia a fármacos, ofreciendo nuevas estrategias y métodos para el tratamiento preciso e individualizado del cáncer.

En resumen, este proyecto de investigación tiene como objetivo ofrecer nuevas ideas y estrategias para el tratamiento de LUAD mediante la exploración profunda del papel del lncRNA PTCSC3 en la resistencia a erlotinib, con el fin de contribuir a mejorar la tasa de supervivencia y la calidad de vida de los pacientes con LUAD.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### 1. Hipótesis de trabajo

Este estudio se basa en la hipótesis de que los exosomas derivados de células madre mesenquimales de médula ósea humana (hBMSCs), enriquecidos con el ARN largo no codificante PTCSC3, pueden revertir la resistencia adquirida al fármaco erlotinib en células de adenocarcinoma pulmonar (LUAD) mediante la modulación de la vía de señalización Wnt /  $\beta$ -catenina. Se propone que esta estrategia de transferencia basada en exosomas con lncRNA podría restaurar la sensibilidad al tratamiento, inhibir la proliferación tumoral y abrir nuevas vías terapéuticas para pacientes con LUAD resistentes a los inhibidores de tirosina quinasa.

### 2. Objetivo general

Evaluar el potencial terapéutico de los exosomas derivados de células madre mesenquimales de médula ósea humana (hBMSCs), cargados con PTCSC3, en la reversión de la resistencia a erlotinib en modelos celulares de adenocarcinoma pulmonar (LUAD).

### 3. Objetivos específicos

3.1 Caracterizar los exosomas derivados de hBMSCs y confirmar la presencia de PTCSC3 en su contenido molecular.

3.2 Analizar el efecto funcional de estos exosomas sobre la viabilidad celular, la proliferación y la apoptosis en células de LUAD resistentes a erlotinib.

3.3 Estudiar la modulación de la vía de señalización Wnt /  $\beta$ -catenina en las células tratadas, evaluando la expresión de  $\beta$ -catenina y de sus principales dianas transcripcionales (como c-Myc y ciclina D1).

3.4 Determinar si la restauración de la sensibilidad a erlotinib mediada por PTCSC3 se debe a la

inhibición de esta vía de señalización.

3.5 Establecer una base experimental para futuras validaciones in vivo y para el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en exosomas dirigidas al LUAD.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. Materiales experimentales

### 1.1 Muestras clínicas

Entre junio de 2021 y junio de 2024, se aislaron tejidos tumorales pulmonares y tejidos adyacentes normales de 8 pacientes con cáncer de pulmón no microcítico resistente a erlotinib en el Hospital del Centro Médico Internacional de Xi'an. Todos los pacientes firmaron formularios de consentimiento informado, y el estudio fue aprobado por el Comité de Ética Médica Institucional del Hospital del Centro Médico Internacional de Xi'an (Número de aprobación ética: GJYX-KY-2021-012).

### 1.2 Líneas celulares

Las líneas celulares de cáncer de pulmón humano PC9 y A549 (células epiteliales de adenocarcinoma pulmonar, LUAD) fueron adquiridas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC).

### 1.3 Materiales e instrumentos principales

| Materiales                                       | Instrumentos                          |
|--------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Centrífuga refrigerada de alta velocidad         | Hunan Kedida, GL21M                   |
| Agitador de temperatura constante                | Dongguan Gaosheng Electronics, CHA-S9 |
| Refrigerador                                     | Qingdao Samsung, BCD-268WBCS          |
| Lector de microplacas                            | BioTek, Synergy H1                    |
| Incubadora de cultivo celular de CO <sub>2</sub> | Thermo, HERAcell 150i                 |

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

|                                                |                                      |
|------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Estación de trabajo de purificación            | Guangzhou Lumei, Ultra-clean bench   |
| Microscopio óptico binocular BH-2              | Suzhou Maige Instrument, DVM1000     |
| Baño María a temperatura constante             | Dongguan Tiemuzhen, TMJ-9715         |
| Agitador vórtex                                | Jinan Boken, VORTEX-1K               |
| Minicentrífuga                                 | Qingdao Lubo, LB series              |
| Pipetas (varios modelos)                       | Thermo fisher                        |
| Balanza electrónica                            | Tianjin Tianma, TD2002C              |
| Microscopio biológico vertical                 | Olympus, CX43                        |
| Citómetro de flujo                             | BD FACSCanto II                      |
| Microscopio invertido                          | Nikon Eclipse Ti2                    |
| Micropipetas (10 $\mu$ L–1mL)                  | Thermo fisher                        |
| Instrumento de PCR cuantitativa en tiempo real | Applied Biosystems 7500              |
| Contador de células                            | Countstar IC1000                     |
| Reactivos y consumibles clave                  |                                      |
| Medio de cultivo DMEM                          | Thermo fisher                        |
| Suero fetal bovino                             | beckman coulter life science         |
| Matraces de cultivo celular                    | Corning Inc                          |
| Penicilina sódica                              | shanghai Sangon, A430123-0500        |
| Estreptomicina                                 | shanghai Sangon, B540734-0010        |
| Tripsina                                       | Thermo fisher                        |
| Pipeta sin ARN                                 | Axygen                               |
| Tubo EP sin ARN                                | Axygen                               |
| Kit de reactivos CCK-8                         | Dojindo Molecular Technologies, Cat# |

---



---

|                                                                                           |                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
|                                                                                           | CK04                                      |
| Medio de cultivo DMEM con alto contenido de glucosa                                       | Gibco, Cat# 11965092                      |
| Suero fetal bovino                                                                        | FBS, BI, Cat# 04-001-1ACS                 |
| Anexina V-FITC                                                                            | BD Biosciences                            |
| Yoduro de propidio (PI)                                                                   | Sigma-Aldrich                             |
| Tampón de unión a anexina V                                                               | BD Biosciences                            |
| Tubos de citometría de flujo (tubos de poliestireno de 5mL)                               | BD Biosciences                            |
| Tampón PBS (sin $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$ )                                     | Gibco                                     |
| Reactivo de transfección de liposomas (Lipofectamina 3000)                                | Invitrogen                                |
| Kit de extracción de ARN                                                                  | Invitrogen                                |
| Kit de transcripción inversa (PrimeScript RT Master Mix)                                  | Takara                                    |
| Cámaras Transwell                                                                         | Corning                                   |
| Placas de 6 pocillos, placas de 12 pocillos, placas de 24 pocillos, placas de 96 pocillos | Corning                                   |
| Tubos de centrifuga estériles de 1,5mL                                                    | Axygen                                    |
| Reactivo de qPCR (SYBR Green)                                                             | Roche                                     |
| Solución de tinción de violeta cristal                                                    | Merck Sigma-Aldrich                       |
| Fijador de paraformaldehído                                                               | Merck Sigma-Aldrich                       |
| Kit de reactivo cromogénico DAB                                                           | Shanghai Beyotime Biotechnology Co., Ltd. |

---

|                                                  |                                           |
|--------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Imitación de PTCSC3                              | Suzhou GenePharma Co., Ltd.               |
| PTCSC3 NC                                        | Suzhou GenePharma Co., Ltd.               |
| Cebadores directos e inversos de $\beta$ -actina | Shanghai Sangon Biotech Co., Ltd.         |
| $\beta$ -catenina (anticuerpo de Western blot)   | Shanghai Beyotime Biotechnology Co., Ltd. |
| c-myc (anticuerpo de Western blot)               | Shanghai Beyotime Biotechnology Co., Ltd. |
| ciclina D1 (anticuerpo de Western blot)          | Shanghai Beyotime Biotechnology Co., Ltd. |
| GAPDH (anticuerpo de Western blot)               | Shanghai Beyotime Biotechnology Co., Ltd. |
| Agar blando                                      | Sigma-Aldrich                             |
| Medicamento (erlotinib)                          | Shanghai Sangon, A430670                  |

---

## 2. Métodos Experimentales

### 2.1 Cultivo Celular

#### (1) Preparación del medio DMEM y solución PBS

Preparación del medio DMEM: Mezclar 90% de medio DMEM, 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 U / mL de penicilina y 100 $\mu$ g / mL de estreptomicina. Conservar a -4°C para su uso posterior.

Preparación de la solución tampón fosfato (PBS): Disolver 8.1816 g de NaCl, 0.2013 g de KCl, 3.5172 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0.25 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 500mL de agua desionizada. Ajustar el pH a 7.2 con 1mL de NaOH y completar el volumen hasta 1000mL con agua desionizada.

#### (2) Reanimación, cultivo, pasaje y criopreservación celular

① Reanimación celular: Extraer las células del nitrógeno líquido y descongelarlas rápidamente en un baño de agua a 37°C agitando suavemente durante aproximadamente 1 minuto. Centrifugar a 1000 rpm durante 10 minutos para recoger las células. Aspirar el

sobrenadante en una cabina de bioseguridad con una pipeta estéril, y resuspender el pellet celular en medio de cultivo. Transferir la suspensión celular a un matraz de cultivo e incubar durante 2 días.

② Cultivo celular: Cultivar las células A549 y PC9 reanimadas en medio DMEM en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

③ Pasaje celular: Cuando las células reanimadas alcancen una densidad del 85% de confluencia aproximadamente, realizar el pasaje. Aspirar cuidadosamente el medio original con una pipeta. Añadir 1.5-2mL de tripsina al 0.25% para desprender las células. Pipetear suavemente para obtener una suspensión celular. Transferir las células a nuevos matraces de cultivo a una proporción de 1:4 y continuar el cultivo. Lavar las células 1-3 veces con PBS 1×, y añadir medio completo fresco para continuar el cultivo.

④ Criopreservación celular: Digestionar las células como se describió anteriormente para obtener una suspensión celular. Recoger las células en un tubo de centrifuga y centrifugar a 1000 rpm durante 10 minutos. Desechar el sobrenadante. Añadir una solución criopreservante compuesta por 10% de DMSO, 30% de FBS y 60% de DMEM al pellet celular, y resuspender suavemente. Distribuir la suspensión en criotubos de 1mL, sellar y etiquetar con el tipo celular y la fecha. Criopreservar siguiendo una reducción de temperatura escalonada: -4°C (30 minutos), -20°C (30 minutos), -80°C (24 horas), y finalmente conservar en nitrógeno líquido para almacenamiento a largo plazo.

## **2.2 Establecimiento de líneas celulares de LUAD resistentes a erlotinib**

Cultivar las células A549 y PC9 en fase de crecimiento logarítmico en medio DMEM que contenga 0.001µmol / mL de erlotinib durante 14 días. Después de la digestión, realizar el pasaje

de las células A549 y cultivarlas en medio DMEM con  $0.01\mu\text{mol} / \text{mL}$  de erlotinib. Continuar con el pasaje y cultivo durante 14 días, luego cambiar a medio DMEM con  $0.1\mu\text{mol} / \text{mL}$  de erlotinib y cultivar durante 14 días. Posteriormente, cultivar en medio DMEM con  $1\mu\text{mol} / \text{mL}$  de erlotinib durante 14 días, seguido por  $10\mu\text{mol} / \text{mL}$  de erlotinib durante otros 14 días. Siguiendo este método, aumentar gradualmente la concentración de erlotinib a  $100\mu\text{mol} / \text{mL}$  y  $64\mu\text{mol} / \text{mL}$ , cultivando durante 14 días en cada concentración. Finalmente, mantener la resistencia al erlotinib de las células A549 con  $100\mu\text{mol} / \text{mL}$  de erlotinib. Este proceso genera líneas celulares de cáncer de pulmón no microcítico resistentes a erlotinib, designadas como A549-Er y PC9-Er. Utilizar el ensayo CCK-8 para determinar la tasa de inhibición de las células A549 y PC9 tratadas con diferentes concentraciones de erlotinib y calcular los valores de  $\text{IC}_{50}$  de erlotinib para las células A549 y PC9 (ver Método 2.1).

### ***2.3 Ensayo de Viabilidad Celular***

(1) Preparación celular: Recoger las células de cada grupo en fase de crecimiento logarítmico (como se describe en el apartado 2.2). Digestionar las células con tripsina al 0.25% para preparar una suspensión unicelular. Ajustar la densidad celular a  $5 \times 10^4$  células / mL utilizando un hemocitómetro.

(2) Siembra celular: Sembrar las células en fase logarítmica en placas de 96 pocillos, añadiendo  $100\mu\text{L}$  de la suspensión celular (aproximadamente  $5 \times 10^3$  células / pocillo) en cada uno. Añadir PBS estéril a los pocillos de borde para minimizar los efectos de evaporación.

(3) Tratamiento con fármacos: Establecer grupos experimentales con concentraciones graduales del fármaco ( $n=5$  réplicas). Incluir un grupo control blanco (solo medio de cultivo) y un grupo control negativo (células sin tratar).

(4) Incubación: Después de 12 horas de adhesión celular, aspirar el medio original.

Añadir medio fresco con diferentes concentraciones del fármaco a los grupos experimentales, y el mismo volumen de medio completo a los grupos control. Incubar las placas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24, 48 y 72 horas.

(5) Ensayo CCK-8: Dos horas antes del final del periodo de incubación, añadir 10µL de reactivo CCK-8 (concentración final 10%) a cada pocillo, protegiendo de la luz. Agitar suavemente las placas para mezclar y continuar la incubación.

(6) Medición de OD: Medir la densidad óptica (OD) a 450nm (longitud de referencia 650nm) utilizando un lector de microplacas. Antes de la medición, eliminar las burbujas con hisopos estériles.

(7) Análisis de datos: Calcular la tasa de proliferación celular y la tasa de inhibición utilizando las siguientes fórmulas:

Viabilidad Celular (%) =  $[(\text{OD grupo experimental} - \text{OD grupo blanco}) / (\text{OD grupo control} - \text{OD grupo blanco})] \times 100\%$

Tasa de Inhibición (%) =  $[(\text{OD grupo control} - \text{OD grupo experimental}) / (\text{OD grupo control} - \text{OD grupo blanco})] \times 100\%$

#### ***2.4 Experimento de PCR cuantitativa en tiempo real***

(1) Extracción de ARN de las células: método TRIZOL

① Mezclar el reactivo TRIZOL con las células y agitar suavemente con una punta de pipeta estéril para homogeneizar. 1mL de TRIZOL puede disolver  $5 \times 10^6$  células. Para evitar la degradación del ARNm, no lavar las células antes de añadir TRIZOL. Para células cultivadas en monocapa, añadir 1mL de TRIZOL por cada placa de cultivo de 10 cm<sup>2</sup>.

② Incubar la mezcla a 20 °C durante 15 minutos para lisar completamente las células.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

Luego añadir cloroformo en la proporción de 0.2mL de cloroformo por cada 1mL de TRIZOL. Agitar suavemente durante 20 segundos y continuar la incubación durante 15 minutos.

③ Transferir la fase acuosa superior a un nuevo tubo EP libre de RNasa utilizando una pipeta, y añadir isopropanol en la siguiente proporción: 0.5mL de isopropanol por cada 1mL de TRIZOL. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos, luego centrifugar durante 10 minutos a 12000 rpm, 4 °C. El ARN precipitado se observará en la pared o en el fondo del tubo.

④ Tras eliminar el sobrenadante, lavar con etanol al 75%. La proporción de etanol es de 1mL de etanol al 75% por cada 1mL de TRIZOL, mezclar bien. Centrifugar durante 5 minutos a 7500 rpm, 4 °C.

⑤ Eliminar el exceso de etanol, secar al aire el ARN, pero sin secarlo completamente para evitar su degradación. Disolver el ARN en un volumen adecuado de agua libre de RNasa.

⑥ Almacenar el ARN a -80 °C hasta su uso.

### (2) Detección de calidad del ARN

① Medir la concentración de ARN y los valores de OD230, OD260 y OD280 de las muestras.

② Evaluar si las muestras de ARN extraídas están contaminadas con iones salinos, proteínas, disolventes orgánicos, etc., a través de las proporciones OD260 / OD230 y OD260 / OD280.

### (3) Síntesis de la primera cadena de cDNA a partir de ARNm

① Mezclar los siguientes componentes en un tubo de centrífuga de 1mL libre de RNasa

| REACTIVO  | VOLUMEN |
|-----------|---------|
| ARN total | 2.0µg   |

|                                         |                       |
|-----------------------------------------|-----------------------|
| cebador anclado oligo (dT) (500µg / µl) | 1.0µl                 |
| Mezcla de dNTP (10mM de cada uno)       | 1.0µl                 |
| Agua DEPC estéril                       | Para un total de 12µl |

② Después de mezclar completamente, incubar la solución de reacción en un baño María a temperatura constante de 60 °C durante 10 minutos. A continuación, colocar inmediatamente en hielo durante 3 minutos para enfriar.

③ Añadir los siguientes componentes en orden:

| REACTIVO                       | VOLUMEN |
|--------------------------------|---------|
| Tampón de primera cadena (5X)  | 4.0 µl  |
| DTT (0.1 M)                    | 2.0 µl  |
| Inhibitor de RNase (40 U / µl) | 1.0 µl  |

④ Después de mezclar completamente, incubar la mezcla en un baño de agua a temperatura constante de 37 °C durante 10 minutos. Posteriormente, añadir 10 µl de transcriptasa inversa.

Después de mezclar de forma uniforme, colocar la solución en un baño de agua a temperatura constante de 37 °C durante 1 hora.

⑤ Finalizar la reacción incubando en un baño de agua a 75 °C durante 5 minutos, y luego almacenar la muestra a -20 °C para su uso futuro.

#### (4) Síntesis de cDNA

Utilizar transcriptasa reversa para sintetizar la primera cadena de cDNA.

① Combinar los siguientes componentes en un tubo centrífugo de 0,5mL libre de RNasas:

## MATERIALES Y MÉTODOS

| REACTIVO                          | VOLUMEN        |
|-----------------------------------|----------------|
| ARN de molécula pequeña           | 20ng           |
|                                   | 1.0 µl         |
| Mezcla de dNTP (10mM de cada uno) | 1.0 µl         |
| RT de miARN / RT de LncARN        | 1.0 µl         |
| RT de GAPDH snARN (2µm / L)       | To total 12 µl |

② Después de mezclar completamente, incubar la mezcla de reacción en un baño de agua a 70 °C durante 3 minutos.

③ Colocar inmediatamente la mezcla sobre hielo durante 5 minutos, seguido de una centrifugación a temperatura ambiente para concentrar el líquido.

④ Añadir secuencialmente los siguientes componentes: 4,0µl de tampón de primera cadena (5X), 2,0µl de DTT (0,1 M) y 1,0µl de inhibidor de RNasa (40 U / µl).

⑤ Después de mezclar bien la solución, centrifugar el líquido enriquecido e incubarlo en un baño de agua a 37 °C durante 10 minutos; luego, añadir 20 µl de transcriptasa reversa.

⑥ Mezclar bien e incubar en un baño de agua a 37 °C durante 1 hora.

⑦ Posteriormente, colocar la mezcla en un baño de agua a 70 °C durante 10 minutos para terminar la reacción. Finalmente, almacenar la muestra a -20 °C para su uso futuro.

(5) PCR en tiempo real de ARNm

Se utilizó GAPDH como referencia interna. Cada muestra incluyó tres réplicas, y el sistema de reacción fue el siguiente:

| SISTEMA DE REACCIÓN | VOLUMEN |
|---------------------|---------|
| SYBRmix (2×)        | 10 µl   |



|                              |       |
|------------------------------|-------|
| ddH <sub>2</sub> O           | 1 µl  |
| Cebador 1 a 4µM              | 1 µl  |
| cDNA                         | 7 µl  |
| Cebador 7 a 4µM              | 1 µl  |
| Volumen total de la reacción | 20 µl |

1) Asegúrese de mezclar completamente para obtener una solución homogénea.

2) Utilice el software CFX, seleccione el tipo de muestra adecuado y defina el protocolo de ciclaje térmico de la siguiente manera: Etapa 1: 94°C durante 30 segundos; Etapa 2: 94°C durante 10 segundos, 60°C durante 30 segundos, repitiendo durante 40 ciclos. Guarde el protocolo.

3) Adquiera los valores de fluorescencia de los productos de PCR inmediatamente después de iniciar la ejecución del instrumento.

4) Establezca un umbral y proceda con el análisis de los niveles relativos de expresión de ARNm.

(6) PCR en tiempo real para LncRNA

Se emplea GAPDH como control endógeno, y cada muestra se analiza por triplicado. El volumen total de la reacción es de 20µL, y la composición de la mezcla de reacción es la siguiente:

| SISTEMA DE REACCIÓN    | VOLUMEN |
|------------------------|---------|
| SYBRmix (2×)           | 10 µl   |
| cDNA                   | 1 µl    |
| Cebador reverso a 7µM  | 1 µl    |
| Cebador reverso a 15µM | 1 µl    |

## MATERIALES Y MÉTODOS

|                              |       |
|------------------------------|-------|
| ddH <sub>2</sub> O           | 7 µl  |
| Volumen total de la reacción | 20 µl |

Asegúrese de lograr una homogenización completa del líquido.

Utilice el software CFR, siguiendo el mismo procedimiento que para el ARNm. Las secuencias de los cebadores de detallan a continuación:

|            | F (3'-5')                             | R (3'-5')                             |
|------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| PTCSC3     | GTACGGTACCCTCCTTCAGACTT<br>CTCAGTACTC | CGACTCGAGATTGCTACTGTGAGCA<br>TAACCTAC |
| GAPDH*     | CTCAGACACCATGGGGAGGTGA                | ATGATCTTGAGGCTGTTGTCATA               |
| β-Catenina | TGACGGTCAGTACGCCATGA                  | GGCATCAAACCTGCGTGGAT                  |
| c-myc      | AGGACACACAACGTCTTGGA                  | GGGCCTTTTCGTTGTTTCC                   |
| ciclina D1 | TGCGTGCAGAGGGAGATTG                   | AGCGGGAAGACCTCCTCTTC                  |
| GAPDH#     | AGGGCTGCCTTCTCTTGGA                   | AACTTGCCGTGGGTAGAGTCA                 |

Nota: GAPDH\* es el control endógeno de PTCSC3, mientras que GAPDH# se utiliza como control endógeno de β-Catenin, c-myc, y ciclina D1.

### 2.5 Construcción del Vector

#### (1) Construcción del vector de sobreexpresión (PTCSC3-pcDNA3.1)

Se construyó un plásmido de sobreexpresión que contiene la secuencia completa de cDNA del LncRNA humano PTCSC3 para estudios funcionales posteriores. Se optimizaron la selección del vector, las estrategias de clonación y los métodos de validación para garantizar una alta eficiencia de expresión y estabilidad del plásmido.

#### (2) Obtención de la secuencia objetivo y diseño de cebadores

## ① Fuente de la secuencia

La secuencia completa de PTCSC3 se obtuvo de la base de datos NCBI, seleccionando el transcrito validado (NR\_024031.1) para asegurar la inclusión de todos los exones y elementos reguladores.

## ② Cebadores para la secuencia objetivo

Upstream (adelante): 5'-CGCGAATTCATGAGCTCGCT-3'

Downstream (reversa): 5'-CCGCTCGAGTTACAGGTAC-3'

## ③ Amplificación por PCR de la secuencia de PTCSC3

## I. Sistema de reacción (50µL):

| SISTEMA DE REACCIÓN        | VOLOMEN |
|----------------------------|---------|
| ddH <sub>2</sub> O         | 36µL    |
| 10×Tampón                  | 5µL     |
| dNTPs(2.5mM)               | 4µL     |
| Cebador ascendente (10µM)  | 2µL     |
| Cebador descendente (10µM) | 2µL     |
| ADN molde                  | 1µL     |
| PrimeSTARMax               | 0.5µL   |

II. Protocolo de amplificación: Pre-desnaturalización a 98 °C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de: 98 °C durante 10 segundos → 60 °C durante 15 segundos → 72 °C durante 2 minutos, con una extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

III. Digestión con enzimas de restricción y ligación: Los productos de PCR y el vector fueron digeridos con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI (a 37 °C durante 2 horas). Las

bandas objetivo fueron extraídas del gel (fragmento de PTCSC3 de aproximadamente 2 kb, vector linealizado de aproximadamente 5.4 kb).

IV. Transformación y selección de clones positivos: El producto de ligación fue transformado en células competentes DH5 $\alpha$  y sembrado en placas de agar LB con ampicilina, incubadas a 37 °C durante 16 horas. Se seleccionaron colonias individuales, se extrajo ADN plasmídico tras la amplificación bacteriana (AxyPrep Plasmid Miniprep Kit). Se realizó una verificación preliminar mediante digestión doble (EcoRI / XhoI) y electroforesis en gel de agarosa, seguida de secuenciación para confirmar la exactitud de la secuencia.

V. Validación funcional del plásmido: El plásmido fue transfectado en células HEK293T. Tras 48 horas, se extrajo ARN y se realizó RT-qPCR para detectar los niveles de expresión de PTCSC3 (comparado con el grupo de vector vacío).

Cebadores in vitro:

Adelante: 5'-CTGGTCAAGATCCTGGAAGG-3'

Reverso: 5'-GCTGTGGTAGGTGGTCTGCT-3'

(2) Construcción del vector de silenciamiento dirigido contra PTCSC3 (shRNA-PTCSC3)

① Diseño de shRNA: Basado en las reglas de diseño de siRNA (regla de Tuschl), se seleccionaron secuencias diana específicas de PTCSC3 (por ejemplo, 5'-GCAAGTACTTCGAGATCAT-3').

② Hibridación de oligonucleótidos: Se sintetizaron cadenas complementarias y se hibridaron para formar ADN de doble hebra (95°C durante 5 minutos, seguido de enfriamiento lento hasta 25°C).

③ Ligación al vector: El producto hibridado se clonó en los sitios AgeI / EcoRI del

vector pLKO.1, y posteriormente se transformaron células competentes Stbl3 (para evitar recombinación del shRNA).

④ Verificación: Se confirmó la inserción correcta mediante digestión enzimática con EcoRI / AgeI y secuenciación utilizando el cebador del promotor U6.

### (3) Construcción del vector control vacío

① pcDNA3.1 vacío: Se obtuvo mediante religación del vector tras digestión enzimática (sin fragmento insertado). El método de verificación fue el mismo que para el vector de sobreexpresión.

### (4) Proceso de transfección

① Siembra celular: Se seleccionaron células en fase de crecimiento logarítmico, se digirieron con tripsina y se contaron. Se ajustó la densidad celular a  $2 \times 10^5$  células / mL. Se sembraron en placas de 6 pocillos, 2mL por pocillo (densidad final de aproximadamente  $1 \times 10^5$  células / pocillo, buscando alcanzar una confluencia del 70-80% en el momento de la transfección). Se incubaron durante la noche a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

#### ② Preparación del complejo de transfección

•I. Dilución del ácido nucleico: En un tubo de centrifuga de 1.5mL, se añadieron 125μL de Opti-MEM, y luego:

- Grupo experimental: 2,5μg del plásmido de sobreexpresión de lncRNA + 5μL de potenciador P3000.
- Control negativo: igual cantidad del vector vacío.
- Control positivo: plásmido pEGFP-N1.

•II. Dilución del reactivo de transfección: En otro tubo, se mezclaron 125μL de DMEM con 5μL de Lipofectamine 3000 y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos.

### ③ Mezcla:

Se mezclaron las soluciones I y II, se pipetearon suavemente y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 15-20 minutos para formar complejos liposoma-ADN.

### ④ Transfección:

Se retiró el medio de cultivo original de cada pocillo y se añadió 1.5mL de medio de cultivo completo fresco. Posteriormente, se añadió por goteo 250µL del complejo de transfección a cada pocillo y se agitó suavemente para mezclar. Se continuó el cultivo a 37°C durante 6-8 horas, tras lo cual se reemplazó el medio por medio de cultivo completo fresco (para reducir la toxicidad de los liposomas).

### ⑤ Procesamiento postransfección:

Si el vector contenía una etiqueta fluorescente, se observó la eficiencia de transfección mediante microscopía de fluorescencia a las 24 horas (por ejemplo, proporción de células GFP positivas). A las 48 horas postransfección se recolectaron las células para los análisis posteriores.

### ⑥ Extracción de ARN:

Se extrajo el ARN total mediante el método TRIzol, se transcribió reversamente a cDNA y se verificó el nivel de expresión del lncRNA mediante qPCR.

## ***2.6 Construcción del plásmido de sobreexpresión de LncRNA PTCSC3 y su transfección en células de LUAD resistentes a erlotinib***

### (1) Objetivo experimental:

Construir un plásmido de sobreexpresión que contenga la secuencia completa de cDNA del LncRNA humano PTCSC3 para estudios funcionales posteriores. Para ello, se optimizarán la selección del vector, las estrategias de clonación y los métodos de verificación, garantizando una

alta eficiencia de expresión y estabilidad del plásmido.

(2) Obtención de la secuencia diana y diseño de cebadores

① Fuente de la secuencia:

La secuencia completa de PTCSC3 se obtuvo de la base de datos NCBI, seleccionando el transcrito validado (NR\_024031.1) con el fin de asegurar la inclusión de todos los exones y elementos reguladores pertinentes.

② Diseño de cebadores para la secuencia diana:

- Cebador directo (upstream): 5'-CGCGAATTCATGAGCTCGCT-3'
- Cebador reverso (downstream): 5'-CCGCTCGAGTTACAGGTAC-3'

③ Amplificación por PCR de la secuencia de PTCSC3:

I. Sistema de reacción (50µL):

| SISTEMA DE REACCIÓN    | VOLOMEN |
|------------------------|---------|
| dd H <sub>2</sub> O    | 36µL    |
| Tampón (10×)           | 5µL     |
| dNTPs (2.5mM)          | 4µL     |
| Cebador directo (10µM) | 2µL     |
| Reverse primer (10µM)  | 2µL     |
| ADN molde              | 1µL     |
| PrimeSTARMax           | 0.5µL   |

II. Protocolo de PCR: Pre-desnaturalización: 98 °C durante 2 minutos; 35 ciclos de: 98 °C durante 10 segundos → 60 °C durante 15 segundos → 72 °C durante 2 minutos; extensión final: 72 °C durante 10 minutos.

III. Digestión enzimática y ligación: Tanto el producto de PCR como el vector fueron

digeridos con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI a 37 °C durante 2 horas. Las bandas objetivo se recuperaron por electroforesis en gel (fragmento de PTCSC3 de aproximadamente 2 kb; vector linealizado de aproximadamente 5,4 kb).

IV. Transformación y selección de clones positivos: El producto de ligación se transformó en células competentes DH5 $\alpha$  y se sembraron en placas de agar LB que contenían ampicilina, incubándose a 37 °C durante 16 horas. Se seleccionaron colonias individuales, y tras la amplificación bacteriana, se extrajeron los plásmidos (Kit AxyPrep Plasmid Miniprep). La verificación preliminar se realizó mediante doble digestión (EcoRI / XhoI) y electroforesis en gel de agarosa, confirmando posteriormente la secuencia mediante secuenciación.

V. Validación funcional del plásmido: El plásmido se transfirió a células HEK293T. A las 48 horas, se extrajo el ARN y se realizó RT-qPCR para detectar los niveles de expresión de PTCSC3 (comparados con el grupo de vector vacío).

### (3) Protocolo de Transfección de LncRNA

#### ① Siembra celular

Recolectar las células en fase logarítmica de crecimiento, digerir con tripsina y contar. Ajustar la densidad celular a  $2 \times 10^5$  células / mL. Sembrar 2mL por pocillo en placas de 6 pocillos (densidad final aproximada:  $1 \times 10^5$  células / pocillo, para alcanzar una confluencia del 70–80 % al momento de la transfección). Incubar durante la noche a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>.

#### ② Preparación del complejo de transfección

I. Dilución del ácido nucleico: En un tubo centrífugo de 1.5mL, añadir 125 $\mu$ L de Opti-MEM. Agregar:

- Grupo experimental: 2.5 $\mu$ g de plásmido de sobreexpresión de lncRNA + 5 $\mu$ L de potenciador P3000.



- Control negativo: misma cantidad de vector vacío.
- Control positivo: plásmido pEGFP-N1.

II. Dilución del reactivo de transfección: En otro tubo, mezclar 125µL de DMEM con 5µL de Lipofectamine 3000. Dejar reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos.

### ③ Mezcla

Combinar las soluciones I y II, mezclar suavemente mediante pipeteo, y dejar reposar a temperatura ambiente durante 15–20 minutos para formar el complejo liposoma-ADN.

### ④ Procedimiento de transfección

Retirar el medio de cultivo original de las células y añadir 1.5mL de medio completo fresco por pocillo. Añadir por goteo el complejo de transfección (250µL / pocillo) y agitar suavemente para mezclar. Continuar el cultivo a 37 °C durante 6–8 horas, luego reemplazar con medio completo fresco (para reducir la toxicidad de los liposomas).

### ⑤ Procesamiento post-transfección

Si el vector contiene marcador fluorescente, evaluar la eficiencia de transfección (porcentaje de células GFP positivas) mediante microscopía de fluorescencia a las 24 horas post-transfección. Recolectar las células a las 48 horas para análisis posteriores.

### ⑥ Extracción de ARN

Extraer el ARN total utilizando el método TRIzol, retrotranscribir a cDNA y verificar los niveles de expresión de lncRNA mediante qPCR.

## ***2.7 Aislamiento e Identificación de Exosomas***

### (1) Preparación del sobrenadante celular

Se recomienda utilizar únicamente muestras previamente filtradas, excluyendo partículas

superiores a 0,8µm. En lo posible, la filtración debe realizarse antes de congelar las muestras.

- ① Cultivar células hBMSCs utilizando suero libre de exosomas.
- ② Tras el tratamiento farmacológico, aspirar el sobrenadante de cultivo y recogerlo en un tubo de tamaño adecuado.
- ③ Filtrar con un filtro de 0,8µm para eliminar residuos celulares y fragmentos.
- ④ Transferir cuidadosamente el sobrenadante clarificado a un nuevo tubo sin perturbar el sedimento, que formará una marca en la parte externa del tubo centrífugo.
- ⑤ Si se van a aislar exosomas el mismo día, conservar el sobrenadante a 4°C hasta su procesamiento. Para almacenamiento a largo plazo, alícuotar y congelar a -80°C.
- ⑥ Antes de aislar vesículas extracelulares (EVs) a partir de sobrenadante congelado, descongelar a temperatura ambiente (20°C).

### (2) Aislamiento de exosomas

- ① Utilizar sobrenadante de cultivo celular previamente filtrado.
- ② Añadir 1 volumen de tampón XBP por cada volumen de muestra. Invertir el tubo suavemente 5 veces para mezclar completamente. Permitir que la mezcla alcance temperatura ambiente.
- ③ Añadir hasta 16mL de la mezcla muestra / XBP a la columna de centrifugación exoEasy y centrifugar a 500g durante 1 minuto. Desechar el flujo y colocar de nuevo la columna en el mismo tubo de recolección. Si el volumen de muestra supera los 8mL, repetir este paso hasta que todo el volumen haya pasado por la columna. (Opcional: para eliminar líquido residual de la membrana, centrifugar a 5000g durante 1 minuto).
- ④ Añadir 10mL de tampón XWP y centrifugar a 5000 g durante 5 minutos para eliminar

residuos. Desechar el flujo y el tubo de recolección. Nota: La velocidad de centrifugación puede reducirse hasta un mínimo de 3000 g sin comprometer el rendimiento.

⑤ Transferir la columna a un nuevo tubo de recolección.

⑥ Añadir 400µL de tampón XE a la membrana, incubar 1 minuto y centrifugar a 500 g durante 5 minutos para recoger el eluato. Nota: El uso de menos de 400µL puede resultar en una elución incompleta. El eluato puede concentrarse por ultrafiltración; si se realiza este paso, se recomienda eluir con 1–2mL de tampón XE.

⑦ Reaplicar el eluato a la membrana de la columna exoEasy, incubar durante 1 minuto y centrifugar a 5000 g durante 5 minutos. Recoger el eluato final y transferir a un tubo adecuado.

### (3) Identificación de exosomas

① Utilizar microscopía electrónica para observar la integridad morfológica de las vesículas exosómicas:

Filtrar el tampón PBS usado para disolver los exosomas mediante un filtro de membrana de fase acuosa de 0,2µm para eliminar cristales e impurezas.

Tomar el tampón de exosomas y centrifugar a 100.000g durante 60 minutos con ultracentrífuga Beckman. Desechar el sobrenadante y resuspender el sedimento en PBS.

Centrifugar nuevamente a 100.000g durante 60 minutos. El sedimento obtenido corresponde a los exosomas. Resuspenderlo en PBS.

Tomar 20µL del sedimento resuspendido y colocarlo en una rejilla de cobre.

Dejar reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos, retirar el exceso con papel de filtro.

Tinción con ácido fosfotúngstico al 2% (pH=5,0) durante 60 segundos. Retirar el exceso de tinción con papel de filtro.

Observar la muestra teñida bajo microscopio electrónico de transmisión (TEM).

② Utilizar análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) para determinar el tamaño de las partículas exosómicas:

Filtrar el tampón XE utilizado para disolver exosomas mediante un filtro de membrana de fase acuosa de 0,2µm.

Tomar 10–50µL de la solución eluida con tampón XE, diluir 1:1000 con el mismo tampón y analizar con un equipo de rastreo de nanopartículas (Zetaview).

### ***2.8 Ensayo BCA para la determinación de la concentración de exosomas y proteínas***

(1) Extracción de proteínas celulares (utilizando una placa de 6 pocillos como ejemplo)

① Después del tratamiento celular, incubar durante un tiempo apropiado.

② Aspirar el medio de cultivo antiguo, lavar dos veces con PBS y añadir 100µL de tampón de lisis RIPA a cada pocillo; realizar la lisis sobre hielo durante 15 minutos.

③ Raspar las células, aspirarlas y transferirlas a un tubo EP de 1.5mL.

④ Colocar el tubo EP sobre hielo y sonicar las células con una sonda ultrasónica durante 1 minuto.

⑤ Centrifugar el tubo EP en una centrífuga previamente enfriada a 12.000 rpm durante 15 minutos.

⑥ Aspirar el sobrenadante a un nuevo tubo EP, que servirá como muestra de proteína para la medición de concentración.

(2) Preparación del estándar de proteínas

① Añadir 0.8mL de solución de dilución al tubo de estándar proteico y disolver completamente para preparar una solución estándar de 25mg / mL. Puede utilizarse

inmediatamente o conservarse a -20 °C para almacenamiento prolongado.

② Tomar una cantidad adecuada de esta solución y diluirla hasta obtener una concentración final de 0.5mg / mL.

(3) Preparación de la solución de trabajo BCA

Preparar la cantidad necesaria de solución BCA añadiendo 50 volúmenes del reactivo A por cada volumen del reactivo B (50:1), y mezclar bien. Por ejemplo, añadir 100µL de reactivo B a 5mL de reactivo A para obtener 5.1mL de solución de trabajo. Esta mezcla es estable durante 24 horas a temperatura ambiente.

(4) Determinación de concentración de proteínas y exosomas

① En una placa de 96 pocillos, añadir a los pocillos estándar volúmenes de 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16 y 20µL del estándar proteico, completando hasta 20µL con solución de dilución. Estas concentraciones corresponden a 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5mg / mL respectivamente.

② Añadir 2µL de muestra de exosomas con proteínas celulares a los pocillos correspondientes. Si el volumen es inferior a 20µL, completar con solución de dilución y registrar el volumen.

③ Añadir 200µL de solución de trabajo BCA a cada pocillo e incubar a 37 °C durante 20-30 minutos.

④ Medir la absorbancia a 562nm con un lector de microplacas.

⑤ Calcular la concentración de la muestra basándose en la curva estándar y el volumen utilizado.

(5) Extracción de ARN de exosomas en sobrenadante celular

① Utilizar suero libre de exosomas para cultivar células hBMSC, añadir los factores de tratamiento y recolectar el sobrenadante después del tiempo deseado.

- ② Se recomienda usar sobrenadante prefiltrado, eliminando partículas mayores a 0.8µm.
  - ③ Añadir la mezcla muestra / XBP a la columna de centrifugación exoEASY (máx. 16mL), centrifugar a 500 g durante 1 minuto. Desechar el flujo y repetir hasta que toda la muestra haya pasado por la columna.
  - ④ Añadir 10mL de tampón XWP, centrifugar a 5000 g durante 5 minutos para lavar la columna. Desechar el flujo.
  - ⑤ Transferir la columna a un nuevo tubo de recolección.
  - ⑥ Añadir 700µL de QLAzol directamente a la membrana de la columna. Centrifugar a 5000 g durante 5 minutos y transferir el lisado a un tubo estéril libre de enzimas.
  - ⑦ Vortexar brevemente e incubar 5 minutos a temperatura ambiente para disociar los complejos ribonucleoproteicos.
  - ⑧ Añadir 90µL de cloroformo, cerrar firmemente y agitar 15 segundos.
  - ⑨ Incubar 2-3 minutos a temperatura ambiente.
- (6) Recolección de exosomas y purificación de ARN
- ① Centrifugar a 12.000 g durante 15 minutos a 4 °C. Separar cuidadosamente las tres fases: una fase acuosa superior (ARN), una interfase blanca y una fase orgánica roja. La fase acuosa debe ser de ~400µL. Transferirla a un nuevo tubo, evitando la interfase. Añadir 2 volúmenes de etanol al 100% y mezclar bien.
  - ② Colocar una columna RNeasy MinElute en un nuevo tubo de 1.5mL. Añadir 14µL de agua libre de RNasa al centro de la membrana. Dejar reposar 1 minuto, luego centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto para eluir el ARN. Si se necesita mayor concentración, puede usarse 10µL de agua RNasa-free (con un 20% de pérdida de recuperación). No usar menos

de 10 $\mu$ L, ya que la membrana no se hidratará correctamente. El volumen muerto de la columna es 2 $\mu$ L; elución con 14 $\mu$ L rinde 12 $\mu$ L.

### ***2.9 Ensayo de Captación de Exosomas***

(1) Preparar la solución A disolviendo 100 $\mu$ L de exosomas en 200 $\mu$ L de tampón de dilución; preparar la solución B añadiendo 1mL de PKH67 (proteína fluorescente verde) a 200 $\mu$ L de tampón de dilución.

(2) Mezclar las soluciones A y B e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.

(3) Centrifugar la mezcla en un tubo de ultrafiltración a 4000  $\times$  g durante 3 minutos. Recoger los 50 $\mu$ L restantes de suspensión de exosomas teñidos de la capa superior y añadirlos a las células.

(4) Después de 12 horas de cultivo celular, observar la fluorescencia verde de PKH67 mediante microscopía confocal.

(5) Retirar el medio de cultivo, lavar dos veces con PBS y fijar las células con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos.

(6) Bloquear con BSA al 1% durante 10 minutos.

(7) Añadir la solución de tinción DAPI, teñir durante 3 minutos y lavar dos veces con PBS.

(8) Adquirir imágenes con un microscopio confocal. Interpretación de resultados: el azul indica el núcleo celular y el verde indica los exosomas marcados con PKH67.

### ***2.10 Ensayo de inhibición de Exosomas con GW4869***

En un sistema de cocultivo de células madre mesenquimales de médula ósea (hBMSCs) y células epiteliales de cáncer de pulmón humano, se añadió GW4869 para tratar las hBMSCs

durante 24 horas (concentración final: 15nmol / mL). Posteriormente, se añadieron células epiteliales de cáncer de pulmón humano para observar la expresión de PTCSC3 y las características biológicas de estas células cancerosas.

