

Informe final publicable de proyecto PEQUEÑOS ARN CIRCULANTES COMO NUEVOS BIOMARCADORES DE USO CLÍNICO EN CANCER DE PULMÓN.

Código de proyecto ANII: FSS_X_2018_1_149070

31/01/2022

CAYOTA GUZIKOVSKY, Alfonso (Responsable Técnico - Científico)

AMARILLO HERNANDEZ, Dahiana (Investigador)

RODRIGUEZ SANDE, Virginia (Investigador)

BIANCHI CANTERA, Sergio (Investigador)

TOSAR ROVIRA, Juan Pablo (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA (Institución Proponente) \\
INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO \\
ADMINISTRACIÓN DE SERVICIOS DE SALUD DEL ESTADO

Resumen del proyecto

El cáncer broncopulmonar es la primera causa de mortalidad por cáncer, debido en parte al diagnóstico tardío. Esto apoya la búsqueda de estrategias diagnósticas accesibles y poco invasivas para su detección precoz, en vistas a disminuir su alta mortalidad. En este estudio, analizamos la capacidad diagnóstica de pequeños ARN en suero como potenciales biomarcadores circulantes. Mediante el uso de nuevas tecnologías de biología molecular y amplificación génica se compararon los niveles séricos de distintos pequeños ARN entre una población de sujetos sanos y una población de sujetos portadores de cáncer de pulmón. Este trabajo reveló una expresión tres veces mayor en suero de un pequeño ARN derivado de ARN de transferencia de glicina en pacientes con cáncer broncopulmonar. Por tanto, éste se identificó como potencial biomarcador circulante diagnóstico con significancia estadística. Sin embargo, fue un mejor biomarcador en estadios avanzados de la enfermedad. Otros biomarcadores analizados fueron capaces de discriminar entre distintos tipos histológicos de cáncer pulmonar. Es el primer estudio en analizar el rol de estas especies como biomarcadores circulantes en el diagnóstico de cáncer broncopulmonar. Este es un tema que requiere mayor desarrollo, por lo que las primeras aproximaciones pueden ayudar a comprender mejor su rol como moléculas circulantes y sentar las bases para estudios a mayor escala, venciendo las dificultades encontradas hasta el momento. La capacidad diagnóstica de los fragmentos estudiados debe ser analizada en cohortes de validación con un mayor tamaño muestral.

Ciencias Médicas y de la Salud / Medicina Clínica / Oncología / Oncología Médica

Palabras clave: Pequeños ARN reguladores / ARN circulantes / Cáncer de Pulmón /

Introducción

Desde 2007, nuestro equipo se ha dedicado al estudio de la estructura y función de vías de pequeños sARN reguladores en la iniciación y progresión del cáncer. Inicialmente reportamos el valor diagnóstico y pronóstico del perfil de microRNAs en células leucémicas provenientes de pacientes con Leucemia Linfoide Crónica, siendo una de las primeras descripciones en la literatura internacional. Posteriormente, fuimos de los primeros grupos en identificar a los fragmentos derivados de tRNAs (tsARN) como una nueva familia de pequeños ARNs reguladores con un rol clave en la interacción huésped-parásito así como en los procesos de iniciación y progresión del cáncer.

Más recientemente contribuimos a caracterizar los sARN secretados el medio extracelular empaquetados y protegidos en microvesículas o complejos ribonucleoproteicos por células tumorales participando en la transferencia entre células como un nuevo mecanismo de comunicación celular. Reportamos, que estas biomoléculas son transportadas por los fluidos biológicos, en diferentes fracciones (vesiculares, proteicas o libres) que le confieren estabilidad frente a la degradación. Recientemente, en un trabajo de Maestría de nuestro equipo, hemos comparado los perfiles de pequeños ARNs en tejido tumoral de 3 pacientes con cáncer de pulmón con el respectivo tejido normal peri-tumoral mediante el uso de tecnologías de secuenciado masivo. Este estudio reveló que 3 sARN, Y4-RNA, tsRNAGly y tsRNAGlu, mostraron niveles significativamente elevados en muestras de pacientes portadores de cáncer de pulmón, los cuales forman parte de los objetivos de esta propuesta.

