



## PERFILES ESPECÍFICOS DE RNA EN VESÍCULAS EXTRACELULARES DE SUERO Y ORINA DE PACIENTES CON COLANGIOCARCINOMA QUE IMITAN EL TEJIDO TUMORAL Y LA EXPRESIÓN CELULAR: NUEVO ENFOQUE DE BIOPSIA LÍQUIDA

A. Lapitz<sup>1</sup>, P. Rodrigues<sup>1</sup>, A. Arbelaiz<sup>2</sup>, J.L. Lavín<sup>3</sup>, C. O'Rourke<sup>4</sup>, M. Krawczyk<sup>5,6</sup>, Á. Santos-Laso<sup>1</sup>, M.J. Perugorria<sup>1,7,8</sup>, A. Lacasta<sup>1</sup>, R. Jiménez-Agüero<sup>1</sup>, C. Ibarra<sup>9</sup>, A. Sánchez-Campos<sup>9</sup>, J.P. Jimeno<sup>10</sup>, I. Riaño<sup>1</sup>, E. González<sup>11</sup>, M. Erice<sup>1</sup>, F. Lammert<sup>12</sup>, M. Marziani<sup>13</sup>, R.I.R. Macías<sup>14</sup>, J.J.G. Marín<sup>14</sup>, T.H. Karlsen<sup>15</sup>, L. Bujanda<sup>1,7</sup>, J.M. Falcón-Pérez<sup>7,8,11</sup>, J.B. Andersen<sup>4</sup>, A.M. Aransay<sup>3,7</sup> y J.M. Banales<sup>1,7,8</sup>

<sup>1</sup>Department of Liver and Gastrointestinal Diseases, Biodonostia Research Institute, Donostia University Hospital, University of the Basque Country (UPV/EHU), San Sebastian. <sup>2</sup>Sorbonne Université, INSERM, Saint-Antoine Research Center, Paris (Francia). <sup>3</sup>Genome Analysis Platform, CIC bioGUNE, Bizkaia Technology Park, Derio. <sup>4</sup>Biotech Research & Innovation Centre (BRIC), Department of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen (Dinamarca). <sup>5</sup>Department of Medicine II, Saarland University Medical Centre, Saarland University, Homburg (Alemania). <sup>6</sup>Laboratory of Metabolic Liver Diseases, Centre for Preclinical Research, Department of General, Transplant and Liver Surgery, Medical University of Warsaw, Warsaw (Polonia). <sup>7</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Carlos III National Institute of Health, Madrid. <sup>8</sup>IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbao. <sup>9</sup>Hospital de Cruces, Bilbao. <sup>10</sup>Complejo Hospitalario de Navarra, Pamplona. <sup>11</sup>Laboratory of exosomes, CIC bioGUNE, Derio. <sup>12</sup>Department of Medicine II, Saarland University Medical Center, Saarland University, Homburg (Alemania). <sup>13</sup>Department of Gastroenterology, Università Politecnica delle Marche, Ancona, (Italia). <sup>14</sup>Experimental Hepatology and Drug Targeting (HEVEFARM), Biomedical Research Institute of Salamanca (IBSAL), University of Salamanca, Salamanca. <sup>15</sup>Norwegian PSC Research Center, Division of Cancer Medicine, Surgery and Transplantation, Oslo University Hospital, Rikshospitalet, Oslo (Noruega).

### Resumen

**Introducción:** El colangiocarcinoma (CCA) incluye un conjunto heterogéneo de tumores biliares con mal pronóstico. Su etiología es prácticamente desconocida, aunque la colangitis esclerosante primaria (PSC) puede predisponer a su desarrollo. En torno al 80% de los pacientes con PSC presentan enfermedad inflamatoria intestinal de forma concomitante, generalmente colitis ulcerosa (UC). No existen biomarcadores sensibles y específicos para el diagnóstico no invasivo del CCA. Las vesículas extracelulares (EVs) se han postulado como contenedores de biomarcadores y posibles reguladores de la patogenia en algunas enfermedades. Por ello, nos planteamos determinar el potencial valor de las EVs de suero y orina como transportadores de biomarcadores de RNA para el diagnóstico del CCA y su posible implicación en su patogenia.

**Métodos:** Las EVs de suero y orina de pacientes con UC (n = 8 y 12), PSC (n = 4 y 4) y CCA (n = 10 y 18) e individuos sanos (n = 9 y 5) se aislaron mediante ultracentrifugación diferencial. La caracterización de las EVs se llevó a cabo a través de microscopía electrónica de transmisión (TEM), *nanoparticle tracking analysis* (NTA) e Immunoblot. El perfil de RNA de las EVs fue determinado por microarrays (Illumina). La capacidad diagnóstica de los transcritos identificados (AUC, sensibilidad, especificidad) fue calculada mediante curvas ROC. La expresión de los candidatos seleccionados fue

evaluada en tejido humano de CCA y adyacente sano de dos cohortes independientes (TCGA y Copenhague), así como en cultivos de colangiocitos humanos normales (NHC) y tumorales (EGI-1 y TFK-1) y en EVs liberadas de dichas líneas celulares.

**Resultados:** Las EVs aisladas de suero y de orina mostraron una morfología redondeada, tamaño similar (180 nm diámetro) y marcadores típicos de EVs (CD63 y CD81). El análisis transcriptómico de dichas EVs mostró un perfil diferencial de RNAs en los pacientes con CCA en comparación con individuos sanos o pacientes con otras enfermedades (PSC y UC), algunos de ellos con el máximo valor diagnóstico (AUC = 1). En pacientes con CCA, un total de 268 transcritos en EVs de suero y 50 en orina presentaron una abundancia diferencial en comparación con sanos y PSC/UC. Además, 179 y 28 de esos transcritos presentaron la misma expresión diferencial en tejido tumoral de CCA (TCGA y Copenhague) comparado con tejido hepático adyacente sano y con tejido normal de conductos biliares. Asimismo, 49 y 27 de esos RNAs también estaban desregulados en líneas celulares de CCA y en EVs secretadas por dichas líneas, respectivamente y podrían estar implicadas en la patogenia de la enfermedad (crecimiento celular, ciclo celular, reparación del DNA, metabolismo).

**Conclusiones:** las EVs de suero y orina de pacientes con CCA contienen perfiles transcriptómicos específicos con alta capacidad diagnóstica. Al menos parte de estos RNAs pueden ser liberados por las células de CCA; lo que refleja el nuevo enfoque de las EVs de suero como posible estrategia de biopsia líquida.