### **2.11 Transducción Lentiviral**

Según los datos proporcionados por GeneChem, la multiplicidad de infección (MOI, proporción de virus / células durante la infección) requerida para infectar al 80% de las hBMSCs es 50. El título del virus LV-NC es  $1 \times 10^8$  pfu / mL, y el del virus LV-PTCSC3-mimic es  $2 \times 10^8$  pfu / mL. El volumen de virus requerido se calcula con la fórmula: (número de células  $\times$  MOI) / título viral. Para  $5 \times 10^4$  células se requieren 25 $\mu$ L de LV-NC y 1.25 $\mu$ L de LV-PTCSC3-mimic.

(1) Veinticuatro horas antes de la transducción, sembrar hBMSCs a una densidad de  $2.5 \times 10^4$  células / pozo en una placa de 6 pozos, asegurando que se alcancen aproximadamente  $5 \times 10^4$  células / pozo al momento de la infección.

(2) Al día siguiente, reemplazar el medio con 2mL de medio fresco conteniendo 5 $\mu$ g / mL de polibreno y añadir la suspensión viral correspondiente. Incubar a 37 °C.

(3) Continuar el cultivo durante 24 horas, luego reemplazar el medio con medio fresco sin virus.

(4) Después de 72 horas, observar la fluorescencia verde (GFP) bajo un microscopio de fluorescencia. Posteriormente, añadir 5 $\mu$ g / mL de puromicina para seleccionar células resistentes. Continuar el cultivo y la selección durante dos semanas. Extraer ARN para evaluar la eficiencia de transducción y proceder con los siguientes experimentos.

### **2.12 Ensayo Transwell**

(1) Ensayo de Invasión Celular



① Preparación de la matriz Matrigel

Descongelar la matriz Matrigel a 4 °C desde -80 °C durante la noche hasta su completa licuefacción.

② Revestimiento de la cámara superior

En hielo, tomar 60 µL de Matrigel líquido y mezclar con 300 µL de medio sin suero. Añadir 100 µL de esta mezcla a cada cámara superior. Incubar a 37 °C durante aproximadamente 5 horas hasta observar una capa blanca, indicativa de solidificación.

③ Preparación celular

Digestión de las células de cada grupo experimental, lavado 3 veces con medio sin suero, y resuspensión hasta alcanzar una densidad celular de  $1 \times 10^5$  células / mL. Añadir 100 µL de suspensión celular a cada cámara.

④ Preparación de la cámara inferior

Añadir 500 µL de medio conteniendo 20% de suero fetal bovino a la cámara inferior. Incubar el sistema completo a 37 °C durante 24 horas.

⑤ Fijación y tinción

Retirar la cámara Transwell, lavar con PBS, fijar con metanol a 4 °C durante 30 minutos, teñir con cristal violeta al 0.1% durante 20 minutos, y lavar con PBS.

⑥ Observación y análisis

Observar las células que invadieron al lado inferior del filtro bajo microscopio, seleccionar 5 campos aleatorios, tomar imágenes, contar las células, y calcular el promedio.

(2) Ensayo de Migración Celular

El procedimiento es similar al del ensayo de invasión, con la diferencia de que no se añade matriz Matrigel a la cámara superior. Todos los demás pasos y el análisis de resultados son

idénticos.

### ***2.13 Análisis de Apoptosis por Citometría de Flujo con Tinción Doble Annexina V-FITC / PI***

#### **(1) Fundamento Experimental**

La apoptosis, una forma crucial de muerte celular programada, se caracteriza por la externalización de fosfatidilserina (PS) y la pérdida de la integridad de la membrana celular. La Annexina V, una proteína dependiente de calcio que se une específicamente a la PS expuesta en la membrana externa, se utiliza en combinación con el yoduro de propidio (PI), un colorante de ácidos nucleicos que no puede penetrar membranas intactas. Esta tinción doble permite distinguir distintas fases de la apoptosis:

- Células en apoptosis temprana: Annexina V-FITC<sup>+</sup> / PI<sup>-</sup>
- Células en apoptosis tardía o necrosis: Annexina V-FITC<sup>+</sup> / PI<sup>+</sup>
- Células necróticas o dañadas mecánicamente: Annexina V-FITC<sup>-</sup> / PI<sup>+</sup>

#### **(2) Procedimiento Experimental**

##### **① Tratamiento y recolección celular:**

Tratar las células según el diseño experimental y recolectarlas mediante digestión suave con tripsina al 0,25%, deteniendo la digestión con medio con suero.

##### **② Tinción:**

- Reconstituir las células en PBS frío ( $1 \times 10^6$  células / mL).
- Tomar 100µL de suspensión y añadir:
  - ✓ 5µL de Annexina V-FITC
  - ✓ 5µL de PI (50µg / mL)
- Incubar en oscuridad 15 minutos a temperatura ambiente.

- Añadir 400µL de tampón de unión Annexina V y analizar inmediatamente por citometría de flujo (en 1 h).

③ Citometría de flujo:

- Canal FITC (Ex 488nm / Em 530nm)
- Canal PI (Ex 488nm / Em 610nm)
- Adquirir  $\geq 10,000$  eventos.
- Analizar mediante FlowJo o BD FACSDiva con puertas FSC / SSC para excluir residuos.

#### ***2.14 Ensayo de Formación de Colonias en Dos Dimensiones (2D)***

(1) Preparación celular:

Recolectar células en fase logarítmica, digerir con tripsina, contar y ajustar a una densidad de  $\sim 1000$  células / pozo.

(2) Siembra y tratamiento:

- Sembrar 1000 células / pozo en placas de 6 pozos con 2mL de medio completo.
- Incubar a 37°C.

(3) Grupos:

- Control: Er-A549-NC y Er-PC9-NC
- Experimental: Er-A549-PTCSC3 y Er-PC9-PTCSC3
- Añadir erlotinib (1 µmol / L), cambiar medio cada 2-3 días.

(4) Capa de agar:

- Agar base 0,6%: mezclar agarosa con medio 2× y FBS al 20%.
- Capa celular: mezclar suspensión celular con agarosa al 0,3%.

- Capa superior: añadir 0,5mL de medio cada 3 días.

### (5) Cultivo y observación:

Cultivar 2-4 semanas; considerar colonias positivas si el diámetro  $\geq 50\mu\text{m}$ .

### (6) Fijación y tinción:

- Fijar con paraformaldehído al 4%.
- Teñir con cristal violeta al 0,5%.

### (7) Cuantificación:

- Fotografiar colonias, analizar con ImageJ.

•Tasa de formación de colonias (%) =  $(\text{Número de colonias} / \text{Células sembradas}) \times 100\%$ .

## 2.15 *Análisis por Western Blot*

### (1) Extracción y Cuantificación de Proteínas

Recolección y lisis celular: Recolectar las células cultivadas y lavarlas tres veces con tampón PBS. Centrifugar a 10,000 rpm durante 10 minutos para formar el pellet celular. Desechar el sobrenadante y añadir una cantidad adecuada de tampón de lisis celular. Colocar las muestras sobre hielo durante aproximadamente 30 minutos para garantizar una lisis completa. Finalmente, centrifugar durante 5 minutos, aspirar el sobrenadante cuidadosamente y alícuotar para uso posterior.

Cuantificación de proteínas: Determinar la concentración proteica utilizando un kit de cuantificación BCA.

### (2) Electroforesis SDS-PAGE de Proteínas

Desnaturalización de proteínas: Añadir tampón de carga 5× a las muestras proteicas ya cuantificadas. Mezclar completamente, sellar la boca del tubo con film protector y hervir las

muestras en agua en ebullición durante 10 minutos para desnaturalizar la conformación espacial de las proteínas. Centrifugar las muestras a 12,000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Transferir cuidadosamente el sobrenadante a un nuevo tubo EP estéril para los experimentos siguientes.

Preparación de geles separadores y concentradores: Primero, verter el gel separador en el sistema de fundición y dejar que solidifique. A continuación, añadir el gel concentrador y colocar el peine. Una vez que el gel concentrador haya solidificado completamente, retirar el peine y eliminar cualquier residuo de los pocillos de muestra.

Cargar una cantidad adecuada de muestra de proteína en los pocillos, y realizar la electroforesis a voltaje constante de 80 V. Cuando la muestra ingrese al gel separador, aumentar inmediatamente el voltaje a 120 V y continuar la electroforesis a corriente constante. Detener la corrida tan pronto como el colorante azul de bromofenol esté a unos 10mm del borde inferior del gel separador. Retirar cuidadosamente el gel para el siguiente paso.

### (3) Transferencia

Activación de la membrana PVDF: Remojar la membrana PVDF en metanol para activarla y luego sumergirla, junto con el papel de filtro, las esponjas y el sistema de transferencia, en tampón de transferencia. Se recomienda remojar la membrana PVDF en el tampón de transferencia durante al menos 15 minutos para una activación completa.

Transferencia de proteínas: Colocar el sistema de transferencia en el tanque de transferencia, rodeándolo con paquetes de hielo para mantener la temperatura baja durante todo el proceso. Disponer el gel en el lado del electrodo negativo y la membrana PVDF en el lado del electrodo positivo. Conectar la fuente de alimentación, ajustar la corriente a 260 mA y comenzar la transferencia. Finalizar el proceso después de aproximadamente 1 hora. Luego, desmontar cuidadosamente cada capa, retirar suavemente la membrana PVDF con pinzas y cortar la esquina

superior izquierda como marca de orientación de carga.

### (4) Hibridación

Bloqueo: Sumergir la membrana PVDF en solución TBST, agitar suavemente en una plataforma oscilante durante aproximadamente 5 minutos para enjuagar. Luego bloquear con leche descremada al 2% a 37°C durante aproximadamente 2 horas. Este paso permite eliminar sitios de unión inespecífica y reducir la coloración de fondo.

Incubación con anticuerpo primario: Diluir el anticuerpo primario con tampón de bloqueo a las siguientes proporciones:

- c-Myc: 1:500
- Ciclina: 1:500
- $\beta$ -Catenina: 1:500
- GAPDH: 1:500

Incubar la membrana con el anticuerpo diluido a 4°C durante toda la noche.

Incubación con anticuerpo secundario: Al día siguiente, lavar la membrana tres veces con tampón TBST, 10 minutos por cada lavado. Luego, incubar la membrana con el anticuerpo secundario diluido (1:1000) a 37°C durante 2 horas. Posteriormente, realizar nuevamente tres lavados con TBST de 10 minutos cada uno.

Revelado: Colocar la membrana (lado proteico hacia arriba) sobre una hoja de film plástico. Aplicar uniformemente la solución de reacción ECL sobre la membrana y dejar reaccionar en la oscuridad durante 2 minutos. Finalmente, revelar utilizando película de rayos X en un cuarto oscuro.

### **2.16 Análisis Estadístico**

Todos los datos de este experimento fueron analizados utilizando el software estadístico

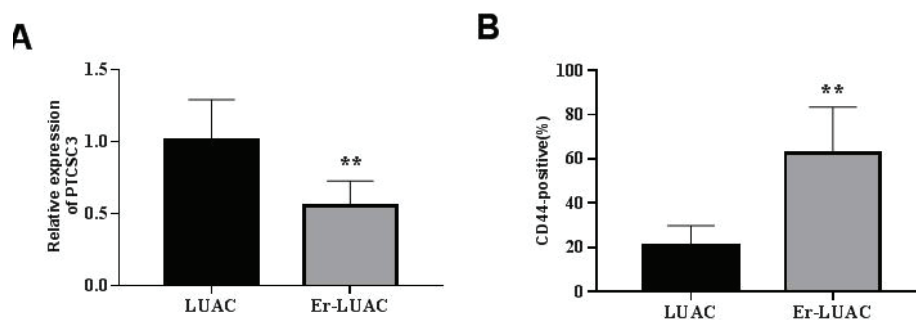
SPSS versión 22.0. Los datos se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (DE). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA unidireccional o prueba t de Student. Un valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

## **RESULTADOS**



### 1. La lncRNA PTCSC3 se encuentra regulada a la baja en tejidos de adenocarcinoma pulmonar (LUAD) resistentes a erlotinib

Se evaluaron los niveles de expresión de la lncRNA PTCSC3 en tejidos de adenocarcinoma pulmonar resistentes a erlotinib (Er-LUAD,  $n = 8$ ) y en tejidos primarios de LUAD ( $n = 14$ ), así como la tasa de expresión positiva del marcador de células madre CD133. En comparación con los tejidos primarios de LUAD, la expresión de PTCSC3 se redujo significativamente en los tejidos tumorales resistentes a erlotinib; además, el marcador de células madre CD44<sup>+</sup> mostró un aumento significativo en los tejidos resistentes a erlotinib (Figure 7).



**Figura 7. La lncRNA PTCSC3 presenta baja expresión en tejidos de LUAD resistentes a erlotinib (Er-LUAD).** (A) Se cuantificó la expresión de PTCSC3 mediante qRT-PCR en tejidos primarios de LUAD (LUAD,  $n = 14$ ) y tejidos Er-LUAD ( $n = 8$ ).  $P < 0.01$ . (B) La tasa de expresión positiva de CD44 se analizó mediante citometría de flujo.  $P < 0.01$ .

### 2. Establecimiento de líneas celulares de LUAD resistentes a Erlotinib

Para determinar los perfiles de resistencia de las líneas celulares establecidas de adenocarcinoma pulmonar no microcítico (LUAD) resistentes a erlotinib, A549 y PC9, se utilizaron ensayos CCK-8 para evaluar las tasas de inhibición y los valores de IC<sub>50</sub> de las células

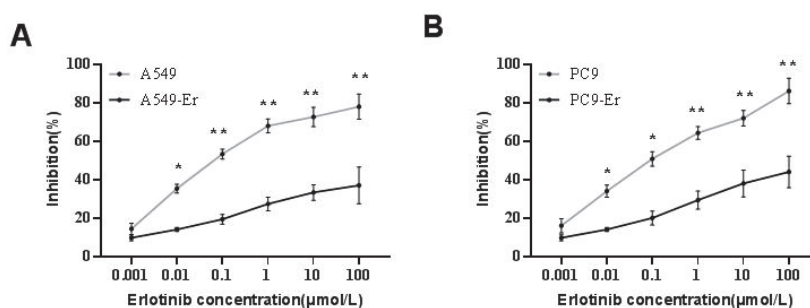
## RESULTADOS

A549 y PC9 tras 72 horas de exposición a diferentes concentraciones de erlotinib (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ).

Los resultados demostraron una reducción significativa y dependiente de la concentración en las tasas de inhibición de las células Er-A549 en comparación con el grupo A549 a las concentraciones de erlotinib mencionadas. Además, a concentraciones superiores a 1  $\mu\text{mol} / \text{L}$ , las diferencias en las tasas de inhibición fueron mínimas, con una tasa de inhibición de  $72.67 \pm 5.33$  a 1  $\mu\text{mol} / \text{L}$  y de  $78.32 \pm 5.64$  a 100  $\mu\text{mol} / \text{L}$  (Figura 8A).

En comparación con el grupo de células PC9, las células Er-PC9 mostraron diferencias mínimas en las tasas de inhibición a concentraciones de erlotinib superiores a 1  $\mu\text{mol} / \text{L}$ , con una tasa de inhibición de  $29.67 \pm 1.43$  a 1  $\mu\text{mol} / \text{L}$  y de  $43.32 \pm 1.64$  a 100  $\mu\text{mol} / \text{L}$  (Figura 8B).

Con base en los resultados del ensayo CCK-8, se seleccionó una concentración final de 1  $\mu\text{mol} / \text{L}$  de erlotinib para los experimentos posteriores de evaluación de la invasión, migración y apoptosis de las células Er-A549 y Er-PC9.

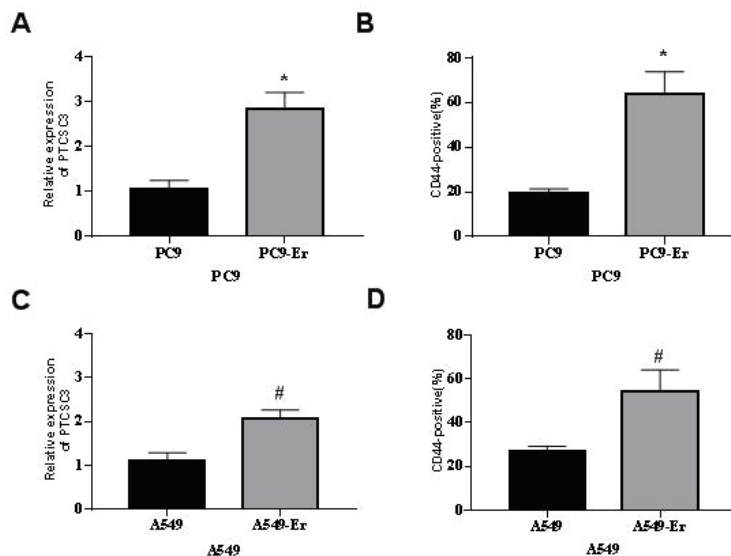


**Figura 8. El efecto del erlotinib sobre las células de LUAD.** (A) Efecto de diferentes concentraciones de erlotinib sobre la tasa de inhibición de las células A549 y Er-A549, \* $P < 0.05$ ,

**\*\*P<0.01.** (B) Efecto de diferentes concentraciones de erlotinib sobre la tasa de inhibición de las células PC9 y Er-PC9, \*P<0.05, \*\*P<0.01.

### 3. LncRNA PTCSC3 está disminuido en células de LUAD resistentes a erlotinib

Se examinó adicionalmente la expresión de PTCSC3 y CD44 en las células Er-A549 y Er-PC9. En comparación con las células A549, la expresión de PTCSC3 estaba significativamente disminuida en las células Er-A549 (Figura 9A), mientras que la expresión de CD44 estaba significativamente aumentada (Figura 9B). Del mismo modo, en comparación con las células PC9, la expresión de PTCSC3 también estaba significativamente disminuida en las células Er-PC9 (Figura 9C), mientras que la expresión de CD44 estaba significativamente aumentada (Figura 9D).



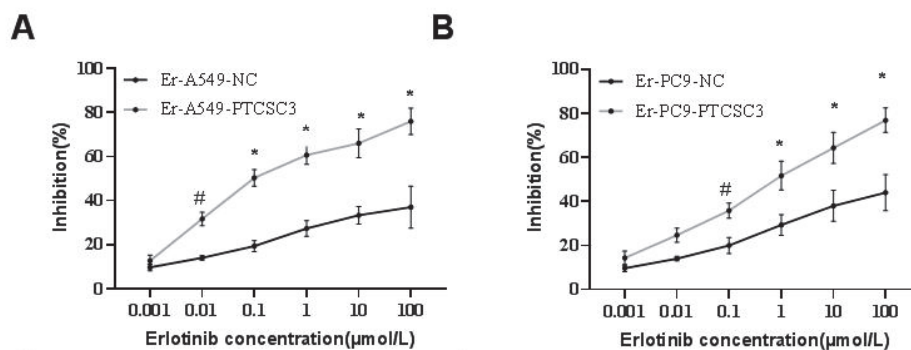
**Figura 9. El lncRNA PTCSC3 se expresa en niveles bajos en células de LUAD resistentes a erlotinib.** (A, C) Análisis cuantitativo de la expresión de PTCSC3 en células de LUAD resistentes a erlotinib mediante qRT-PCR. En comparación con las células LUAD, \*P<0.01, #P<0.05. (B, D) La tasa de expresión positiva de CD44 en células LUAD y células resistentes

## RESULTADOS

fue analizada por citometría de flujo. En comparación con las células LUAD,  $*P<0.01$ ,  $\#P<0.05$ .

### 4. La sobreexpresión de PTCSC3 puede revertir la resistencia de las células de LUAD a erlotinib

Mediante la construcción de líneas celulares de LUAD resistentes a erlotinib (Er-A549 y Er-PC9) que sobreexpresan de forma estable el lncRNA PTCSC3, los resultados del ensayo CCK-8 (Figura 10) mostraron que, en comparación con el grupo control con vector vacío (Er-A549-NC y Er-PC9-NC), la sobreexpresión de PTCSC3 mejoró significativamente el efecto inhibidor del crecimiento inducido por erlotinib en células resistentes. Bajo tratamiento de 72 horas, la tasa de inhibición del grupo experimental Er-A549-PTCSC3 disminuyó del  $58.4\% \pm 2.7\%$  en el grupo control al  $21.6\% \pm 1.7\%$  ( $P < 0.01$ ), y la tasa de inhibición en Er-PC9-PTCSC3 disminuyó del  $44.7\% \pm 3.7\%$  al  $22.5\% \pm 2.3\%$ , indicando que la sobreexpresión de PTCSC3 puede revertir la sensibilidad de las células resistentes a erlotinib.



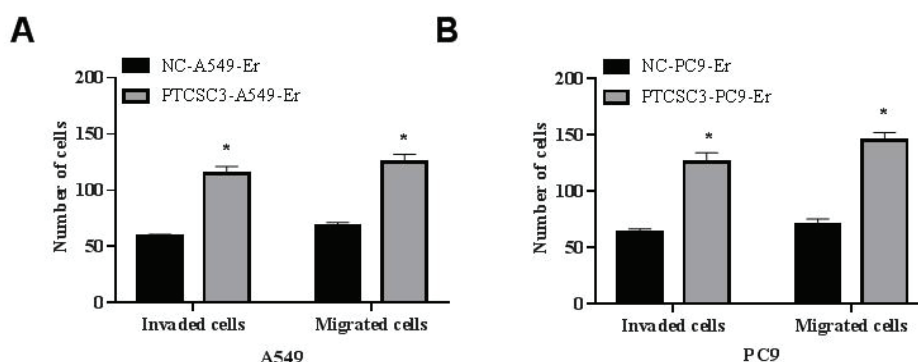
**Figura 10. La sobreexpresión de PTCSC3 inhibe la resistencia a fármacos en LUAD. (A, B)**

Ensayo CCK-8 para detectar la inhibición inducida por erlotinib en células PC9 y A549 resistentes. En comparación con el grupo control,  $\#P<0.05$ ,  $*P<0.01$ .

## 5. La sobreexpresión de PTCSC3 inhibe la invasión y migración de células de LUAD resistentes a erlotinib

La capacidad de invasión celular se evaluó mediante un ensayo Transwell con matriz de gel (Figura 11A). Los resultados mostraron que el número de células PTCSC3-Er-A549 que atravesaron la matriz de gel en 24 horas fue de  $(68.3 \pm 3.1)$  células / campo, significativamente inferior al grupo control con vector vacío (Er-A549-NC), que presentó  $(125 \pm 7)$  células / campo ( $p < 0.01$ ). En el caso de las células PTCSC3-Er-PC9, el número fue de  $(57.7 \pm 3.5)$  células / campo, también significativamente inferior al grupo control (Er-PC9-NC) con  $(139 \pm 8)$  células / campo ( $p < 0.01$ ).

La capacidad de migración celular se evaluó utilizando un ensayo de migración Transwell sin matriz de gel (Figura 11B). Se observó que el número de células PTCSC3-Er-A549 migradas en 24 horas fue de  $(63.3 \pm 3.2)$  células / campo, en comparación con  $(126 \pm 8)$  células / campo del grupo Er-A549-NC ( $p < 0.01$ ). En el grupo experimental Er-PC9-PTCSC3, el número de células migradas fue de  $(70.7 \pm 4.5)$  células / campo, significativamente menor que el grupo Er-PC9-NC, que fue de  $(145 \pm 7)$  células / campo ( $p < 0.01$ ). Estos resultados experimentales indican que la sobreexpresión de PTCSC3 puede inhibir de manera sinérgica la invasión y migración de las células LUAD resistentes a erlotinib.

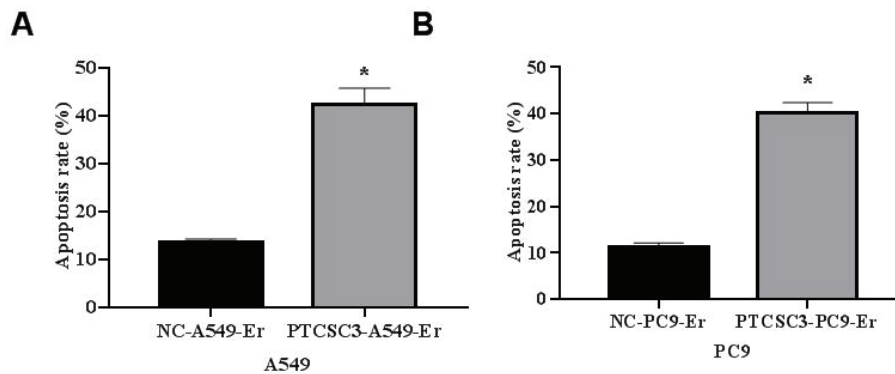


**Figura 11. Evaluación de la invasión y migración de células Er-LUAD mediante Transwell.**

Porcentaje de apoptosis (%) de células Er-LUAD en cada grupo. \* $P < 0.01$ .

**6. La sobreexpresión de PTCSC3 aumenta la apoptosis en células de LUAD resistentes a erlotinib**

El análisis por citometría de flujo mediante doble tinción Annexina V-FITC / PI reveló (Figura 12) que tras 24 horas de tratamiento con erlotinib a una concentración de  $1\mu\text{mol} / \text{L}$  en combinación con la sobreexpresión de PTCSC3, la tasa de apoptosis en las células A549-Er aumentó del ( $13.43\% \pm 0.76\%$ ) en el grupo control al ( $45.39\% \pm 3.3\%$ ) ( $p < 0.01$ ) (Figura 12A). De forma similar, la tasa de apoptosis en las células PC9-Er se incrementó del ( $12.24\% \pm 0.73\%$ ) al ( $40.16\% \pm 2.2\%$ ) ( $p < 0.01$ ) (Figura 12B). Estos hallazgos sugieren que la sobreexpresión de PTCSC3 puede potenciar la respuesta apoptótica de las células de LUAD resistentes a erlotinib.

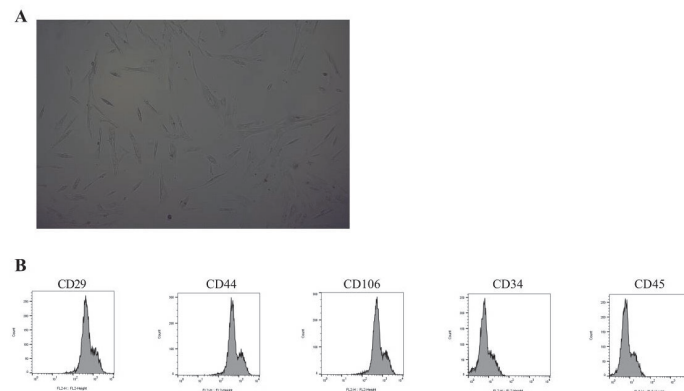


**Figura 12. Evaluación de la tasa de apoptosis de células Er-LUAD mediante citometría de flujo.** Porcentaje de apoptosis (%) en cada grupo experimental. \* $P < 0.01$ .

## 7. Aislamiento, Cultivo, e identificación de células madre mesenquimales humanas de médula ósea (hBMSCs)

Se logró con éxito el aislamiento, cultivo e identificación de hBMSCs. Las células se cultivaron inicialmente en  $\alpha$ -MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de penicilina-estreptomicina y 24mM de glutamina. Para la digestión celular y los pases, se aplicó tripsina a 37 °C durante 2 minutos. Una vez que las células adquirieron una morfología redondeada, se añadió igual volumen de medio de cultivo. Se eliminaron las células envejecidas y las mezcladas mediante pases en serie. Después de 3-4 generaciones, se observaron células purificadas con forma de huso, viables y dispuestas en patrón de vórtice (Figura 13A).

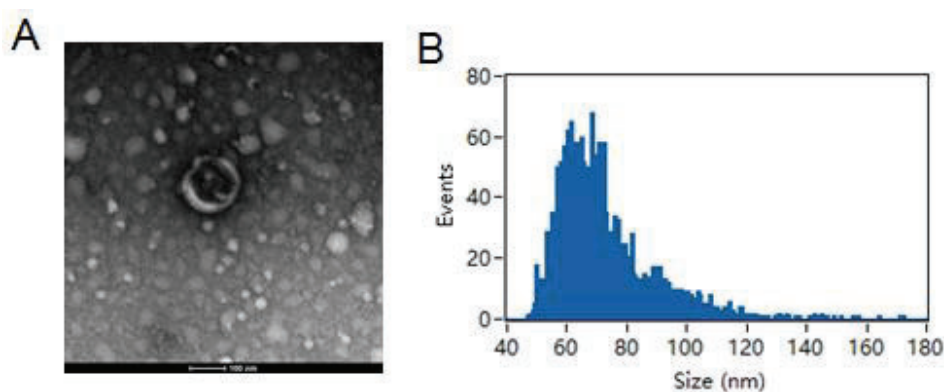
Las células de tercera generación en buen estado fueron incubadas con anticuerpos fluorescentes anti-humanos (CD29, CD44, CD106, CD34 y CD45) y analizadas por citometría de flujo. Los resultados mostraron positividad para CD29, CD44 y CD106, y negatividad para CD34 y CD45 (Figura 13B).



**Figura 13. Resultados de identificación de hBMSCs.** (A) Características morfológicas observadas al microscopio. (B) Resultados del análisis por citometría de flujo para marcadores de células madre.

## 8. Extracción e identificación de exosomas derivados de hBMSCs

Para aislar e identificar exosomas secretados por hBMSCs, se cultivaron las células en suero exento de exosomas y se trataron con PTCSC3-NC o PTCSC3 mimic. Tras 48 horas, se recolectó el sobrenadante celular y se extrajeron exosomas de 40-150nm utilizando el kit de Qiagen. La microscopía electrónica de transmisión (TEM) mostró que los exosomas tenían morfología esférica u ovalada, con estructura de membrana íntegra y contenido de baja densidad (Figura 14A). El análisis del tamaño de partícula mediante NTA reveló una distribución alrededor de 80nm (Figura 14B).



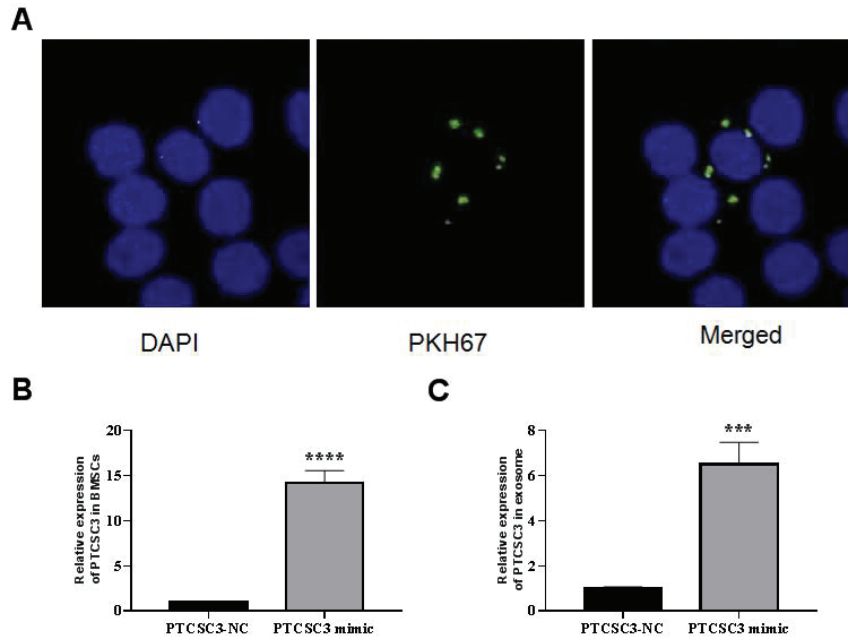
**Figura 14. Identificación de exosomas derivados de hBMSCs.** (A) Observación de la morfología mediante TEM. (B) Análisis del tamaño de partícula por NTA.

## 9. Los exosomas derivados de hBMSCs pueden encapsular lncRNA PTCSC3 y ser absorbidos por células de LUAD

Los exosomas secretados por hBMSCs fueron marcados con la proteína fluorescente verde PKH67. Tras co-cultivo durante 12 horas con células de LUAD, se fijaron y tiñeron con DAPI. La observación con microscopía confocal reveló fluorescencia verde (PKH67) en el citoplasma de las células de LUAD, indicando que los exosomas habían sido internalizados



(Figura 15A). Además, hBMSCs tratadas con PTCSC3 mimic mostraron alta expresión de PTCSC3 en los exosomas, determinada por RT-qPCR (Figura 15B).

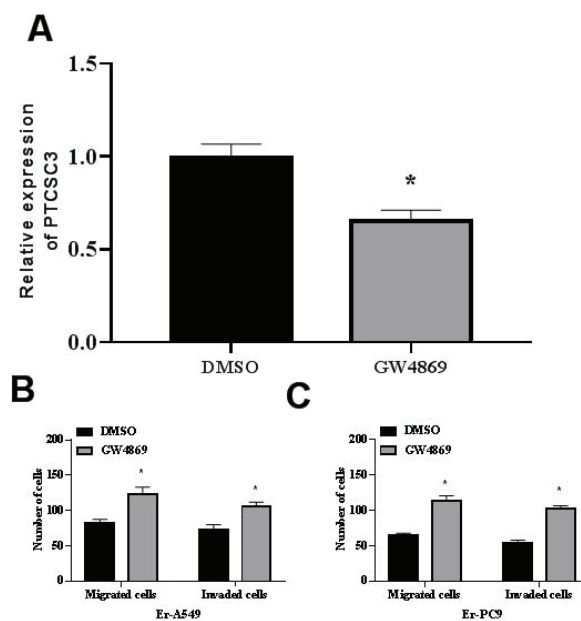


**Figura 15.** Los exosomas derivados de hBMSCs pueden encapsular PTCSC3 y ser absorbidos por células epiteliales humanas de cáncer de pulmón A549. (A) Internalización de exosomas marcados con PKH67. (B) Expresión de PTCSC3 en hBMSCs tratados con PTCSC3-NC o PTCSC3 mimic. (C) Expresión de PTCSC3 en los exosomas. Datos expresados como media  $\pm$  DE. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

## 10. GW4869 inhibe la liberación de exosomas derivados de BMSCs, reduciendo la absorción de lncRNA PTCSC3 por células de LUAD y promoviendo su migración e invasión

Se evaluó si el lncRNA PTCSC3 exosomal afecta las funciones biológicas de células LUAD. Para ello, se añadió GW4869, un inhibidor específico de la secreción de exosomas, al sistema de co-cultivo Transwell. Las células BMSCs fueron tratadas con GW4869 (15 pmol /

mL) durante 24 h, y luego se añadieron células LUAD. La expresión de PTCSC3 en las células LUAD fue menor en el grupo GW4869 en comparación con el grupo control (DMSO) (Figura 16A). Además, las capacidades de migración e invasión de las células LUAD aumentaron en el grupo tratado con GW4869 (Figura 16B). Estos hallazgos sugieren que GW4869 inhibe la liberación de exosomas derivados de BMSCs, reduciendo así la transferencia de PTCSC3 a las células LUAD.

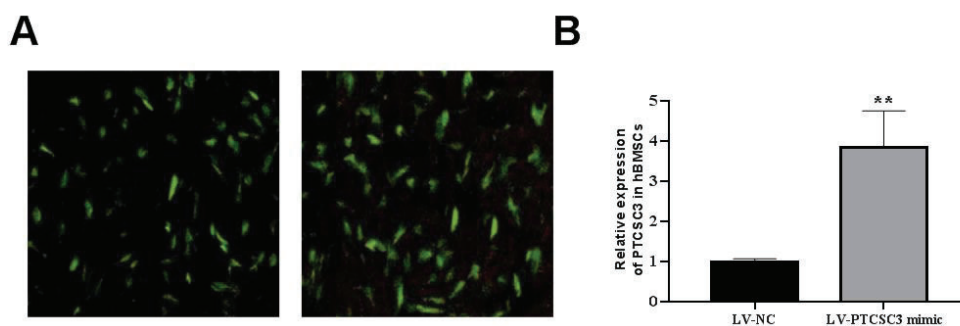


**Figura 16.** *GW4869 inhibe la liberación de exosomas derivados de hBMSCs, incrementando la proliferación e invasión de células LUAD resistentes. (A) Expresión de PTCSC3 en células Er-A549 y Er-PC9 tras tratamiento con GW4869. (B, C) Evaluación de la migración e invasión en el sistema de co-cultivo.*

## 11. Transducción lentiviral exitosa de células BMSC

De acuerdo con los valores de MOI obtenidos para hBMSCs en el protocolo de transducción lentiviral de GeneChem, se determinó el volumen correspondiente de virus a

utilizar. El lentivirus adquirido contenía fluorescencia verde GFP y resistencia a puromicina. A las 72 horas post-transducción, se observó la intensidad fluorescente mediante microscopía. Posteriormente, se añadió puromicina (concentración final 5  $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ ) para seleccionar las hBMSCs, obteniendo finalmente una línea celular estable hBMSC transducida lentiviralmente (Figura 17A). El análisis de eficiencia de transducción mediante RT-qPCR reveló una expresión aumentada de PTCSC3 en el grupo tratado con el mimético de PTCSC3 (Figura 17B).

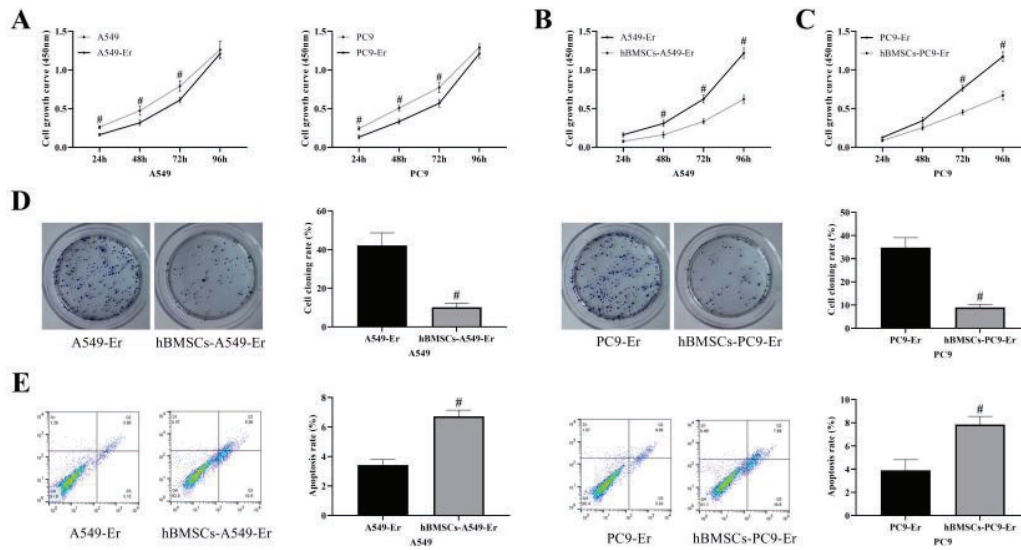


**Figura 17.** Niveles de expresión de células hBMSC transducidas con lentivirus. El grupo control es hBMSCs-LV-NC; el grupo experimental es hBMSCs tratado con lentivirus mimético de PTCSC3. LV: lentivirus. Los valores se expresan como media  $\pm$  DE,  $**P < 0.01$ .

## 12. Impacto de los exosomas derivados de hBMSCs que contienen PTCSC3 sobre células LUAD resistentes a erlotinib

Este estudio estableció inicialmente un sistema de co-cultivo de hBMSC y líneas celulares LUAD resistentes al erlotinib. El cocultivo sin contacto directo de los dos tipos de células se logró utilizando insertos Transwell (tamaño de poro 0,4  $\mu\text{m}$ ), lo que garantizó que la comunicación celular se produjera únicamente a través de factores secretados. El sistema de cocultivo se mantuvo a 37  $^{\circ}\text{C}$  con un 5 % de  $\text{CO}_2$  durante 14 días para evaluar los efectos a medio y largo plazo.

Inicialmente, se evaluó la capacidad proliferativa de las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar (LUAD) resistentes a erlotinib (Er-A549 y Er-PC9) mediante el ensayo CCK-8. Los resultados indicaron que, en comparación con las líneas celulares parentales de LUAD (A549 y PC9), la proliferación de las líneas celulares resistentes a erlotinib (Er-A549 y Er-PC9) se redujo significativamente entre las 24 y 72 horas ( $P < 0.05$ ), aunque no se observó una diferencia significativa a las 96 horas en comparación con las líneas celulares parentales ( $P > 0.05$ ) (Figura 18A). Posteriormente, tras el co-cultivo de las líneas celulares LUAD resistentes a erlotinib (Er-A549 y Er-PC9) con medio de cultivo condicionado por hBMSCs durante dos semanas, se observó una disminución significativa en la capacidad proliferativa de las células co-cultivadas hBMSCs-Er-A549 y hBMSCs-Er-PC9 ( $P < 0.05$ ) (Figuras 18B y 18C). Además, la capacidad de formación de colonias de las células Er-A549 y Er-PC9 después del co-cultivo se evaluó mediante un ensayo de formación de colonias. En comparación con las líneas celulares LUAD resistentes a erlotinib (Er-A549 y Er-PC9), la capacidad de formación de colonias de las células co-cultivadas hBMSCs-Er-A549 y hBMSCs-Er-PC9 se redujo significativamente ( $P < 0.05$ ) (Figura 18D). Finalmente, se analizó la apoptosis de las células Er-A549 y Er-PC9 tras el co-cultivo mediante citometría de flujo. Los resultados mostraron que, en comparación con las líneas celulares LUAD resistentes a erlotinib (Er-A549 y Er-PC9), la apoptosis de las células co-cultivadas hBMSCs-Er-A549 y hBMSCs-Er-PC9 aumentó (Figuras 18E y 18F). Los estudios anteriores indican que la actividad celular de las células hBMSCs-Er-A549 y hBMSCs-Er-PC9 se inhibió bajo condiciones de co-cultivo con hBMSCs.



**Figura 18. Impacto de las hBMSCs en células resistentes a fármacos.** (A) El ensayo CCK-8 detectó la actividad de las células LUAD resistentes a erlotinib (Er) establecidas mediante inducción gradual. El símbolo # indica comparación con células resistentes ( $P < 0.05$ ). (B) El ensayo CCK-8 detectó la influencia de las hBMSCs en la proliferación de células A549-Er. (C) El ensayo CCK-8 detectó la influencia de las hBMSCs en la proliferación de células PC9-Er. (D) El ensayo de formación de colonias celulares evaluó el impacto de las hBMSCs en la capacidad clonogénica de las células A549-Er y PC9-Er. (E) La citometría de flujo midió el efecto de las hBMSCs en la apoptosis de las células A549-Er y PC9-Er. El símbolo # indica comparación con las células resistentes después de la intervención con hBMSCs ( $P < 0.05$ ).