Los procedimientos tecnológicos que hemos desarrollado durante estos años para el estudio estructural y funcional de los pequeños ARNs extracelulares o circulantes, han sido publicados en un prestigioso manual de procedimientos, lo cual es un reconocimiento al trabajo que hemos desarrollado en el área.

En estudios más recientes demostramos que los tRNAh de glicina y glutámico son producidos en altos niveles por células tumorales in vitro y transferidos mediante vesículas membranosas a otras células, lo cual podría tener importantes implicancias en la biología del cáncer.

Este estudio ha permitido abordar el estudio de pequeños ARNs circulantes como nuevos potenciales biomarcadores en cáncer de pulmón

Metodología/diseño del estudio

Mediante procedimientos de amplificación génica cuantitativa específico para pequeños ARNs ("Stem Loop RT-qPCR) se cuantificaron los niveles séricos de 3 pequeños ARNs derivados de tRNA-Gly, tRNA-Glu y Y4-RNA en un total de 60 pacientes portadores de cáncer de pulmón y 30 voluntarios clínicamente sanos. Todas la determinaciones se realizaron por triplicado y normalizadas contra un oligoribonucleotido sintético agregado a una concentración conocida a cada

muestra inmediatamente antes de la extracción y cuantificación de pequeños ARNs.

Los niveles de expresión relativa se compararon mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney (para dos colas) utilizando los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Se consideraron estadísticamente significativos resultados con valores de $p < 0.05$.

El valor como biomarcadores diagnósticos en suero fue analizado mediante la construcción de curvas ROC (Receiver Operating Characteristic Curve)

Se calculó el área debajo de la curva (AUC) y su intervalo de confianza al 95% para evaluar la capacidad discriminante global del test.

Se analizaron varios puntos de corte con sus valores de sensibilidad y especificidad

Resultados, análisis y discusión

El rol de los pequeños ARN derivados de ARNt y de fragmentos de Y-ARN como biomarcadores circulantes en cáncer es un campo con pocos trabajos publicados a la fecha. En nuestro trabajo se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de expresión a nivel sérico de las mitades 5' de ARNt Gly_GCC entre pacientes con cáncer broncopulmonar y controles clínicamente sanos. Sus niveles fueron 3 veces mayores en individuos enfermos. Estas se comportaron como posibles biomarcadores circulantes estadísticamente significativos de cáncer broncopulmonar, de acuerdo con el análisis de la curva ROC (Receiver Operating Characteristic) con un área debajo de la curva (AUC) cercana a 0.7. Se alcanzó una sensibilidad de 70% y una especificidad de 55% como test diagnóstico. Su utilidad como biomarcador diagnóstico se observó para estadios avanzados de la enfermedad. No pudimos determinar su valor en estadios iniciales, lo que puede deberse al bajo número de pacientes analizados en esta etapa de la enfermedad. Los niveles de las mitades 5' de ARNt Glu_TTC y de fragmentos 5' Y4-ARN no fueron capaces de discriminar entre población con cáncer de pulmón y control.

Según el subtipo histológico de cáncer broncopulmonar, las mitades 5' de ARNt Glu_TTC mostraron una fuerte tendencia al aumento en tumores de células pequeñas. Dato que debería ser validado en cohortes con un tamaño muestral adecuado. Mientras que las mitades 5' de ARNt Gly_GCC la tienen con los de células no pequeñas. Esto resulta interesante dado que según su historia natural, pronóstico y tratamiento son dos entidades completamente diferentes, por lo que podría esperarse que tuvieran un perfil diferente en cuanto a biomarcadores.

Nuestro trabajo es el primer estudio en analizar el rol de las ARNth-Gly, ARNth-Glu y Y4-ARN como biomarcadores circulantes en el diagnóstico de cáncer broncopulmonar. Estos resultados, en conjunto con los analizados en la literatura, apoyan el uso potencial de estos fragmentos como biomarcadores diagnósticos en un futuro cercano. Tienen el potencial de su uso como método de tamizaje en la selección de individuos con alto riesgo que justifiquen la realización de estudios imagenológicos. Creemos importante buscar y validar firmas que incluyan varios biomarcadores con el fin de aumentar la sensibilidad y la especificidad alcanzada. El rol de los ARNpnc circulantes como biomarcadores en cáncer es un tema que requiere mayor desarrollo, por lo que estas primeras aproximaciones pueden ayudar a comprender mejor su rol como moléculas circulantes y sentar las bases para estudios a mayor escala, venciendo las dificultades encontradas hasta el momento.