### 13. Impacto de la co-cultivación con hBMSCs sobre la expresión de PTCSC3 y el eje Wnt / $\beta$ -Catenina en células LUAD resistentes a erlotinib

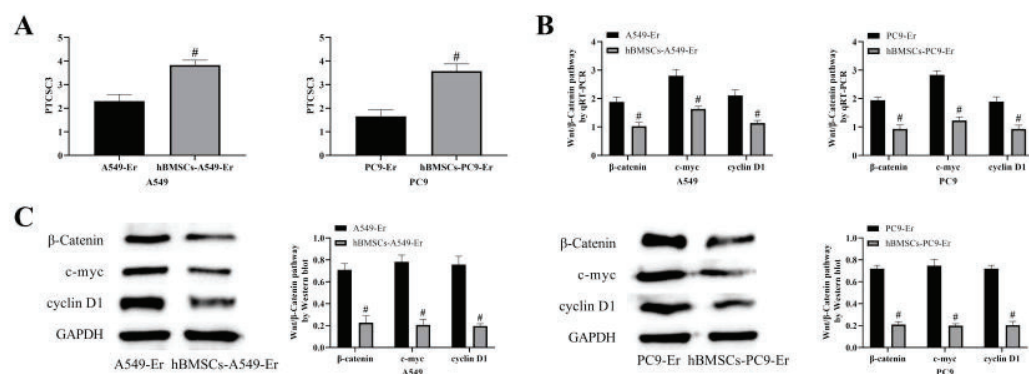
El análisis por PCR reveló que los niveles de expresión relativa de PTCSC3 en las células hBMSCs-Er-A549 y hBMSCs-Er-PC9 después de la co-cultivación fueron de  $(3.83 \pm 0.21)$  y  $(3.57 \pm 0.31)$ , respectivamente, significativamente más altos que en las células Er-A549 ( $P < 0.05$ ).

## RESULTADOS

y Er-PC9 ( $P<0.05$ ) (Figura 19A).

Además, se detectaron niveles reducidos de expresión de ARNm de  $\beta$ -catenina, c-myc y ciclina D1 en las células hBMSCs-Er-A549 y hBMSCs-Er-PC9, lo que indica que la co-cultivación con hBMSCs puede inhibir la expresión del eje Wnt /  $\beta$ -catenina en estas células (Figura 19B).

Los resultados del Western blot (WB) también fueron consistentes, mostrando una reducción en la expresión de las proteínas  $\beta$ -catenina, c-myc y ciclina D1 en hBMSCs-Er-A549 y hBMSCs-Er-PC9 en comparación con Er-A549 y Er-PC9 ( $P<0.05$ ) (Figura 19C).



**Figura 19. Efectos de las hBMSCs sobre PTCSC3 y el eje Wnt /  $\beta$ -Catenina en células resistentes a fármacos.** (A) Nivel de expresión de PTCSC3 mediante qRT-PCR. (B) Nivel de expresión de la vía de señalización Wnt /  $\beta$ -Catenina mediante qRT-PCR. (C) Nivel de expresión de la vía de señalización Wnt /  $\beta$ -Catenina mediante Western blot. Indica comparación con células resistentes ( $P<0.05$ ).

### 14. El impacto de la alteración en la expresión del lncRNA PTCSC3 sobre las células LUAD resistentes a erlotinib

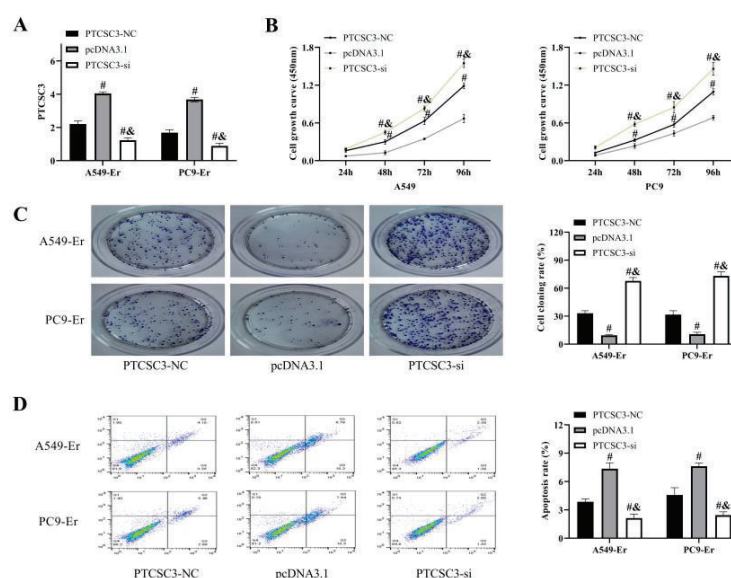
Tras la transfección con vectores de expresión de PTCSC3, se observó una mayor

expresión de PTCSC3 en el grupo pcDNA3.1 en comparación con los grupos PTCSC3-si y PTCSC3-NC, mientras que la expresión de PTCSC3 fue más baja en el grupo PTCSC3-si que en el grupo PTCSC3-NC ( $P<0.05$ ), lo que confirma que la transfección fue exitosa.

Posteriormente, los ensayos CCK-8 revelaron que la capacidad proliferativa del grupo pcDNA3.1 fue inferior a la de los grupos PTCSC3-si y PTCSC3-NC ( $P<0.05$ ), con la tasa de formación de colonias más baja entre los tres grupos ( $P<0.05$ ); tanto la capacidad de proliferación como la tasa de formación de colonias del grupo PTCSC3-si fueron superiores a las del grupo PTCSC3-NC ( $P<0.05$ ).

El análisis por citometría de flujo (FCM) mostró que la tasa de apoptosis fue mayor en el grupo pcDNA3.1 y menor en el grupo PTCSC3-si ( $P<0.05$ ).

Estos hallazgos sugieren que el aumento de la expresión de PTCSC3 puede inhibir el crecimiento de las células LUAD y promover la apoptosis, mientras que la silenciamiento de PTCSC3 produce el efecto opuesto (Figura 20).



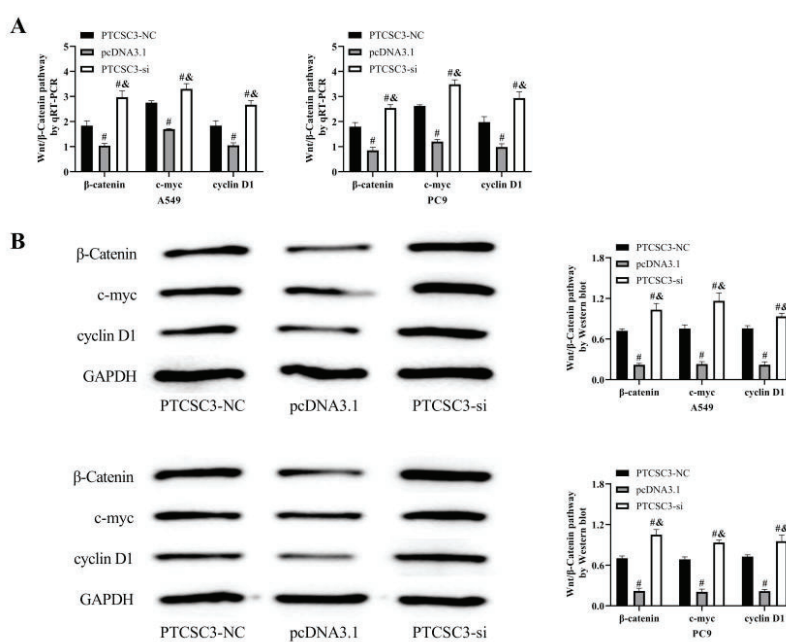
**Figura 20. Influencia de PTCSC3 en células resistentes a fármacos.** (A) Verificación de la eficiencia de transfección mediante qRT-PCR. (B) Curva de crecimiento de células LUAD. (C)



*Formación de colonias en células LUAD. (D) Apoptosis de células LUAD. Indica comparación con el grupo PTCSC3-NC ( $P<0.05$ ); & indica comparación con el grupo pcDNA3.1 ( $P<0.05$ ).*

### 15. Impacto de las alteraciones en la expresión del lncRNA PTCSC3 sobre el eje Wnt / $\beta$ -Catenina

Según los análisis de PCR y Western blot (WB), los niveles de  $\beta$ -catenina, c-myc y ciclina D1 fueron más bajos en el grupo pcDNA3.1 ( $P<0.05$ ), mientras que el grupo PTCSC3-si presentó niveles más altos en comparación con el grupo PTCSC3-NC ( $P<0.05$ ). En consecuencia, la sobreexpresión de PTCSC3 también puede suprimir el eje Wnt /  $\beta$ -Catenina en células LUAD (Figura 21).

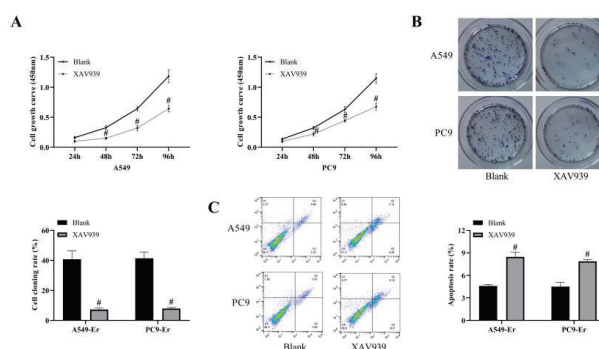


**Figura 21. Impacto de PTCSC3 en el eje de señalización Wnt /  $\beta$ -Catenina. (A) Nivel de expresión del eje Wnt /  $\beta$ -Catenina mediante qRT-PCR. (B) Nivel de expresión del eje Wnt /  $\beta$ -Catenina mediante Western blot. Indica comparación con el grupo PTCSC3-NC ( $P<0.05$ ); & indica comparación con el grupo pcDNA3.1 ( $P<0.05$ ).**



### 16. Impacto de la vía Wnt / $\beta$ -Catenina en las células de LUAD resistentes a erlotinib

El grupo de intervención con XAV939 mostró una proliferación y capacidad de clonación reducidas en comparación con el grupo control, junto con un aumento en las tasas de apoptosis ( $P < 0.05$ ), lo que indica que la inhibición de la vía Wnt /  $\beta$ -Catenina promueve la apoptosis en las células LUAD (Figura 22).

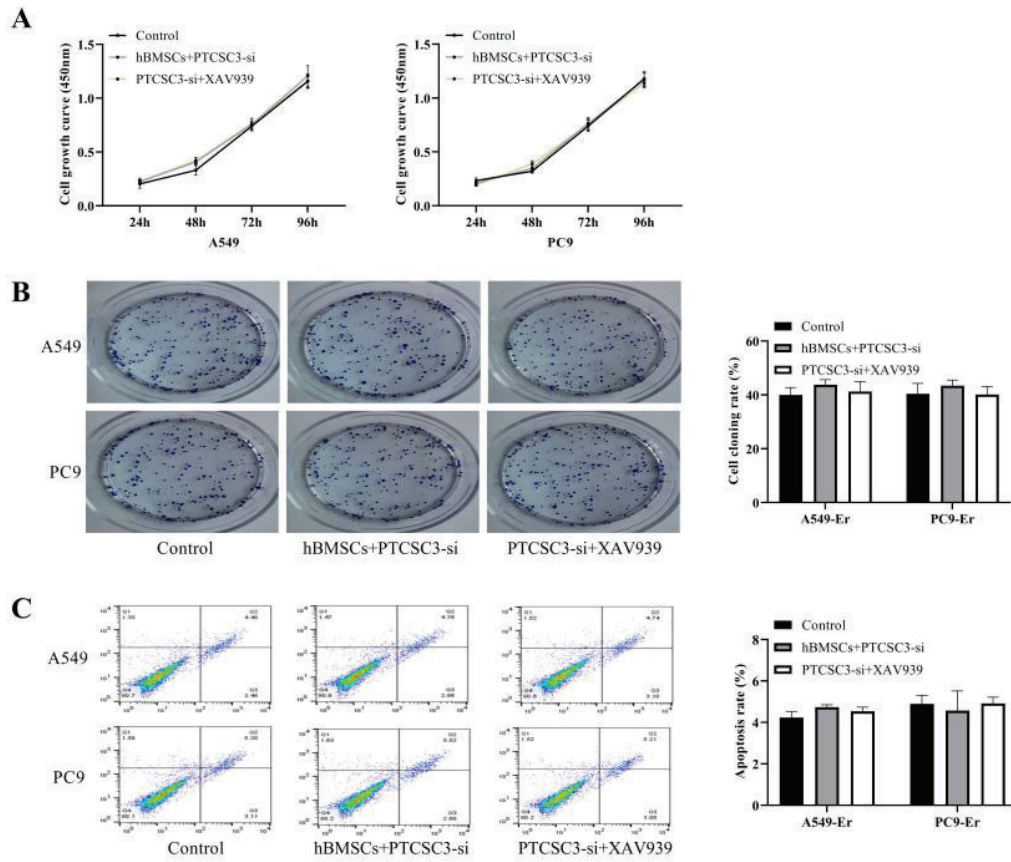


**Figura 22. Influencia del eje Wnt /  $\beta$ -Catenina en células resistentes a erlotinib.** (A) Curva de crecimiento celular de LUAD. (B) Ensayo de clonación celular de LUAD. (C) Apoptosis celular de LUAD. Indica comparación con el grupo control ( $P < 0.05$ ).

### 17. Las hBMSCs revierten la resistencia al erlotinib de las células de LUAD a través del eje PTCSC3 / Wnt / $\beta$ -Catenina

Finalmente, se prepararon células A549-Er y PC9-Er tratadas respectivamente con hBMSCs + vector de silenciamiento de expresión de PTCSC3 y vector de silenciamiento de PTCSC3 + XAV939, utilizando como grupo control las células A549-Er y PC9-Er sin ningún tratamiento, para realizar experimentos de rescate. Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas entre los tres grupos en términos de capacidad de proliferación, tasa de clonación y tasa de apoptosis ( $P > 0.05$ ) (Figura 23).

## RESULTADOS



**Figura 23.** Las hBMSCs revierten la resistencia al erlotinib de las células LUAD a través del eje *PTCSC3* / *Wnt* /  $\beta$ -Catenina. (A) Curva de crecimiento celular de LUAD. (B) Clonación celular de LUAD. (C) Apoptosis celular de LUAD.

## **DISCUSIÓN**

El cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), subtipo predominante del adenocarcinoma pulmonar (LUAD), depende en gran medida del uso de inhibidores de la tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR-TKIs), como erlotinib, para su tratamiento [533-534]. A pesar de la eficacia significativa de erlotinib en pacientes con mutaciones sensibles (por ejemplo, deleciones del exón 19 de EGFR y mutaciones L858R), la resistencia sigue siendo un obstáculo clínico importante, con una mediana de supervivencia libre de progresión (PFS) que oscila entre 10 y 13 meses [535]. Los mecanismos de resistencia son complejos y diversos, incluyendo mutaciones secundarias como EGFR T790M, activación de vías de derivación (como amplificación de MET y sobreexpresión de HER2), así como la activación aberrante de vías de señalización downstream como PI3K / AKT y MAPK [536-538].

En los últimos años, los ARN largos no codificantes (lncRNAs), como moléculas clave en la regulación epigenética, han demostrado participar en la formación de resistencia a fármacos mediante la regulación del microambiente tumoral, la reprogramación metabólica y el eflujo de medicamentos, proporcionando nuevas direcciones para revertir la resistencia [539-540]. Los lncRNAs pueden afectar la resistencia farmacológica regulando directa o indirectamente EGFR y sus vías downstream. Por ejemplo, algunos lncRNAs pro-resistencia como HOTAIR promueven características de células madre tumorales y reducen la sensibilidad a erlotinib activando las vías Wnt /  $\beta$ -catenina o Hippo-YAP [541-542]. Por el contrario, lncRNAs supresores tumorales como MEG3 potencian la respuesta celular a EGFR-TKIs inhibiendo el eje PI3K / AKT / mTOR [543].

La adaptación metabólica de las células tumorales constituye una característica importante de la resistencia a fármacos. Se ha demostrado que ciertos lncRNAs, como PTCSC3, inhiben el metabolismo energético de las células tumorales mediante la regulación de enzimas glucolíticas clave como PGK1, revirtiendo así la resistencia tanto a la quimioterapia como a

terapias dirigidas <sup>[544]</sup>. En LUAD, una regulación metabólica similar podría remodelar la sensibilidad al erlotinib al influir en el estrés oxidativo inducido y la función mitocondrial.

Asimismo, los lncRNAs pueden regular la expresión de genes relacionados con la resistencia a fármacos a través de modificaciones epigenéticas como la metilación del ADN o la acetilación de histonas. Por ejemplo, ANRIL promueve la supervivencia celular reclutando al complejo represor Polycomb (PRC) para silenciar el gen supresor tumoral INK4a / ARF <sup>[545]</sup>. Además, lncRNAs como SNHG9 ayudan a las células tumorales a evadir la muerte celular inducida por fármacos mediante la inhibición de la vía de ferroptosis dependiente de p53 <sup>[546]</sup>.

El gen Wnt1 fue identificado en 1982 al activarse mediante la integración del ADN del virus del tumor mamario murino en tumores mamarios inducidos. La vía de señalización Wnt participa en procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario, el mantenimiento de células madre, la inmunidad celular y la homeostasis, regulando proteínas como Dishevelled, Axin, APC y  $\beta$ -catenina. Según sus mecanismos de activación, la vía Wnt se divide en la vía canónica (dependiente de  $\beta$ -catenina) y las no canónicas. La vía Wnt /  $\beta$ -catenina es la más estudiada en oncología, jugando un rol clave en la iniciación y progresión tumoral.

En ausencia de activación, la  $\beta$ -catenina es degradada por un complejo formado por APC, Axin y otras proteínas, evitando su acumulación intracelular. Cuando la  $\beta$ -catenina nuclear es escasa, los factores TCF / LEF reclutan represores transcripcionales como TLE / Groucho, impidiendo la transcripción de genes diana como c-myc, c-jun, cyclin D1, PLA2G2A y VEGF. No obstante, en presencia de ligandos Wnt, la acumulación de  $\beta$ -catenina en el citoplasma permite su entrada al núcleo, activando la transcripción de estos genes y promoviendo la proliferación celular continua, lo que finalmente conduce a carcinogénesis.

Estudios previos han confirmado que la activación anómala de esta vía contribuye a

diversos cánceres, incluidos gástrico <sup>[547]</sup>, ovárico <sup>[548]</sup>, vesical <sup>[549]</sup>, endometrial <sup>[550]</sup> y colorrectal <sup>[551]</sup>. Además, se ha hallado que la señalización Wnt /  $\beta$ -catenina regula a las células madre en cáncer de intestino, mama <sup>[552]</sup> y piel <sup>[553]</sup>, siendo esencial en el mantenimiento del fenotipo de autorrenovación tumoral.

En fases tempranas del tumor, la señalización Wnt /  $\beta$ -catenina induce proliferación y desdiferenciación mediante genes como c-myc y cyclin D1, pero también puede inducir genes supresores de invasión como PLA2G2A, limitando la progresión acelerada. En tumores avanzados, esta protección puede perderse por silenciamiento epigenético o deleciones, promoviendo un cáncer más agresivo <sup>[554]</sup>.

La resistencia farmacológica tumoral involucra procesos epigenéticos, genéticos, metabólicos y de transducción de señales. Recientemente, múltiples estudios han indicado que las células madre mesenquimales (MSCs) pueden influir en dicha resistencia, constituyendo una vía prometedora para futuras terapias <sup>[555-556]</sup>. Las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana (hBMSCs), subpoblación estromal con potencial de diferenciación hacia osteoblastos, condrocitos, adipocitos y otros, también sustentan la hematopoyesis al secretar factores como IL-6, IL-11 y LIF <sup>[557-558]</sup>. Su capacidad proliferativa e inmunomoduladora las convierte en herramientas clave en terapia celular y génica <sup>[559-560]</sup>, con efectos demostrados sobre la resistencia en linfoma B difuso de células grandes, glioblastoma, entre otros <sup>[561-562]</sup>.

En nuestro estudio, primero identificamos fenotípicamente a las hBMSCs, confirmando expresión positiva de CD29, CD44 y CD106, y negativa de CD34 y CD45, lo cual coincide con características troncales. El ensayo CCK-8 demostró que la resistencia a erlotinib fue inducida con éxito en el modelo celular, pero su proliferación fue inhibida tras exposición a hBMSCs, indicando que estas podrían revertir parcialmente la resistencia en LUAD.

Estudios anteriores muestran que las hBMSCs pueden revertir la resistencia a cisplatino en NSCLC <sup>[563]</sup>, lo que refuerza nuestra hipótesis. Para dilucidar el mecanismo, analizamos la expresión de PTCSC3 tras intervención con hBMSCs, encontrando una expresión aumentada en hBMSCs-A549-Er y hBMSCs-A559-Er. Si bien estudios previos como los de Yang et al. sugieren que PTCSC3 se encuentra disminuido en cáncer, nuestros hallazgos apuntan a que la acción antitumoral de las hBMSCs podría depender de la inducción de PTCSC3 <sup>[564-566]</sup>.

Posteriormente, al transfectar vectores para silenciar o sobreexpresar PTCSC3, se observó que su sobreexpresión redujo el crecimiento y promovió apoptosis en A549 Er y PC9 Er, mientras que el silenciamiento tuvo el efecto contrario. Esto confirma el papel funcional de PTCSC3 mediado por hBMSCs. Estudios previos también demuestran que PTCSC3 promueve la apoptosis en células de cáncer de mama <sup>[567-568]</sup>.

El eje Wnt /  $\beta$ -catenina, bien establecido en LUAD <sup>[569-570]</sup>, podría ser la vía principal por la cual PTCSC3 ejerce su efecto. Observamos que hBMSCs suprimen esta vía en líneas resistentes, y que la elevación de PTCSC3 se correlaciona con la inhibición de Wnt /  $\beta$ -catenina. Por el contrario, el silenciamiento de PTCSC3 restablece la vía. Inhibidores como XAV939 replicaron este efecto, reduciendo la viabilidad y aumentando la apoptosis celular, lo que valida nuestra hipótesis.

Finalmente, la co-intervención con hBMSCs + shPTCSC3 o shPTCSC3 + XAV939 demostró que la supresión de PTCSC3 revierte los efectos antitumorales de hBMSCs, pero estos pueden recuperarse mediante inhibición directa de Wnt /  $\beta$ -catenina, confirmando así que hBMSCs ejercen su efecto revirtiendo la resistencia a erlotinib mediante el eje PTCSC3 / Wnt /  $\beta$ -catenina.

No obstante, nuestro estudio presenta limitaciones. Futuros ensayos in vivo serán

## DISCUSIÓN

---

esenciales para confirmar estos hallazgos. Además, se recomienda realizar ensayos de migración celular (scratch assay) para evaluar de forma integral el comportamiento biológico del LUAD. Es posible que otros factores de transcripción o vías de señalización estén implicados, por lo que se requieren experimentos adicionales para obtener resultados concluyentes con valor clínico.



## **CONCLUSIÓN**

## CONCLUSIÓN

---

La lncRNA PTCSC3 desempeña un papel clave en la regulación de la resistencia a erlotinib en el adenocarcinoma pulmonar (LUAD). Su expresión está significativamente reducida en células y tejidos resistentes, lo que contribuye a fenotipos tumorales más agresivos y con mayor resistencia a fármacos.

La sobreexpresión de PTCSC3, ya sea mediante transfección directa o a través de exosomas derivados de células madre mesenquimales humanas de médula ósea (hBMSCs), revierte la resistencia a erlotinib en modelos celulares de LUAD. Esta intervención restaura la sensibilidad al fármaco, reduce la proliferación, migración e invasión celular, y promueve la apoptosis.

El principal mecanismo molecular identificado implica la modulación negativa de la vía de señalización Wnt /  $\beta$ -Catenina por parte de PTCSC3. La inhibición de esta vía conlleva una disminución en la expresión de dianas oncogénicas asociadas con la resistencia y la progresión tumoral.

Los exosomas derivados de hBMSCs representan una plataforma eficaz y biocompatible para la entrega de lncRNAs terapéuticos como PTCSC3. Su capacidad para transferir material genético funcional a células tumorales resistentes resalta su potencial traslacional en el desarrollo de terapias personalizadas.

Este trabajo proporciona sólida evidencia preclínica que respalda la viabilidad de estrategias basadas en exosomas y lncRNAs para superar la resistencia adquirida a inhibidores de tirosina quinasa en cáncer de pulmón. Sin embargo, se requieren estudios in vivo adicionales y ensayos clínicos para validar la seguridad y eficacia de este enfoque en el ámbito clínico.

## **CONCLUSION**

## CONCLUSION

---

The lncRNA PTCSC3 plays a key role in regulating erlotinib resistance in LUAD (lung adenocarcinoma). Its expression is significantly reduced in resistant cells and tissues, contributing to more aggressive and drug-resistant tumor phenotypes.

Overexpression of PTCSC3, either by direct transfection or via exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSCs), reverses erlotinib resistance in LUAD cell models. This intervention restores drug sensitivity, reduces cell proliferation, migration, and invasion, and promotes apoptosis.

The main molecular mechanism identified involves negative modulation of the Wnt /  $\beta$ -Catenin signaling pathway by PTCSC3. Inhibition of this pathway results in decreased expression of oncogenic targets associated with resistance and tumor progression.

Exosomes derived from hBMSCs represent an effective and biocompatible platform for the delivery of therapeutic lncRNAs such as PTCSC3. Their ability to transfer functional genetic material to resistant tumor cells highlights their translational potential for the development of personalized therapies.

This work provides robust preclinical evidence supporting the feasibility of exosome- and lncRNA-based strategies to overcome acquired tyrosine kinase inhibitor resistance in lung cancer. However, further in vivo studies and clinical trials are required to validate the safety and efficacy of this approach in clinical settings.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322 / caac.21660. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33538338.
- [2] Siegel EM, Ulrich CM, Shibata D. Risk Stratification for Early-onset Colorectal Cancer Screening: Are We Ready for Implementation? *Cancer Prev Res (Phila).* 2023 Sep 1;16(9):479-481. doi: 10.1158 / 1940-6207.CAPR-23-0239. PMID: 37655450.
- [3] Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, Poulsen HS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol.* 1997 Dec;8(12):1197-206. doi: 10.1023 / a:1008209720526. PMID: 9496384.
- [4] Nooreldeen R, Bach H. Current and Future Development in Lung Cancer Diagnosis. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 12;22(16):8661. doi: 10.3390 / ijms22168661. PMID: 34445366; PMCID: PMC8395394.
- [5] Ruco A, Dossa F, Tinmouth J, Llovet D, Jacobson J, Kishibe T, Baxter N. Social Media and mHealth Technology for Cancer Screening: Systematic Review and Meta-analysis. *J Med Internet Res.* 2021 Jul 30;23(7):e26759. doi: 10.2196 / 26759. PMID: 34328423; PMCID: PMC8367160.
- [6] Zhang L, Yip R, Jirapatnakul A, Li M, Cai Q, Henschke CI, Yankelevitz DF; I-ELCAP Investigators. Lung cancer screening intervals based on cancer risk. *Lung Cancer.* 2020 Nov;149:113-119. doi: 10.1016 / j.lungcan.2020.09.013. Epub 2020 Sep 23. PMID: 3300767.
- [7] Hamra GB, Guha N, Cohen A, Laden F, Raaschou-Nielsen O, Samet JM, Vineis P, Forastiere F, Saldiva P, Yorifuji T, Loomis D. Outdoor particulate matter exposure and lung

- cancer: a systematic review and meta-analysis. *Environ Health Perspect.* 2014 Sep;122(9):906-11. doi: 10.1289 / ehp / 1408092. Epub 2014 Jun 6. Erratum in: *Environ Health Perspect.* 2014 Sep;122(9):A236. PMID: 24911630; PMCID: PMC4154221.
- [8] McKay JD, Hung RJ, Han Y, Zong X, Carreras-Torres R, Christiani DC, Caporaso NE, Johansson M, Xiao X, Li Y, Byun J, Dunning A, Pooley KA, Qian DC, Ji X, Liu G, Timofeeva MN, Bojesen SE, Wu X, Le Marchand L, Albanes D, Bickeböllner H, Aldrich MC, Bush WS, Tardon A, Rennert G, Teare MD, Field JK, Kiemeny LA, Lazarus P, Haugen A, Lam S, Schabath MB, Andrew AS, Shen H, Hong YC, Yuan JM, Bertazzi PA, Pesatori AC, Ye Y, Diao N, Su L, Zhang R, Brhane Y, Leighl N, Johansen JS, Møller H, Saliba W, Haiman CA, Wilkens LR, Fernandez-Somoano A, Fernandez-Tardon G, van der Heijden HFM, Kim JH, Dai J, Hu Z, Davies MPA, Marcus MW, Brunnström H, Manjer J, Melander O, Muller DC, Overvad K, Trichopoulou A, Tumino R, Doherty JA, Barnett MP, Chen C, Goodman GE, Cox A, Taylor F, Woll P, Brüske I, Wichmann HE, Manj J, Muley TR, Risch A, Rosenberger A, Grankvist K, Johansson M, Shepherd FA, Tsao MS, Arnold SM, Haura EB, Bolca C, Holcatova I, Janout V, Kontic M, Lissowska J, Mukeria A, Ognjanovic S, Orłowski TM, Scelo G, Swiatkowska B, Zaridze D, Bakke P, Skaug V, Zienolddiny S, Duell EJ, Butler LM, Koh WP, Gao YT, Houlston RS, McLaughlin J, Stevens VL, Joubert P, Lamontagne M, Nickle DC, Obeidat M, Timens W, Zhu B, Song L, Kachuri L, Artigas MS, Tobin MD, Wain LV; SpiroMeta Consortium; Rafnar T, Thorgeirsson TE, Reginsson GW, Stefansson K, Hancock DB, Bierut LJ, Spitz MR, Gaddis NC, Lutz SM, Gu F, Johnson EO, Kamal A, Pikielny C, Zhu D, Lindström S, Jiang X, Tyndale RF, Chenevix-Trench G, Beesley J, Bossé Y, Chanock S, Brennan P, Landi MT, Amos CI. Large-scale association analysis identifies new lung cancer susceptibility loci and heterogeneity in genetic

- susceptibility across histological subtypes. *Nat Genet.* 2017 Jul;49(7):1126-1132. doi: 10.1038 / ng.3892. Epub 2017 Jun 12. PMID: 28604730; PMCID: PMC5510465.
- [9] Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti GV, Douillard JY, Shepherd FA, Stephens RJ, Dunant A, Torri V, Rosell R, Seymour L, Spiro SG, Rolland E, Fossati R, Aubert D, Ding K, Waller D, Le Chevalier T; LACE Collaborative Group. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol.* 2008 Jul 20;26(21):3552-9. doi: 10.1200 / JCO.2007.13.9030. Epub 2008 May 27. PMID: 18506026.
- [10] Pisters KM, Evans WK, Azzoli CG, Kris MG, Smith CA, Desch CE, Somerfield MR, Brouwers MC, Darling G, Ellis PM, Gaspar LE, Pass HI, Spigel DR, Strawn JR, Ung YC, Shepherd FA; Cancer Care Ontario; American Society of Clinical Oncology. Cancer Care Ontario and American Society of Clinical Oncology adjuvant chemotherapy and adjuvant radiation therapy for stages I-IIIa resectable non small-cell lung cancer guideline. *J Clin Oncol.* 2007 Dec 1;25(34):5506-18. doi: 10.1200 / JCO.2007.14.1226. Epub 2007 Oct 22. PMID: 17954710.
- [11] Soria JC, Ohe Y, Vansteenkiste J, Reungwetwattana T, Chewaskulyong B, Lee KH, Dechaphunkul A, Imamura F, Nogami N, Kurata T, Okamoto I, Zhou C, Cho BC, Cheng Y, Cho EK, Voon PJ, Planchard D, Su WC, Gray JE, Lee SM, Hodge R, Marotti M, Rukazenzov Y, Ramalingam SS; FLAURA Investigators. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2018 Jan 11;378(2):113-125. doi: 10.1056 / NEJMoa1713137. Epub 2017 Nov 18. PMID: 29151359.
- [12] Wu YL, Tsuboi M, He J, John T, Grohe C, Majem M, Goldman JW, Laktionov K, Kim SW, Kato T, Vu HV, Lu S, Lee KY, Akewanlop C, Yu CJ, de Marinis F, Bonanno L, Domine M, Shepherd FA, Zeng L, Hodge R, Atasoy A, Rukazenzov Y, Herbst RS; ADAURA



- Investigators. Osimertinib in Resected EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2020 Oct 29;383(18):1711-1723. doi: 10.1056 / NEJMoa2027071. Epub 2020 Sep 19. PMID: 32955177.
- [13] Felip E, Altorki N, Zhou C, Csőszi T, Vynnychenko I, Goloborodko O, Luft A, Akopov A, Martinez-Marti A, Kenmotsu H, Chen YM, Chella A, Sugawara S, Voong D, Wu F, Yi J, Deng Y, McClelland M, Bennett E, Gitlitz B, Wakelee H; IMpower010 Investigators. Adjuvant atezolizumab after adjuvant chemotherapy in resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (IMpower010): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2021 Oct 9;398(10308):1344-1357. doi: 10.1016 / S0140-6736(21)02098-5. Epub 2021 Sep 20. Erratum in: *Lancet*. 2021 Nov 6;398(10312):1686. doi: 10.1016 / S0140-6736(21)02135-8. PMID: 34555333.
- [14] Double Blind Placebo Controlled Study of Adjuvant MEDI4736 in Completely Resected NSCLC. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02273375.
- [15] Torre LA, Siegel RL, Jemal A. Lung Cancer Statistics. *Adv Exp Med Biol*. 2016;893:1-19. doi: 10.1007 / 978-3-319-24223-1\_1. PMID: 26667336.
- [16] Albain KS, Swann RS, Rusch VW, Turrisi AT 3rd, Shepherd FA, Smith C, Chen Y, Livingston RB, Feins RH, Gandara DR, Fry WA, Darling G, Johnson DH, Green MR, Miller RC, Ley J, Sause WT, Cox JD. Radiotherapy plus chemotherapy with or without surgical resection for stage III non-small-cell lung cancer: a phase III randomised controlled trial. *Lancet*. 2009 Aug 1;374(9687):379-86. doi: 10.1016 / S0140-6736(09)60737-6. Epub 2009 Jul 24. PMID: 19632716; PMCID: PMC4407808.
- [17] Aupérin A, Le Péchoux C, Rolland E, Curran WJ, Furuse K, Fournel P, Belderbos J, Clamon G, Ulutin HC, Paulus R, Yamanaka T, Bozonnat MC, Uitterhoeve A, Wang X,

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Stewart L, Arriagada R, Burdett S, Pignon JP. Meta-analysis of concomitant versus sequential radiochemotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010 May 1;28(13):2181-90. doi: 10.1200 / JCO.2009.26.2543. Epub 2010 Mar 29. PMID: 20351327.
- [18] Vokes EE, Herndon JE 2nd, Kelley MJ, Cicchetti MG, Ramnath N, Neill H, Atkins JN, Watson DM, Akerley W, Green MR; Cancer and Leukemia Group B. Induction chemotherapy followed by chemoradiotherapy compared with chemoradiotherapy alone for regionally advanced unresectable stage III Non-small-cell lung cancer: Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol*. 2007 May 1;25(13):1698-704. doi: 10.1200 / JCO.2006.07.3569. Epub 2007 Apr 2. PMID: 17404369.
- [19] Bradley JD, Hu C, Komaki RR, Masters GA, Blumenschein GR, Schild SE, Bogart JA, Forster KM, Magliocco AM, Kavadi VS, Narayan S, Iyengar P, Robinson CG, Wynn RB, Koprowski CD, Olson MR, Meng J, Paulus R, Curran WJ Jr, Choy H. Long-Term Results of NRG Oncology RTOG 0617: Standard- Versus High-Dose Chemoradiotherapy With or Without Cetuximab for Unresectable Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2020 Mar 1;38(7):706-714. doi: 10.1200 / JCO.19.01162. Epub 2019 Dec 16. PMID: 31841363; PMCID: PMC7048161.
- [20] Faivre-Finn C, Vicente D, Kurata T, Planchard D, Paz-Ares L, Vansteenkiste JF, Spigel DR, Garassino MC, Reck M, Senan S, Naidoo J, Rimner A, Wu YL, Gray JE, Özgüroğlu M, Lee KH, Cho BC, Kato T, de Wit M, Newton M, Wang L, Thiyagarajah P, Antonia SJ. Four-Year Survival With Durvalumab After Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC-an Update From the PACIFIC Trial. *J Thorac Oncol*. 2021 May;16(5):860-867. doi: 10.1016 / j.jtho.2020.12.015. Epub 2021 Jan 19. PMID: 33476803.

- [21] Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, Yokoi T, Chiappori A, Lee KH, de Wit M, Cho BC, Bourhaba M, Quantin X, Tokito T, Mekhail T, Planchard D, Kim YC, Karapetis CS, Hiet S, Ostoros G, Kubota K, Gray JE, Paz-Ares L, de Castro Carpeño J, Wadsworth C, Melillo G, Jiang H, Huang Y, Dennis PA, Özgüroğlu M; PACIFIC Investigators. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2017 Nov 16;377(20):1919-1929. doi: 10.1056 / NEJMoA1709937. Epub 2017 Sep 8. PMID: 28885881.
- [22] Rothschild SI, Zippelius A, Eboulet EI, Savic Prince S, Betticher D, Bettini A, Früh M, Joerger M, Lardinois D, Gelpke H, Mauti LA, Britschgi C, Weder W, Peters S, Mark M, Cathomas R, Ochsenbein AF, Janthur WD, Waibel C, Mach N, Froesch P, Buess M, Bohanes P, Godar G, Rusterholz C, Gonzalez M, Pless M; Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). SAKK 16 / 14: Durvalumab in Addition to Neoadjuvant Chemotherapy in Patients With Stage IIIA(N2) Non-Small-Cell Lung Cancer-A Multicenter Single-Arm Phase II Trial. *J Clin Oncol*. 2021 Sep 10;39(26):2872-2880. doi: 10.1200 / JCO.21.00276. Epub 2021 Jul 12. PMID: 34251873.
- [23] Temel JS, Greer JA, Muzikansky A, Gallagher ER, Admane S, Jackson VA, Dahlin CM, Blinderman CD, Jacobsen J, Pirl WF, Billings JA, Lynch TJ. Early palliative care for patients with metastatic non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2010 Aug 19;363(8):733-42. doi: 10.1056 / NEJMoA1000678. PMID: 20818875.
- [24] Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, Colasacco C, Dacic S, Hirsch FR, Kerr K, Kwiatkowski DJ, Ladanyi M, Nowak JA, Sholl L, Temple-Smolkin R, Solomon B, Souter LH, Thunnissen E, Tsao MS, Ventura CB, Wynes MW, Yatabe Y. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer

- Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2018 Mar;142(3):321-346. doi: 10.5858 / arpa.2017-0388-CP. Epub 2018 Jan 22. PMID: 29355391.
- [25] Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, Akerley W, Bauman JR, Bharat A, Bruno DS, Chang JY, Chirieac LR, D'Amico TA, Dilling TJ, Dowell J, Gettinger S, Gubens MA, Hegde A, Hennon M, Lackner RP, Lanuti M, Leal TA, Lin J, Loo BW Jr, Lovly CM, Martins RG, Massarelli E, Morgensztern D, Ng T, Otterson GA, Patel SP, Riely GJ, Schild SE, Shapiro TA, Singh AP, Stevenson J, Tam A, Yanagawa J, Yang SC, Gregory KM, Hughes M. NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer, Version 2.2021. *J Natl Compr Canc Netw*. 2021 Mar 2;19(3):254-266. doi: 10.6004 / jnccn.2021.0013. PMID: 33668021.
- [26] Mithoowani H, Febbraro M. Non-Small-Cell Lung Cancer in 2022: A Review for General Practitioners in Oncology. *Curr Oncol*. 2022 Mar 9;29(3):1828-1839. doi: 10.3390 / curroncol29030150. PMID: 35323350; PMCID: PMC8946954
- [27] Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007 Mar;7(3):169-81. doi: 10.1038 / nrc2088. PMID: 17318210.
- [28] Ramalingam SS, Vansteenkiste J, Planchard D, Cho BC, Gray JE, Ohe Y, Zhou C, Reungwetwattana T, Cheng Y, Chewaskulyong B, Shah R, Cobo M, Lee KH, Cheema P, Tiseo M, John T, Lin MC, Imamura F, Kurata T, Todd A, Hodge R, Saggese M, Rukazenzov Y, Soria JC; FLAURA Investigators. Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC. *N Engl J Med*. 2020 Jan 2;382(1):41-50. doi:

- 10.1056 / NEJMoa1913662. Epub 2019 Nov 21. PMID: 31751012.
- [29] Kunimasa K, Oka T, Hara S, Yamada N, Oizumi S, Miyashita Y, Kamada R, Funamoto T, Kawachi H, Kawamura T, Inoue T, Kuhara H, Tamiya M, Nishino K, Matsunaga T, Imamura F, Fujita M, Kumagai T. Osimertinib is associated with reversible and dose-independent cancer therapy-related cardiac dysfunction. *Lung Cancer*. 2021 Mar;153:186-192. doi: 10.1016 / j.lungcan.2020.10.021. Epub 2020 Nov 16. PMID: 33277055.
- [30] Pikor LA, Ramnarine VR, Lam S, Lam WL. Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications. *Lung Cancer*. 2013 Nov;82(2):179-89. doi: 10.1016 / j.lungcan.2013.07.025. Epub 2013 Aug 20. PMID: 24011633.
- [31] Hanna NH, Robinson AG, Temin S, Baker S Jr, Brahmer JR, Ellis PM, Gaspar LE, Haddad RY, Hesketh PJ, Jain D, Jaiyesimi I, Johnson DH, Leighl NB, Moffitt PR, Phillips T, Riely GJ, Rosell R, Schiller JH, Schneider BJ, Singh N, Spigel DR, Tashbar J, Masters G. Therapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer With Driver Alterations: ASCO and OH (CCO) Joint Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2021 Mar 20;39(9):1040-1091. doi: 10.1200 / JCO.20.03570. Epub 2021 Feb 16. Erratum in: *J Clin Oncol*. 2021 Aug 1;39(22):2520. doi: 10.1200 / JCO.21.01572. PMID: 33591844.
- [32] Hida T, Nokihara H, Kondo M, Kim YH, Azuma K, Seto T, Takiguchi Y, Nishio M, Yoshioka H, Imamura F, Hotta K, Watanabe S, Goto K, Satouchi M, Kozuki T, Shukuya T, Nakagawa K, Mitsudomi T, Yamamoto N, Asakawa T, Asabe R, Tanaka T, Tamura T. Alectinib versus crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer (J-ALEX): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet*. 2017 Jul 1;390(10089):29-39. doi: 10.1016 / S0140-6736(17)30565-2. Epub 2017 May 10. PMID: 28501140.

- [33] Zhou C, Kim SW, Reungwetwattana T, Zhou J, Zhang Y, He J, Yang JJ, Cheng Y, Lee SH, Bu L, Xu T, Yang L, Wang C, Liu T, Morcos PN, Lu Y, Zhang L. Alectinib versus crizotinib in untreated Asian patients with anaplastic lymphoma kinase-positive non-small-cell lung cancer (ALESIA): a randomised phase 3 study. *Lancet Respir Med*. 2019 May;7(5):437-446. doi: 10.1016 / S2213-2600(19)30053-0. Epub 2019 Apr 10. PMID: 30981696.
- [34] Mok T, Camidge DR, Gadgeel SM, Rosell R, Dziadziuszko R, Kim DW, Pérol M, Ou SI, Ahn JS, Shaw AT, Bordogna W, Smoljanović V, Hilton M, Ruf T, Noé J, Peters S. Updated overall survival and final progression-free survival data for patients with treatment-naive advanced ALK-positive non-small-cell lung cancer in the ALEX study. *Ann Oncol*. 2020 Aug;31(8):1056-1064. doi: 10.1016 / j.annonc.2020.04.478. Epub 2020 May 11. PMID: 32418886.
- [35] Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, Massion PP, Siwak-Tapp C, Gonzalez A, Fang R, Mark EJ, Batten JM, Chen H, Wilner KD, Kwak EL, Clark JW, Carbone DP, Ji H, Engelman JA, Mino-Kenudson M, Pao W, Iafrate AJ. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol*. 2012 Mar 10;30(8):863-70. doi: 10.1200 / JCO.2011.35.6345. Epub 2012 Jan 3. PMID: 22215748; PMCID: PMC3295572.
- [36] Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, Riely GJ, Varella-Garcia M, Shapiro GI, Costa DB, Doebele RC, Le LP, Zheng Z, Tan W, Stephenson P, Shreeve SM, Tye LM, Christensen JG, Wilner KD, Clark JW, Iafrate AJ. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2014 Nov 20;371(21):1963-71. doi: 10.1056 / NEJMoa1406766. Epub 2014 Sep 27. PMID: 25264305; PMCID:

PMC4264527.

- [37] Shaw AT, Solomon BJ, Chiari R, Riely GJ, Besse B, Soo RA, Kao S, Lin CC, Bauer TM, Clancy JS, Thurm H, Martini JF, Peltz G, Abbattista A, Li S, Ou SI. Lorlatinib in advanced ROS1-positive non-small-cell lung cancer: a multicentre, open-label, single-arm, phase 1-2 trial. *Lancet Oncol.* 2019 Dec;20(12):1691-1701. doi: 10.1016 / S1470-2045(19)30655-2. Epub 2019 Oct 25. PMID: 31669155.
- [38] Hong DS, Fakih MG, Strickler JH, Desai J, Durm GA, Shapiro GI, Falchook GS, Price TJ, Sacher A, Denlinger CS, Bang YJ, Dy GK, Krauss JC, Kuboki Y, Kuo JC, Coveler AL, Park K, Kim TW, Barlesi F, Munster PN, Ramalingam SS, Burns TF, Meric-Bernstam F, Henary H, Ngang J, Ngarmchamnanrith G, Kim J, Houk BE, Canon J, Lipford JR, Friberg G, Lito P, Govindan R, Li BT. KRAS<sup>G12C</sup> Inhibition with Sotorasib in Advanced Solid Tumors. *N Engl J Med.* 2020 Sep 24;383(13):1207-1217. doi: 10.1056 / NEJMoa1917239. Epub 2020 Sep 20. PMID: 32955176; PMCID: PMC7571518.
- [39] Kerk SA, Papagiannakopoulos T, Shah YM, Lyssiotis CA. Metabolic networks in mutant KRAS-driven tumours: tissue specificities and the microenvironment. *Nat Rev Cancer.* 2021 Aug;21(8):510-525. doi: 10.1038 / s41568-021-00375-9. Epub 2021 Jul 9. PMID: 34244683; PMCID: PMC10257891.
- [40] Rizvi NA, Mazières J, Planchard D, Stinchcombe TE, Dy GK, Antonia SJ, Horn L, Lena H, Minenza E, Mennezier B, Otterson GA, Campos LT, Gandara DR, Levy BP, Nair SG, Zalcman G, Wolf J, Souquet PJ, Baldini E, Cappuzzo F, Chouaid C, Dowlati A, Sanborn R, Lopez-Chavez A, Grohe C, Huber RM, Harbison CT, Baudalet C, Lestini BJ, Ramalingam SS. Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063):

- a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol.* 2015 Mar;16(3):257-65. doi: 10.1016 / S1470-2045(15)70054-9. Epub 2015 Feb 20. PMID: 25704439; PMCID: PMC5726228.
- [41] Borghaei H, Gettinger S, Vokes EE, Chow LQM, Burgio MA, de Castro Carpeno J, Pluzanski A, Arrieta O, Frontera OA, Chiari R, Butts C, Wójcik-Tomaszewska J, Coudert B, Garassino MC, Ready N, Felip E, García MA, Waterhouse D, Domine M, Barlesi F, Antonia S, Wohlleber M, Gerber DE, Czyzewicz G, Spigel DR, Crino L, Eberhardt WEE, Li A, Marimuthu S, Brahmer J. Five-Year Outcomes From the Randomized, Phase III Trials CheckMate 017 and 057: Nivolumab Versus Docetaxel in Previously Treated Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2021 Mar 1;39(7):723-733. doi: 10.1200 / JCO.20.01605. Epub 2021 Jan 15. Erratum in: *J Clin Oncol.* 2021 Apr 1;39(10):1190. doi: 10.1200 / JCO.21.00546. PMID: 33449799; PMCID: PMC8078445.
- [42] Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, Gottfried M, Peled N, Tafreshi A, Cuffe S, O'Brien M, Rao S, Hotta K, Leal TA, Riess JW, Jensen E, Zhao B, Pietanza MC, Brahmer JR. Five-Year Outcomes With Pembrolizumab Versus Chemotherapy for Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score  $\geq 50$ . *J Clin Oncol.* 2021 Jul 20;39(21):2339-2349. doi: 10.1200 / JCO.21.00174. Epub 2021 Apr 19. PMID: 33872070; PMCID: PMC8280089.
- [43] Herbst RS, Giaccone G, de Marinis F, Reinmuth N, Vergnenegre A, Barrios CH, Morise M, Felip E, Andric Z, Geater S, Özgüroğlu M, Zou W, Sandler A, Enquist I, Komatsubara K, Deng Y, Kuriki H, Wen X, McClelland M, Mocchi S, Jassem J, Spigel DR. Atezolizumab for First-Line Treatment of PD-L1-Selected Patients with NSCLC. *N Engl J Med.* 2020 Oct 1;383(14):1328-1339. doi: 10.1056 / NEJMoa1917346. PMID: 32997907.
- [44] Sezer A, Kilickap S, Gümüş M, Bondarenko I, Özgüroğlu M, Gogishvili M, Turk HM,



- Cicin I, Bentsion D, Gladkov O, Clingan P, Sriuranpong V, Rizvi N, Gao B, Li S, Lee S, McGuire K, Chen CI, Makharadze T, Paydas S, Nechaeva M, Seebach F, Weinreich DM, Yancopoulos GD, Gullo G, Lowy I, Rietschel P. Cemiplimab monotherapy for first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer with PD-L1 of at least 50%: a multicentre, open-label, global, phase 3, randomised, controlled trial. *Lancet*. 2021 Feb 13;397(10274):592-604. doi: 10.1016 / S0140-6736(21)00228-2. PMID: 33581821.
- [45] Gadgeel S, Rodríguez-Abreu D, Speranza G, Esteban E, Felip E, Dómine M, Hui R, Hochmair MJ, Clingan P, Powell SF, Cheng SY, Bischoff HG, Peled N, Grossi F, Jennens RR, Reck M, Garon EB, Novello S, Rubio-Viqueira B, Boyer M, Kurata T, Gray JE, Yang J, Bas T, Pietanza MC, Garassino MC. Updated Analysis From KEYNOTE-189: Pembrolizumab or Placebo Plus Pemetrexed and Platinum for Previously Untreated Metastatic Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2020 May 10;38(14):1505-1517. doi: 10.1200 / JCO.19.03136. Epub 2020 Mar 9. PMID: 32150489.
- [46] Gadgeel S, Rodríguez-Abreu D, Speranza G, Esteban E, Felip E, Dómine M, Hui R, Hochmair MJ, Clingan P, Powell SF, Cheng SY, Bischoff HG, Peled N, Grossi F, Jennens RR, Reck M, Garon EB, Novello S, Rubio-Viqueira B, Boyer M, Kurata T, Gray JE, Yang J, Bas T, Pietanza MC, Garassino MC. Updated Analysis From KEYNOTE-189: Pembrolizumab or Placebo Plus Pemetrexed and Platinum for Previously Untreated Metastatic Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2020 May 10;38(14):1505-1517. doi: 10.1200 / JCO.19.03136. Epub 2020 Mar 9. PMID: 32150489.
- [47] Reck M, Ciuleanu TE, Cobo M, Schenker M, Zurawski B, Menezes J, Richardet E, Bennouna J, Felip E, Juan-Vidal O, Alexandru A, Sakai H, Lingua A, Reyes F, Souquet PJ, De Marchi P, Martin C, Pérol M, Scherpereel A, Lu S, Paz-Ares L, Carbone DP, Memaj A,

- Marimuthu S, Zhang X, Tran P, John T. First-line nivolumab plus ipilimumab with two cycles of chemotherapy versus chemotherapy alone (four cycles) in advanced non-small-cell lung cancer: CheckMate 9LA 2-year update. *ESMO Open*. 2021 Oct;6(5):100273. doi: 10.1016 / j.esmoop.2021.100273. Epub 2021 Oct 1. Erratum in: *ESMO Open*. 2021 Dec;6(6):100345. doi: 10.1016 / j.esmoop.2021.100345. PMID: 34607285; PMCID: PMC8493593.
- [48] Wang Y, Zhou S, Yang F, Qi X, Wang X, Guan X, Shen C, Duma N, Vera Aguilera J, Chintakuntlawar A, Price KA, Molina JR, Pagliaro LC, Halfdanarson TR, Grothey A, Markovic SN, Nowakowski GS, Ansell SM, Wang ML. Treatment-Related Adverse Events of PD-1 and PD-L1 Inhibitors in Clinical Trials: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2019 Jul 1;5(7):1008-1019. doi: 10.1001 / jamaoncol.2019.0393. PMID: 31021376; PMCID: PMC6487913.
- [49] Groner B, von Manstein V. Jak Stat signaling and cancer: Opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition. *Mol Cell Endocrinol*. 2017 Aug 15;451:1-14. doi: 10.1016 / j.mce.2017.05.033. Epub 2017 May 30. PMID: 28576744.
- [50] Liongue C, Sertori R, Ward AC. Evolution of Cytokine Receptor Signaling. *J Immunol*. 2016 Jul 1;197(1):11-8. doi: 10.4049 / jimmunol.1600372. PMID: 27317733.
- [51] Groner B, Hennighausen L. The versatile regulation of cellular events by Jak-Stat signaling: from transcriptional control to microtubule dynamics and energy metabolism. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2012 Jun;10(1):193-200. doi: 10.1515 / hmbci-2012-0010. PMID: 25436675.
- [52] Gong AH, Wei P, Zhang S, Yao J, Yuan Y, Zhou AD, Lang FF, Heimberger AB, Rao G, Huang S. FoxM1 Drives a Feed-Forward STAT3-Activation Signaling Loop That Promotes

- the Self-Renewal and Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells. *Cancer Res.* 2015 Jun 1;75(11):2337-48. doi: 10.1158 / 0008-5472.CAN-14-2800. Epub 2015 Apr 1. PMID: 25832656; PMCID: PMC4452436.
- [53] Bouchekioua A, Scourzic L, de Wever O, Zhang Y, Cervera P, Aline-Fardin A, Mercher T, Gaulard P, Nyga R, Jeziorowska D, Douay L, Vainchenker W, Louache F, Gespach C, Solary E, Coppo P. JAK3 deregulation by activating mutations confers invasive growth advantage in extranodal nasal-type natural killer cell lymphoma. *Leukemia.* 2014 Feb;28(2):338-48. doi: 10.1038 / leu.2013.157. Epub 2013 May 21. PMID: 23689514.
- [54] Mirtti T, Leiby BE, Abdulghani J, Aaltonen E, Pavela M, Mamtani A, Alanen K, Egevad L, Granfors T, Josefsson A, Stattin P, Bergh A, Nevalainen MT. Nuclear Stat5a / b predicts early recurrence and prostate cancer-specific death in patients treated by radical prostatectomy. *Hum Pathol.* 2013 Mar;44(3):310-9. doi: 10.1016 / j.humpath.2012.06.001. Epub 2012 Sep 29. PMID: 23026195; PMCID: PMC3548055.
- [55] Zhang X, Hu F, Li G, Li G, Yang X, Liu L, Zhang R, Zhang B, Feng Y. Human colorectal cancer-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through IL-6 / JAK2 / STAT3 signaling. *Cell Death Dis.* 2018 Jan 18;9(2):25. doi: 10.1038 / s41419-017-0176-3. PMID: 29348540; PMCID: PMC5833830.
- [56] McGuire JJ, Frieling JS, Lo CH, Li T, Muhammad A, Lawrence HR, Lawrence NJ, Cook LM, Lynch CC. Mesenchymal stem cell-derived interleukin-28 drives the selection of apoptosis resistant bone metastatic prostate cancer. *Nat Commun.* 2021 Feb 1;12(1):723. doi: 10.1038 / s41467-021-20962-6. PMID: 33526787; PMCID: PMC7851397.
- [57] He N, Kong Y, Lei X, Liu Y, Wang J, Xu C, Wang Y, Du L, Ji K, Wang Q, Li Z, Liu Q. MSCs inhibit tumor progression and enhance radiosensitivity of breast cancer cells by

- down-regulating Stat3 signaling pathway. *Cell Death Dis.* 2018 Oct 8;9(10):1026. doi: 10.1038 / s41419-018-0949-3. PMID: 30297887; PMCID: PMC6175943.
- [58] Dragomir MP, Manyam GC, Ott LF, Berland L, Knutsen E, Ivan C, Lipovich L, Broom BM, Calin GA. FuncPEP: A Database of Functional Peptides Encoded by Non-Coding RNAs. *Noncoding RNA.* 2020 Sep 23;6(4):41. doi: 10.3390 / ncna6040041. PMID: 32977531; PMCID: PMC7712257.
- [59] Carrington JC, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science.* 2003 Jul 18;301(5631):336-8. doi: 10.1126 / science.1085242. PMID: 12869753.
- [60] Pang KC, Frith MC, Mattick JS. Rapid evolution of noncoding RNAs: lack of conservation does not mean lack of function. *Trends Genet.* 2006 Jan;22(1):1-5. doi: 10.1016 / j.tig.2005.10.003. Epub 2005 Nov 10. PMID: 16290135.
- [61] Chen LL. The biogenesis and emerging roles of circular RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016 Apr;17(4):205-11. doi: 10.1038 / nrm.2015.32. Epub 2016 Feb 24. PMID: 26908011.
- [62] Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell.* 2018 Mar 22;173(1):20-51. doi: 10.1016 / j.cell.2018.03.006. PMID: 29570994; PMCID: PMC6091663.
- [63] Dragomir MP, Knutsen E, Calin GA. Classical and noncanonical functions of miRNAs in cancers. *Trends Genet.* 2022 Apr;38(4):379-394. doi: 10.1016 / j.tig.2021.10.002. Epub 2021 Oct 30. PMID: 34728089.
- [64] Dragomir MP, Knutsen E, Calin GA. SnapShot: Unconventional miRNA Functions. *Cell.* 2018 Aug 9;174(4):1038-1038.e1. doi: 10.1016 / j.cell.2018.07.040. PMID: 30096304.
- [65] Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8;47(D1):D155-D162. doi: 10.1093 / nar / gky1141. PMID: 30423142; PMCID: PMC6323917.

- [66] Londin E, Loher P, Telonis AG, Quann K, Clark P, Jing Y, Hatzimichael E, Kirino Y, Honda S, Lally M, Ramratnam B, Comstock CE, Knudsen KE, Gomella L, Spaeth GL, Hark L, Katz LJ, Witkiewicz A, Rostami A, Jimenez SA, Hollingsworth MA, Yeh JJ, Shaw CA, McKenzie SE, Bray P, Nelson PT, Zupo S, Van Roosbroeck K, Keating MJ, Calin GA, Yeo C, Jimbo M, Cozzitorto J, Brody JR, Delgrosso K, Mattick JS, Fortina P, Rigoutsos I. Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Mar 10;112(10):E1106-15. doi: 10.1073 / pnas.1420955112. Epub 2015 Feb 23. PMID: 25713380; PMCID: PMC4364231.
- [67] Ha M, Pang M, Agarwal V, Chen ZJ. Interspecies regulation of microRNAs and their targets. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Nov;1779(11):735-42. doi: 10.1016 / j.bbagr.2008.03.004. Epub 2008 Mar 25. PMID: 18407843; PMCID: PMC2586835.
- [68] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 26;99(24):15524-9. doi: 10.1073 / pnas.242606799. Epub 2002 Nov 14. PMID: 12434020; PMCID: PMC137750.
- [69] Anfossi S, Babayan A, Pantel K, Calin GA. Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018 Sep;15(9):541-563. doi: 10.1038 / s41571-018-0035-x. PMID: 29784926.
- [70] Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015 Jun;15(6):321-33. doi: 10.1038 / nrc3932. PMID: 25998712; PMCID: PMC4859809.
- [71] Song S, Ajani JA. The role of microRNAs in cancers of the upper gastrointestinal tract. *Nat*

- Rev Gastroenterol Hepatol. 2013 Feb;10(2):109-18. doi: 10.1038 / nrgastro.2012.210. Epub 2012 Nov 20. PMID: 23165235; PMCID: PMC3855852.
- [72] Hong DS, Kang YK, Borad M, Sachdev J, Ejadi S, Lim HY, Brenner AJ, Park K, Lee JL, Kim TY, Shin S, Becerra CR, Falchook G, Stoudemire J, Martin D, Kelnar K, Peltier H, Bonato V, Bader AG, Smith S, Kim S, O'Neill V, Beg MS. Phase 1 study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer*. 2020 May;122(11):1630-1637. doi: 10.1038 / s41416-020-0802-1. Epub 2020 Apr 2. PMID: 32238921; PMCID: PMC7251107.
- [73] Fabbri M, Girnita L, Varani G, Calin GA. Decrypting noncoding RNA interactions, structures, and functional networks. *Genome Res*. 2019 Sep;29(9):1377-1388. doi: 10.1101 / gr.247239.118. Epub 2019 Aug 21. PMID: 31434680; PMCID: PMC6724670.
- [74] Pisignano G, Napoli S, Magistri M, Mapelli SN, Pastori C, Di Marco S, Civenni G, Albino D, Enriquez C, Allegrini S, Mitra A, D'Ambrosio G, Mello-Grand M, Chiorino G, Garcia-Escudero R, Varani G, Carbone GM, Catapano CV. A promoter-proximal transcript targeted by genetic polymorphism controls E-cadherin silencing in human cancers. *Nat Commun*. 2017 May 30;8:15622. doi: 10.1038 / ncomms15622. PMID: 28555645; PMCID: PMC5459991.
- [75] Carlevaro-Fita J, Johnson R. Global Positioning System: Understanding Long Noncoding RNAs through Subcellular Localization. *Mol Cell*. 2019 Mar 7;73(5):869-883. doi: 10.1016 / j.molcel.2019.02.008. PMID: 30849394.
- [76] Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat Rev Genet*. 2016 Jan;17(1):47-62. doi: 10.1038 / nrg.2015.10. PMID: 26666209.
- [77] Dragomir MP, Kopetz S, Ajani JA, Calin GA. Non-coding RNAs in GI cancers: from

- cancer hallmarks to clinical utility. *Gut*. 2020 Apr;69(4):748-763. doi: 10.1136 / gutjnl-2019-318279. Epub 2020 Feb 7. PMID: 32034004.
- [78] Ji P, Diederichs S, Wang W, Böing S, Metzger R, Schneider PM, Tidow N, Brandt B, Buerger H, Bulk E, Thomas M, Berdel WE, Serve H, Müller-Tidow C. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 2003 Sep 11;22(39):8031-41. doi: 10.1038 / sj.onc.1206928. PMID: 12970751.
- [79] Chevli KK, Duff M, Walter P, Yu C, Capuder B, Elshafei A, Malczewski S, Kattan MW, Jones JS. Urinary PCA3 as a predictor of prostate cancer in a cohort of 3,073 men undergoing initial prostate biopsy. *J Urol*. 2014 Jun;191(6):1743-8. doi: 10.1016 / j.juro.2013.12.005. Epub 2013 Dec 11. PMID: 24333241.
- [80] Calin GA, Liu CG, Ferracin M, Hyslop T, Spizzo R, Sevignani C, Fabbri M, Cimmino A, Lee EJ, Wojcik SE, Shimizu M, Tili E, Rossi S, Taccioli C, Pichiorri F, Liu X, Zupo S, Herlea V, Gramantieri L, Lanza G, Alder H, Rassenti L, Volinia S, Schmittgen TD, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. Ultraconserved regions encoding ncRNAs are altered in human leukemias and carcinomas. *Cancer Cell*. 2007 Sep;12(3):215-29. doi: 10.1016 / j.ccr.2007.07.027. PMID: 17785203.
- [81] Fabris L, Calin GA. Understanding the Genomic Ultraconservations: T-UCRs and Cancer. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2017;333:159-172. doi: 10.1016 / bs.ircmb.2017.04.004. Epub 2017 Jun 7. PMID: 28729024.
- [82] Rigoutsos I, Lee SK, Nam SY, Anfossi S, Pasculli B, Pichler M, Jing Y, Rodriguez-Aguayo C, Telonis AG, Rossi S, Ivan C, Catela Ivkovic T, Fabris L, Clark PM, Ling H, Shimizu M, Redis RS, Shah MY, Zhang X, Okugawa Y, Jung EJ, Tsirigos A,

- Huang L, Ferdin J, Gafà R, Spizzo R, Nicoloso MS, Paranjape AN, Shariati M, Tiron A, Yeh JJ, Teruel-Montoya R, Xiao L, Melo SA, Menter D, Jiang ZQ, Flores ER, Negrini M, Goel A, Bar-Eli M, Mani SA, Liu CG, Lopez-Berestein G, Berindan-Neagoe I, Esteller M, Kopetz S, Lanza G, Calin GA. N-BLR, a primate-specific non-coding transcript leads to colorectal cancer invasion and migration. *Genome Biol.* 2017 May 24;18(1):98. doi: 10.1186 / s13059-017-1224-0. PMID: 28535802; PMCID: PMC5442648.
- [83] Pichler M, Rodriguez-Aguayo C, Nam SY, Dragomir MP, Bayraktar R, Anfossi S, Knutsen E, Ivan C, Fuentes-Mattei E, Lee SK, Ling H, Catela Ivkovic T, Huang G, Huang L, Okugawa Y, Katayama H, Taguchi A, Bayraktar E, Bhattacharya R, Amero P, He WR, Tran AM, Vychytilova-Faltejskova P, Klec C, Bonilla DL, Zhang X, Kapitanovic S, Loncar B, Gafà R, Wang Z, Cristini V, Hanash SM, Bar-Eli M, Lanza G, Slaby O, Goel A, Rigoutsos I, Lopez-Berestein G, Calin GA. Therapeutic potential of FLANC, a novel primate-specific long non-coding RNA in colorectal cancer. *Gut.* 2020 Oct;69(10):1818-1831. doi: 10.1136 / gutjnl-2019-318903. Epub 2020 Jan 27. PMID: 31988194; PMCID: PMC7382985.
- [84] Rigoutsos I, Huynh T, Miranda K, Tsirigos A, McHardy A, Platt D. Short blocks from the noncoding parts of the human genome have instances within nearly all known genes and relate to biological processes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Apr 25;103(17):6605-10. doi: 10.1073 / pnas.0601688103. Epub 2006 Apr 24. PMID: 16636294; PMCID: PMC1447521.
- [85] Dragomir MP, Tudor S, Okubo K, Shimizu M, Chen M, Giza DE, He WR, Ivan C, Calin GA, Vasilescu C. The non-coding RNome after splenectomy. *J Cell Mol Med.* 2019 Nov;23(11):7844-7858. doi: 10.1111 / jcomm.14664. Epub 2019 Sep 8. PMID: 31496026;



---

PMCID: PMC6815812.

- [86] Dragomir M, Calin GA. Circular RNAs in Cancer - Lessons Learned From microRNAs. *Front Oncol.* 2018 May 28;8:179. doi: 10.3389 / fonc.2018.00179. Erratum in: *Front Oncol.* 2018 Sep 21;8:307. doi: 10.3389 / fonc.2018.00307. PMID: 29911069; PMCID: PMC5992376.
- [87] Ruskin B, Green MR. An RNA processing activity that debranches RNA lariats. *Science.* 1985 Jul 12;229(4709):135-40. doi: 10.1126 / science.2990042. PMID: 2990042.
- [88] Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK, Kjems J. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature.* 2013 Mar 21;495(7441):384-8. doi: 10.1038 / nature11993. Epub 2013 Feb 27. PMID: 23446346.
- [89] Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, Maier L, Mackowiak SD, Gregersen LH, Munschauer M, Loewer A, Ziebold U, Landthaler M, Kocks C, le Noble F, Rajewsky N. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature.* 2013 Mar 21;495(7441):333-8. doi: 10.1038 / nature11928. Epub 2013 Feb 27. PMID: 23446348.
- [90] Du WW, Fang L, Yang W, Wu N, Awan FM, Yang Z, Yang BB. Induction of tumor apoptosis through a circular RNA enhancing Foxo3 activity. *Cell Death Differ.* 2017 Feb;24(2):357-370. doi: 10.1038 / cdd.2016.133. Epub 2016 Nov 25. PMID: 27886165; PMCID: PMC5299715.
- [91] Salzman J, Chen RE, Olsen MN, Wang PL, Brown PO. Cell-type specific features of circular RNA expression. *PLoS Genet.* 2013;9(9):e1003777. doi: 10.1371 / journal.pgen.1003777. Epub 2013 Sep 5. Erratum in: *PLoS Genet.* 2013 Dec;9(12). doi:10.1371 / annotation / f782282b-eefa-4c8d-985c-b1484e845855. PMID: 24039610;

PMCID: PMC3764148.

- [92] Redis RS, Vela LE, Lu W, Ferreira de Oliveira J, Ivan C, Rodriguez-Aguayo C, Adamoski D, Pasculli B, Taguchi A, Chen Y, Fernandez AF, Valledor L, Van Roosbroeck K, Chang S, Shah M, Kinnebrew G, Han L, Atlasi Y, Cheung LH, Huang GY, Monroig P, Ramirez MS, Catela Ivkovic T, Van L, Ling H, Gafã R, Kapitanovic S, Lanza G, Bankson JA, Huang P, Lai SY, Bast RC, Rosenblum MG, Radovich M, Ivan M, Bartholomeusz G, Liang H, Fraga MF, Widger WR, Hanash S, Berindan-Neagoe I, Lopez-Berestein G, Ambrosio ALB, Gomes Dias SM, Calin GA. Allele-Specific Reprogramming of Cancer Metabolism by the Long Non-coding RNA CCAT2. *Mol Cell*. 2016 Feb 18;61(4):520-534. doi: 10.1016 / j.molcel.2016.01.015. Epub 2016 Feb 4. Erratum in: *Mol Cell*. 2016 Feb 18;61(4):640. PMID: 26853146; PMCID: PMC4982398.
- [93] Meyer M, Paquet A, Arguel MJ, Peyre L, Gomes-Pereira LC, Lebrigand K, Mograbi B, Brest P, Waldmann R, Barbry P, Hofman P, Roux J. Profiling the Non-genetic Origins of Cancer Drug Resistance with a Single-Cell Functional Genomics Approach Using Predictive Cell Dynamics. *Cell Syst*. 2020 Oct 21;11(4):367-374.e5. doi: 10.1016 / j.cels.2020.08.019. Epub 2020 Sep 23. PMID: 33099406.
- [94] Pardini B, Sabo AA, Birolo G, Calin GA. Noncoding RNAs in Extracellular Fluids as Cancer Biomarkers: The New Frontier of Liquid Biopsies. *Cancers (Basel)*. 2019 Aug 14;11(8):1170. doi: 10.3390 / cancers11081170. PMID: 31416190; PMCID: PMC6721601.
- [95] Fabbri M, Paone A, Calore F, Galli R, Gaudio E, Santhanam R, Lovat F, Fadda P, Mao C, Nuovo GJ, Zanesi N, Crawford M, Ozer GH, Wernicke D, Alder H, Caligiuri MA, Nana-Sinkam P, Perrotti D, Croce CM. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jul

- 31;109(31):E2110-6. doi: 10.1073 / pnas.1209414109. Epub 2012 Jul 2. PMID: 22753494; PMCID: PMC3412003.
- [96] Dragomir M, Mafra ACP, Dias SMG, Vasilescu C, Calin GA. Using microRNA Networks to Understand Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018 Jun 26;19(7):1871. doi: 10.3390 / ijms19071871. PMID: 29949872; PMCID: PMC6073868.
- [97] Thomson DW, Dinger ME. Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy. *Nat Rev Genet*. 2016 May;17(5):272-83. doi: 10.1038 / nrg.2016.20. Epub 2016 Apr 4. PMID: 27040487.
- [98] Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*. 2005 Jan;205(2):275-92. doi: 10.1002 / path.1706. PMID: 15641020.
- [99] Lippert TH, Ruoff HJ, Volm M. Intrinsic and acquired drug resistance in malignant tumors. The main reason for therapeutic failure. *Arzneimittelforschung*. 2008;58(6):261-4. doi: 10.1055 / s-0031-1296504. PMID: 18677966.
- [100] Santoni-Rugiu E, Melchior LC, Urbanska EM, Jakobsen JN, Stricker K, Grauslund M, Sørensen JB. Intrinsic resistance to EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: Differences and Similarities with Acquired Resistance. *Cancers (Basel)*. 2019 Jul 1;11(7):923. doi: 10.3390 / cancers11070923. PMID: 31266248; PMCID: PMC6678669.
- [101] Yu KD, Di GH, Wu J, Lu JS, Shen KW, Liu GY, Shen ZZ, Shao ZM. Breast cancer patients with estrogen receptor-negative / progesterone receptor-positive tumors: being younger and getting less benefit from adjuvant tamoxifen treatment. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008 Dec;134(12):1347-54. doi: 10.1007 / s00432-008-0414-2. Epub 2008 May 17. PMID: 18488249.

- [102] Vinogradov S, Wei X. Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine. *Nanomedicine (Lond)*. 2012 Apr;7(4):597-615. doi: 10.2217 / nmm.12.22. PMID: 22471722; PMCID: PMC3376090.
- [103] Chen Z, Shi T, Zhang L, Zhu P, Deng M, Huang C, Hu T, Jiang L, Li J. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett*. 2016 Jan 1;370(1):153-64. doi: 10.1016 / j.canlet.2015.10.010. Epub 2015 Oct 20. PMID: 26499806.
- [104] Neel DS, Bivona TG. Resistance is futile: overcoming resistance to targeted therapies in lung adenocarcinoma. *NPJ Precis Oncol*. 2017;1:3. doi: 10.1038 / s41698-017-0007-0. Epub 2017 Mar 20. PMID: 29152593; PMCID: PMC5687582.
- [105] Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018 Feb;15(2):81-94. doi: 10.1038 / nrclinonc.2017.166. Epub 2017 Nov 8. PMID: 29115304.
- [106] Ling H, Spizzo R, Atlasi Y, Nicoloso M, Shimizu M, Redis RS, Nishida N, Gafà R, Song J, Guo Z, Ivan C, Barbarotto E, De Vries I, Zhang X, Ferracin M, Churchman M, van Galen JF, Beverloo BH, Shariati M, Haderk F, Estecio MR, Garcia-Manero G, Patijn GA, Gotley DC, Bhardwaj V, Shureiqi I, Sen S, Multani AS, Welsh J, Yamamoto K, Taniguchi I, Song MA, Gallinger S, Casey G, Thibodeau SN, Le Marchand L, Tiirikainen M, Mani SA, Zhang W, Davuluri RV, Mimori K, Mori M, Sieuwerts AM, Martens JW, Tomlinson I, Negrini M, Berindan-Neagoe I, Foekens JA, Hamilton SR, Lanza G, Kopetz S, Fodde R, Calin GA. CCAT2, a novel noncoding RNA mapping to 8q24, underlies metastatic progression and chromosomal instability in colon cancer. *Genome Res*. 2013 Sep;23(9):1446-61. doi: 10.1101 / gr.152942.112. Epub 2013 Jun 24. PMID: 23796952;

- PMCID: PMC3759721.
- [107] Chen B, Dragomir MP, Fabris L, Bayraktar R, Knutsen E, Liu X, Tang C, Li Y, Shimura T, Ivkovic TC, De Los Santos MC, Anfossi S, Shimizu M, Shah MY, Ling H, Shen P, Multani AS, Pardini B, Burks JK, Katayama H, Reineke LC, Huo L, Syed M, Song S, Ferracin M, Oki E, Fromm B, Ivan C, Bhuvaneshwar K, Gusev Y, Mimori K, Menter D, Sen S, Matsuyama T, Uetake H, Vasilescu C, Kopetz S, Parker-Thornburg J, Taguchi A, Hanash SM, Girnita L, Slaby O, Goel A, Varani G, Gagea M, Li C, Ajani JA, Calin GA. The Long Noncoding RNA CCAT2 Induces Chromosomal Instability Through BOP1-AURKB Signaling. *Gastroenterology*. 2020 Dec;159(6):2146-2162.e33. doi: 10.1053 / j.gastro.2020.08.018. Epub 2020 Aug 15. PMID: 32805281; PMCID: PMC7725986.
- [108] He W, Liang B, Wang C, Li S, Zhao Y, Huang Q, Liu Z, Yao Z, Wu Q, Liao W, Zhang S, Liu Y, Xiang Y, Liu J, Shi M. MSC-regulated lncRNA MACC1-AS1 promotes stemness and chemoresistance through fatty acid oxidation in gastric cancer. *Oncogene*. 2019 Jun;38(23):4637-4654. doi: 10.1038 / s41388-019-0747-0. Epub 2019 Feb 11. PMID: 30742067; PMCID: PMC6756048.
- [109] Drayton RM, Dudzic E, Peter S, Bertz S, Hartmann A, Bryant HE, Catto JW. Reduced expression of miRNA-27a modulates cisplatin resistance in bladder cancer by targeting the cystine / glutamate exchanger SLC7A11. *Clin Cancer Res*. 2014 Apr 1;20(7):1990-2000. doi: 10.1158 / 1078-0432.CCR-13-2805. Epub 2014 Feb 10. PMID: 24516043; PMCID: PMC3974662.
- [110] Huang X, Li Z, Zhang Q, Wang W, Li B, Wang L, Xu Z, Zeng A, Zhang X, Zhang X, He Z, Li Q, Sun G, Wang S, Li Q, Wang L, Zhang L, Xu H, Xu Z. Circular RNA AKT3

- upregulates PIK3R1 to enhance cisplatin resistance in gastric cancer via miR-198 suppression. *Mol Cancer*. 2019 Mar 30;18(1):71. doi: 10.1186 / s12943-019-0969-3. PMID: 30927924; PMCID: PMC6441201.
- [111] Ellis LM, Hicklin DJ. Resistance to Targeted Therapies: Refining Anticancer Therapy in the Era of Molecular Oncology. *Clin Cancer Res*. 2009 Dec 15;15(24):7471-7478. doi: 10.1158 / 1078-0432.CCR-09-1070. PMID: 20008847.
- [112] Molina AM, Lin X, Korytowsky B, Matczak E, Lechuga MJ, Wiltshire R, Motzer RJ. Sunitinib objective response in metastatic renal cell carcinoma: analysis of 1059 patients treated on clinical trials. *Eur J Cancer*. 2014 Jan;50(2):351-8. doi: 10.1016 / j.ejca.2013.08.021. Epub 2013 Sep 16. PMID: 24051327.
- [113] Qu L, Ding J, Chen C, Wu ZJ, Liu B, Gao Y, Chen W, Liu F, Sun W, Li XF, Wang X, Wang Y, Xu ZY, Gao L, Yang Q, Xu B, Li YM, Fang ZY, Xu ZP, Bao Y, Wu DS, Miao X, Sun HY, Sun YH, Wang HY, Wang LH. Exosome-Transmitted lncARSR Promotes Sunitinib Resistance in Renal Cancer by Acting as a Competing Endogenous RNA. *Cancer Cell*. 2016 May 9;29(5):653-668. doi: 10.1016 / j.ccell.2016.03.004. Epub 2016 Apr 21. PMID: 27117758.
- [114] Lu Y, Zhao X, Liu Q, Li C, Graves-Deal R, Cao Z, Singh B, Franklin JL, Wang J, Hu H, Wei T, Yang M, Yeatman TJ, Lee E, Saito-Diaz K, Hinger S, Patton JG, Chung CH, Emmrich S, Klusmann JH, Fan D, Coffey RJ. lncRNA MIR100HG-derived miR-100 and miR-125b mediate cetuximab resistance via Wnt /  $\beta$ -Catenina signaling. *Nat Med*. 2017 Nov;23(11):1331-1341. doi: 10.1038 / nm.4424. Epub 2017 Oct 16. PMID: 29035371; PMCID: PMC5961502.
- [115] Chen J, Jin R, Zhao J, Liu J, Ying H, Yan H, Zhou S, Liang Y, Huang D, Liang X, Yu H,

- Lin H, Cai X. Potential molecular, cellular and microenvironmental mechanism of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2015 Oct 10;367(1):1-11. doi: 10.1016 / j.canlet.2015.06.019. Epub 2015 Jul 10. PMID: 26170167.
- [116] Xu WP, Liu JP, Feng JF, Zhu CP, Yang Y, Zhou WP, Ding J, Huang CK, Cui YL, Ding CH, Zhang X, Lu B, Xie WF. miR-541 potentiates the response of human hepatocellular carcinoma to sorafenib treatment by inhibiting autophagy. *Gut.* 2020 Jul;69(7):1309-1321. doi: 10.1136 / gutjnl-2019-318830. Epub 2019 Nov 14. PMID: 31727683.
- [117] Xu J, Ji L, Liang Y, Wan Z, Zheng W, Song X, Gorshkov K, Sun Q, Lin H, Zheng X, Chen J, Jin RA, Liang X, Cai X. CircRNA-SORE mediates sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma by stabilizing YBX1. *Signal Transduct Target Ther.* 2020 Dec 26;5(1):298. doi: 10.1038 / s41392-020-00375-5. PMID: 33361760; PMCID: PMC7762756.
- [118] Park SY, Kim JY, Jun Y, Nam JS. Strategies to Tackle Radiation Resistance by Penetrating Cancer Stem Cell Line of Scrimmage. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2018;13(1):18-39. doi: 10.2174 / 1574892812666171003150410. PMID: 28971778.
- [119] Barker HE, Paget JT, Khan AA, Harrington KJ. The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nat Rev Cancer.* 2015 Jul;15(7):409-25. doi: 10.1038 / nrc3958. Erratum in: *Nat Rev Cancer.* 2015 Aug;15(8):509. PMID: 26105538; PMCID: PMC4896389.
- [120] Guo Z, Wang YH, Xu H, Yuan CS, Zhou HH, Huang WH, Wang H, Zhang W. LncRNA linc00312 suppresses radiotherapy resistance by targeting DNA-PKcs and impairing DNA damage repair in nasopharyngeal carcinoma. *Cell Death Dis.* 2021 Jan 4;12(1):69. doi: 10.1038 / s41419-020-03302-2. PMID: 33431817; PMCID: PMC7801696.

- [121] Pajic M, Froio D, Daly S, Doculara L, Millar E, Graham PH, Drury A, Steinmann A, de Bock CE, Boulghourjian A, Zaratzian A, Carroll S, Toohey J, O'Toole SA, Harris AL, Buffa FM, Gee HE, Hollway GE, Molloy TJ. miR-139-5p Modulates Radiotherapy Resistance in Breast Cancer by Repressing Multiple Gene Networks of DNA Repair and ROS Defense. *Cancer Res.* 2018 Jan 15;78(2):501-515. doi: 10.1158 / 0008-5472.CAN-16-3105. Epub 2017 Nov 27. PMID: 29180477.
- [122] Yuan Y, Liao H, Pu Q, Ke X, Hu X, Ma Y, Luo X, Jiang Q, Gong Y, Wu M, Liu L, Zhu W. miR-410 induces both epithelial-mesenchymal transition and radioresistance through activation of the PI3K / mTOR pathway in non-small cell lung cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2020 Jun 12;5(1):85. doi: 10.1038 / s41392-020-0182-2. PMID: 32528035; PMCID: PMC7290026.
- [123] Xia X, Li X, Li F, Wu X, Zhang M, Zhou H, Huang N, Yang X, Xiao F, Liu D, Yang L, Zhang N. A novel tumor suppressor protein encoded by circular AKT3 RNA inhibits glioblastoma tumorigenicity by competing with active phosphoinositide-dependent Kinase-1. *Mol Cancer.* 2019 Aug 30;18(1):131. doi: 10.1186 / s12943-019-1056-5. Erratum in: *Mol Cancer.* 2019 Oct 29;18(1):149. doi: 10.1186 / s12943-019-1083-2. Erratum in: *Mol Cancer.* 2022 Jun 7;21(1):124. doi: 10.1186 / s12943-022-01584-y. PMID: 31470874; PMCID: PMC6716823.
- [124] Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, Weber JS, Margolin K, Hamid O, Patt D, Chen TT, Berman DM, Wolchok JD. Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol.* 2015 Jun 10;33(17):1889-94. doi: 10.1200 / JCO.2014.56.2736. Epub 2015 Feb 9. PMID: 25667295; PMCID: PMC5089162.



- [125] Jenkins RW, Barbie DA, Flaherty KT. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Br J Cancer*. 2018 Jan;118(1):9-16. doi: 10.1038 / bjc.2017.434. Epub 2018 Jan 2. PMID: 29319049; PMCID: PMC5765236.
- [126] Hu Q, Ye Y, Chan LC, Li Y, Liang K, Lin A, Egranov SD, Zhang Y, Xia W, Gong J, Pan Y, Chatterjee SS, Yao J, Evans KW, Nguyen TK, Park PK, Liu J, Coarfa C, Donepudi SR, Putluri V, Putluri N, Sreekumar A, Ambati CR, Hawke DH, Marks JR, Gunaratne PH, Caudle AS, Sahin AA, Hortobagyi GN, Meric-Bernstam F, Chen L, Yu D, Hung MC, Curran MA, Han L, Lin C, Yang L. Oncogenic lncRNA downregulates cancer cell antigen presentation and intrinsic tumor suppression. *Nat Immunol*. 2019 Jul;20(7):835-851. doi: 10.1038 / s41590-019-0400-7. Epub 2019 Jun 3. PMID: 31160797; PMCID: PMC6619502.
- [127] Gebhardt C, Sevko A, Jiang H, Lichtenberger R, Reith M, Tarnanidis K, Holland-Letz T, Umansky L, Beckhove P, Sucker A, Schadendorf D, Utikal J, Umansky V. Myeloid Cells and Related Chronic Inflammatory Factors as Novel Predictive Markers in Melanoma Treatment with Ipilimumab. *Clin Cancer Res*. 2015 Dec 15;21(24):5453-9. doi: 10.1158 / 1078-0432.CCR-15-0676. Epub 2015 Aug 19. PMID: 26289067.
- [128] Huber V, Vallacchi V, Fleming V, Hu X, Cova A, Dugo M, Shahaj E, Sulsenti R, Vergani E, Filipazzi P, De Laurentiis A, Lalli L, Di Guardo L, Patuzzo R, Vergani B, Casiraghi E, Cossa M, Gualeni A, Bollati V, Arienti F, De Braud F, Mariani L, Villa A, Altevogt P, Umansky V, Rodolfo M, Rivoltini L. Tumor-derived microRNAs induce myeloid suppressor cells and predict immunotherapy resistance in melanoma. *J Clin Invest*. 2018 Dec 3;128(12):5505-5516. doi: 10.1172 / JCI98060. Epub 2018 Nov 5. PMID: 30260323; PMCID: PMC6264733.