Conclusiones y recomendaciones

Este es el primer estudio en analizar el rol de las tRNA-h Gly, tRNA-h Glu y Y4-RNA como biomarcadores circulantes en el diagnóstico de cáncer broncopulmonar.

De nuestro análisis surge que solo la tRNA-h Gly_GCC se comportó como potencial biomarcador en cáncer de pulmón con significancia estadística

Se obtuvieron resultados originales y prometedores, de acuerdo con la literatura actual. Estos apoyan el uso potencial de estos fragmentos como biomarcadores diagnósticos en un futuro cercano.

Deberán ser analizados en una cohorte de validación de mayor tamaño que incluya un mayor número de pacientes con enfermedad en estadio localizado

Referencias bibliográficas

- ? Rovira C, Güida MC, Cayota A. MicroRNAs and other small silencing RNAs in cancer. *IUBMB Life*. 2010;62(12):859–68.
- ? Zhu L, Ge J, Li T, Shen Y, Guo J. tRNA-derived fragments and tRNA halves: The new players in cancers. *Cancer Lett* [Internet]. 2019;452(February):31–7.
- ? Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: An expanding universe. *Nat Rev Genet*. 2009;10(2):94–108.
- ? Garcia-Silva MR, Cabrera-Cabrera F, Güida MC, Cayota A. Hints of tRNA-derived small RNAs role in RNA silencing mechanisms. *Genes (Basel)*. 2012;3(4):603–14.
- ? Tosar JP, Gámbaro F, Sanguinetti J, Bonilla B, Witwer KW, Cayota A. Assessment of small RNA sorting into different extracellular fractions revealed by high-throughput sequencing of breast cell lines. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(11):5601–16.
- ? Wu KL, Tsai YM, Lien CT, Kuo PL, Hung JY. The roles of microRNA in lung cancer. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7):1–24.
- ? Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Med*. 2009;60:167–79.
- ? Iqbal MA, Arora S, Prakasam G, Calin GA, Syed MA. MicroRNA in lung cancer: role, mechanisms, pathways and therapeutic relevance. *Mol Aspects Med* [Internet]. 2019;70(July):3–20.
- ? Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: A new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*. 2010;101(10):2087–92.
- ? Schaffner F, Merlin J-L, Bubnoff N von. Tumor liquid biopsies. 2019. 189 p.
- ? Sestini S, Boeri M, Marchiano A, Pelosi G, Verri C, Suatoni P, et al. 2015 Sestini Oncotarget miRNA in lung cancer. 6(32).
- ? Balatti V, Croce CM. MicroRNA dysregulation and multi-targeted therapy for cancer treatment. *Adv Biol Regul* [Internet]. 2020;75(August):100669.
- ? Tosar JP, Cayota A. Extracellular tRNAs and tRNA-derived fragments. *RNA Biol* [Internet]. 2020;17(8):1149–67.
- ? Gu W, Shi J, Liu H, Zhang X, Zhou JJ, Li M, et al. Peripheral blood non-canonical small non-coding RNAs as novel biomarkers in lung cancer. *Mol Cancer*. 2020;19(1):4–9.
- ? Garcia-Silva MR, Frugier M, Tosar JP, Correa-Dominguez A, Ronalte-Alves L, Parodi-Talice A, et al. A population of tRNA-derived small RNAs is actively produced in *Trypanosoma cruzi* and recruited to specific cytoplasmic granules. *Mol Biochem Parasitol* [Internet]. 2010;171(2):64–73.
- ? Gulia C, Signore F, Gaffi M, Gigli S, Votino R, Nucciotti R, et al. Y RNA: An overview of their role as potential biomarkers and molecular targets in human cancers. *Cancers (Basel)*. 2020;12(5):1–21.
- ? Guglas K, Ko?odziejczak I, Kolenda T, Koczy?ska M, Teresiak A, Soboci?ska J, et al. YRNAs and YRNA-derived fragments as new players in cancer research and their potential role in diagnostics. *Int J Mol Sci*. 2020;21(16):1–12.
- ? Driedonks TAP, Nolte-T’Hoen ENM. Circulating Y-RNAs in extracellular vesicles and ribonucleoprotein complexes; Implications for the immune system. *Front Immunol*. 2019;10(JAN):1–15.
- ? Tosar JP, Gámbaro F, Darré L, Pantano S, Westhof E, Cayota A. Dimerization confers increased stability to nucleases in 5 halves from glycine and glutamic acid tRNAs. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(17):9081–93.
- ? Dhabhi JM, Spindler SR, Atamna H, Boffelli D, Mote P, Martin DIK. 5-YRNA fragments derived by processing of transcripts from specific YRNA genes and pseudogenes are abundant in human serum and plasma. *Physiol Genomics*. 2013;45(21):990–8.
- ? Lyons SM, Gudanis D, Coyne SM, Gdaniec Z, Ivanov P. Identification of functional tetramolecular RNA G-quadruplexes derived from transfer RNAs. *Nat Commun*. 2017;8(1).
- ? Schimmel P. RNA Processing and Modifications: The emerging complexity of the tRNA world: Mammalian tRNAs beyond protein synthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(1):45–58.
- ? Gámbaro F, Li Calzi M, Fagúndez P, Costa B, Greif G, Mallick E, et al. Stable tRNA halves can be sorted into extracellular vesicles and delivered to recipient cells in a concentration-dependent manner. *RNA Biol* [Internet]. 2020;17(8):1168–82.
- ? Aristeidis G, Telonis and Isidore Rigoutsos. Race disparities in the contribution of miRNA isoforms and tRNA-derived fragments to triple-negative breast cancer. *Cancer Res*. 2018;78(5):1140–54.
- ? Wang X, Yang Y, Tan X, Mao X, Wei D, Yao Y, et al. Identification of tRNA-Derived Fragments Expression Profile in Breast Cancer Tissues. *Curr Genomics*. 2019;20(3):199–213.
- ? Balatti V, Nigita G, Veneziano D, Drusco A, Stein GS, Messier TL, et al. tsRNA signatures in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(30):8071–6.
- ? Li C, Qin F, Hu F, Xu H, Sun G, Han G, et al. Characterization and selective incorporation of small non-coding RNAs in non-small cell lung cancer extracellular vesicles. *Cell Biosci* [Internet]. 2018 Jan 10 [cited 2021 Jun 2];8(1).
- ? Tosar JP, Segovia M, Castellano M, Gámbaro F, Akiyama Y, Fagúndez P, et al. Fragmentation of extracellular ribosomes