- [129] Huang XY, Zhang PF, Wei CY, Peng R, Lu JC, Gao C, Cai JB, Yang X, Fan J, Ke AW, Zhou J, Shi GM. Circular RNA circMET drives immunosuppression and anti-PD1 therapy resistance in hepatocellular carcinoma via the miR-30-5p / snail / DPP4 axis. *Mol Cancer*. 2020 May 19;19(1):92. doi: 10.1186 / s12943-020-01213-6. Erratum in: *Mol Cancer*. 2024 Feb 29;23(1):44. doi: 10.1186 / s12943-024-01969-1. PMID: 32430013; PMCID: PMC7236145.
- [130] Zhang PF, Gao C, Huang XY, Lu JC, Guo XJ, Shi GM, Cai JB, Ke AW. Cancer cell-derived exosomal circUHRF1 induces natural killer cell exhaustion and may cause resistance to anti-PD1 therapy in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer*. 2020 Jun 27;19(1):110. doi: 10.1186 / s12943-020-01222-5. PMID: 32593303; PMCID: PMC7320583.
- [131] Mayeux R. Biomarkers: potential uses and limitations. *NeuroRx*. 2004 Apr;1(2):182-8. doi: 10.1602 / neuroRx.1.2.182. PMID: 15717018; PMCID: PMC534923.
- [132] Henry NL, Hayes DF. Cancer biomarkers. *Mol Oncol*. 2012 Apr;6(2):140-6. doi: 10.1016 / j.molonc.2012.01.010. Epub 2012 Feb 6. PMID: 22356776; PMCID: PMC5528374.
- [133] Aberuyi N, Rahgozar S, Ghodousi ES, Ghaedi K. Drug Resistance Biomarkers and Their Clinical Applications in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Front Oncol*. 2020 Jan 17;9:1496. doi: 10.3389 / fonc.2019.01496. PMID: 32010613; PMCID: PMC6978753.
- [134] Bolha L, Ravnik-Glavač M, Glavač D. Long Noncoding RNAs as Biomarkers in Cancer. *Dis Markers*. 2017;2017:7243968. doi: 10.1155 / 2017 / 7243968. Epub 2017 May 29. PMID: 28634418; PMCID: PMC5467329.
- [135] Lan H, Lu H, Wang X, Jin H. MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: opportunities and challenges. *Biomed Res Int*. 2015;2015:125094. doi: 10.1155 / 2015 / 125094. Epub

- 2015 Mar 22. PMID: 25874201; PMCID: PMC4385606.
- [136] Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, Guernec G, Martin D, Merkel A, Knowles DG, Lagarde J, Veeravalli L, Ruan X, Ruan Y, Lassmann T, Carninci P, Brown JB, Lipovich L, Gonzalez JM, Thomas M, Davis CA, Shiekhata R, Gingeras TR, Hubbard TJ, Notredame C, Harrow J, Guigó R. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* 2012 Sep;22(9):1775-89. doi: 10.1101 / gr.132159.111. PMID: 22955988; PMCID: PMC3431493.
- [137] Hu G, Tang Q, Sharma S, Yu F, Escobar TM, Muljo SA, Zhu J, Zhao K. Expression and regulation of intergenic long noncoding RNAs during T cell development and differentiation. *Nat Immunol.* 2013 Nov;14(11):1190-8. doi: 10.1038 / ni.2712. Epub 2013 Sep 22. PMID: 24056746; PMCID: PMC3805781.
- [138] Zhang Y, Li B, Bai Q, Wang P, Wei G, Li Z, Hu L, Tian Q, Zhou J, Huang Q, Wang Z, Yue S, Wu J, Yang L, Zhou X, Jiang L, Ni T, Ye L, Wu Y. The lncRNA Snhg1-Vps13D vesicle trafficking system promotes memory CD8 T cell establishment via regulating the dual effects of IL-7 signaling. *Signal Transduct Target Ther.* 2021 Mar 24;6(1):126. doi: 10.1038 / s41392-021-00492-9. PMID: 33758164; PMCID: PMC7987995.
- [139] Alix-Panabières C. The future of liquid biopsy. *Nature.* 2020 Mar;579(7800):S9. doi: 10.1038 / d41586-020-00844-5. PMID: 32214259.
- [140] Barth DA, Drula R, Ott L, Fabris L, Slaby O, Calin GA, Pichler M. Circulating Non-coding RNAs in Renal Cell Carcinoma-Pathogenesis and Potential Implications as Clinical Biomarkers. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Sep 15;8:828. doi: 10.3389 / fcell.2020.00828. PMID: 33042985; PMCID: PMC7523432.

- [141] Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 22;108(12):5003-8. doi: 10.1073 / pnas.1019055108. Epub 2011 Mar 7. PMID: 21383194; PMCID: PMC3064324.
- [142] Rayner KJ, Hennessy EJ. Extracellular communication via microRNA: lipid particles have a new message. *J Lipid Res*. 2013 May;54(5):1174-81. doi: 10.1194 / jlr.R034991. Epub 2013 Mar 15. PMID: 23505318; PMCID: PMC3622315.
- [143] Vickers KC, Remaley AT. Lipid-based carriers of microRNAs and intercellular communication. *Curr Opin Lipidol*. 2012 Apr;23(2):91-7. doi: 10.1097 / MOL.0b013e328350a425. PMID: 22418571; PMCID: PMC5570485.
- [144] Zhang HG, Grizzle WE. Exosomes: a novel pathway of local and distant intercellular communication that facilitates the growth and metastasis of neoplastic lesions. *Am J Pathol*. 2014 Jan;184(1):28-41. doi: 10.1016 / j.ajpath.2013.09.027. Epub 2013 Nov 21. PMID: 24269592; PMCID: PMC3873490.
- [145] Dragomir M, Chen B, Calin GA. Exosomal lncRNAs as new players in cell-to-cell communication. *Transl Cancer Res*. 2018 Mar;7(Suppl 2):S243-S252. doi: 10.21037 / tcr.2017.10.46. PMID: 30148073; PMCID: PMC6107076.
- [146] Zhang J, Zhang K, Bi M, Jiao X, Zhang D, Dong Q. Circulating microRNA expressions in colorectal cancer as predictors of response to chemotherapy. *Anticancer Drugs*. 2014 Mar;25(3):346-52. doi: 10.1097 / CAD.0000000000000049. PMID: 24304648.
- [147] Kjersem JB, Ikdahl T, Lingjaerde OC, Guren T, Tveit KM, Kure EH. Plasma microRNAs predicting clinical outcome in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line

- oxaliplatin-based treatment. *Mol Oncol.* 2014 Feb;8(1):59-67. doi: 10.1016 / j.molonc.2013.09.001. Epub 2013 Sep 21. PMID: 24119443; PMCID: PMC5528512.
- [148] Rasmussen MH, Jensen NF, Tarpgaard LS, Qvortrup C, Rømer MU, Stenvang J, Hansen TP, Christensen LL, Lindebjerg J, Hansen F, Jensen BV, Hansen TF, Pfeiffer P, Brünner N, Ørntoft TF, Andersen CL. High expression of microRNA-625-3p is associated with poor response to first-line oxaliplatin based treatment of metastatic colorectal cancer. *Mol Oncol.* 2013 Jun;7(3):637-46. doi: 10.1016 / j.molonc.2013.02.016. Epub 2013 Feb 28. PMID: 23506979; PMCID: PMC5528477.
- [149] Rasmussen MH, Lyskjær I, Jersie-Christensen RR, Tarpgaard LS, Primdal-Bengtson B, Nielsen MM, Pedersen JS, Hansen TP, Hansen F, Olsen JV, Pfeiffer P, Ørntoft TF, Andersen CL. miR-625-3p regulates oxaliplatin resistance by targeting MAP2K6-p38 signalling in human colorectal adenocarcinoma cells. *Nat Commun.* 2016 Aug 16;7:12436. doi: 10.1038 / ncomms12436. PMID: 27526785; PMCID: PMC4990699.
- [150] Xu W, Hua Y, Deng F, Wang D, Wu Y, Zhang W, Tang J. MiR-145 in cancer therapy resistance and sensitivity: A comprehensive review. *Cancer Sci.* 2020 Sep;111(9):3122-3131. doi: 10.1111 / cas.14517. Epub 2020 Jul 8. PMID: 32506767; PMCID: PMC7469794.
- [151] Pan YJ, Zhuang Y, Zheng JN, Pei DS. MiR-106a: Promising biomarker for cancer. *Bioorg Med Chem Lett.* 2016 Nov 15;26(22):5373-5377. doi: 10.1016 / j.bmcl.2016.10.042. Epub 2016 Oct 15. PMID: 27780637.
- [152] Lu H, Lu S, Yang D, Zhang L, Ye J, Li M, Hu W. MiR-20a-5p regulates gemcitabine chemosensitivity by targeting RRM2 in pancreatic cancer cells and serves as a predictor for gemcitabine-based chemotherapy. *Biosci Rep.* 2019 May 7;39(5):BSR20181374. doi:

- 10.1042 / BSR20181374. PMID: 30777929; PMCID: PMC6504660.
- [153] Zhu W, Liu M, Fan Y, Ma F, Xu N, Xu B. Dynamics of circulating microRNAs as a novel indicator of clinical response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Cancer Med*. 2018 Sep;7(9):4420-4433. doi: 10.1002 / cam4.1723. Epub 2018 Aug 11. PMID: 30099860; PMCID: PMC6144164.
- [154] Xiong Y, Sun F, Dong P, Watari H, Yue J, Yu MF, Lan CY, Wang Y, Ma ZB. iASPP induces EMT and cisplatin resistance in human cervical cancer through miR-20a-FBXL5 / BTG3 signaling. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017 Apr 11;36(1):48. doi: 10.1186 / s13046-017-0520-6. PMID: 28399926; PMCID: PMC5387376.
- [155] Zhang Y, Zheng L, Ding Y, Li Q, Wang R, Liu T, Sun Q, Yang H, Peng S, Wang W, Chen L. MiR-20a Induces Cell Radioresistance by Activating the PTEN / PI3K / Akt Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2015 Aug 1;92(5):1132-1140. doi: 10.1016 / j.ijrobp.2015.04.007. Epub 2015 Apr 13. PMID: 26031366.
- [156] Pu Y, Yi Q, Zhao F, Wang H, Cai W, Cai S. MiR-20a-5p represses multi-drug resistance in osteosarcoma by targeting the KIF26B gene. *Cancer Cell Int*. 2016 Aug 5;16:64. doi: 10.1186 / s12935-016-0340-3. PMID: 27499703; PMCID: PMC4974744.
- [157] García-García F, Salinas-Vera YM, García-Vázquez R, Marchat LA, Rodríguez-Cuevas S, López-González JS, Carlos-Reyes Á, Ramos-Payán R, Aguilar-Medina M, Pérez-Plasencia C, Ruíz-García E, López-Camarillo C. miR-145-5p is associated with pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy and impairs cell proliferation by targeting TGF $\beta$ R2 in breast cancer. *Oncol Rep*. 2019 Jun;41(6):3527-3534. doi: 10.3892 / or.2019.7102. Epub 2019 Apr 5. PMID: 31002371.

- [158] McGuire A, Casey MC, Waldron RM, Heneghan H, Kalinina O, Holian E, McDermott A, Lowery AJ, Newell J, Dwyer RM, Miller N, Keane M, Brown JAL, Kerin MJ. Prospective Assessment of Systemic MicroRNAs as Markers of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020 Jul 7;12(7):1820. doi: 10.3390 / cancers12071820. PMID: 32645898; PMCID: PMC7408914.
- [159] Lim EL, Trinh DL, Ries RE, Wang J, Gerbing RB, Ma Y, Topham J, Hughes M, Pleasance E, Mungall AJ, Moore R, Zhao Y, Aplenc R, Sung L, Kolb EA, Gamis A, Smith M, Gerhard DS, Alonzo TA, Meshinchi S, Marra MA. MicroRNA Expression-Based Model Indicates Event-Free Survival in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2017 Dec 10;35(35):3964-3977. doi: 10.1200 / JCO.2017.74.7451. Epub 2017 Oct 25. Erratum in: *J Clin Oncol*. 2019 Jan 20;37(3):261. doi: 10.1200 / JCO.18.02104. PMID: 29068783; PMCID: PMC5721230.
- [160] Jin L, Zhang N, Zhang Q, Ding G, Yang Z, Zhang Z. Serum microRNAs as potential new biomarkers for cisplatin resistance in gastric cancer patients. *PeerJ*. 2020 Apr 14;8:e8943. doi: 10.7717 / peerj.8943. PMID: 32328349; PMCID: PMC7164432.
- [161] Qi M, Liu D, Zhang S. MicroRNA-21 contributes to the discrimination of chemoresistance in metastatic gastric cancer. *Cancer Biomark*. 2017;18(4):451-458. doi: 10.3233 / CBM-161732. PMID: 28128744.
- [162] Hamano R, Miyata H, Yamasaki M, Kurokawa Y, Hara J, Moon JH, Nakajima K, Takiguchi S, Fujiwara Y, Mori M, Doki Y. Overexpression of miR-200c induces chemoresistance in esophageal cancers mediated through activation of the Akt signaling pathway. *Clin Cancer Res*. 2011 May 1;17(9):3029-38. doi: 10.1158 / 1078-0432.CCR-10-2532. Epub 2011 Jan 19. PMID: 21248297.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [163] Xiao Y, Yurievich UA, Yosypovych SV. Long noncoding RNA XIST is a prognostic factor in colorectal cancer and inhibits 5-fluorouracil-induced cell cytotoxicity through promoting thymidylate synthase expression. *Oncotarget*. 2017 Aug 24;8(47):83171-83182. doi: 10.18632 / oncotarget.20487. PMID: 29137332; PMCID: PMC5669958.
- [164] Li L, Shang J, Zhang Y, Liu S, Peng Y, Zhou Z, Pan H, Wang X, Chen L, Zhao Q. MEG3 is a prognostic factor for CRC and promotes chemosensitivity by enhancing oxaliplatin-induced cell apoptosis. *Oncol Rep*. 2017 Sep;38(3):1383-1392. doi: 10.3892 / or.2017.5828. Epub 2017 Jul 17. PMID: 28731151; PMCID: PMC5549059.
- [165] Zeng Y, Wang G, Zhou CF, Zhang HB, Sun H, Zhang W, Zhou HH, Liu R, Zhu YS. LncRNA Profile Study Reveals a Three-LncRNA Signature Associated With the Pathological Complete Response Following Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Front Pharmacol*. 2019 May 28;10:574. doi: 10.3389 / fphar.2019.00574. PMID: 31191314; PMCID: PMC6546925.
- [166] Liu R, Zeng Y, Zhou CF, Wang Y, Li X, Liu ZQ, Chen XP, Zhang W, Zhou HH. Long noncoding RNA expression signature to predict platinum-based chemotherapeutic sensitivity of ovarian cancer patients. *Sci Rep*. 2017 Feb 2;7(1):18. doi: 10.1038 / s41598-017-00050-w. PMID: 28154416; PMCID: PMC5428368.
- [167] Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell*. 2008 Aug;15(2):261-71. doi: 10.1016 / j.devcel.2008.07.002. PMID: 18694565; PMCID: PMC2685763.
- [168] Zhu Y, Yang SR, Wang PP, Savas S, Wish T, Zhao J, Green R, Woods M, Sun Z, Roebathan B, Squires J, Buehler S, Dicks E, Zhao J, McLaughlin JR, Parfrey PS, Campbell



- PT. Influence of pre-diagnostic cigarette smoking on colorectal cancer survival: overall and by tumour molecular phenotype. *Br J Cancer*. 2014 Mar 4;110(5):1359-66. doi: 10.1038 / bjcr.2014.6. Epub 2014 Jan 21. PMID: 24448365; PMCID: PMC3950884.
- [169] Tan W, Lin Z, Chen X, Li W, Zhu S, Wei Y, Huo L, Chen Y, Shang C. miR-126-3p contributes to sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma via downregulating SPRED1. *Ann Transl Med*. 2021 Jan;9(1):38. doi: 10.21037 / atm-20-2081. Erratum in: *Ann Transl Med*. 2022 Oct;10(19):1076. doi: 10.21037 / atm-2022-34. PMID: 33553331; PMCID: PMC7859776.
- [170] Lechman ER, Gentner B, Ng SW, Schoof EM, van Galen P, Kennedy JA, Nucera S, Ciceri F, Kaufmann KB, Takayama N, Dobson SM, Trotman-Grant A, Krivdova G, Elzinga J, Mitchell A, Nilsson B, Hermans KG, Eppert K, Marke R, Isserlin R, Voisin V, Bader GD, Zandstra PW, Golub TR, Ebert BL, Lu J, Minden M, Wang JC, Naldini L, Dick JE. miR-126 Regulates Distinct Self-Renewal Outcomes in Normal and Malignant Hematopoietic Stem Cells. *Cancer Cell*. 2016 Feb 8;29(2):214-28. doi: 10.1016 / j.ccell.2015.12.011. Epub 2016 Jan 28. Erratum in: *Cancer Cell*. 2016 Apr 11;29(4):602-606. doi: 10.1016 / j.ccell.2016.03.015. PMID: 26832662; PMCID: PMC4749543.
- [171] Caporali S, Amaro A, Levati L, Alvino E, Lacal PM, Mastroeni S, Ruffini F, Bonmassar L, Antonini Cappellini GC, Felli N, Carè A, Pfeffer U, D'Atri S. miR-126-3p down-regulation contributes to dabrafenib acquired resistance in melanoma by up-regulating ADAM9 and VEGF-A. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019 Jun 21;38(1):272. doi: 10.1186 / s13046-019-1238-4. PMID: 31227006; PMCID: PMC6588909.
- [172] Hoppe R, Achinger-Kawecka J, Winter S, Fritz P, Lo WY, Schroth W, Brauch H.

- Increased expression of miR-126 and miR-10a predict prolonged relapse-free time of primary oestrogen receptor-positive breast cancer following tamoxifen treatment. *Eur J Cancer*. 2013 Nov;49(17):3598-608. doi: 10.1016 / j.ejca.2013.07.145. Epub 2013 Aug 19. PMID: 23968733.
- [173] Rinnerthaler G, Gampenrieder SP, Hackl H, Steiner M, Monzo-Fuentes C, Melchardt T, Magnes T, Huemer F, Westphal T, Hufnagl C, Hauser-Kronberger C, Egle A, Greil R. Low Expression of miR-20a-5p Predicts Benefit to Bevacizumab in Metastatic Breast Cancer Patients Treated within the TANIA Phase III Trial. *J Clin Med*. 2020 Jun 1;9(6):1663. doi: 10.3390 / jcm9061663. PMID: 32492882; PMCID: PMC7355487.
- [174] Zhao Q, Cao J, Wu YC, Liu X, Han J, Huang XC, Jiang LH, Hou XX, Mao WM, Ling ZQ. Circulating miRNAs is a potential marker for gefitinib sensitivity and correlation with EGFR mutational status in human lung cancers. *Am J Cancer Res*. 2015 Apr 15;5(5):1692-705. PMID: 26175938; PMCID: PMC4497436.
- [175] Du W, Sun L, Liu T, Zhu J, Zeng Y, Zhang Y, Wang X, Liu Z, Huang JA. The miR-625-3p / AXL axis induces non-T790M acquired resistance to EGFR-TKI via activation of the TGF- $\beta$  / Smad pathway and EMT in EGFR-mutant non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. 2020 Jul;44(1):185-195. doi: 10.3892 / or.2020.7579. Epub 2020 Apr 8. PMID: 32319651; PMCID: PMC7251657.
- [176] Kou Y, Yang R, Wang Q. Serum miR-518e-5p is a potential biomarker for secondary imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *J Biosci*. 2018 Dec;43(5):1015-1023. PMID: 30541960.
- [177] Bai Y, Su X. Updates to the drug-resistant mechanism of proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2021 Feb;17(1):29-35. doi: 10.1111 /

- ajco.13459. Epub 2020 Sep 13. PMID: 32920949.
- [178] Robak P, Drózd I, Jarych D, Mikulski D, Węglowska E, Siemieniuk-Ryś M, Misiewicz M, Stawiski K, Fendler W, Szemraj J, Smolewski P, Robak T. The Value of Serum MicroRNA Expression Signature in Predicting Refractoriness to Bortezomib-Based Therapy in Multiple Myeloma Patients. *Cancers (Basel)*. 2020 Sep 9;12(9):2569. doi: 10.3390 / cancers12092569. PMID: 32916955; PMCID: PMC7565855.
- [179] Jin J, Guo Y, Dong X, Liu J, He Y. Methylation-associated silencing of miR-193b improves the radiotherapy sensitivity of esophageal cancer cells by targeting cyclin D1 in areas with zinc deficiency. *Radiother Oncol*. 2020 Sep;150:104-113. doi: 10.1016 / j.radonc.2020.06.022. Epub 2020 Jun 21. PMID: 32580002.
- [180] Bulibu J, Wang W, Tang Y, Li N, Saifuding K. Association Between Polymorphisms in the Promoter Region of microRNA-34b / c and the Chemoradiotherapy Efficacy for Locally Advanced Esophageal Squamous Cell Carcinoma in Chinese Han Population. *Pathol Oncol Res*. 2019 Jan;25(1):421-427. doi: 10.1007 / s12253-017-0366-4. Epub 2017 Dec 21. PMID: 29270777.
- [181] Ferrando L, Cirmena G, Garuti A, Scabini S, Grillo F, Mastracci L, Isnaldi E, Marrone C, Gonella R, Murialdo R, Fiocca R, Romairone E, Ballestrero A, Zoppoli G. Development of a long non-coding RNA signature for prediction of response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal adenocarcinoma. *PLoS One*. 2020 Feb 5;15(2):e0226595. doi: 10.1371 / journal.pone.0226595. PMID: 32023246; PMCID: PMC7001901.
- [182] Dragomir M, Chen B, Fu X, Calin GA. Key questions about the checkpoint blockade-are microRNAs an answer? *Cancer Biol Med*. 2018 May;15(2):103-115. doi: 10.20892 /

- j.issn.2095-3941.2018.0006. PMID: 29951335; PMCID: PMC5994554.
- [183] Smolle MA, Calin HN, Pichler M, Calin GA. Noncoding RNAs and immune checkpoints-clinical implications as cancer therapeutics. *FEBS J.* 2017 Jul;284(13):1952-1966. doi: 10.1111 / febs.14030. Epub 2017 Feb 17. PMID: 28132417.
- [184] Grenda A, Krawczyk P. New Dancing Couple: PD-L1 and MicroRNA. *Scand J Immunol.* 2017 Sep;86(3):130-134. doi: 10.1111 / sji.12577. PMID: 28675453.
- [185] Schrock AB, Ouyang C, Sandhu J, Sokol E, Jin D, Ross JS, Miller VA, Lim D, Amanam I, Chao J, Catenacci D, Cho M, Braiteh F, Klempner SJ, Ali SM, Fakih M. Tumor mutational burden is predictive of response to immune checkpoint inhibitors in MSI-high metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2019 Jul 1;30(7):1096-1103. doi: 10.1093 / annonc / mdz134. PMID: 31038663.
- [186] Xia Y, Wang Q, Huang X, Yin X, Song J, Ke Z, Duan X. miRNA-Based Feature Classifier Is Associated with Tumor Mutational Burden in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Biomed Res Int.* 2020 Dec 9;2020:1686480. doi: 10.1155 / 2020 / 1686480. PMID: 33490233; PMCID: PMC7787755.
- [187] Zhou H, Chen L, Qin M, Lei Y, Li T, Li H, Cheng X. An miRNA signature associated with tumor mutation burden in endometrial cancer. *Biosci Rep.* 2020 Nov 27;40(11):BSR20203398. doi: 10.1042 / BSR20203398. PMID: 33141168; PMCID: PMC7670578.
- [188] Lv Y, Huang Z, Lin Y, Fang Y, Chen Z, Pan L, Zhang Y, Xu Z. MiRNA expression patterns are associated with tumor mutational burden in lung adenocarcinoma. *Oncoimmunology.* 2019 Jun 24;8(10):e1629260. doi: 10.1080 / 2162402X.2019.1629260. PMID: 31646073; PMCID: PMC6791442.

- 
- [189] Ding C, Shan Z, Li M, Xia Y, Jin Z. Exploration of the Associations of lncRNA Expression Patterns with Tumor Mutation Burden and Prognosis in Colon Cancer. *Onco Targets Ther.* 2021 Apr 29;14:2893-2909. doi: 10.2147 / OTT.S300095. PMID: 33958876; PMCID: PMC8096447.
- [190] Yang D, Yu J, Han B, Sun Y, Mo S, Hu J. Long Non-coding RNA Expression Patterns in Stomach Adenocarcinoma Serve as an Indicator of Tumor Mutation Burden and Are Associated With Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Microsatellite Instability. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Feb 12;9:618313. doi: 10.3389 / fcell.2021.618313. PMID: 33644056; PMCID: PMC7907456.
- [191] Sudo K, Kato K, Matsuzaki J, Takizawa S, Aoki Y, Shoji H, Iwasa S, Honma Y, Takashima A, Sakamoto H, Naka T, Sekine S, Boku N, Ochiya T. Identification of serum microRNAs predicting the response of esophageal squamous-cell carcinoma to nivolumab. *Jpn J Clin Oncol.* 2020 Feb 17;50(2):114-121. doi: 10.1093 / jjco / hyz146. PMID: 31612917.
- [192] Shukuya T, Ghai V, Amann JM, Okimoto T, Shilo K, Kim TK, Wang K, Carbone DP. Circulating MicroRNAs and Extracellular Vesicle-Containing MicroRNAs as Response Biomarkers of Anti-programmed Cell Death Protein 1 or Programmed Death-Ligand 1 Therapy in NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2020 Nov;15(11):1773-1781. doi: 10.1016 / j.jtho.2020.05.022. Epub 2020 Jun 19. PMID: 32565389; PMCID: PMC7641981.
- [193] Omar HA, El-Serafi AT, Hersi F, Arafa EA, Zaher DM, Madkour M, Arab HH, Tolba MF. Immunomodulatory MicroRNAs in cancer: targeting immune checkpoints and the tumor microenvironment. *FEBS J.* 2019 Sep;286(18):3540-3557. doi: 10.1111 / febs.15000. Epub 2019 Jul 27. PMID: 31306553.

- [194] Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, González S, Sánchez-Cabo F, González MÁ, Bernad A, Sánchez-Madrid F. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun.* 2011;2:282. doi: 10.1038 / ncomms1285. PMID: 21505438; PMCID: PMC3104548.
- [195] Winkle M, El-Daly SM, Fabbri M, Calin GA. Noncoding RNA therapeutics - challenges and potential solutions. *Nat Rev Drug Discov.* 2021 Aug;20(8):629-651. doi: 10.1038 / s41573-021-00219-z. Epub 2021 Jun 18. PMID: 34145432; PMCID: PMC8212082.
- [196] Crooke ST. Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther.* 2017 Apr;27(2):70-77. doi: 10.1089 / nat.2016.0656. Epub 2017 Jan 12. PMID: 28080221; PMCID: PMC5372764.
- [197] Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature.* 2005 Dec 1;438(7068):685-9. doi: 10.1038 / nature04303. Epub 2005 Oct 30. PMID: 16258535.
- [198] Ottosen S, Parsley TB, Yang L, Zeh K, van Doorn LJ, van der Veer E, Raney AK, Hodges MR, Patick AK. In vitro antiviral activity and preclinical and clinical resistance profile of miravirsin, a novel anti-hepatitis C virus therapeutic targeting the human factor miR-122. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Jan;59(1):599-608. doi: 10.1128 / AAC.04220-14. Epub 2014 Nov 10. PMID: 25385103; PMCID: PMC4291405.
- [199] Zhou T, Kim Y, MacLeod AR. Targeting Long Noncoding RNA with Antisense Oligonucleotide Technology as Cancer Therapeutics. *Methods Mol Biol.* 2016;1402:199-213. doi: 10.1007 / 978-1-4939-3378-5\_16. PMID: 26721493.
- [200] Dana H, Chalbatani GM, Mahmoodzadeh H, Karimloo R, Rezaiean O, Moradzadeh A, Mehmandoost N, Moazzen F, Mazraeh A, Marmari V, Ebrahimi M, Rashno MM, Abadi

- SJ, Gharagouzlo E. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *Int J Biomed Sci.* 2017 Jun;13(2):48-57. PMID: 28824341; PMCID: PMC5542916.
- [201] Moore CB, Guthrie EH, Huang MT, Taxman DJ. Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods Mol Biol.* 2010;629:141-58. doi: 10.1007 / 978-1-60761-657-3\_10. PMID: 20387148; PMCID: PMC3679364.
- [202] Yang J, Meng X, Pan J, Jiang N, Zhou C, Wu Z, Gong Z. CRISPR / Cas9-mediated noncoding RNA editing in human cancers. *RNA Biol.* 2018 Jan 2;15(1):35-43. doi: 10.1080 / 15476286.2017.1391443. Epub 2017 Nov 9. PMID: 29028415; PMCID: PMC5785983.
- [203] Ebert MS, Sharp PA. MicroRNA sponges: progress and possibilities. *RNA.* 2010 Nov;16(11):2043-50. doi: 10.1261 / rna.2414110. Epub 2010 Sep 20. PMID: 20855538; PMCID: PMC2957044.
- [204] Wen D, Danquah M, Chaudhary AK, Mahato RI. Small molecules targeting microRNA for cancer therapy: Promises and obstacles. *J Control Release.* 2015 Dec 10;219:237-247. doi: 10.1016 / j.jconrel.2015.08.011. Epub 2015 Aug 6. PMID: 26256260; PMCID: PMC4749151.
- [205] Pedram Fatemi R, Salah-Uddin S, Modarresi F, Khoury N, Wahlestedt C, Faghihi MA. Screening for Small-Molecule Modulators of Long Noncoding RNA-Protein Interactions Using AlphaScreen. *J Biomol Screen.* 2015 Oct;20(9):1132-41. doi: 10.1177 / 1087057115594187. Epub 2015 Jul 14. PMID: 26173710; PMCID: PMC4576503.
- [206] Bader AG, Brown D, Winkler M. The promise of microRNA replacement therapy. *Cancer Res.* 2010 Sep 15;70(18):7027-30. doi: 10.1158 / 0008-5472.CAN-10-2010. Epub 2010 Aug 31. PMID: 20807816; PMCID: PMC2940943.

- [207] Lehmann SM, Krüger C, Park B, Derkow K, Rosenberger K, Baumgart J, Trimbuch T, Eom G, Hinz M, Kaul D, Habbel P, Kälin R, Franzoni E, Rybak A, Nguyen D, Veh R, Ninnemann O, Peters O, Nitsch R, Heppner FL, Golenbock D, Schott E, Ploegh HL, Wulczyn FG, Lehnardt S. An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. *Nat Neurosci.* 2012 Jun;15(6):827-35. doi: 10.1038 / nn.3113. PMID: 22610069.
- [208] LaCasse EC. Pulling the plug on a cancer cell by eliminating XIAP with AEG35156. *Cancer Lett.* 2013 May 28;332(2):215-24. doi: 10.1016 / j.canlet.2012.06.015. Epub 2012 Jul 7. PMID: 22776562.
- [209] Roberts TC, Langer R, Wood MJA. Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2020 Oct;19(10):673-694. doi: 10.1038 / s41573-020-0075-7. Epub 2020 Aug 11. PMID: 32782413; PMCID: PMC7419031.
- [210] Jia Z, Gong Y, Pi Y, Liu X, Gao L, Kang L, Wang J, Yang F, Tang J, Lu W, Li Q, Zhang W, Yan Z, Yu L. pPB Peptide-Mediated siRNA-Loaded Stable Nucleic Acid Lipid Nanoparticles on Targeting Therapy of Hepatic Fibrosis. *Mol Pharm.* 2018 Jan 2;15(1):53-62. doi: 10.1021 / acs.molpharmaceut.7b00709. Epub 2017 Dec 7. PMID: 29148802.
- [211] Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifepour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki K. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett.* 2013 Feb 22;8(1):102. doi: 10.1186 / 1556-276X-8-102. PMID: 23432972; PMCID: PMC3599573.
- [212] Kristen AV, Ajroud-Driss S, Conceição I, Gorevic P, Kyriakides T, Obici L. Patisiran, an RNAi therapeutic for the treatment of hereditary transthyretin-mediated amyloidosis.



- Neurodegener Dis Manag. 2019 Feb;9(1):5-23. doi: 10.2217 / nmt-2018-0033. Epub 2018 Nov 27. PMID: 30480471.
- [213] MacEwan SR, Callahan DJ, Chilkoti A. Stimulus-responsive macromolecules and nanoparticles for cancer drug delivery. *Nanomedicine (Lond)*. 2010 Jul;5(5):793-806. doi: 10.2217 / nmm.10.50. PMID: 20662649; PMCID: PMC2963449.
- [214] Wang X, Jin N, Wang Q, Liu T, Liu K, Li Y, Bai Y, Chen X. MiRNA Delivery System Based on Stimuli-Responsive Gold Nanoparticle Aggregates for Multimodal Tumor Therapy. *ACS Appl Bio Mater*. 2019 Jul 15;2(7):2833-2839. doi: 10.1021 / acsabm.9b00240. Epub 2019 Jun 25. PMID: 35030817.
- [215] Ekin A, Karatas OF, Culha M, Ozen M. Designing a gold nanoparticle-based nanocarrier for microRNA transfection into the prostate and breast cancer cells. *J Gene Med*. 2014 Nov-Dec;16(11-12):331-5. doi: 10.1002 / jgm.2810. PMID: 25331590.
- [216] Springer AD, Dowdy SF. GalNAc-siRNA Conjugates: Leading the Way for Delivery of RNAi Therapeutics. *Nucleic Acid Ther*. 2018 Jun;28(3):109-118. doi: 10.1089 / nat.2018.0736. Epub 2018 May 24. PMID: 29792572; PMCID: PMC5994659.
- [217] Balwani M, Sardh E, Ventura P, Peiró PA, Rees DC, Stölzel U, Bissell DM, Bonkovsky HL, Windyga J, Anderson KE, Parker C, Silver SM, Keel SB, Wang JD, Stein PE, Harper P, Vassiliou D, Wang B, Phillips J, Ivanova A, Langendonk JG, Kauppinen R, Minder E, Horie Y, Penz C, Chen J, Liu S, Ko JJ, Sweetser MT, Garg P, Vaishnaw A, Kim JB, Simon AR, Gouya L; ENVISION Investigators. Phase 3 Trial of RNAi Therapeutic Givosiran for Acute Intermittent Porphyria. *N Engl J Med*. 2020 Jun 11;382(24):2289-2301. doi: 10.1056 / NEJMoa1913147. PMID: 32521132.
- [218] Dugal-Tessier J, Thirumalairajan S, Jain N. Antibody-Oligonucleotide Conjugates: A

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Twist to Antibody-Drug Conjugates. *J Clin Med*. 2021 Feb 18;10(4):838. doi: 10.3390 / jcm10040838. PMID: 33670689; PMCID: PMC7922418.
- [219] Kordelas L, Rebmann V, Ludwig AK, Radtke S, Ruesing J, Doeppner TR, Eppler M, Horn PA, Beelen DW, Giebel B. MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia*. 2014 Apr;28(4):970-3. doi: 10.1038 / leu.2014.41. PMID: 24445866.
- [220] Marcus L, Lemery SJ, Keegan P, Pazdur R. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Microsatellite Instability-High Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2019 Jul 1;25(13):3753-3758. doi: 10.1158 / 1078-0432.CCR-18-4070. Epub 2019 Feb 20. PMID: 30787022.
- [221] Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2011;20(1):5-14. doi: 10.3727 / 096368910X. PMID: 21396235.
- [222] Lan T, Luo M, Wei X. Mesenchymal stem / stromal cells in cancer therapy. *J Hematol Oncol*. 2021 Nov 17;14(1):195. doi: 10.1186 / s13045-021-01208-w. PMID: 34789315; PMCID: PMC8596342.
- [223] Lan T, Luo M, Wei X. Mesenchymal stem / stromal cells in cancer therapy. *J Hematol Oncol*. 2021 Nov 17;14(1):195. doi: 10.1186 / s13045-021-01208-w. PMID: 34789315; PMCID: PMC8596342.
- [224] Jiang N, Dai Q, Su X, Fu J, Feng X, Peng J. Role of PI3K / AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior. *Mol Biol Rep*. 2020 Jun;47(6):4587-4629. doi: 10.1007 / s11033-020-05435-1. Epub 2020 Apr 24. PMID: 32333246; PMCID: PMC7295848.
- [225] Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*. 2004 Nov;9(6):667-76. doi: 10.1023 / B:APPT.0000045801.15585.dd.

- PMID: 15505410.
- [226] Faes S, Dormond O. PI3K and AKT: Unfaithful Partners in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2015 Sep 3;16(9):21138-52. doi: 10.3390 / ijms160921138. PMID: 26404259; PMCID: PMC4613246.
- [227] Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*. 2008 Sep 18;27(41):5497-510. doi: 10.1038 / onc.2008.245. PMID: 18794884; PMCID: PMC3398461.
- [228] Chen H, Mei L, Zhou L, Shen X, Guo C, Zheng Y, Zhu H, Zhu Y, Huang L. PTEN restoration and PIK3CB knockdown synergistically suppress glioblastoma growth in vitro and in xenografts. *J Neurooncol*. 2011 Aug;104(1):155-67. doi: 10.1007 / s11060-010-0492-2. Epub 2010 Dec 29. PMID: 21188471.
- [229] Liu D, Shen X, Zhu G, Xing M. REC8 is a novel tumor suppressor gene epigenetically robustly targeted by the PI3K pathway in thyroid cancer. *Oncotarget*. 2015 Nov 17;6(36):39211-24. doi: 10.18632 / oncotarget.5391. PMID: 26472282; PMCID: PMC4770767.
- [230] Li L, Li JC, Yang H, Zhang X, Liu LL, Li Y, Zeng TT, Zhu YH, Li XD, Li Y, Xie D, Fu L, Guan XY. Expansion of cancer stem cell pool initiates lung cancer recurrence before angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Sep 18;115(38):E8948-E8957. doi: 10.1073 / pnas.1806219115. Epub 2018 Aug 29. PMID: 30158168; PMCID: PMC6156672.
- [231] Yan XL, Fu CJ, Chen L, Qin JH, Zeng Q, Yuan HF, Nan X, Chen HX, Zhou JN, Lin YL, Zhang XM, Yu CZ, Yue W, Pei XT. Mesenchymal stem cells from primary breast cancer tissue promote cancer proliferation and enhance mammosphere formation partially via

- EGF / EGFR / Akt pathway. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Feb;132(1):153-64. doi: 10.1007 / s10549-011-1577-0. Epub 2011 May 17. PMID: 21584665.
- [232] Liu C, Feng X, Wang B, Wang X, Wang C, Yu M, Cao G, Wang H. Bone marrow mesenchymal stem cells promote head and neck cancer progression through Periostin-mediated phosphoinositide 3-kinase / Akt / mammalian target of rapamycin. *Cancer Sci.* 2018 Mar;109(3):688-698. doi: 10.1111 / cas.13479. Epub 2018 Jan 23. PMID: 29284199; PMCID: PMC5834805.
- [233] Groner B, von Manstein V. Jak Stat signaling and cancer: Opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition. *Mol Cell Endocrinol.* 2017 Aug 15;451:1-14. doi: 10.1016 / j.mce.2017.05.033. Epub 2017 May 30. PMID: 28576744.
- [234] Liongue C, Sertori R, Ward AC. Evolution of Cytokine Receptor Signaling. *J Immunol.* 2016 Jul 1;197(1):11-8. doi: 10.4049 / jimmunol.1600372. PMID: 27317733.
- [235] Groner B, Hennighausen L. The versatile regulation of cellular events by Jak-Stat signaling: from transcriptional control to microtubule dynamics and energy metabolism. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2012 Jun;10(1):193-200. doi: 10.1515 / hmbci-2012-0010. PMID: 25436675.
- [236] Gong AH, Wei P, Zhang S, Yao J, Yuan Y, Zhou AD, Lang FF, Heimberger AB, Rao G, Huang S. FoxM1 Drives a Feed-Forward STAT3-Activation Signaling Loop That Promotes the Self-Renewal and Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells. *Cancer Res.* 2015 Jun 1;75(11):2337-48. doi: 10.1158 / 0008-5472.CAN-14-2800. Epub 2015 Apr 1. PMID: 25832656; PMCID: PMC4452436.
- [237] Bouchekioua A, Scourzic L, de Wever O, Zhang Y, Cervera P, Aline-Fardin A, Mercher T, Gaulard P, Nyga R, Jeziorowska D, Douay L, Vainchenker W, Louache F, Gespach C,

- Solary E, Coppo P. JAK3 deregulation by activating mutations confers invasive growth advantage in extranodal nasal-type natural killer cell lymphoma. *Leukemia*. 2014 Feb;28(2):338-48. doi: 10.1038 / leu.2013.157. Epub 2013 May 21. PMID: 23689514.
- [238] Mirtti T, Leiby BE, Abdulghani J, Aaltonen E, Pavela M, Mamtani A, Alanen K, Egevad L, Granfors T, Josefsson A, Stattin P, Bergh A, Nevalainen MT. Nuclear Stat5a / b predicts early recurrence and prostate cancer-specific death in patients treated by radical prostatectomy. *Hum Pathol*. 2013 Mar;44(3):310-9. doi: 10.1016 / j.humpath.2012.06.001. Epub 2012 Sep 29. PMID: 23026195; PMCID: PMC3548055.
- [239] Zhang X, Hu F, Li G, Li G, Yang X, Liu L, Zhang R, Zhang B, Feng Y. Human colorectal cancer-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through IL-6 / JAK2 / STAT3 signaling. *Cell Death Dis*. 2018 Jan 18;9(2):25. doi: 10.1038 / s41419-017-0176-3. PMID: 29348540; PMCID: PMC5833830.
- [240] McGuire JJ, Frieling JS, Lo CH, Li T, Muhammad A, Lawrence HR, Lawrence NJ, Cook LM, Lynch CC. Mesenchymal stem cell-derived interleukin-28 drives the selection of apoptosis resistant bone metastatic prostate cancer. *Nat Commun*. 2021 Feb 1;12(1):723. doi: 10.1038 / s41467-021-20962-6. PMID: 33526787; PMCID: PMC7851397.
- [241] He N, Kong Y, Lei X, Liu Y, Wang J, Xu C, Wang Y, Du L, Ji K, Wang Q, Li Z, Liu Q. MSCs inhibit tumor progression and enhance radiosensitivity of breast cancer cells by down-regulating Stat3 signaling pathway. *Cell Death Dis*. 2018 Oct 8;9(10):1026. doi: 10.1038 / s41419-018-0949-3. PMID: 30297887; PMCID: PMC6175943.
- [242] Russell JO, Monga SP. Wnt /  $\beta$ -Catenin Signaling in Liver Development, Homeostasis, and Pathobiology. *Annu Rev Pathol*. 2018 Jan 24;13:351-378. doi: 10.1146 / annurev-pathol-020117-044010. Epub 2017 Nov 10. PMID: 29125798; PMCID:

- PMC5927358.
- [243] Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998;14:59-88. doi: 10.1146 / annurev.cellbio.14.1.59. PMID: 9891778.
- [244] Beck B, Blanpain C. Unravelling cancer stem cell potential. *Nat Rev Cancer.* 2013 Oct;13(10):727-38. doi: 10.1038 / nrc3597. PMID: 24060864.
- [245] Wang W, Zhong W, Yuan J, Yan C, Hu S, Tong Y, Mao Y, Hu T, Zhang B, Song G. Involvement of Wnt /  $\beta$ -catenin signaling in the mesenchymal stem cells promote metastatic growth and chemoresistance of cholangiocarcinoma. *Oncotarget.* 2015 Dec 8;6(39):42276-89. doi: 10.18632 / oncotarget.5514. PMID: 26474277; PMCID: PMC4747224.
- [246] Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene.* 2017 Mar;36(11):1461-1473. doi: 10.1038 / onc.2016.304. Epub 2016 Sep 12. PMID: 27617575; PMCID: PMC5357762.
- [247] Voloshanenko O, Erdmann G, Dubash TD, Augustin I, Metzsig M, Moffa G, Hundsrucker C, Kerr G, Sandmann T, Anchang B, Demir K, Boehm C, Leible S, Ball CR, Glimm H, Spang R, Boutros M. Wnt secretion is required to maintain high levels of Wnt activity in colon cancer cells. *Nat Commun.* 2013;4:2610. doi: 10.1038 / ncomms3610. PMID: 24162018; PMCID: PMC3826636.
- [248] Ekström EJ, Bergenfelz C, von Bülow V, Serifler F, Carlemalm E, Jönsson G, Andersson T, Leandersson K. WNT5A induces release of exosomes containing pro-angiogenic and immunosuppressive factors from malignant melanoma cells. *Mol Cancer.* 2014 Apr 26;13:88. doi: 10.1186 / 1476-4598-13-88. PMID: 24766647; PMCID: PMC4022450.
- [249] Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature.* 2005 Apr

- 14;434(7035):843-50. doi: 10.1038 / nature03319. PMID: 15829953.
- [250] Park JI, Venteicher AS, Hong JY, Choi J, Jun S, Shkreli M, Chang W, Meng Z, Cheung P, Ji H, McLaughlin M, Veenstra TD, Nusse R, McCrea PD, Artandi SE. Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature*. 2009 Jul 2;460(7251):66-72. doi: 10.1038 / nature08137. PMID: 19571879; PMCID: PMC4349391.
- [251] Li Y, Zhong X, Zhang Y, Lu X. Mesenchymal Stem Cells in Gastric Cancer: Vicious but Hopeful. *Front Oncol*. 2021 May 11;11:617677. doi: 10.3389 / fonc.2021.617677. PMID: 34046337; PMCID: PMC8144497.
- [252] Wang W, Zhong W, Yuan J, Yan C, Hu S, Tong Y, Mao Y, Hu T, Zhang B, Song G. Involvement of Wnt /  $\beta$ -catenin signaling in the mesenchymal stem cells promote metastatic growth and chemoresistance of cholangiocarcinoma. *Oncotarget*. 2015 Dec 8;6(39):42276-89. doi: 10.18632 / oncotarget.5514. PMID: 26474277; PMCID: PMC4747224.
- [253] Zhu Y, Sun Z, Han Q, Liao L, Wang J, Bian C, Li J, Yan X, Liu Y, Shao C, Zhao RC. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. *Leukemia*. 2009 May;23(5):925-33. doi: 10.1038 / leu.2008.384. Epub 2009 Jan 15. PMID: 19148141.
- [254] Harvey KF, Zhang X, Thomas DM. The Hippo pathway and human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013 Apr;13(4):246-57. doi: 10.1038 / nrc3458. Epub 2013 Mar 7. PMID: 23467301.
- [255] Zygulska AL, Krzemieniecki K, Pierzchalski P. Hippo pathway - brief overview of its relevance in cancer. *J Physiol Pharmacol*. 2017 Jun;68(3):311-335. PMID: 28820389.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [256] Zhu C, Li L, Zhao B. The regulation and function of YAP transcription co-activator. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2015 Jan;47(1):16-28. doi: 10.1093 / abbs / gmu110. Epub 2014 Dec 8. PMID: 25487920.
- [257] Han Y. Analysis of the role of the Hippo pathway in cancer. *J Transl Med*. 2019 Apr 8;17(1):116. doi: 10.1186 / s12967-019-1869-4. PMID: 30961610; PMCID: PMC6454697.
- [258] Zanconato F, Cordenonsi M, Piccolo S. YAP / TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell*. 2016 Jun 13;29(6):783-803. doi: 10.1016 / j.ccell.2016.05.005. PMID: 27300434; PMCID: PMC6186419.
- [259] Pei T, Li Y, Wang J, Wang H, Liang Y, Shi H, Sun B, Yin D, Sun J, Song R, Pan S, Sun Y, Jiang H, Zheng T, Liu L. YAP is a critical oncogene in human cholangiocarcinoma. *Oncotarget*. 2015 Jul 10;6(19):17206-20. doi: 10.18632 / oncotarget.4043. PMID: 26015398; PMCID: PMC4627302.
- [260] Liang K, Zhou G, Zhang Q, Li J, Zhang C. Expression of hippo pathway in colorectal cancer. *Saudi J Gastroenterol*. 2014 May-Jun;20(3):188-94. doi: 10.4103 / 1319-3767.133025. PMID: 24976283; PMCID: PMC4067916.
- [261] Ai J, Ketabchi N, Verdi J, Gheibi N, Khadem Haghighian H, Kavianpour M. Mesenchymal stromal cells induce inhibitory effects on hepatocellular carcinoma through various signaling pathways. *Cancer Cell Int*. 2019 Dec 5;19:329. doi: 10.1186 / s12935-019-1038-0. PMID: 31827403; PMCID: PMC6894473.
- [262] Liu Y, Ren H, Wang J, Yang F, Li J, Zhou Y, Yuan X, Zhu W, Shi X. Prostaglandin E<sub>2</sub> secreted by mesenchymal stem cells protects against acute liver failure via enhancing hepatocyte proliferation. *FASEB J*. 2019 Feb;33(2):2514-2525. doi: 10.1096 /



- fj.201801349RR. Epub 2018 Sep 27. PMID: 30260707.
- [263] Liu Y, Ren H, Zhou Y, Shang L, Zhang Y, Yang F, Shi X. The hypoxia conditioned mesenchymal stem cells promote hepatocellular carcinoma progression through YAP mediated lipogenesis reprogramming. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019 May 29;38(1):228. doi: 10.1186 / s13046-019-1219-7. PMID: 31142342; PMCID: PMC6540399.
- [264] Elbadawy M, Usui T, Yamawaki H, Sasaki K. Emerging Roles of C-Myc in Cancer Stem Cell-Related Signaling and Resistance to Cancer Chemotherapy: A Potential Therapeutic Target Against Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019 May 11;20(9):2340. doi: 10.3390 / ijms20092340. PMID: 31083525; PMCID: PMC6539579.
- [265] Miller DM, Thomas SD, Islam A, Muench D, Sedoris K. c-Myc and cancer metabolism. *Clin Cancer Res.* 2012 Oct 15;18(20):5546-53. doi: 10.1158 / 1078-0432.CCR-12-0977. PMID: 23071356; PMCID: PMC3505847.
- [266] Wang XN, Su XX, Cheng SQ, Sun ZY, Huang ZS, Ou TM. MYC modulators in cancer: a patent review. *Expert Opin Ther Pat.* 2019 May;29(5):353-367. doi: 10.1080 / 13543776.2019.1612878. Epub 2019 May 8. PMID: 31068032.
- [267] Valera A, López-Guillermo A, Cardesa-Salzmann T, Climent F, González-Barca E, Mercadal S, Espinosa I, Novelli S, Briones J, Mate JL, Salamero O, Sancho JM, Arenillas L, Serrano S, Erill N, Martínez D, Castillo P, Rovira J, Martínez A, Campo E, Colomo L; Grup per l'Estudi dels Limfomes de Catalunya i Balears (GELCAB). MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica.* 2013 Oct;98(10):1554-62. doi: 10.3324 / haematol.2013.086173. Epub 2013 May 28. PMID: 23716551; PMCID: PMC3789460.

- [268] Madden SK, de Araujo AD, Gerhardt M, Fairlie DP, Mason JM. Taking the Myc out of cancer: toward therapeutic strategies to directly inhibit c-Myc. *Mol Cancer*. 2021 Jan 4;20(1):3. doi: 10.1186 / s12943-020-01291-6. PMID: 33397405; PMCID: PMC7780693.
- [269] Ruvolo PP, Ruvolo VR, Burks JK, Qiu Y, Wang RY, Shpall EJ, Mirandola L, Hail N Jr, Zeng Z, McQueen T, Daver N, Post SM, Chiriva-Internati M, Kornblau SM, Andreeff M. Role of MSC-derived galectin 3 in the AML microenvironment. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2018 Jul;1865(7):959-969. doi: 10.1016 / j.bbamcr.2018.04.005. Epub 2018 Apr 12. PMID: 29655803; PMCID: PMC5936474.
- [270] Chen B, Yu J, Wang Q, Zhao Y, Sun L, Xu C, Zhao X, Shen B, Wang M, Xu W, Zhu W. Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Promote Gastric Cancer Growth via Regulating c-Myc. *Stem Cells Int*. 2018 Jul 18;2018:9501747. doi: 10.1155 / 2018 / 9501747. PMID: 30186330; PMCID: PMC6116400.
- [271] Xia B, Tian C, Guo S, Zhang L, Zhao D, Qu F, Zhao W, Wang Y, Wu X, Da W, Wei S, Zhang Y. c-Myc plays part in drug resistance mediated by bone marrow stromal cells in acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2015 Jan;39(1):92-9. doi: 10.1016 / j.leukres.2014.11.004. Epub 2014 Nov 15. PMID: 25443862.
- [272] Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. 1986 Aug 29;46(5):705-16. doi: 10.1016 / 0092-8674(86)90346-6. PMID: 3091258.
- [273] Neumann M, Naumann M. Beyond IkappaBs: alternative regulation of NF-kappaB activity. *FASEB J*. 2007 Sep;21(11):2642-54. doi: 10.1096 / fj.06-7615rev. Epub 2007 Apr 12. PMID: 17431096.
- [274] Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer.

- Mol Cancer. 2013 Aug 2;12:86. doi: 10.1186 / 1476-4598-12-86. PMID: 23915189; PMCID: PMC3750319.
- [275] Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*. 2004 Aug 6;118(3):285-96. doi: 10.1016 / j.cell.2004.07.013. PMID: 15294155.
- [276] Li J, Deng Z, Wang Z, Wang D, Zhang L, Su Q, Lai Y, Li B, Luo Z, Chen X, Chen Y, Huang X, Ma J, Wang W, Bi J, Guan X. Zipper-interacting protein kinase promotes epithelial-mesenchymal transition, invasion and metastasis through AKT and NF- $\kappa$ B signaling and is associated with metastasis and poor prognosis in gastric cancer patients. *Oncotarget*. 2015 Apr 10;6(10):8323-38. doi: 10.18632 / oncotarget.3200. PMID: 25831050; PMCID: PMC4480755.
- [277] Avnet S, Di Pompo G, Chano T, Errani C, Ibrahim-Hashim A, Gillies RJ, Donati DM, Baldini N. Cancer-associated mesenchymal stroma fosters the stemness of osteosarcoma cells in response to intratumoral acidosis via NF- $\kappa$ B activation. *Int J Cancer*. 2017 Mar 15;140(6):1331-1345. doi: 10.1002 / ijc.30540. PMID: 27888521; PMCID: PMC5272857.
- [278] Wu XB, Liu Y, Wang GH, Xu X, Cai Y, Wang HY, Li YQ, Meng HF, Dai F, Jin JD. Mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through AMPK / mTOR-mediated NF- $\kappa$ B activation. *Sci Rep*. 2016 Feb 19;6:21420. doi: 10.1038 / srep21420. PMID: 26892992; PMCID: PMC4759824.
- [279] Zhong W, Tong Y, Li Y, Yuan J, Hu S, Hu T, Song G. Mesenchymal stem cells in inflammatory microenvironment potently promote metastatic growth of cholangiocarcinoma via activating Akt / NF- $\kappa$ B signaling by paracrine CCL5. *Oncotarget*.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- 2017 May 11;8(43):73693-73704. doi: 10.18632 / oncotarget.17793. PMID: 29088737; PMCID: PMC5650292.
- [280] Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*. 1986 Dec 25;315(26):1650-9. doi: 10.1056 / NEJM198612253152606. PMID: 3537791.
- [281] Liu T, Zhou L, Li D, Andl T, Zhang Y. Cancer-Associated Fibroblasts Build and Secure the Tumor Microenvironment. *Front Cell Dev Biol*. 2019 Apr 24;7:60. doi: 10.3389 / fcell.2019.00060. PMID: 31106200; PMCID: PMC6492564.
- [282] Rustad KC, Gurtner GC. Mesenchymal Stem Cells Home to Sites of Injury and Inflammation. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2012 Aug;1(4):147-152. doi: 10.1089 / wound.2011.0314. PMID: 24527296; PMCID: PMC3623614.
- [283] Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood*. 2003 Apr 15;101(8):2999-3001. doi: 10.1182 / blood-2002-06-1830. Epub 2002 Dec 12. PMID: 12480709.
- [284] Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, Cai X, Fox JG, Goldenring JR, Wang TC. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science*. 2004 Nov 26;306(5701):1568-71. doi: 10.1126 / science.1099513. PMID: 15567866.
- [285] Spees JL, Lee RH, Gregory CA. Mechanisms of mesenchymal stem / stromal cell function. *Stem Cell Res Ther*. 2016 Aug 31;7(1):125. doi: 10.1186 / s13287-016-0363-7. PMID: 27581859; PMCID: PMC5007684.
- [286] Sun Z, Wang S, Zhao RC. The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory

- microenvironment. *J Hematol Oncol*. 2014 Feb 6;7:14. doi: 10.1186 / 1756-8722-7-14. PMID: 24502410; PMCID: PMC3943443.
- [287] Liu S, Ginestier C, Ou SJ, Clouthier SG, Patel SH, Monville F, Korkaya H, Heath A, Dutcher J, Kleer CG, Jung Y, Dontu G, Taichman R, Wicha MS. Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. *Cancer Res*. 2011 Jan 15;71(2):614-24. doi: 10.1158 / 0008-5472.CAN-10-0538. Epub 2011 Jan 11. Erratum in: *Cancer Res*. 2011 Mar 15;71(6):2407. PMID: 21224357; PMCID: PMC3100554.
- [288] Teo GS, Ankrum JA, Martinelli R, Boetto SE, Simms K, Sciuto TE, Dvorak AM, Karp JM, Carman CV. Mesenchymal stem cells transmigrate between and directly through tumor necrosis factor- $\alpha$ -activated endothelial cells via both leukocyte-like and novel mechanisms. *Stem Cells*. 2012 Nov;30(11):2472-86. doi: 10.1002 / stem.1198. PMID: 22887987; PMCID: PMC3479371.
- [289] Uchibori R, Tsukahara T, Mizuguchi H, Saga Y, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ozawa K. NF- $\kappa$ B activity regulates mesenchymal stem cell accumulation at tumor sites. *Cancer Res*. 2013 Jan 1;73(1):364-72. doi: 10.1158 / 0008-5472.CAN-12-0088. Epub 2012 Oct 12. PMID: 23066037.
- [290] Stone MJ, Hayward JA, Huang C, E Huma Z, Sanchez J. Mechanisms of Regulation of the Chemokine-Receptor Network. *Int J Mol Sci*. 2017 Feb 7;18(2):342. doi: 10.3390 / ijms18020342. PMID: 28178200; PMCID: PMC5343877.
- [291] Lau TT, Wang DA. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1): homing factor for engineered regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther*. 2011 Feb;11(2):189-97. doi: 10.1517 / 14712598.2011.546338. PMID: 21219236.
- [292] Shi M, Li J, Liao L, Chen B, Li B, Chen L, Jia H, Zhao RC. Regulation of CXCR4

- expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD / SCID mice. *Haematologica*. 2007 Jul;92(7):897-904. doi: 10.3324 / haematol.10669. PMID: 17606439.
- [293] Salha S, Gehmert S, Bréban V, Anker A, Loibl M, Prantl L, Gehmert S. PDGF regulated migration of mesenchymal stem cells towards malignancy acts via the PI3K signaling pathway. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2018;70(4):543-551. doi: 10.3233 / CH-189319. PMID: 30347613.
- [294] Chaturvedi P, Gilkes DM, Wong CC; Kshitiz; Luo W, Zhang H, Wei H, Takano N, Schito L, Levchenko A, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-dependent breast cancer-mesenchymal stem cell bidirectional signaling promotes metastasis. *J Clin Invest*. 2013 Jan;123(1):189-205. doi: 10.1172 / JCI64993. Epub 2012 Dec 17. Erratum in: *J Clin Invest*. 2013 Mar 1;123(3):1402. PMID: 23318994; PMCID: PMC3533298.
- [295] Dührsen L, Hartfuß S, Hirsch D, Geiger S, Maire CL, Sedlacik J, Guenther C, Westphal M, Lamszus K, Hermann FG, Schmidt NO. Preclinical analysis of human mesenchymal stem cells: tumor tropism and therapeutic efficiency of local HSV-TK suicide gene therapy in glioblastoma. *Oncotarget*. 2019 Oct 22;10(58):6049-6061. doi: 10.18632 / oncotarget.27071. PMID: 31692882; PMCID: PMC6817450.
- [296] Wu HH, Zhou Y, Tabata Y, Gao JQ. Mesenchymal stem cell-based drug delivery strategy: from cells to biomimetic. *J Control Release*. 2019 Jan 28;294:102-113. doi: 10.1016 / j.jconrel.2018.12.019. Epub 2018 Dec 13. PMID: 30553849.
- [297] Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res*. 2002 Jul 1;62(13):3603-8. PMID: 12097260.

- 
- [298] Chawla-Sarkar M, Leaman DW, Borden EC. Preferential induction of apoptosis by interferon (IFN)-beta compared with IFN-alpha2: correlation with TRAIL / Apo2L induction in melanoma cell lines. *Clin Cancer Res.* 2001 Jun;7(6):1821-31. PMID: 11410525.
- [299] Okada H, Pollack IF. Cytokine gene therapy for malignant glioma. *Expert Opin Biol Ther.* 2004 Oct;4(10):1609-20. doi: 10.1517 / 14712598.4.10.1609. PMID: 15461572.
- [300] Witsch E, Sela M, Yarden Y. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda).* 2010 Apr;25(2):85-101. doi: 10.1152 / physiol.00045.2009. PMID: 20430953; PMCID: PMC3062054.
- [301] Audsley KM, Wagner T, Ta C, Newnes HV, Buzzai AC, Barnes SA, Wylie B, Armitage J, Kaisho T, Bosco A, McDonnell A, Cruickshank M, Fear VS, Foley B, Waithman J. IFN $\beta$  Is a Potent Adjuvant for Cancer Vaccination Strategies. *Front Immunol.* 2021 Sep 6;12:735133. doi: 10.3389 / fimmu.2021.735133. PMID: 34552594; PMCID: PMC8450325.
- [302] Yang X, Zhang X, Fu ML, Weichselbaum RR, Gajewski TF, Guo Y, Fu YX. Targeting the tumor microenvironment with interferon- $\beta$  bridges innate and adaptive immune responses. *Cancer Cell.* 2014 Jan 13;25(1):37-48. doi: 10.1016 / j.ccr.2013.12.004. PMID: 24434209; PMCID: PMC3927846.
- [303] Yang PM, Hsieh YY, Du JL, Yen SC, Hung CF. Sequential Interferon  $\beta$ -Cisplatin Treatment Enhances the Surface Exposure of Calreticulin in Cancer Cells via an Interferon Regulatory Factor 1-Dependent Manner. *Biomolecules.* 2020 Apr 21;10(4):643. doi: 10.3390 / biom10040643. PMID: 32326356; PMCID: PMC7226424.
- [304] Wong VL, Rieman DJ, Aronson L, Dalton BJ, Greig R, Anzano MA. Growth-inhibitory

- activity of interferon-beta against human colorectal carcinoma cell lines. *Int J Cancer*. 1989 Mar 15;43(3):526-30. doi: 10.1002 / ijc.2910430331. PMID: 2494120.
- [305] Mirlekar B, Pylayeva-Gupta Y. IL-12 Family Cytokines in Cancer and Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2021 Jan 6;13(2):167. doi: 10.3390 / cancers13020167. PMID: 33418929; PMCID: PMC7825035.
- [306] Gao P, Ding Q, Wu Z, Jiang H, Fang Z. Therapeutic potential of human mesenchymal stem cells producing IL-12 in a mouse xenograft model of renal cell carcinoma. *Cancer Lett*. 2010 Apr 28;290(2):157-66. doi: 10.1016 / j.canlet.2009.08.031. Epub 2009 Sep 27. PMID: 19786319.
- [307] Seo SH, Kim KS, Park SH, Suh YS, Kim SJ, Jeun SS, Sung YC. The effects of mesenchymal stem cells injected via different routes on modified IL-12-mediated antitumor activity. *Gene Ther*. 2011 May;18(5):488-95. doi: 10.1038 / gt.2010.170. Epub 2011 Jan 13. PMID: 21228885; PMCID: PMC3125103.
- [308] Kanehira M, Xin H, Hoshino K, Maemondo M, Mizuguchi H, Hayakawa T, Matsumoto K, Nakamura T, Nukiwa T, Saijo Y. Targeted delivery of NK4 to multiple lung tumors by bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cancer Gene Ther*. 2007 Nov;14(11):894-903. doi: 10.1038 / sj.cgt.7701079. Epub 2007 Aug 10. PMID: 17693990.
- [309] van Eckelen M, Sasportas LS, Kasmieh R, Yip S, Figueiredo JL, Louis DN, Weissleder R, Shah K. Human stem cells expressing novel TSP-1 variant have anti-angiogenic effect on brain tumors. *Oncogene*. 2010 Jun 3;29(22):3185-95. doi: 10.1038 / onc.2010.75. Epub 2010 Mar 22. PMID: 20305695; PMCID: PMC3390229.
- [310] Belotti D, Capelli C, Resovi A, Introna M, Taraboletti G. Thrombospondin-1 promotes mesenchymal stromal cell functions via TGF $\beta$  and in cooperation with PDGF. *Matrix Biol*.



- 2016 Sep;55:106-116. doi: 10.1016 / j.matbio.2016.03.003. Epub 2016 Mar 16. PMID: 26992552.
- [311] Zhang CL, Huang T, Wu BL, He WX, Liu D. Stem cells in cancer therapy: opportunities and challenges. *Oncotarget*. 2017 Sep 8;8(43):75756-75766. doi: 10.18632 / oncotarget.20798. PMID: 29088907; PMCID: PMC5650462.
- [312] Kim SK, Cargioli TG, Machluf M, Yang W, Sun Y, Al-Hashem R, Kim SU, Black PM, Carroll RS. PEX-producing human neural stem cells inhibit tumor growth in a mouse glioma model. *Clin Cancer Res*. 2005 Aug 15;11(16):5965-70. doi: 10.1158 / 1078-0432.CCR-05-0371. PMID: 16115940.
- [313] Loebinger MR, Eddaoudi A, Davies D, Janes SM. Mesenchymal stem cell delivery of TRAIL can eliminate metastatic cancer. *Cancer Res*. 2009 May 15;69(10):4134-42. doi: 10.1158 / 0008-5472.CAN-08-4698. Epub 2009 May 12. PMID: 19435900; PMCID: PMC2699841.
- [314] Mueller LP, Luetzkendorf J, Widder M, Nerger K, Caysa H, Mueller T. TRAIL-transduced multipotent mesenchymal stromal cells (TRAIL-MS-C) overcome TRAIL resistance in selected CRC cell lines in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther*. 2011 Apr;18(4):229-39. doi: 10.1038 / cgt.2010.68. Epub 2010 Oct 29. PMID: 21037557.
- [315] Danks MK, Yoon KJ, Bush RA, Remack JS, Wierdl M, Tsurkan L, Kim SU, Garcia E, Metz MZ, Najbauer J, Potter PM, Aboody KS. Tumor-targeted enzyme / prodrug therapy mediates long-term disease-free survival of mice bearing disseminated neuroblastoma. *Cancer Res*. 2007 Jan 1;67(1):22-5. doi: 10.1158 / 0008-5472.CAN-06-3607. PMID: 17210679.
- [316] Cavarretta IT, Altanerova V, Matuskova M, Kucerova L, Culig Z, Altaner C. Adipose

- tissue-derived mesenchymal stem cells expressing prodrug-converting enzyme inhibit human prostate tumor growth. *Mol Ther.* 2010 Jan;18(1):223-31. doi: 10.1038 / mt.2009.237. Epub 2009 Oct 20. PMID: 19844197; PMCID: PMC2839205.
- [317] Altaner C. Prodrug cancer gene therapy. *Cancer Lett.* 2008 Nov 8;270(2):191-201. doi: 10.1016 / j.canlet.2008.04.023. Epub 2008 May 27. PMID: 18502571.
- [318] Kucerova L, Altanero V, Matuskova M, Tyciakova S, Altaner C. Adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy. *Cancer Res.* 2007 Jul 1;67(13):6304-13. doi: 10.1158 / 0008-5472.CAN-06-4024. PMID: 17616689.
- [319] Kucerova L, Matuskova M, Pastorakova A, Tyciakova S, Jakubikova J, Bohovic R, Altanero V, Altaner C. Cytosine deaminase expressing human mesenchymal stem cells mediated tumour regression in melanoma bearing mice. *J Gene Med.* 2008 Oct;10(10):1071-82. doi: 10.1002 / jgm.1239. PMID: 18671316.
- [320] Liu L, Zhang SX, Liao W, Farhoodi HP, Wong CW, Chen CC, Ségaligny AI, Chacko JV, Nguyen LP, Lu M, Polovin G, Pone EJ, Downing TL, Lawson DA, Digman MA, Zhao W. Mechanoresponsive stem cells to target cancer metastases through biophysical cues. *Sci Transl Med.* 2017 Jul 26;9(400):eaan2966. doi: 10.1126 / scitranslmed.aan2966. PMID: 28747514; PMCID: PMC5890431.
- [321] Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, Zanconato F, Le Digabel J, Forcato M, Bicciato S, Elvassore N, Piccolo S. Role of YAP / TAZ in mechanotransduction. *Nature.* 2011 Jun 8;474(7350):179-83. doi: 10.1038 / nature10137. PMID: 21654799.
- [322] Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, Fong SF, Csiszar K, Giaccia

- A, Weninger W, Yamauchi M, Gasser DL, Weaver VM. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*. 2009 Nov 25;139(5):891-906. doi: 10.1016/j.cell.2009.10.027. PMID: 19931152; PMCID: PMC2788004.
- [323] Parato KA, Senger D, Forsyth PA, Bell JC. Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat Rev Cancer*. 2005 Dec;5(12):965-76. doi: 10.1038/nrc1750. PMID: 16294217.
- [324] Pidelaserra-Martí G, Engeland CE. Mechanisms of measles virus oncolytic immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2020 Dec;56:28-38. doi: 10.1016/j.cytogfr.2020.07.009. Epub 2020 Jul 3. PMID: 32660751.
- [325] Zhang L, Wang W, Wang R, Zhang N, Shang H, Bi Y, Chen D, Zhang C, Li L, Yin J, Zhang H, Cao Y. Reshaping the Immune Microenvironment by Oncolytic Herpes Simplex Virus in Murine Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Mol Ther*. 2021 Feb 3;29(2):744-761. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.10.027. Epub 2020 Oct 30. PMID: 33130310; PMCID: PMC7854309.
- [326] Nakashima H, Kaur B, Chiocca EA. Directing systemic oncolytic viral delivery to tumors via carrier cells. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010 Apr-Jun;21(2-3):119-26. doi: 10.1016/j.cytogfr.2010.02.004. Epub 2010 Mar 11. PMID: 20226717; PMCID: PMC3109423.
- [327] Power AT, Bell JC. Cell-based delivery of oncolytic viruses: a new strategic alliance for a biological strike against cancer. *Mol Ther*. 2007 Apr;15(4):660-5. doi: 10.1038/sj.mt.6300098. Epub 2007 Jan 30. PMID: 17264852.
- [328] Stoff-Khalili MA, Rivera AA, Mathis JM, Banerjee NS, Moon AS, Hess A, Rocconi RP, Numnum TM, Everts M, Chow LT, Douglas JT, Siegal GP, Zhu ZB, Bender HG, Dall P, Stoff A, Pereboeva L, Curiel DT. Mesenchymal stem cells as a vehicle for targeted

- delivery of CRAds to lung metastases of breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 2007 Oct;105(2):157-67. doi: 10.1007 / s10549-006-9449-8. Epub 2007 Jan 13. PMID: 17221158.
- [329] Yong RL, Shinojima N, Fueyo J, Gumin J, Vecil GG, Marini FC, Bogler O, Andreeff M, Lang FF. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells for intravascular delivery of oncolytic adenovirus Delta24-RGD to human gliomas. *Cancer Res.* 2009 Dec 1;69(23):8932-40. doi: 10.1158 / 0008-5472.CAN-08-3873. Epub 2009 Nov 17. PMID: 19920199; PMCID: PMC2789204.
- [330] Yoon AR, Hong J, Li Y, Shin HC, Lee H, Kim HS, Yun CO. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Delivery of an Oncolytic Adenovirus Enhances Antitumor Efficacy in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res.* 2019 Sep 1;79(17):4503-4514. doi: 10.1158 / 0008-5472.CAN-18-3900. Epub 2019 Jul 9. PMID: 31289131.
- [331] Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci.* 2007 Aug;8(8):610-22. doi: 10.1038 / nrn2175. PMID: 17643088.
- [332] Matsumoto K, Nakamura T. NK4 (HGF-antagonist / angiogenesis inhibitor) in cancer biology and therapeutics. *Cancer Sci.* 2003 Apr;94(4):321-7. doi: 10.1111 / j.1349-7006.2003.tb01440.x. PMID: 12824898; PMCID: PMC11160298.
- [333] Walczak H, Krammer PH. The CD95 (APO-1 / Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res.* 2000 Apr 10;256(1):58-66. doi: 10.1006 / excr.2000.4840. PMID: 10739652.
- [334] Noble M. Can neural stem cells be used as therapeutic vehicles in the treatment of brain tumors? *Nat Med.* 2000 Apr;6(4):369-70. doi: 10.1038 / 74610. PMID: 10742131.

- 
- [335] Phinney DG, Pittenger MF. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem Cells*. 2017 Apr;35(4):851-858. doi: 10.1002 / stem.2575. Epub 2017 Mar 10. Erratum in: *Stem Cells*. 2017 Sep;35(9):2103. doi: 10.1002 / stem.2626. PMID: 28294454.
- [336] Qin J, Xu Q. Functions and application of exosomes. *Acta Pol Pharm*. 2014 Jul-Aug;71(4):537-43. PMID: 25272880.
- [337] Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, Al Saffar H, Anand S, Zhao K, Samuel M, Pathan M, Jois M, Chilamkurti N, Gangoda L, Mathivanan S. ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J Mol Biol*. 2016 Feb 22;428(4):688-692. doi: 10.1016 / j.jmb.2015.09.019. Epub 2015 Oct 3. PMID: 26434508; PMCID: PMC4783248.
- [338] Yeo RW, Lai RC, Zhang B, Tan SS, Yin Y, Teh BJ, Lim SK. Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013 Mar;65(3):336-41. doi: 10.1016 / j.addr.2012.07.001. Epub 2012 Jul 7. PMID: 22780955.
- [339] Zhou J, Tan X, Tan Y, Li Q, Ma J, Wang G. Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes in Cancer Progression, Metastasis and Drug Delivery: A Comprehensive Review. *J Cancer*. 2018 Aug 6;9(17):3129-3137. doi: 10.7150 / jca.25376. PMID: 30210636; PMCID: PMC6134817.
- [340] Pascucci L, Coccè V, Bonomi A, Ami D, Ceccarelli P, Ciusani E, Viganò L, Locatelli A, Sisto F, Doglia SM, Parati E, Bernardo ME, Muraca M, Alessandri G, Bondiolotti G, Pessina A. Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: a new approach for drug delivery. *J Control Release*. 2014 Oct 28;192:262-70. doi: 10.1016 / j.jconrel.2014.07.042. Epub 2014 Jul 30. PMID: 25084218.

- [341] Munoz JL, Bliss SA, Greco SJ, Ramkissoon SH, Ligon KL, Rameshwar P. Delivery of Functional Anti-miR-9 by Mesenchymal Stem Cell-derived Exosomes to Glioblastoma Multiforme Cells Conferred Chemosensitivity. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2013 Oct 1;2(10):e126. doi: 10.1038 / mtna.2013.60. PMID: 24084846; PMCID: PMC4027430.
- [342] Lee JK, Park SR, Jung BK, Jeon YK, Lee YS, Kim MK, Kim YG, Jang JY, Kim CW. Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by down-regulating VEGF expression in breast cancer cells. *PLoS One*. 2013 Dec 31;8(12):e84256. doi: 10.1371 / journal.pone.0084256. PMID: 24391924; PMCID: PMC3877259.
- [343] Zhou W, Zhou Y, Chen X, Ning T, Chen H, Guo Q, Zhang Y, Liu P, Zhang Y, Li C, Chu Y, Sun T, Jiang C. Pancreatic cancer-targeting exosomes for enhancing immunotherapy and reprogramming tumor microenvironment. *Biomaterials*. 2021 Jan;268:120546. doi: 10.1016 / j.biomaterials.2020.120546. Epub 2020 Nov 23. PMID: 33253966.
- [344] Luo T, Liu Q, Tan A, Duan L, Jia Y, Nong L, Tang J, Zhou W, Xie W, Lu Y, Yu Q, Liu Y. Mesenchymal Stem Cell-Secreted Exosome Promotes Chemoresistance in Breast Cancer via Enhancing miR-21-5p-Mediated S100A6 Expression. *Mol Ther Oncolytics*. 2020 Oct 20;19:283-293. doi: 10.1016 / j.omto.2020.10.008. PMID: 33294586; PMCID: PMC7689030.
- [345] Nam GH, Choi Y, Kim GB, Kim S, Kim SA, Kim IS. Emerging Prospects of Exosomes for Cancer Treatment: From Conventional Therapy to Immunotherapy. *Adv Mater*. 2020 Dec;32(51):e2002440. doi: 10.1002 / adma.202002440. Epub 2020 Oct 5. PMID: 33015883.
- [346] Mendt M, Rezvani K, Shpall E. Mesenchymal stem cell-derived exosomes for clinical use.

- Bone Marrow Transplant. 2019 Aug;54(Suppl 2):789-792. doi: 10.1038 / s41409-019-0616-z. PMID: 31431712.
- [347] Aravindhan S, Ejam SS, Lafta MH, Markov A, Yumashev AV, Ahmadi M. Mesenchymal stem cells and cancer therapy: insights into targeting the tumour vasculature. *Cancer Cell Int.* 2021 Mar 8;21(1):158. doi: 10.1186 / s12935-021-01836-9. PMID: 33685452; PMCID: PMC7938588.
- [348] Ruivo CF, Adem B, Silva M, Melo SA. The Biology of Cancer Exosomes: Insights and New Perspectives. *Cancer Res.* 2017 Dec 1;77(23):6480-6488. doi: 10.1158 / 0008-5472.CAN-17-0994. Epub 2017 Nov 21. PMID: 29162616.
- [349] Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem.* 1987 Jul 5;262(19):9412-20. PMID: 3597417.
- [350] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science.* 2020 Feb 7;367(6478):eaau6977. doi: 10.1126 / science.aau6977. PMID: 32029601; PMCID: PMC7717626.
- [351] Skotland T, Sandvig K, Llorente A. Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Prog Lipid Res.* 2017 Apr;66:30-41. doi: 10.1016 / j.plipres.2017.03.001. Epub 2017 Mar 23. PMID: 28342835.
- [352] Puhka M, Takatalo M, Nordberg ME, Valkonen S, Nandania J, Aatonen M, Yliperttula M, Laitinen S, Velagapudi V, Mirtti T, Kallioniemi O, Rannikko A, Siljander PR, Af Hällström TM. Metabolomic Profiling of Extracellular Vesicles and Alternative Normalization Methods Reveal Enriched Metabolites and Strategies to Study Prostate Cancer-Related Changes. *Theranostics.* 2017 Aug 23;7(16):3824-3841. doi: 10.7150 /

- thno.19890. PMID: 29109780; PMCID: PMC5667407.
- [353] Schey KL, Luther JM, Rose KL. Proteomics characterization of exosome cargo. *Methods*. 2015 Oct 1;87:75-82. doi: 10.1016 / j.ymeth.2015.03.018. Epub 2015 Mar 31. PMID: 25837312; PMCID: PMC4591097.
- [354] van den Boorn JG, Dassler J, Coch C, Schlee M, Hartmann G. Exosomes as nucleic acid nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013 Mar;65(3):331-5. doi: 10.1016 / j.addr.2012.06.011. Epub 2012 Jun 28. PMID: 22750807.
- [355] Tai YL, Chen KC, Hsieh JT, Shen TL. Exosomes in cancer development and clinical applications. *Cancer Sci*. 2018 Aug;109(8):2364-2374. doi: 10.1111 / cas.13697. Epub 2018 Jul 13. PMID: 29908100; PMCID: PMC6113508.
- [356] Lindtner RA, Krappinger D, Neururer S. Response to 'Inter and intraobserver reliability and critical analysis of the FFP classification of osteoporotic pelvic ring injuries: Methodological issue' (doi:10.1016 / j.injury.2019.04.011). *Injury*. 2022 Jun;53(6):2384. doi: 10.1016 / j.injury.2021.11.060. Epub 2021 Nov 29. PMID: 34895714
- [357] Ibrahim A, Marbán E. Exosomes: Fundamental Biology and Roles in Cardiovascular Physiology. *Annu Rev Physiol*. 2016;78:67-83. doi: 10.1146 / annurev-physiol-021115-104929. Epub 2015 Nov 30. PMID: 26667071; PMCID: PMC5425157.
- [358] Colombo M, Moita C, van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, Manel N, Moita LF, Théry C, Raposo G. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci*. 2013 Dec 15;126(Pt 24):5553-65. doi: 10.1242 / jcs.128868. Epub 2013 Oct 8. PMID: 24105262.
- [359] Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol*



- Life Sci. 2018 Jan;75(2):193-208. doi: 10.1007 / s00018-017-2595-9. Epub 2017 Jul 21. PMID: 28733901; PMCID: PMC5756260.
- [360] Schöneberg J, Lee IH, Iwasa JH, Hurley JH. Reverse-topology membrane scission by the ESCRT proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017 Jan;18(1):5-17. doi: 10.1038 / nrm.2016.121. Epub 2016 Oct 5. PMID: 27703243; PMCID: PMC5198518.
- [361] Hurley JH, Hanson PI. Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Aug;11(8):556-66. doi: 10.1038 / nrm2937. Epub 2010 Jun 30. PMID: 20588296; PMCID: PMC2922035.
- [362] Tian X, Shen H, Li Z, Wang T, Wang S. Tumor-derived exosomes, myeloid-derived suppressor cells, and tumor microenvironment. *J Hematol Oncol.* 2019 Aug 22;12(1):84. doi: 10.1186 / s13045-019-0772-z. PMID: 31438991; PMCID: PMC6704713.
- [363] Mimeault M, Batra SK. Molecular biomarkers of cancer stem / progenitor cells associated with progression, metastases, and treatment resistance of aggressive cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014 Feb;23(2):234-54. doi: 10.1158 / 1055-9965.EPI-13-0785. Epub 2013 Nov 22. PMID: 24273063; PMCID: PMC3977531.
- [364] Xu R, Greening DW, Zhu HJ, Takahashi N, Simpson RJ. Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application. *J Clin Invest.* 2016 Apr 1;126(4):1152-62. doi: 10.1172 / JCI81129. Epub 2016 Apr 1. PMID: 27035807; PMCID: PMC4811150.
- [365] Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics.* 2017 Jan 26;7(3):789-804. doi: 10.7150 / thno.18133. PMID: 28255367; PMCID: PMC5327650.
- [366] Lee K, Shao H, Weissleder R, Lee H. Acoustic purification of extracellular microvesicles.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- ACS Nano. 2015 Mar 24;9(3):2321-7. doi: 10.1021 / nn506538f. Epub 2015 Feb 16. PMID: 25672598; PMCID: PMC4373978.
- [367] Davies RT, Kim J, Jang SC, Choi EJ, Gho YS, Park J. Microfluidic filtration system to isolate extracellular vesicles from blood. *Lab Chip*. 2012 Dec 21;12(24):5202-10. doi: 10.1039 / c2lc41006k. PMID: 23111789.
- [368] Xie F, Zhou X, Fang M, Li H, Su P, Tu Y, Zhang L, Zhou F. Extracellular Vesicles in Cancer Immune Microenvironment and Cancer Immunotherapy. *Adv Sci (Weinh)*. 2019 Oct 23;6(24):1901779. doi: 10.1002 / advs.201901779. PMID: 31871860; PMCID: PMC6918121.
- [369] Moreno-Gonzalo O, Fernandez-Delgado I, Sanchez-Madrid F. Post-translational add-ons mark the path in exosomal protein sorting. *Cell Mol Life Sci*. 2018 Jan;75(1):1-19. doi: 10.1007 / s00018-017-2690-y. Epub 2017 Oct 27. PMID: 29080091; PMCID: PMC11105655.
- [370] Xu J, Liao K, Zhou W. Exosomes Regulate the Transformation of Cancer Cells in Cancer Stem Cell Homeostasis. *Stem Cells Int*. 2018 Sep 23;2018:4837370. doi: 10.1155 / 2018 / 4837370. PMID: 30344611; PMCID: PMC6174755.
- [371] Segura E, Nicco C, Lombard B, Véron P, Raposo G, Batteux F, Amigorena S, Théry C. ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood*. 2005 Jul 1;106(1):216-23. doi: 10.1182 / blood-2005-01-0220. Epub 2005 Mar 24. PMID: 15790784.
- [372] Milane L, Singh A, Mattheolabakis G, Suresh M, Amiji MM. Exosome mediated communication within the tumor microenvironment. *J Control Release*. 2015 Dec 10;219:278-294. doi: 10.1016 / j.jconrel.2015.06.029. Epub 2015 Jul 2. PMID: 26143224.