and tRNAs shapes the extracellular RNAome. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(22):12874–88.

? Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer. Situación Epidemiológica del Uruguay en relación al Cáncer. *Regist Nac del Cáncer, Com Honor Lucha Contra el Cáncer.* 2019;1–The National Lung Screening Trial Research Team. Reduced Lung-Cancer Mortality with Low-Dose Computed Tomographic Screening. *N Engl J Med.* 2011;365(5):395–409. The National Lung Screening Trial Research Team. Lung Cancer Incidence and Mortality with Extended Follow-up in the National Lung Screening Trial. *J Thorac Oncol.* 2019;14(10):1732–42.

? de Koning HJ, van der Aalst CM, de Jong PA, Scholten ET, Nackaerts K, Heuvelmans MA, et al. Reduced Lung-Cancer Mortality with Volume CT Screening in a Randomized Trial. *N Engl J Med.* 2020;382(6):503–13.

? Kramer MF. Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Curr Protoc Mol Biol.* 2011;(SUPPL. 95):1–15.

? Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101–8.

? Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-??CT method. *Methods.* 2001;25(4):402–8.

? Kan CFK, Unis GD, Li LZ, Gunn S, Li L, Soyer HP, et al. Circulating Biomarkers for Early Stage Non-Small Cell Lung Carcinoma Detection: Supplementation to Low-Dose Computed Tomography. *Front Oncol.* 2021;11(April):1–11.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)