- [373] Mazurov D, Barbashova L, Filatov A. Tetraspanin protein CD9 interacts with metalloprotease CD10 and enhances its release via exosomes. *FEBS J.* 2013 Mar;280(5):1200-13. doi: 10.1111 / febs.12110. Epub 2013 Feb 6. PMID: 23289620.
- [374] Juan T, Fürthauer M. Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles. *Semin Cell Dev Biol.* 2018 Feb;74:66-77. doi: 10.1016 / j.semcdb.2017.08.022. Epub 2017 Aug 12. PMID: 28807885.
- [375] Taha EA, Ono K, Eguchi T. Roles of Extracellular HSPs as Biomarkers in Immune Surveillance and Immune Evasion. *Int J Mol Sci.* 2019 Sep 17;20(18):4588. doi: 10.3390 / ijms20184588. PMID: 31533245; PMCID: PMC6770223.
- [376] Schopf FH, Biebl MM, Buchner J. The HSP90 chaperone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017 Jun;18(6):345-360. doi: 10.1038 / nrm.2017.20. Epub 2017 Apr 21. PMID: 28429788.
- [377] Lauwers E, Wang YC, Gallardo R, Van der Kant R, Michiels E, Swerts J, Baatsen P, Zaiter SS, McAlpine SR, Goukko NV, Rousseau F, Schymkowitz J, Verstreken P. Hsp90 Mediates Membrane Deformation and Exosome Release. *Mol Cell.* 2018 Sep 6;71(5):689-702.e9. doi: 10.1016 / j.molcel.2018.07.016. PMID: 30193096.
- [378] Tang X, Chang C, Guo J, Lincoln V, Liang C, Chen M, Woodley DT, Li W. Tumour-Secreted Hsp90 $\alpha$  on External Surface of Exosomes Mediates Tumour - Stromal Cell Communication via Autocrine and Paracrine Mechanisms. *Sci Rep.* 2019 Oct 22;9(1):15108. doi: 10.1038 / s41598-019-51704-w. PMID: 31641193; PMCID: PMC6805946.
- [379] Yang F, Ning Z, Ma L, Liu W, Shao C, Shu Y, Shen H. Exosomal miRNAs and miRNA dysregulation in cancer-associated fibroblasts. *Mol Cancer.* 2017 Aug 29;16(1):148. doi:

- 10.1186 / s12943-017-0718-4. PMID: 28851377; PMCID: PMC5576273.
- [380] Treiber T, Treiber N, Meister G. Publisher Correction: Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 May;20(5):321. doi: 10.1038 / s41580-019-0106-6. Erratum for: *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Jan;20(1):5-20. doi: 10.1038 / s41580-018-0059-1. PMID: 30728477.
- [381] Kanaoka R, Iinuma H, Dejima H, Sakai T, Uehara H, Matsutani N, Kawamura M. Usefulness of Plasma Exosomal MicroRNA-451a as a Noninvasive Biomarker for Early Prediction of Recurrence and Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncology.* 2018;94(5):311-323. doi: 10.1159 / 000487006. Epub 2018 Mar 13. PMID: 29533963.
- [382] Fortunato O, Gasparini P, Boeri M, Sozzi G. Exo-miRNAs as a New Tool for Liquid Biopsy in Lung Cancer. *Cancers (Basel).* 2019 Jun 25;11(6):888. doi: 10.3390 / cancers11060888. PMID: 31242686; PMCID: PMC6627875.
- [383] Endzeliņš E, Berger A, Melne V, Bajo-Santos C, Soboļevska K, Ābols A, Rodriguez M, Šantare D, Rudņickiha A, Lietuvietis V, Llorente A, Linē A. Detection of circulating miRNAs: comparative analysis of extracellular vesicle-incorporated miRNAs and cell-free miRNAs in whole plasma of prostate cancer patients. *BMC Cancer.* 2017 Nov 9;17(1):730. doi: 10.1186 / s12885-017-3737-z. PMID: 29121858; PMCID: PMC5679326.
- [384] Huang X, Yuan T, Liang M, Du M, Xia S, Dittmar R, Wang D, See W, Costello BA, Quevedo F, Tan W, Nandy D, Bevan GH, Longenbach S, Sun Z, Lu Y, Wang T, Thibodeau SN, Boardman L, Kohli M, Wang L. Exosomal miR-1290 and miR-375 as prognostic markers in castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol.* 2015 Jan;67(1):33-41. doi: 10.1016 / j.eururo.2014.07.035. Epub 2014 Aug 14. PMID: 25129854; PMCID: PMC4252606.

- 
- [385] Sun ZP, Li AQ, Jia WH, Ye S, Van Eps G, Yu JM, Yang WJ. MicroRNA expression profiling in exosomes derived from gastric cancer stem-like cells. *Oncotarget*. 2017 Sep 27;8(55):93839-93855. doi: 10.18632 / oncotarget.21288. PMID: 29212193; PMCID: PMC5706839.
- [386] Shi Y, Wang Z, Zhu X, Chen L, Ma Y, Wang J, Yang X, Liu Z. Exosomal miR-1246 in serum as a potential biomarker for early diagnosis of gastric cancer. *Int J Clin Oncol*. 2020 Jan;25(1):89-99. doi: 10.1007 / s10147-019-01532-9. Epub 2019 Sep 10. PMID: 31506750.
- [387] Huang J, Shen M, Yan M, Cui Y, Gao Z, Meng X. Exosome-mediated transfer of miR-1290 promotes cell proliferation and invasion in gastric cancer via NKD1. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2019 Sep 6;51(9):900-907. doi: 10.1093 / abbs / gmz077. PMID: 31435644.
- [388] Nedaeinia R, Manian M, Jazayeri MH, Ranjbar M, Salehi R, Sharifi M, Mohaghegh F, Goli M, Jahednia SH, Avan A, Ghayour-Mobarhan M. Circulating exosomes and exosomal microRNAs as biomarkers in gastrointestinal cancer. *Cancer Gene Ther*. 2017 Feb;24(2):48-56. doi: 10.1038 / cgt.2016.77. Epub 2016 Dec 16. PMID: 27982021.
- [389] Puik JR, Meijer LL, Le Large TY, Prado MM, Frampton AE, Kazemier G, Giovannetti E. miRNA profiling for diagnosis, prognosis and stratification of cancer treatment in cholangiocarcinoma. *Pharmacogenomics*. 2017 Sep;18(14):1343-1358. doi: 10.2217 / pgs-2017-0010. Epub 2017 Aug 23. PMID: 28832247.
- [390] Hu C, Meiners S, Lukas C, Stathopoulos GT, Chen J. Role of exosomal microRNAs in lung cancer biology and clinical applications. *Cell Prolif*. 2020 Jun;53(6):e12828. doi: 10.1111 / cpr.12828. Epub 2020 May 11. PMID: 32391938; PMCID: PMC7309943.

- [391] Grimolizzi F, Monaco F, Leoni F, Bracci M, Staffolani S, Bersaglieri C, Gaetani S, Valentino M, Amati M, Rubini C, Saccucci F, Neuzil J, Tomasetti M, Santarelli L. Exosomal miR-126 as a circulating biomarker in non-small-cell lung cancer regulating cancer progression. *Sci Rep*. 2017 Nov 10;7(1):15277. doi: 10.1038 / s41598-017-15475-6. PMID: 29127370; PMCID: PMC5681649.
- [392] Hsu YL, Hung JY, Chang WA, Lin YS, Pan YC, Tsai PH, Wu CY, Kuo PL. Hypoxic lung cancer-secreted exosomal miR-23a increased angiogenesis and vascular permeability by targeting prolyl hydroxylase and tight junction protein ZO-1. *Oncogene*. 2017 Aug 24;36(34):4929-4942. doi: 10.1038 / onc.2017.105. Epub 2017 Apr 24. PMID: 28436951.
- [393] Wei F, Ma C, Zhou T, Dong X, Luo Q, Geng L, Ding L, Zhang Y, Zhang L, Li N, Li Y, Liu Y. Exosomes derived from gemcitabine-resistant cells transfer malignant phenotypic traits via delivery of miRNA-222-3p. *Mol Cancer*. 2017 Jul 25;16(1):132. doi: 10.1186 / s12943-017-0694-8. Erratum in: *Mol Cancer*. 2021 Feb 17;20(1):35. doi: 10.1186 / s12943-021-01320-y. PMID: 28743280; PMCID: PMC5526308.
- [394] Tang Y, Cui Y, Li Z, Jiao Z, Zhang Y, He Y, Chen G, Zhou Q, Wang W, Zhou X, Luo J, Zhang S. Radiation-induced miR-208a increases the proliferation and radioresistance by targeting p21 in human lung cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016 Jan 12;35:7. doi: 10.1186 / s13046-016-0285-3. Erratum in: *J Exp Clin Cancer Res*. 2016 Jan 28;35:20. doi: 10.1186 / s13046-016-0299-x.. Cheng, Guangxia [corrected to Chen, Guangxia]. PMID: 26754670; PMCID: PMC4710038.
- [395] Baroni S, Romero-Cordoba S, Plantamura I, Dugo M, D'Ippolito E, Cataldo A, Cosentino G, Angeloni V, Rossini A, Daidone MG, Iorio MV. Exosome-mediated delivery of miR-9 induces cancer-associated fibroblast-like properties in human breast fibroblasts. *Cell*

- Death Dis. 2016 Jul 28;7(7):e2312. doi: 10.1038 / cddis.2016.224. PMID: 27468688; PMCID: PMC4973361.
- [396] Wang B, Tan Z, Guan F. Tumor-Derived Exosomes Mediate the Instability of Cadherins and Promote Tumor Progression. *Int J Mol Sci.* 2019 Jul 26;20(15):3652. doi: 10.3390 / ijms20153652. PMID: 31357383; PMCID: PMC6696460.
- [397] Roccaro AM, Sacco A, Maiso P, Azab AK, Tai YT, Reagan M, Azab F, Flores LM, Campigotto F, Weller E, Anderson KC, Scadden DT, Ghobrial IM. BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *J Clin Invest.* 2013 Apr;123(4):1542-55. doi: 10.1172 / JCI66517. Erratum in: *J Clin Invest.* 2013 Aug 1;123(8):3635. PMID: 23454749; PMCID: PMC3613927.
- [398] Wang J, Hendrix A, Hernot S, Lemaire M, De Bruyne E, Van Valckenborgh E, Lahoutte T, De Wever O, Vanderkerken K, Menu E. Bone marrow stromal cell-derived exosomes as communicators in drug resistance in multiple myeloma cells. *Blood.* 2014 Jul 24;124(4):555-66. doi: 10.1182 / blood-2014-03-562439. Epub 2014 Jun 13. PMID: 24928860.
- [399] Hu Y, Yan C, Mu L, Huang K, Li X, Tao D, Wu Y, Qin J. Fibroblast-Derived Exosomes Contribute to Chemoresistance through Priming Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer. *PLoS One.* 2015 May 4;10(5):e0125625. doi: 10.1371 / journal.pone.0125625. PMID: 25938772; PMCID: PMC4418721.
- [400] Zhao W, Shan B, He D, Cheng Y, Li B, Zhang C, Duan C. Recent Progress in Characterizing Long Noncoding RNAs in Cancer Drug Resistance. *J Cancer.* 2019 Oct 22;10(26):6693-6702. doi: 10.7150 / jca.30877. PMID: 31777598; PMCID: PMC6856905.

- [401] Hewson C, Morris KV. Form and Function of Exosome-Associated Long Non-coding RNAs in Cancer. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2016;394:41-56. doi: 10.1007 / 82\_2015\_486. PMID: 26739961.
- [402] Wang M, Zhou L, Yu F, Zhang Y, Li P, Wang K. The functional roles of exosomal long non-coding RNAs in cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2019 Jun;76(11):2059-2076. doi: 10.1007 / s00018-019-03018-3. Epub 2019 Jan 25. PMID: 30683984; PMCID: PMC11105177.
- [403] Li J, Li Z, Zheng W, Li X, Wang Z, Cui Y, Jiang X. LncRNA-ATB: An indispensable cancer-related long noncoding RNA. *Cell Prolif*. 2017 Dec;50(6):e12381. doi: 10.1111 / cpr.12381. Epub 2017 Sep 8. PMID: 28884871; PMCID: PMC6529097.
- [404] Zhou R, Chen KK, Zhang J, Xiao B, Huang Z, Ju C, Sun J, Zhang F, Lv XB, Huang G. The decade of exosomal long RNA species: an emerging cancer antagonist. *Mol Cancer*. 2018 Mar 20;17(1):75. doi: 10.1186 / s12943-018-0823-z. PMID: 29558960; PMCID: PMC5861621.
- [405] Deng H, Zhang J, Shi J, Guo Z, He C, Ding L, Tang JH, Hou Y. Role of long non-coding RNA in tumor drug resistance. *Tumour Biol*. 2016 Sep;37(9):11623-11631. doi: 10.1007 / s13277-016-5125-8. Epub 2016 Jul 5. PMID: 27380056.
- [406] Chen QN, Wei CC, Wang ZX, Sun M. Long non-coding RNAs in anti-cancer drug resistance. *Oncotarget*. 2017 Jan 3;8(1):1925-1936. doi: 10.18632 / oncotarget.12461. PMID: 27713133; PMCID: PMC5352108.
- [407] Kristensen LS, Andersen MS, Stagsted LVW, Ebbesen KK, Hansen TB, Kjems J. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs. *Nat Rev Genet*. 2019 Nov;20(11):675-691. doi: 10.1038 / s41576-019-0158-7. Epub 2019 Aug 8. PMID: 31395983.



- 
- [408] Fanale D, Taverna S, Russo A, Bazan V. Circular RNA in Exosomes. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1087:109-117. doi: 10.1007 / 978-981-13-1426-1\_9. PMID: 30259361.
- [409] Bao C, Lyu D, Huang S. Circular RNA expands its territory. *Mol Cell Oncol*. 2015 Aug 28;3(2):e1084443. doi: 10.1080 / 23723556.2015.1084443. PMID: 27308606; PMCID: PMC4905385.
- [410] Cheng X, Zhang L, Zhang K, Zhang G, Hu Y, Sun X, Zhao C, Li H, Li YM, Zhao J. Circular RNA VMA21 protects against intervertebral disc degeneration through targeting miR-200c and X linked inhibitor-of-apoptosis protein. *Ann Rheum Dis*. 2018 May;77(5):770-779. doi: 10.1136 / annrheumdis-2017-212056. Epub 2018 Jan 17. PMID: 29343508; PMCID: PMC5909753.
- [411] Li J, Li Z, Jiang P, Peng M, Zhang X, Chen K, Liu H, Bi H, Liu X, Li X. Circular RNA IARS (circ-IARS) secreted by pancreatic cancer cells and located within exosomes regulates endothelial monolayer permeability to promote tumor metastasis. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018 Jul 31;37(1):177. doi: 10.1186 / s13046-018-0822-3. PMID: 30064461; PMCID: PMC6069563.
- [412] Jamal M, Song T, Chen B, Faisal M, Hong Z, Xie T, Wu Y, Pan S, Yin Q, Shao L, Zhang Q. Recent Progress on Circular RNA Research in Acute Myeloid Leukemia. *Front Oncol*. 2019 Nov 6;9:1108. doi: 10.3389 / fonc.2019.01108. PMID: 31781482; PMCID: PMC6851197.
- [413] Smid M, Wilting SM, Uhr K, Rodríguez-González FG, de Weerd V, Prager-Van der Smissen WJC, van der Vlugt-Daane M, van Galen A, Nik-Zainal S, Butler A, Martin S, Davies HR, Staaf J, van de Vijver MJ, Richardson AL, MacGrogan G, Salgado R, van den Eynden GGGM, Purdie CA, Thompson AM, Caldas C, Span PN, Sweep FCGJ, Simpson

- PT, Lakhani SR, Van Laere S, Desmedt C, Paradiso A, Eyfjord J, Broeks A, Vincent-Salomon A, Futreal AP, Knappskog S, King T, Viari A, Børresen-Dale AL, Stunnenberg HG, Stratton M, Foekens JA, Sieuwerts AM, Martens JWM. The circular RNome of primary breast cancer. *Genome Res.* 2019 Mar;29(3):356-366. doi: 10.1101 / gr.238121.118. Epub 2019 Jan 28. PMID: 30692147; PMCID: PMC6396421.
- [414] Li Y, Zheng Q, Bao C, Li S, Guo W, Zhao J, Chen D, Gu J, He X, Huang S. Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis. *Cell Res.* 2015 Aug;25(8):981-4. doi: 10.1038 / cr.2015.82. Epub 2015 Jul 3. PMID: 26138677; PMCID: PMC4528056.
- [415] Roma-Rodrigues C, Mendes R, Baptista PV, Fernandes AR. Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2019 Feb 15;20(4):840. doi: 10.3390 / ijms20040840. PMID: 30781344; PMCID: PMC6413095.
- [416] Wang J, De Veirman K, Faict S, Frassanito MA, Ribatti D, Vacca A, Menu E. Multiple myeloma exosomes establish a favourable bone marrow microenvironment with enhanced angiogenesis and immunosuppression. *J Pathol.* 2016 Jun;239(2):162-73. doi: 10.1002 / path.4712. Epub 2016 Apr 7. PMID: 26956697.
- [417] Li I, Nabet BY. Exosomes in the tumor microenvironment as mediators of cancer therapy resistance. *Mol Cancer.* 2019 Mar 1;18(1):32. doi: 10.1186 / s12943-019-0975-5. PMID: 30823926; PMCID: PMC6397467.
- [418] Zhao H, Yang L, Baddour J, Achreja A, Bernard V, Moss T, Marini JC, Tudawe T, Seviour EG, San Lucas FA, Alvarez H, Gupta S, Maiti SN, Cooper L, Peehl D, Ram PT, Maitra A, Nagrath D. Tumor microenvironment derived exosomes pleiotropically modulate cancer cell metabolism. *Elife.* 2016 Feb 27;5:e10250. doi: 10.7554 / eLife.10250.

- PMID: 26920219; PMCID: PMC4841778.
- [419] Whiteside TL. Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Cancer Progression. *Adv Clin Chem.* 2016;74:103-41. doi: 10.1016 / bs.acc.2015.12.005. Epub 2016 Apr 7. PMID: 27117662; PMCID: PMC5382933.
- [420] Yang X, Li Y, Zou L, Zhu Z. Role of Exosomes in Crosstalk Between Cancer-Associated Fibroblasts and Cancer Cells. *Front Oncol.* 2019 May 3;9:356. doi: 10.3389 / fonc.2019.00356. PMID: 31131261; PMCID: PMC6510008.
- [421] Huang TX, Guan XY, Fu L. Therapeutic targeting of the crosstalk between cancer-associated fibroblasts and cancer stem cells. *Am J Cancer Res.* 2019 Sep 1;9(9):1889-1904. PMID: 31598393; PMCID: PMC6780671.
- [422] Hu YB, Yan C, Mu L, Mi YL, Zhao H, Hu H, Li XL, Tao DD, Wu YQ, Gong JP, Qin JC. Exosomal Wnt-induced dedifferentiation of colorectal cancer cells contributes to chemotherapy resistance. *Oncogene.* 2019 Mar;38(11):1951-1965. doi: 10.1038 / s41388-018-0557-9. Epub 2018 Nov 2. Erratum in: *Oncogene.* 2019 Aug;38(35):6319-6321. doi: 10.1038 / s41388-019-0863-x. PMID: 30390075; PMCID: PMC6756234.
- [423] Savardashtaki A, Shabaninejad Z, Movahedpour A, Sahebhasagh R, Mirzaei H, Hamblin MR. miRNAs derived from cancer-associated fibroblasts in colorectal cancer. *Epigenomics.* 2019 Nov;11(14):1627-1645. doi: 10.2217 / epi-2019-0110. Epub 2019 Nov 8. PMID: 31702390; PMCID: PMC7132634.
- [424] Richards KE, Zeleniak AE, Fishel ML, Wu J, Littlepage LE, Hill R. Cancer-associated fibroblast exosomes regulate survival and proliferation of pancreatic cancer cells. *Oncogene.* 2017 Mar 30;36(13):1770-1778. doi: 10.1038 / onc.2016.353. Epub 2016 Sep

26. PMID: 27669441; PMCID: PMC5366272.
- [425] Li W, Zhang X, Wang J, Li M, Cao C, Tan J, Ma D, Gao Q. TGF $\beta$ 1 in fibroblasts-derived exosomes promotes epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells. *Oncotarget*. 2017 Oct 6;8(56):96035-96047. doi: 10.18632 / oncotarget.21635. PMID: 29221185; PMCID: PMC5707079.
- [426] Hao Y, Baker D, Ten Dijke P. TGF- $\beta$ -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci*. 2019 Jun 5;20(11):2767. doi: 10.3390 / ijms20112767. PMID: 31195692; PMCID: PMC6600375.
- [427] Ren Y, Jia HH, Xu YQ, Zhou X, Zhao XH, Wang YF, Song X, Zhu ZY, Sun T, Dou Y, Tian WP, Zhao XL, Kang CS, Mei M. Paracrine and epigenetic control of CAF-induced metastasis: the role of HOTAIR stimulated by TGF- $\beta$ 1 secretion. *Mol Cancer*. 2018 Jan 11;17(1):5. doi: 10.1186 / s12943-018-0758-4. PMID: 29325547; PMCID: PMC5765658.
- [428] Zhuang J, Lu Q, Shen B, Huang X, Shen L, Zheng X, Huang R, Yan J, Guo H. TGF $\beta$ 1 secreted by cancer-associated fibroblasts induces epithelial-mesenchymal transition of bladder cancer cells through lncRNA-ZEB2NAT. *Sci Rep*. 2015 Jul 8;5:11924. doi: 10.1038 / srep11924. PMID: 26152796; PMCID: PMC4495469.
- [429] Sun Z, Wang L, Dong L, Wang X. Emerging role of exosome signalling in maintaining cancer stem cell dynamic equilibrium. *J Cell Mol Med*. 2018 Aug;22(8):3719-3728. doi: 10.1111 / jcmm.13676. Epub 2018 May 25. PMID: 29799161; PMCID: PMC6050499.
- [430] Li W, Zhang L, Guo B, Deng J, Wu S, Li F, Wang Y, Lu J, Zhou Y. Exosomal FMR1-AS1 facilitates maintaining cancer stem-like cell dynamic equilibrium via TLR7 / NF $\kappa$ B / c-Myc signaling in female esophageal carcinoma. *Mol Cancer*. 2019 Feb 8;18(1):22. doi: 10.1186 / s12943-019-0949-7. PMID: 30736860; PMCID: PMC6367809.

- [431] Wang L, Yang G, Zhao D, Wang J, Bai Y, Peng Q, Wang H, Fang R, Chen G, Wang Z, Wang K, Li G, Yang Y, Wang Z, Guo P, Peng L, Hou D, Xu W. CD103-positive CSC exosome promotes EMT of clear cell renal cell carcinoma: role of remote MiR-19b-3p. *Mol Cancer*. 2019 Apr 11;18(1):86. doi: 10.1186 / s12943-019-0997-z. Erratum in: *Mol Cancer*. 2020 Sep 24;19(1):144. doi: 10.1186 / s12943-020-01261-y. PMID: 30975145; PMCID: PMC6458839.
- [432] Cheng Z, Lei Z, Yang P, Si A, Xiang D, Tang X, Guo G, Zhou J, Hüser N. Exosome-transmitted p120-catenin suppresses hepatocellular carcinoma progression via STAT3 pathways. *Mol Carcinog*. 2019 Aug;58(8):1389-1399. doi: 10.1002 / mc.23022. Epub 2019 Apr 17. PMID: 30997702.
- [433] Wang J, Zheng Y, Zhao M. Exosome-Based Cancer Therapy: Implication for Targeting Cancer Stem Cells. *Front Pharmacol*. 2017 Jan 12;7:533. doi: 10.3389 / fphar.2016.00533. PMID: 28127287; PMCID: PMC5226951.
- [434] Yang Z, Zhao N, Cui J, Wu H, Xiong J, Peng T. Exosomes derived from cancer stem cells of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells enhance drug resistance by delivering miR-210. *Cell Oncol (Dordr)*. 2020 Feb;43(1):123-136. doi: 10.1007 / s13402-019-00476-6. Epub 2019 Nov 12. PMID: 31713003.
- [435] Boelens MC, Wu TJ, Nabet BY, Xu B, Qiu Y, Yoon T, Azzam DJ, Twyman-Saint Victor C, Wiemann BZ, Ishwaran H, Ter Brugge PJ, Jonkers J, Slingerland J, Minn AJ. Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways. *Cell*. 2014 Oct 23;159(3):499-513. doi: 10.1016 / j.cell.2014.09.051. PMID: 25417103; PMCID: PMC4283810.
- [436] Deng H, Sun C, Sun Y, Li H, Yang L, Wu D, Gao Q, Jiang X. Lipid, Protein, and

- MicroRNA Composition Within Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes. *Cell Reprogram.* 2018 Jun;20(3):178-186. doi: 10.1089 / cell.2017.0047. Epub 2018 May 21. PMID: 29782191.
- [437] Seo M, Kim SM, Woo EY, Han KC, Park EJ, Ko S, Choi EW, Jang M. Stemness-Attenuating miR-503-3p as a Paracrine Factor to Regulate Growth of Cancer Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2018 Apr 4;2018:4851949. doi: 10.1155 / 2018 / 4851949. PMID: 29849663; PMCID: PMC5904772.
- [438] Sharma A. Role of stem cell derived exosomes in tumor biology. *Int J Cancer.* 2018 Mar 15;142(6):1086-1092. doi: 10.1002 / ijc.31089. Epub 2017 Oct 16. PMID: 28983919.
- [439] Yang YP, Nguyen PNN, Ma HI, Ho WJ, Chen YW, Chien Y, Yarmishyn AA, Huang PI, Lo WL, Wang CY, Liu YY, Lee YY, Lin CM, Chen MT, Wang ML. Tumor Mesenchymal Stromal Cells Regulate Cell Migration of Atypical Teratoid Rhabdoid Tumor through Exosome-Mediated miR155 / SMARCA4 Pathway. *Cancers (Basel).* 2019 May 24;11(5):720. doi: 10.3390 / cancers11050720. PMID: 31137686; PMCID: PMC6563126.
- [440] Hossain A, Gumin J, Gao F, Figueroa J, Shinojima N, Takezaki T, Priebe W, Villarreal D, Kang SG, Joyce C, Sulman E, Wang Q, Marini FC, Andreeff M, Colman H, Lang FF. Mesenchymal Stem Cells Isolated From Human Gliomas Increase Proliferation and Maintain Stemness of Glioma Stem Cells Through the IL-6 / gp130 / STAT3 Pathway. *Stem Cells.* 2015 Aug;33(8):2400-15. doi: 10.1002 / stem.2053. Epub 2015 May 27. PMID: 25966666; PMCID: PMC4509942.
- [441] Figueroa J, Phillips LM, Shahar T, Hossain A, Gumin J, Kim H, Bean AJ, Calin GA, Fueyo J, Walters ET, Kalluri R, Verhaak RG, Lang FF. Exosomes from

- Glioma-Associated Mesenchymal Stem Cells Increase the Tumorigenicity of Glioma Stem-like Cells via Transfer of miR-1587. *Cancer Res.* 2017 Nov 1;77(21):5808-5819. doi: 10.1158 / 0008-5472.CAN-16-2524. Epub 2017 Aug 30. PMID: 28855213; PMCID: PMC5668150.
- [442] Toh WS, Lai RC, Zhang B, Lim SK. MSC exosome works through a protein-based mechanism of action. *Biochem Soc Trans.* 2018 Aug 20;46(4):843-853. doi: 10.1042 / BST20180079. Epub 2018 Jul 9. PMID: 29986939; PMCID: PMC6103455.
- [443] Lee C, Mitsialis SA, Aslam M, Vitali SH, Vergadi E, Konstantinou G, Sdrimas K, Fernandez-Gonzalez A, Kourembanas S. Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation.* 2012 Nov 27;126(22):2601-11. doi: 10.1161 / CIRCULATIONAHA.112.114173. Epub 2012 Oct 31. PMID: 23114789; PMCID: PMC3979353.
- [444] Pakravan K, Babashah S, Sadeghizadeh M, Mowla SJ, Mossahebi-Mohammadi M, Ataei F, Dana N, Javan M. MicroRNA-100 shuttled by mesenchymal stem cell-derived exosomes suppresses in vitro angiogenesis through modulating the mTOR / HIF-1 $\alpha$  / VEGF signaling axis in breast cancer cells. *Cell Oncol (Dordr).* 2017 Oct;40(5):457-470. doi: 10.1007 / s13402-017-0335-7. Epub 2017 Jul 24. PMID: 28741069.
- [445] Ti D, Hao H, Fu X, Han W. Mesenchymal stem cells-derived exosomal microRNAs contribute to wound inflammation. *Sci China Life Sci.* 2016 Dec;59(12):1305-1312. doi: 10.1007 / s11427-016-0240-4. Epub 2016 Nov 18. PMID: 27864711.
- [446] Yong SB, Chung JY, Song Y, Kim J, Ra S, Kim YH. Non-viral nano-immunotherapeutics targeting tumor microenvironmental immune cells. *Biomaterials.* 2019 Oct;219:119401. doi: 10.1016 / j.biomaterials.2019.119401. Epub 2019 Jul 31. PMID: 31398571.

- [447] Ramos-Zayas Y, Franco-Molina MA, Hernández-Granados AJ, Zárate-Triviño DG, Coronado-Cerda EE, Mendoza-Gamboa E, Zapata-Benavides P, Ramírez-Romero R, Santana-Krymskaya SE, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C. Immunotherapy for the treatment of canine transmissible venereal tumor based in dendritic cells pulsed with tumoral exosomes. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2019 Feb;41(1):48-54. doi: 10.1080 / 08923973.2018.1533969. Epub 2018 Dec 20. PMID: 30334465.
- [448] Jan AT, Rahman S, Khan S, Tasduq SA, Choi I. Biology, Pathophysiological Role, and Clinical Implications of Exosomes: A Critical Appraisal. *Cells*. 2019 Jan 29;8(2):99. doi: 10.3390 / cells8020099. PMID: 30699987; PMCID: PMC6406279.
- [449] Muller L, Simms P, Hong CS, Nishimura MI, Jackson EK, Watkins SC, Whiteside TL. Human tumor-derived exosomes (TEX) regulate Treg functions via cell surface signaling rather than uptake mechanisms. *Oncoimmunology*. 2017 Jul 19;6(8):e1261243. doi: 10.1080 / 2162402X.2016.1261243. PMID: 28919985; PMCID: PMC5593709.
- [450] Kim JW, Wieckowski E, Taylor DD, Reichert TE, Watkins S, Whiteside TL. Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin Cancer Res*. 2005 Feb 1;11(3):1010-20. PMID: 15709166.
- [451] Xie Y, Dang W, Zhang S, Yue W, Yang L, Zhai X, Yan Q, Lu J. The role of exosomal noncoding RNAs in cancer. *Mol Cancer*. 2019 Mar 9;18(1):37. doi: 10.1186 / s12943-019-0984-4. PMID: 30849983; PMCID: PMC6408816.
- [452] Hsu YL, Hung JY, Chang WA, Jian SF, Lin YS, Pan YC, Wu CY, Kuo PL. Hypoxic Lung-Cancer-Derived Extracellular Vesicle MicroRNA-103a Increases the Oncogenic Effects of Macrophages by Targeting PTEN. *Mol Ther*. 2018 Feb 7;26(2):568-581. doi:



- 10.1016 / j.ymthe.2017.11.016. Epub 2017 Nov 29. PMID: 29292163; PMCID: PMC5835028.
- [453] Ning Y, Shen K, Wu Q, Sun X, Bai Y, Xie Y, Pan J, Qi C. Tumor exosomes block dendritic cells maturation to decrease the T cell immune response. *Immunol Lett*. 2018 Jul;199:36-43. doi: 10.1016 / j.imlet.2018.05.002. Epub 2018 May 22. PMID: 29800589.
- [454] Seo N, Akiyoshi K, Shiku H. Exosome-mediated regulation of tumor immunology. *Cancer Sci*. 2018 Oct;109(10):2998-3004. doi: 10.1111 / cas.13735. Epub 2018 Aug 1. PMID: 29999574; PMCID: PMC6172045.
- [455] Berchem G, Noman MZ, Bosseler M, Paggetti J, Baconnais S, Le Cam E, Nanbakhsh A, Moussay E, Mami-Chouaib F, Janji B, Chouaib S. Hypoxic tumor-derived microvesicles negatively regulate NK cell function by a mechanism involving TGF- $\beta$  and miR23a transfer. *Oncoimmunology*. 2015 Jun 24;5(4):e1062968. doi: 10.1080 / 2162402X.2015.1062968. PMID: 27141372; PMCID: PMC4839360.
- [456] Du Y, Lin Y, Gan L, Wang S, Chen S, Li C, Hou S, Hu B, Wang B, Ye Y, Shen Z. Potential crosstalk between SPP1+TAMs and CD8+exhausted T cells promotes an immunosuppressive environment in gastric metastatic cancer. *J Transl Med*. 2024 Feb 16;22(1):158. doi: 10.1186 / s12967-023-04688-1. PMID: 38365757; PMCID: PMC10870525.
- [457] Muller L, Mitsunashi M, Simms P, Gooding WE, Whiteside TL. Tumor-derived exosomes regulate expression of immune function-related genes in human T cell subsets. *Sci Rep*. 2016 Feb 4;6:20254. doi: 10.1038 / srep20254. PMID: 26842680; PMCID: PMC4740743.
- [458] Whiteside TL. Immune modulation of T-cell and NK (natural killer) cell activities by TEXs (tumour-derived exosomes). *Biochem Soc Trans*. 2013 Feb 1;41(1):245-51. doi:

- 10.1042 / BST20120265. PMID: 23356291; PMCID: PMC3721347.
- [459] Okoye IS, Coomes SM, Pelly VS, Czieso S, Papayannopoulos V, Tolmachova T, Seabra MC, Wilson MS. MicroRNA-containing T-regulatory-cell-derived exosomes suppress pathogenic T helper 1 cells. *Immunity*. 2014 Jul 17;41(1):89-103. doi: 10.1016 / j.immuni.2014.05.019. Erratum in: *Immunity*. 2014 Sep 18;41(3):503. doi: 10.1016 / j.immuni.2014.08.008. PMID: 25035954; PMCID: PMC4104030.
- [460] Wang J, Li D, Cang H, Guo B. Crosstalk between cancer and immune cells: Role of tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment. *Cancer Med*. 2019 Aug;8(10):4709-4721. doi: 10.1002 / cam4.2327. Epub 2019 Jun 20. PMID: 31222971; PMCID: PMC6712467.
- [461] Lan J, Sun L, Xu F, Liu L, Hu F, Song D, Hou Z, Wu W, Luo X, Wang J, Yuan X, Hu J, Wang G. M2 Macrophage-Derived Exosomes Promote Cell Migration and Invasion in Colon Cancer. *Cancer Res*. 2019 Jan 1;79(1):146-158. doi: 10.1158 / 0008-5472.CAN-18-0014. Epub 2018 Nov 6. PMID: 30401711.
- [462] Steinbichler TB, Dudás J, Skvortsov S, Ganswindt U, Riechelmann H, Skvortsova II. Therapy resistance mediated by exosomes. *Mol Cancer*. 2019 Mar 30;18(1):58. doi: 10.1186 / s12943-019-0970-x. PMID: 30925921; PMCID: PMC6441190.
- [463] Vu T, Datta PK. Regulation of EMT in Colorectal Cancer: A Culprit in Metastasis. *Cancers (Basel)*. 2017 Dec 16;9(12):171. doi: 10.3390 / cancers9120171. PMID: 29258163; PMCID: PMC5742819.
- [464] Khan AQ, Ahmed EI, Elareer NR, Junejo K, Steinhoff M, Uddin S. Role of miRNA-Regulated Cancer Stem Cells in the Pathogenesis of Human Malignancies. *Cells*. 2019 Aug 5;8(8):840. doi: 10.3390 / cells8080840. PMID: 31530793; PMCID:

- PMC6721829.
- [465] Grelet S, Link LA, Howley B, Obellianne C, Palanisamy V, Gangaraju VK, Diehl JA, Howe PH. A regulated PNUTS mRNA to lncRNA splice switch mediates EMT and tumour progression. *Nat Cell Biol.* 2017 Sep;19(9):1105-1115. doi: 10.1038 / ncb3595. Epub 2017 Aug 21. Erratum in: *Nat Cell Biol.* 2017 Nov 29;19(12):1443. doi: 10.1038 / ncb3647. PMID: 28825698; PMCID: PMC5578890.
- [466] Liang H, Yu T, Han Y, Jiang H, Wang C, You T, Zhao X, Shan H, Yang R, Yang L, Shan H, Gu Y. LncRNA PTAR promotes EMT and invasion-metastasis in serous ovarian cancer by competitively binding miR-101-3p to regulate ZEB1 expression. *Mol Cancer.* 2018 Aug 11;17(1):119. doi: 10.1186 / s12943-018-0870-5. Erratum in: *Mol Cancer.* 2021 Apr 9;20(1):64. doi: 10.1186 / s12943-021-01344-4. PMID: 30098599; PMCID: PMC6087007.
- [467] Rahman MA, Barger JF, Lovat F, Gao M, Otterson GA, Nana-Sinkam P. Lung cancer exosomes as drivers of epithelial mesenchymal transition. *Oncotarget.* 2016 Aug 23;7(34):54852-54866. doi: 10.18632 / oncotarget.10243. PMID: 27363026; PMCID: PMC5342386.
- [468] Liu H, Liu Y, Sun P, Leng K, Xu Y, Mei L, Han P, Zhang B, Yao K, Li C, Bai J, Cui B. Colorectal cancer-derived exosomal miR-106b-3p promotes metastasis by down-regulating DLC-1 expression. *Clin Sci (Lond).* 2020 Feb 28;134(4):419-434. doi: 10.1042 / CS20191087. PMID: 32065214.
- [469] Li Z, Jiang P, Li J, Peng M, Zhao X, Zhang X, Chen K, Zhang Y, Liu H, Gan L, Bi H, Zhen P, Zhu J, Li X. Tumor-derived exosomal lnc-Sox2ot promotes EMT and stemness by acting as a ceRNA in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene.* 2018

- Jul;37(28):3822-3838. doi: 10.1038 / s41388-018-0237-9. Epub 2018 Apr 12. PMID: 29643475.
- [470] Li Z, Yanfang W, Li J, Jiang P, Peng T, Chen K, Zhao X, Zhang Y, Zhen P, Zhu J, Li X. Tumor-released exosomal circular RNA PDE8A promotes invasive growth via the miR-338 / MACC1 / MET pathway in pancreatic cancer. *Cancer Lett.* 2018 Sep 28;432:237-250. doi: 10.1016 / j.canlet.2018.04.035. Epub 2018 Apr 28. PMID: 29709702.
- [471] Syn N, Wang L, Sethi G, Thiery JP, Goh BC. Exosome-Mediated Metastasis: From Epithelial-Mesenchymal Transition to Escape from Immunosurveillance. *Trends Pharmacol Sci.* 2016 Jul;37(7):606-617. doi: 10.1016 / j.tips.2016.04.006. Epub 2016 May 3. PMID: 27157716.
- [472] Gu J, Qian H, Shen L, Zhang X, Zhu W, Huang L, Yan Y, Mao F, Zhao C, Shi Y, Xu W. Gastric cancer exosomes trigger differentiation of umbilical cord derived mesenchymal stem cells to carcinoma-associated fibroblasts through TGF- $\beta$  / Smad pathway. *PLoS One.* 2012;7(12):e52465. doi: 10.1371 / journal.pone.0052465. Epub 2012 Dec 20. PMID: 23285052; PMCID: PMC3527492.
- [473] Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, Molina H, Kohsaka S, Di Giannatale A, Ceder S, Singh S, Williams C, Soplop N, Uryu K, Parmer L, King T, Bojmar L, Davies AE, Ararso Y, Zhang T, Zhang H, Hernandez J, Weiss JM, Dumont-Cole VD, Kramer K, Wexler LH, Narendran A, Schwartz GK, Healey JH, Sandstrom P, Labori KJ, Kure EH, Grandgenett PM, Hollingsworth MA, de Sousa M, Kaur S, Jain M, Mallya K, Batra SK, Jarnagin WR, Brady MS, Fodstad O, Muller V, Pantel K, Minn AJ, Bissell MJ, Garcia BA, Kang Y, Rajasekhar VK, Ghajar CM, Matei I,

- Peinado H, Bromberg J, Lyden D. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*. 2015 Nov 19;527(7578):329-35. doi: 10.1038 / nature15756. Epub 2015 Oct 28. PMID: 26524530; PMCID: PMC4788391.
- [474] Lin CJ, Yun EJ, Lo UG, Tai YL, Deng S, Hernandez E, Dang A, Chen YA, Saha D, Mu P, Lin H, Li TK, Shen TL, Lai CH, Hsieh JT. The paracrine induction of prostate cancer progression by caveolin-1. *Cell Death Dis*. 2019 Nov 4;10(11):834. doi: 10.1038 / s41419-019-2066-3. PMID: 31685812; PMCID: PMC6828728.
- [475] Campos A, Salomon C, Bustos R, Díaz J, Martínez S, Silva V, Reyes C, Díaz-Valdivia N, Varas-Godoy M, Lobos-González L, Quest AF. Caveolin-1-containing extracellular vesicles transport adhesion proteins and promote malignancy in breast cancer cell lines. *Nanomedicine (Lond)*. 2018 Oct;13(20):2597-2609. doi: 10.2217 / nnm-2018-0094. Epub 2018 Oct 19. PMID: 30338706.
- [476] Aga M, Bentz GL, Raffa S, Torrisi MR, Kondo S, Wakisaka N, Yoshizaki T, Pagano JS, Shackelford J. Exosomal HIF1 $\alpha$  supports invasive potential of nasopharyngeal carcinoma-associated LMP1-positive exosomes. *Oncogene*. 2014 Sep 11;33(37):4613-22. doi: 10.1038 / onc.2014.66. Epub 2014 Mar 24. PMID: 24662828; PMCID: PMC4162459.
- [477] Han Q, Lv L, Wei J, Lei X, Lin H, Li G, Cao J, Xie J, Yang W, Wu S, You J, Lu J, Liu P, Min J. Vps4A mediates the localization and exosome release of  $\beta$ -catenin to inhibit epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*. 2019 Aug 10;457:47-59. doi: 10.1016 / j.canlet.2019.04.035. Epub 2019 May 3. PMID: 31059752.
- [478] Kalra H, Gangoda L, Fonseka P, Chitti SV, Liem M, Keerthikumar S, Samuel M, Boukouris S, Al Saffar H, Collins C, Adda CG, Ang CS, Mathivanan S. Extracellular

- vesicles containing oncogenic mutant  $\beta$ -catenin activate Wnt signalling pathway in the recipient cells. *J Extracell Vesicles*. 2019 Nov 15;8(1):1690217. doi: 10.1080 / 20013078.2019.1690217. PMID: 31819794; PMCID: PMC6883417.
- [479] Liu X, Yun F, Shi L, Li ZH, Luo NR, Jia YF. Roles of Signaling Pathways in the Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(15):6201-6. doi: 10.7314 / apjcp.2015.16.15.6201. PMID: 26434817.
- [480] Tsubakihara Y, Moustakas A. Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis under the Control of Transforming Growth Factor  $\beta$ . *Int J Mol Sci*. 2018 Nov 20;19(11):3672. doi: 10.3390 / ijms19113672. PMID: 30463358; PMCID: PMC6274739.
- [481] Kim H, Lee S, Shin E, Seong KM, Jin YW, Youn H, Youn B. The Emerging Roles of Exosomes as EMT Regulators in Cancer. *Cells*. 2020 Apr 2;9(4):861. doi: 10.3390 / cells9040861. PMID: 32252322; PMCID: PMC7226841.
- [482] Qu Z, Feng J, Pan H, Jiang Y, Duan Y, Fa Z. Exosomes derived from HCC cells with different invasion characteristics mediated EMT through TGF- $\beta$  / Smad signaling pathway. *Onco Targets Ther*. 2019 Aug 23;12:6897-6905. doi: 10.2147 / OTT.S209413. PMID: 31692540; PMCID: PMC6711569.
- [483] Ma J, Li J, Wang Y, Chen W, Zheng P, Chen Y, Sun Z, Liu J, Zhou Y, Wang J, Liu S, Han X. WSZG inhibits BMSC-induced EMT and bone metastasis in breast cancer by regulating TGF- $\beta$ 1 / Smads signaling. *Biomed Pharmacother*. 2020 Jan;121:109617. doi: 10.1016 / j.biopha.2019.109617. Epub 2019 Nov 22. PMID: 31810139.
- [484] Olea-Flores M, Zuñiga-Eulogio MD, Mendoza-Catalán MA, Rodríguez-Ruiz HA, Castañeda-Saucedo E, Ortuño-Pineda C, Padilla-Benavides T, Navarro-Tito N. Extracellular-Signal Regulated Kinase: A Central Molecule Driving

- Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019 Jun 13;20(12):2885. doi: 10.3390 / ijms20122885. PMID: 31200510; PMCID: PMC6627365.
- [485] Ma Q, Wu H, Xiao Y, Liang Z, Liu T. Upregulation of exosomal microRNA-21 in pancreatic stellate cells promotes pancreatic cancer cell migration and enhances Ras / ERK pathway activity. *Int J Oncol.* 2020 Apr;56(4):1025-1033. doi: 10.3892 / ijo.2020.4986. Epub 2020 Feb 14. PMID: 32319558.
- [486] Chen L, Guo P, He Y, Chen Z, Chen L, Luo Y, Qi L, Liu Y, Wu Q, Cui Y, Fang F, Zhang X, Song T, Guo H. HCC-derived exosomes elicit HCC progression and recurrence by epithelial-mesenchymal transition through MAPK / ERK signalling pathway. *Cell Death Dis.* 2018 May 1;9(5):513. doi: 10.1038 / s41419-018-0534-9. PMID: 29725020; PMCID: PMC5938707.
- [487] Zhang X, Sai B, Wang F, Wang L, Wang Y, Zheng L, Li G, Tang J, Xiang J. Hypoxic BMSC-derived exosomal miRNAs promote metastasis of lung cancer cells via STAT3-induced EMT. *Mol Cancer.* 2019 Mar 13;18(1):40. doi: 10.1186 / s12943-019-0959-5. PMID: 30866952; PMCID: PMC6417285.
- [488] Ha D, Yang N, Nadithe V. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharm Sin B.* 2016 Jul;6(4):287-96. doi: 10.1016 / j.apsb.2016.02.001. Epub 2016 Mar 8. PMID: 27471669; PMCID: PMC4951582.
- [489] Gilligan KE, Dwyer RM. Engineering Exosomes for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2017 May 24;18(6):1122. doi: 10.3390 / ijms18061122. PMID: 28538671; PMCID: PMC5485946.
- [490] Srivastava A, Amreddy N, Razaq M, Towner R, Zhao YD, Ahmed RA, Munshi A,

- Ramesh R. Exosomes as Theranostics for Lung Cancer. *Adv Cancer Res.* 2018;139:1-33. doi: 10.1016 / bs.acr.2018.04.001. PMID: 29941101; PMCID: PMC6548197.
- [491] Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat Biotechnol.* 2015 Sep;33(9):941-51. doi: 10.1038 / nbt.3330. PMID: 26348965; PMCID: PMC4978509.
- [492] Kamerkar S, LeBleu VS, Sugimoto H, Yang S, Ruivo CF, Melo SA, Lee JJ, Kalluri R. Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature.* 2017 Jun 22;546(7659):498-503. doi: 10.1038 / nature22341. Epub 2017 Jun 7. PMID: 28607485; PMCID: PMC5538883.
- [493] Luan X, Sansanaphongpricha K, Myers I, Chen H, Yuan H, Sun D. Engineering exosomes as refined biological nanoplatfroms for drug delivery. *Acta Pharmacol Sin.* 2017 Jun;38(6):754-763. doi: 10.1038 / aps.2017.12. Epub 2017 Apr 10. PMID: 28392567; PMCID: PMC5520184.
- [494] Kim MS, Haney MJ, Zhao Y, Mahajan V, Deygen I, Klyachko NL, Inskoe E, Piroyan A, Sokolsky M, Okolie O, Hingtgen SD, Kabanov AV, Batrakova EV. Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine.* 2016 Apr;12(3):655-664. doi: 10.1016 / j.nano.2015.10.012. Epub 2015 Nov 14. PMID: 26586551; PMCID: PMC4809755.
- [495] Batrakova EV, Kim MS. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *J Control Release.* 2015 Dec 10;219:396-405. doi: 10.1016 / j.jconrel.2015.07.030. Epub 2015 Aug 1. PMID: 26241750; PMCID: PMC4656109.
- [496] Monfared H, Jahangard Y, Nikkhah M, Mirnajafi-Zadeh J, Mowla SJ. Potential Therapeutic Effects of Exosomes Packed With a miR-21-Sponge Construct in a Rat Model



- of Glioblastoma. *Front Oncol.* 2019 Aug 20;9:782. doi: 10.3389 / fonc.2019.00782. PMID: 31482067; PMCID: PMC6710330.
- [497] Yerneni SS, Lathwal S, Shrestha P, Shirwan H, Matyjaszewski K, Weiss L, Yolcu ES, Campbell PG, Das SR. Rapid On-Demand Extracellular Vesicle Augmentation with Versatile Oligonucleotide Tethers. *ACS Nano.* 2019 Sep 24;13(9):10555-10565. doi: 10.1021 / acsnano.9b04651. Epub 2019 Aug 27. PMID: 31436946; PMCID: PMC6800810.
- [498] Raghav KP, Wang W, Liu S, Chavez-MacGregor M, Meng X, Hortobagyi GN, Mills GB, Meric-Bernstam F, Blumenschein GR Jr, Gonzalez-Angulo AM. cMET and phospho-cMET protein levels in breast cancers and survival outcomes. *Clin Cancer Res.* 2012 Apr 15;18(8):2269-77. doi: 10.1158 / 1078-0432.CCR-11-2830. Epub 2012 Feb 28. PMID: 22374333; PMCID: PMC3821167.
- [499] Li S, Wu Y, Ding F, Yang J, Li J, Gao X, Zhang C, Feng J. Engineering macrophage-derived exosomes for targeted chemotherapy of triple-negative breast cancer. *Nanoscale.* 2020 May 21;12(19):10854-10862. doi: 10.1039 / d0nr00523a. PMID: 32396590.
- [500] Koch R, Demant M, Aung T, Diering N, Cicholas A, Chapuy B, Wenzel D, Lahmann M, Güntsch A, Kiecke C, Becker S, Hupfeld T, Venkataramani V, Ziepert M, Opitz L, Klapper W, Trümper L, Wulf GG. Populational equilibrium through exosome-mediated Wnt signaling in tumor progression of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2014 Apr 3;123(14):2189-98. doi: 10.1182 / blood-2013-08-523886. Epub 2014 Feb 21. PMID: 24563408.
- [501] Chen W, Jiang J, Xia W, Huang J. Tumor-Related Exosomes Contribute to

- Tumor-Promoting Microenvironment: An Immunological Perspective. *J Immunol Res.* 2017;2017:1073947. doi: 10.1155 / 2017 / 1073947. Epub 2017 May 31. PMID: 28642882; PMCID: PMC5470026.
- [502] Whiteside TL. Exosomes and tumor-mediated immune suppression. *J Clin Invest.* 2016 Apr 1;126(4):1216-23. doi: 10.1172 / JCI81136. Epub 2016 Feb 29. PMID: 26927673; PMCID: PMC4811135.
- [503] Olejarz W, Dominiak A, Żołnierzak A, Kubiak-Tomaszewska G, Lorenc T. Tumor-Derived Exosomes in Immunosuppression and Immunotherapy. *J Immunol Res.* 2020 May 22;2020:6272498. doi: 10.1155 / 2020 / 6272498. PMID: 32537468; PMCID: PMC7261328.
- [504] Huang Y, Liu K, Li Q, Yao Y, Wang Y. Exosomes Function in Tumor Immune Microenvironment. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1056:109-122. doi: 10.1007 / 978-3-319-74470-4\_7. PMID: 29754177.
- [505] Wang H, Lu Z, Zhao X. Tumorigenesis, diagnosis, and therapeutic potential of exosomes in liver cancer. *J Hematol Oncol.* 2019 Dec 9;12(1):133. doi: 10.1186 / s13045-019-0806-6. PMID: 31815633; PMCID: PMC6902437.
- [506] Rao Q, Zuo B, Lu Z, Gao X, You A, Wu C, Du Z, Yin H. Tumor-derived exosomes elicit tumor suppression in murine hepatocellular carcinoma models and humans in vitro. *Hepatology.* 2016 Aug;64(2):456-72. doi: 10.1002 / hep.28549. Epub 2016 Apr 15. PMID: 26990897.
- [507] Grzybowski A, Kanclerz P. Re: Bhende et al.: Risk Factors for Endophthalmitis after Pars Plana Vitrectomies in a Tertiary Eye Institute in India (*Ophthalmol Retina.* 2018 doi:10.1016 / j.oret.2018.01.001). *Ophthalmol Retina.* 2018 Jul;2(7):e7. doi: 10.1016 /

- j.oret.2018.04.012. Epub 2018 Jul 3. PMID: 31047388.
- [508] Li M, Xia B, Wang Y, You MJ, Zhang Y. Potential Therapeutic Roles of Exosomes in Multiple Myeloma: A Systematic Review. *J Cancer*. 2019 Oct 15;10(24):6154-6160. doi: 10.7150 / jca.31752. PMID: 31762825; PMCID: PMC6856585.
- [509] Xie Y, Bai O, Zhang H, Yuan J, Zong S, Chibbar R, Slattery K, Qureshi M, Wei Y, Deng Y, Xiang J. Membrane-bound HSP70-engineered myeloma cell-derived exosomes stimulate more efficient CD8(+) CTL- and NK-mediated antitumour immunity than exosomes released from heat-shocked tumour cells expressing cytoplasmic HSP70. *J Cell Mol Med*. 2010 Nov;14(11):2655-66. doi: 10.1111 / j.1582-4934.2009.00851.x. PMID: 19627400; PMCID: PMC4373481.
- [510] Gu X, Erb U, Büchler MW, Zöller M. Improved vaccine efficacy of tumor exosome compared to tumor lysate loaded dendritic cells in mice. *Int J Cancer*. 2015 Feb 15;136(4):E74-84. doi: 10.1002 / ijc.29100. Epub 2014 Aug 5. PMID: 25066479.
- [511] Liu Y, Gu Y, Cao X. The exosomes in tumor immunity. *Oncoimmunology*. 2015 Apr 2;4(9):e1027472. doi: 10.1080 / 2162402X.2015.1027472. PMID: 26405598; PMCID: PMC4570093.
- [512] Tan YT, Lin JF, Li T, Li JJ, Xu RH, Ju HQ. LncRNA-mediated posttranslational modifications and reprogramming of energy metabolism in cancer. *Cancer Commun (Lond)*. 2021 Feb;41(2):109-120. doi: 10.1002 / cac2.12108. Epub 2020 Oct 29. PMID: 33119215; PMCID: PMC7896749.
- [513] Li M, Shi M, Hu C, Chen B, Li S. MALAT1 modulated FOXP3 ubiquitination then affected GINS1 transcription and driven NSCLC proliferation. *Oncogene*. 2021 Jun;40(22):3870-3884. doi: 10.1038 / s41388-021-01816-3. Epub 2021 May 10. PMID:

- 33972684.
- [514] Tufail M. HOTAIR in colorectal cancer: structure, function, and therapeutic potential. *Med Oncol.* 2023 Aug 2;40(9):259. doi: 10.1007 / s12032-023-02131-5. PMID: 37530984.
- [515] Raju GSR, Pavitra E, Bandaru SS, Varaprasad GL, Nagaraju GP, Malla RR, Huh YS, Han YK. HOTAIR: a potential metastatic, drug-resistant and prognostic regulator of breast cancer. *Mol Cancer.* 2023 Mar 30;22(1):65. doi: 10.1186 / s12943-023-01765-3. PMID: 36997931; PMCID: PMC10061914.
- [516] Hashemi M, Moosavi MS, Abed HM, Dehghani M, Aalipour M, Heydari EA, Behroozaghdam M, Entezari M, Salimimoghadam S, Gunduz ES, Taheriazam A, Mirzaei S, Samarghandian S. Long non-coding RNA (lncRNA) H19 in human cancer: From proliferation and metastasis to therapy. *Pharmacol Res.* 2022 Oct;184:106418. doi: 10.1016 / j.phrs.2022.106418. Epub 2022 Aug 28. PMID: 36038043.
- [517] Ren J, Ding L, Zhang D, Shi G, Xu Q, Shen S, Wang Y, Wang T, Hou Y. Carcinoma-associated fibroblasts promote the stemness and chemoresistance of colorectal cancer by transferring exosomal lncRNA H19. *Theranostics.* 2018 Jun 24;8(14):3932-3948. doi: 10.7150 / thno.25541. PMID: 30083271; PMCID: PMC6071523.
- [518] Fu Y, Liu L, Zhan J, Zhan H, Qiu C. LncRNA GAS5 expression in non-small cell lung cancer tissues and its correlation with Ki67 and EGFR. *Am J Transl Res.* 2021 May 15;13(5):4900-4907. PMID: 34150073; PMCID: PMC8205762.
- [519] Wang Z, Luo J, Huang H, Wang L, Lv T, Wang Z, Li C, Wang Y, Liu J, Cheng Q, Zuo X, Hu L, Ye M, Liu H, Song Y. NAT10-mediated upregulation of GAS5 facilitates immune

- cell infiltration in non-small cell lung cancer via the MYBBP1A-p53 / IRF1 / type I interferon signaling axis. *Cell Death Discov.* 2024 May 18;10(1):240. doi: 10.1038 / s41420-024-01997-2. PMID: 38762546; PMCID: PMC11102450.
- [520] Ma J, Miao H, Zhang H, Ren J, Qu S, Da J, Xu F, Zhao H. LncRNA GAS5 modulates the progression of non-small cell lung cancer through repressing miR-221-3p and up-regulating IRF2. *Diagn Pathol.* 2021 May 22;16(1):46. doi: 10.1186 / s13000-021-01108-0. PMID: 34022918; PMCID: PMC8140465.
- [521] Lu KH, Li W, Liu XH, Sun M, Zhang ML, Wu WQ, Xie WP, Hou YY. Long non-coding RNA MEG3 inhibits NSCLC cells proliferation and induces apoptosis by affecting p53 expression. *BMC Cancer.* 2013 Oct 7;13:461. doi: 10.1186 / 1471-2407-13-461. PMID: 24098911; PMCID: PMC3851462.
- [522] Li K, Gong Q, Xiang XD, Guo G, Liu J, Zhao L, Li J, Chen N, Li H, Zhang LJ, Zhou CY, Wang ZY, Zhuang L. HNRNPA2B1-mediated m<sup>6</sup>A modification of lncRNA MEG3 facilitates tumorigenesis and metastasis of non-small cell lung cancer by regulating miR-21-5p / PTEN axis. *J Transl Med.* 2023 Jun 12;21(1):382. doi: 10.1186 / s12967-023-04190-8. PMID: 37308993; PMCID: PMC10258935.
- [523] Lv D, Bi Q, Li Y, Deng J, Wu N, Hao S, Zhao M. Long non-coding RNA MEG3 inhibits cell migration and invasion of non-small cell lung cancer cells by regulating the miR-21-5p / PTEN axis. *Mol Med Rep.* 2021 Mar;23(3):191. doi: 10.3892 / mmr.2021.11830. Epub 2021 Jan 26. PMID: 33495842; PMCID: PMC7809909.
- [524] Tang Q, Zhou Q, Li J, Yang X, Wang R, Wang X, Xu M, Han L, Wu W, Wang S. Solamargine enhanced gefitinib antitumor effect via regulating MALAT1 / miR-141-3p / Sp1 / IGFBP1 signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis.* 2023 Aug

- 18;44(6):497-510. doi: 10.1093 / carcin / bgad028. PMID: 37144780.
- [525] Luo J, Ren Q, Liu X, Zheng Q, Yang L, Meng M, Ma H, He S. LncRNA MALAT-1 modulates EGFR-TKI resistance in lung adenocarcinoma cells by downregulating miR-125. *Discov Oncol.* 2024 Aug 28;15(1):379. doi: 10.1007 / s12672-024-01133-7. PMID: 39196297; PMCID: PMC11358566.
- [526] Liu X, Huang Z, Qian W, Zhang Q, Sun J. Silence of lncRNA UCA1 rescues drug resistance of cisplatin to non-small-cell lung cancer cells. *J Cell Biochem.* 2019 Jun;120(6):9243-9249. doi: 10.1002 / jcb.28200. Epub 2019 Jan 16. PMID: 30652341.
- [527] Chen W, Zhao W, Chen S, Zhang L, Guo Z, Wang L, Wang J, Wan Z, Hong Y, Yu L. Expression and correlation of MALAT1 and SOX9 in non-small cell lung cancer. *Clin Respir J.* 2018 Jul;12(7):2284-2291. doi: 10.1111 / crj.12906. Epub 2018 Jun 13. PMID: 29896925.
- [528] Liang H, Peng J. LncRNA HOTAIR promotes proliferation, invasion and migration in NSCLC cells via the CCL22 signaling pathway. *PLoS One.* 2022 Feb 17;17(2):e0263997. doi: 10.1371 / journal.pone.0263997. PMID: 35176085; PMCID: PMC8853541.
- [529] Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* 2011;20(1):5-14. doi: 10.3727 / 096368910X. PMID: 21396235.
- [530] Lan T, Luo M, Wei X. Mesenchymal stem / stromal cells in cancer therapy. *J Hematol Oncol.* 2021 Nov 17;14(1):195. doi: 10.1186 / s13045-021-01208-w. PMID: 34789315; PMCID: PMC8596342.
- [531] Liu H, Li R, Liu T, Yang L, Yin G, Xie Q. Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells and Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol.* 2020 Aug 20;11:1912. doi: 10.3389 / fimmu.2020.01912. PMID:

- 32973792; PMCID: PMC7468450.
- [532] Steins M, Thomas M, Geißler M. Erlotinib. *Recent Results Cancer Res.* 2018;211:1-17. doi: 10.1007 / 978-3-319-91442-8\_1. PMID: 30069756.
- [533] Soria JC, Ohe Y, Vansteenkiste J, Reungwetwattana T, Chewaskulyong B, Lee KH, Dechaphunkul A, Imamura F, Nogami N, Kurata T, Okamoto I, Zhou C, Cho BC, Cheng Y, Cho EK, Voon PJ, Planchard D, Su WC, Gray JE, Lee SM, Hodge R, Marotti M, Rukazenkov Y, Ramalingam SS; FLAURA Investigators. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2018 Jan 11;378(2):113-125. doi: 10.1056 / NEJMoa1713137. Epub 2017 Nov 18. PMID: 29151359.
- [534] Zhang M, Sai B, Cao P, Li Z, Zhang L, Shuai C, Wang X, Wang J, Li G, Xiang J, Tang J. Iron Oxide Nanoparticles Synergize with Erlotinib to Suppress Refractory Non-Small Cell Lung Cancer Cell Proliferation Through the Inhibition of ErbB / PI3K / AKT and PTEN Activation. *J Biomed Nanotechnol.* 2017 Apr;13(4):458-68. doi: 10.1166 / jbn.2017.2358. PMID: 29388752.
- [535] Yue D, Xu S, Wang Q, Li X, Shen Y, Zhao H, Chen C, Mao W, Liu W, Liu J, Zhang L, Ma H, Li Q, Yang Y, Liu Y, Chen H, Zhang Z, Zhang B, Wang C. Updated Overall Survival and Exploratory Analysis From Randomized, Phase II EVAN Study of Erlotinib Versus Vinorelbine Plus Cisplatin Adjuvant Therapy in Stage IIIA Epidermal Growth Factor Receptor+ Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2022 Dec 1;40(34):3912-3917. doi: 10.1200 / JCO.22.00428. Epub 2022 Aug 26. PMID: 36027483.
- [536] Sano Y, Hashimoto E, Nakatani N, Abe M, Satoh Y, Sakata K, Fujii T, Fujimoto-Ouchi K, Sugimoto M, Nagahashi S, Aoki M, Motegi H, Sasaki E, Yatabe Y. Combining

- onartuzumab with erlotinib inhibits growth of non-small cell lung cancer with activating EGFR mutations and HGF overexpression. *Mol Cancer Ther.* 2015 Feb;14(2):533-41. doi: 10.1158 / 1535-7163.MCT-14-0456. Epub 2014 Dec 18. PMID: 25522765.
- [537] Camidge DR, Barlesi F, Goldman JW, Morgensztern D, Heist R, Vokes E, Spira A, Angevin E, Su WC, Hong DS, Strickler JH, Motwani M, Dunbar M, Parikh A, Noon E, Blot V, Wu J, Kelly K. Phase Ib Study of Telisotuzumab Vedotin in Combination With Erlotinib in Patients With c-Met Protein-Expressing Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2023 Feb 10;41(5):1105-1115. doi: 10.1200 / JCO.22.00739. Epub 2022 Oct 26. PMID: 36288547; PMCID: PMC9928626.
- [538] Mani V, Lyu Z, Kumar V, Ercal B, Chen H, Malhotra SV, Demirci U. Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) and Drug Response in Dynamic Bioengineered Lung Cancer Microenvironment. *Adv Biosyst.* 2019 Jan;3(1):e1800223. doi: 10.1002 / adbi.201800223. Epub 2018 Nov 19. PMID: 32627339.
- [539] Fu J, Yu L, Yan H, Tang S, Wang Z, Dai T, Chen H, Zhang S, Hu H, Liu T, Tang S, He R, Zhou H. LncRNAs in non-small cell lung cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers. *Front Mol Biosci.* 2023 Dec 13;10:1297198. doi: 10.3389 / fmolb.2023.1297198. PMID: 38152110; PMCID: PMC10751344.
- [540] Chen Y, Zitello E, Guo R, Deng Y. The function of LncRNAs and their role in the prediction, diagnosis, and prognosis of lung cancer. *Clin Transl Med.* 2021 Apr;11(4):e367. doi: 10.1002 / ctm2.367. PMID: 33931980; PMCID: PMC8021541.
- [541] Chu C, Qu K, Zhong FL, Artandi SE, Chang HY. Genomic maps of long noncoding RNA occupancy reveal principles of RNA-chromatin interactions. *Mol Cell.* 2011 Nov 18;44(4):667-78. doi: 10.1016 / j.molcel.2011.08.027. Epub 2011 Sep 29. PMID:



- 21963238; PMCID: PMC3249421.
- [542] Xiao Q, Zheng F, Tang Q, Wu JJ, Xie J, Huang HD, Yang XB, Hann SS. Repression of PDK1- and LncRNA HOTAIR-Mediated EZH2 Gene Expression Contributes to the Enhancement of Atractylenolide 1 and Erlotinib in the Inhibition of Human Lung Cancer Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2018;49(4):1615-1632. doi: 10.1159 / 000493497. Epub 2018 Sep 17. PMID: 30223276.
- [543] Le X, Nilsson M, Goldman J, Reck M, Nakagawa K, Kato T, Ares LP, Frimodt-Moller B, Wolff K, Visseren-Grul C, Heymach JV, Garon EB. Dual EGFR-VEGF Pathway Inhibition: A Promising Strategy for Patients With EGFR-Mutant NSCLC. *J Thorac Oncol*. 2021 Feb;16(2):205-215. doi: 10.1016 / j.jtho.2020.10.006. Epub 2020 Oct 20. PMID: 33096270.
- [544] Jiang B, Chen Y, Xia F, Li X. PTCSC3-mediated glycolysis suppresses thyroid cancer progression via interfering with PGK1 degradation. *J Cell Mol Med*. 2021 Sep;25(17):8454-8463. doi: 10.1111 / jcmm.16806. Epub 2021 Aug 1. PMID: 34337858; PMCID: PMC8419167.
- [545] Kotake Y, Nakagawa T, Kitagawa K, Suzuki S, Liu N, Kitagawa M, Xiong Y. Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15(INK4B) tumor suppressor gene. *Oncogene*. 2011 Apr 21;30(16):1956-62. doi: 10.1038 / onc.2010.568. Epub 2010 Dec 13. PMID: 21151178; PMCID: PMC3230933.
- [546] Wang M, Liu K, Bao W, Hang B, Chen X, Zhu X, Li G, Liu L, Xiang H, Hu H, Lu Y, Song Z, Chen J, Wang Y. Gut microbiota protect against colorectal tumorigenesis through lncRNA Snhg9. *Dev Cell*. 2025 Jan 3;S1534-5807(24)00734-2. doi: 10.1016 / j.devcel.2024.12.013. Epub ahead of print. PMID: 39755115.

- [547] Wang Y, Zheng L, Shang W, Yang Z, Li T, Liu F, Shao W, Lv L, Chai L, Qu L, Xu Q, Du J, Liang X, Zeng J, Jia J. Wnt / beta-catenin signaling confers ferroptosis resistance by targeting GPX4 in gastric cancer. *Cell Death Differ.* 2022 Nov;29(11):2190-2202. doi: 10.1038 / s41418-022-01008-w. Epub 2022 May 9. PMID: 35534546; PMCID: PMC9613693.
- [548] Nguyen VHL, Hough R, Bernaudo S, Peng C. Wnt /  $\beta$ -catenin signalling in ovarian cancer: Insights into its hyperactivation and function in tumorigenesis. *J Ovarian Res.* 2019 Dec 11;12(1):122. doi: 10.1186 / s13048-019-0596-z. PMID: 31829231; PMCID: PMC6905042.
- [549] Kotollosi R, Gajda M, Grimm MO, Steinbach D. Wnt /  $\beta$ -Catenin Signalling and Its Cofactor BCL9L Have an Oncogenic Effect in Bladder Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2022 May 10;23(10):5319. doi: 10.3390 / ijms23105319. PMID: 35628130; PMCID: PMC9141496.
- [550] Dou Y, Kawaler EA, Cui Zhou D, Gritsenko MA, Huang C, Blumenberg L, Karpova A, Petyuk VA, Savage SR, Satpathy S, Liu W, Wu Y, Tsai CF, Wen B, Li Z, Cao S, Moon J, Shi Z, Cornwell M, Wyczalkowski MA, Chu RK, Vasaikar S, Zhou H, Gao Q, Moore RJ, Li K, Sethuraman S, Monroe ME, Zhao R, Heiman D, Krug K, Clauser K, Kothadia R, Maruvka Y, Pico AR, Oliphant AE, Hoskins EL, Pugh SL, Beecroft SJI, Adams DW, Jarman JC, Kong A, Chang HY, Reva B, Liao Y, Rykunov D, Colaprico A, Chen XS, Czeakański A, Jędryka M, Matkowski R, Wiznerowicz M, Hiltke T, Boja E, Kinsinger CR, Mesri M, Robles AI, Rodriguez H, Mutch D, Fuh K, Ellis MJ, DeLair D, Thiagarajan M, Mani DR, Getz G, Noble M, Nesvizhskii AI, Wang P, Anderson ML, Levine DA, Smith RD, Payne SH, Ruggles KV, Rodland KD, Ding L, Zhang B, Liu T, Fenyö D; Clinical

- Proteomic Tumor Analysis Consortium. Proteogenomic Characterization of Endometrial Carcinoma. *Cell*. 2020 Feb 20;180(4):729-748.e26. doi: 10.1016 / j.cell.2020.01.026. Epub 2020 Feb 13. PMID: 32059776; PMCID: PMC7233456.
- [551] Tang Q, Chen J, Di Z, Yuan W, Zhou Z, Liu Z, Han S, Liu Y, Ying G, Shu X, Di M. TM4SF1 promotes EMT and cancer stemness via the Wnt /  $\beta$ -catenin / SOX2 pathway in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020 Nov 5;39(1):232. doi: 10.1186 / s13046-020-01690-z. PMID: 33153498; PMCID: PMC7643364.
- [552] Xu X, Zhang M, Xu F, Jiang S. Wnt signaling in breast cancer: biological mechanisms, challenges and opportunities. *Mol Cancer*. 2020 Nov 24;19(1):165. doi: 10.1186 / s12943-020-01276-5. PMID: 33234169; PMCID: PMC7686704.
- [553] Alyoussef A. Investigation of the Ability of Crocin to Treat Skin Cancer Chemically Induced in Mice via the Inhibition of the Wnt /  $\beta$ -Catenin and Fibrotic Pathway. *Cureus*. 2023 May 5;15(5):e38596. doi: 10.7759 / cureus.38596. PMID: 37284388; PMCID: PMC10239655.
- [554] Ganesan K, Ivanova T, Wu Y, Rajasegaran V, Wu J, Lee MH, Yu K, Rha SY, Chung HC, Ylstra B, Meijer G, Lian KO, Grabsch H, Tan P. Inhibition of gastric cancer invasion and metastasis by PLA2G2A, a novel beta-catenin / TCF target gene. *Cancer Res*. 2008 Jun 1;68(11):4277-86. doi: 10.1158 / 0008-5472.CAN-07-6517. PMID: 18519687.
- [555] Li P, Gong Z, Shultz LD, Ren G. Mesenchymal stem cells: From regeneration to cancer. *Pharmacol Ther*. 2019 Aug;200:42-54. doi: 10.1016 / j.pharmthera.2019.04.005. Epub 2019 Apr 16. PMID: 30998940; PMCID: PMC6626571.
- [556] Razmkhah M, Abtahi S, Ghaderi A. Mesenchymal Stem Cells, Immune Cells and Tumor Cells Crosstalk: A Sinister Triangle in the Tumor Microenvironment. *Curr Stem Cell Res*

- Ther. 2019;14(1):43-51. doi: 10.2174 / 1574888X13666180816114809. PMID: 30112998.
- [557] Liu GY, Wu Y, Kong FY, Ma S, Fu LY, Geng J. BMSCs differentiated into neurons, astrocytes and oligodendrocytes alleviated the inflammation and demyelination of EAE mice models. *PLoS One*. 2021 May 13;16(5):e0243014. doi: 10.1371 / journal.pone.0243014. PMID: 33983943; PMCID: PMC8118321.
- [558] Hang HL, Xia Q. Role of BMSCs in liver regeneration and metastasis after hepatectomy. *World J Gastroenterol*. 2014 Jan 7;20(1):126-32. doi: 10.3748 / wjg.v20.i1.126. PMID: 24415865; PMCID: PMC3886001.
- [559] Mohamed-Ahmed S, Fristad I, Lie SA, Suliman S, Mustafa K, Vindenes H, Idris SB. Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. *Stem Cell Res Ther*. 2018 Jun 19;9(1):168. doi: 10.1186 / s13287-018-0914-1. PMID: 29921311; PMCID: PMC6008936.
- [560] Lin L, Lin H, Bai S, Zheng L, Zhang X. Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) improved functional recovery of spinal cord injury partly by promoting axonal regeneration. *Neurochem Int*. 2018 May;115:80-84. doi: 10.1016 / j.neuint.2018.02.007. Epub 2018 Feb 16. PMID: 29458076.
- [561] Zhong W, Zhu Z, Xu X, Zhang H, Xiong H, Li Q, Wei Y. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote the growth and drug-resistance of diffuse large B-cell lymphoma by secreting IL-6 and elevating IL-17A levels. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019 Feb 12;38(1):73. doi: 10.1186 / s13046-019-1081-7. PMID: 30755239; PMCID: PMC6373150.
- [562] Wang B, Wu ZH, Lou PY, Chai C, Han SY, Ning JF, Li M. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell-secreted exosomes overexpressing microRNA-34a ameliorate

- glioblastoma development via down-regulating MYCN. *Cell Oncol (Dordr)*. 2019 Dec;42(6):783-799. doi: 10.1007 / s13402-019-00461-z. Epub 2019 Jul 22. Retraction in: *Cell Oncol (Dordr)*. 2021 Oct;44(5):1207. doi: 10.1007 / s13402-021-00627-8. Erratum in: *Cell Oncol (Dordr)*. 2023 Dec;46(6):1873. doi: 10.1007 / s13402-023-00900-y. PMID: 31332647.
- [563] Wu H, Mu X, Liu L, Wu H, Hu X, Chen L, Liu J, Mu Y, Yuan F, Liu W, Zhao Y. Bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomal microRNA-193a reduces cisplatin resistance of non-small cell lung cancer cells via targeting LRRC1. *Cell Death Dis*. 2020 Sep 25;11(9):801. doi: 10.1038 / s41419-020-02962-4. PMID: 32978367; PMCID: PMC7519084.
- [564] Xiao D, Cui X, Wang X. LncRNA PTCSC3 inhibits cell proliferation in laryngeal squamous cell carcinoma by down-regulating lncRNA HOTAIR. *Biosci Rep*. 2019 Jun 28;39(6):BSR20182362. doi: 10.1042 / BSR20182362. PMID: 31171714; PMCID: PMC6597852.
- [565] Zhang H, Wang J, Xun W, Wang J, Song W, Wang X. Long non-coding RNA PTCSC3 inhibits human oral cancer cell proliferation by inducing apoptosis and autophagy. *Arch Med Sci*. 2020 Jun 16;17(2):492-499. doi: 10.5114 / aoms.2020.96409. PMID: 33747284; PMCID: PMC7959011.
- [566] Wang XM, Liu Y, Fan YX, Liu Z, Yuan QL, Jia M, Geng ZS, Gu L, Lu XB. LncRNA PTCSC3 affects drug resistance of anaplastic thyroid cancer through STAT3 / INO80 pathway. *Cancer Biol Ther*. 2018 Jul 3;19(7):590-597. doi: 10.1080 / 15384047.2018.1449610. Epub 2018 May 3. PMID: 29561707; PMCID: PMC5989797.
- [567] Wang N, Hou M, Zhan Y, Sheng X. LncRNA PTCSC3 inhibits triple-negative breast

- cancer cell proliferation by downregulating lncRNA H19. *J Cell Biochem.* 2019 Sep;120(9):15083-15088. doi: 10.1002 / jcb.28769. Epub 2019 Apr 26. PMID: 31026090.
- [568] Zhang M, Song Y, Yu L. LncRNA PTCSC3 suppressed cervical carcinoma cell invasion and proliferation via regulating miR-574-5p. *Am J Transl Res.* 2019 Nov 15;11(11):7186-7194. PMID: 31814920; PMCID: PMC6895514.
- [569] Wang X, Lu X, Geng Z, Yang G, Shi Y. LncRNA PTCSC3 / miR-574-5p Governs Cell Proliferation and Migration of Papillary Thyroid Carcinoma via Wnt /  $\beta$ -Catenin Signaling. *J Cell Biochem.* 2017 Dec;118(12):4745-4752. doi: 10.1002 / jcb.26142. Epub 2017 Jun 22. PMID: 28513866.
- [570] Li Y, Sheng H, Ma F, Wu Q, Huang J, Chen Q, Sheng L, Zhu X, Zhu X, Xu M. RNA m<sup>6</sup>A reader YTHDF2 facilitates lung adenocarcinoma cell proliferation and metastasis by targeting the AXIN1 / Wnt /  $\beta$ -catenin signaling. *Cell Death Dis.* 2021 May 13;12(5):479. doi: 10.1038 / s41419-021-03763-z. PMID: 33980824; PMCID: PMC8116339.
- [571] Pan J, Fang S, Tian H, Zhou C, Zhao X, Tian H, He J, Shen W, Meng X, Jin X, Gong Z. lncRNA JPX / miR-33a-5p / Twist1 axis regulates tumorigenesis and metastasis of lung cancer by activating Wnt /  $\beta$ -catenin signaling. *Mol Cancer.* 2020 Jan 15;19(1):9. doi: 10.1186 / s12943-020-1133-9. PMID: 31941509; PMCID: PMC6961326.
- [572] Zhong C, Chen M, Chen Y, Yao F, Fang W. Loss of DSTYK activates Wnt /  $\beta$ -catenin signaling and glycolysis in lung adenocarcinoma. *Cell Death Dis.* 2021 Dec 1;12(12):1122. doi: 10.1038 / s41419-021-04385-1. PMID: 34853310; PMCID: PMC8636471.
- [573] Zhang HJ, Chang WJ, Jia CY, Qiao L, Zhou J, Chen Q, Zheng XW, Zhang JH, Li HC, Yang ZY, Liu ZH, Liu GC, Ji SP, Lu F. Destrin Contributes to Lung Adenocarcinoma Progression by Activating Wnt /  $\beta$ -Catenin Signaling Pathway. *Mol Cancer Res.* 2020

Dec;18(12):1789-1802. doi: 10.1158 / 1541-7786.MCR-20-0187. Epub 2020 Sep 2. PMID:  
32878967.

## **ABREVIACIÓN**



| ABREVIACIÓN | TÉRMINO COMPLETO                                                         |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------|
| 5-FU        | 5-fluorouracilo                                                          |
| ALIX        | Proteína X interactuante con el gen 2 asociado a la apoptosis            |
| ALK         | Quinasa del linfoma anaplásico                                           |
| AML         | Leucemia mieloide aguda                                                  |
| ASIR        | Tasa de incidencia estandarizada por edad                                |
| ASO         | Oligonucleótido antisentido                                              |
| ATG2A       | Gen relacionado con la autofagia 2A                                      |
| AUC         | Área bajo la curva                                                       |
| CAFs        | Fibroblastos asociados al cáncer                                         |
| CCL5        | Ligando 5 de quimiocina con motivo C-C                                   |
| CCR5        | Receptor tipo 5 de quimiocinas con motivo C-C                            |
| CD::UPRT    | Desaminasa de citosina::uracil fosforibosiltransferasa                   |
| CDEs        | Exosomas derivados de fibroblastos asociados al cáncer                   |
| CIN         | Inestabilidad cromosómica                                                |
| circRNA     | ARN circular                                                             |
| CRC         | Cáncer colorrectal                                                       |
| CSCs        | Células madre cancerosas                                                 |
| CXCL1       | Ligando 1 de quimiocina con motivo C-X-C                                 |
| CXCR        | Receptor de quimiocina CXC                                               |
| DALYs       | Años de vida ajustados por discapacidad                                  |
| DCs         | Células dendríticas                                                      |
| DFS         | Tasa de supervivencia libre de enfermedad                                |
| DKK-1       | Proteína 1 relacionada con Dickkopf                                      |
| DLC-1       | Gen eliminado en cáncer hepático 1                                       |
| EB          | Caja homóloga de unión al motivo E-box con dedo de zinc                  |
| EBV         | Virus de Epstein-Barr                                                    |
| ECM         | Matriz extracelular                                                      |
| EMT         | Transición epitelio-mesenquimal                                          |
| Er          | Erlotinib                                                                |
| ERK1/2      | Quinasas 1/2 reguladas por señales extracelulares (ERK1/2)               |
| ESCRTs      | Complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (ESCRT) |
| EVs         | Vesículas extracelulares                                                 |
| FDA         | Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA)                         |
| GalNAc      | Ligando N-acetilglucosamina                                              |
| GEM         | Gemcitabina                                                              |
| GIST        | Tumores estromales gastrointestinales                                    |
| GS          | Puntuación de Gleason                                                    |
| GSCs        | Células madre de glioma                                                  |
| GVHD        | Enfermedad injerto contra huésped (EICH)                                 |

## ABREVIACIÓN

|                |                                                                    |
|----------------|--------------------------------------------------------------------|
| GWAS           | Estudio de asociación del genoma completo (GWAS)                   |
| HCC            | Carcinoma hepatocelular                                            |
| HGF            | Factor de crecimiento de hepatocitos                               |
| HIF            | Factor inducible por hipoxia                                       |
| HSC            | Células madre hematopoyéticas                                      |
| HSPs           | Proteínas de choque térmico (HSP)                                  |
| IARC           | Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer             |
| ICAM           | Molécula de adhesión intercelular                                  |
| ICIs           | Inhibidores de puntos de control inmunitario                       |
| IFN            | Interferón alfa                                                    |
| IFN- $\gamma$  | Interferón gamma                                                   |
| IL             | Interleucina                                                       |
| ILVs           | Vesículas intraluminales                                           |
| iRAE           | Efectos adversos relacionados con la inmunidad (irAEs)             |
| JAK            | Quinasa Janus                                                      |
| KRAS           | Homólogo del oncogén viral del sarcoma de Kirsten en ratas (KRAS)  |
| LACE           | Evaluación de cisplatino adyuvante en cáncer de pulmón             |
| LATS           | Supresor tumoral grande                                            |
| LMP1           | Proteína de membrana latente 1                                     |
| lncRNA         | ARN largo no codificante (lncRNA)                                  |
| LUAD           | Adenocarcinoma de pulmón                                           |
| MDSC           | Células supresoras mieloides                                       |
| miRNAs         | MicroARNs (miARNs)                                                 |
| MM             | Mieloma múltiple                                                   |
| MNSCLC         | Cáncer de pulmón no microcítico metastásico                        |
| MRCS           | Sistema celular de respuesta mecanosensible                        |
| MSCs           | Células madre mesenquimales                                        |
| MST            | Quinasas similares a Ste20 en mamíferos                            |
| MVBs           | Cuerpos multivesiculares                                           |
| NFs            | Fibroblastos normales                                              |
| NF- $\kappa$ B | Factor nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B)                            |
| NK             | Célula asesina natural (célula NK)                                 |
| NSCLC          | Cáncer de pulmón no microcítico                                    |
| OS             | Supervivencia global                                               |
| OVs            | Virus oncolíticos                                                  |
| PDAC           | Carcinoma ductal pancreático                                       |
| PDGF           | Factor de crecimiento derivado de plaquetas                        |
| PGE2           | Prostaglandina E2                                                  |
| PI3KCB         | Inhibir la codificación de la subunidad catalítica $\beta$ de PI3K |
| PIGF           | Factor de crecimiento placentario                                  |
| PRC            | Complejo represor Polycomb                                         |
| PTX            | Paclitaxel                                                         |
| Rab-GTPase     | GTPasa Rab relacionada con Ras                                     |
| RCCs           | Carcinomas de células renales                                      |
| RIG-I          | Enzima del gen 1 inducido por ácido retinoico                      |

|              |                                                              |
|--------------|--------------------------------------------------------------|
| SDF1         | Factor 1 derivado de células estromales                      |
| shRNAs       | ARN de horquilla corta                                       |
| STAT         | Transductor de señales y activador de la transcripción       |
| TAZ          | Coactivador transcripcional con motivo de unión a PDZ        |
| TCF1         | Factor de transcripción T de citoquina 1 (T-bet)             |
| TERT         | Transcriptasa inversa de la telomerasa                       |
| TEXs         | Exosomas derivados de tumores                                |
| TGF- $\beta$ | Factor de crecimiento transformante $\beta$                  |
| TKI          | Inhibidor de tirosina quinasa (TKI)                          |
| TMB          | Carga mutacional tumoral                                     |
| TME          | Microambiente tumoral                                        |
| TMICs        | Células inmunitarias del microambiente tumoral               |
| TRAIL        | Ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF         |
| TSG101       | Proteína del gen de susceptibilidad tumoral 101              |
| TSP          | Trombospondina                                               |
| VEGF         | Factor de crecimiento endotelial vascular                    |
| VPS4         | Proteína 4 asociada a la clasificación vacuolar de proteínas |
| VTA1         | Tráfico vesicular 1                                          |
| YAP          | Proteína asociada a Yes                                      |