

## Trabajo Fin de Máster

Título del trabajo:  
Vesículas extracelulares en parénquima pulmonar:  
Nuevas perspectivas en la enfermedad pulmonar  
obstructiva crónica.

English tittle:  
Extracellular vesicles in lung parenchyma: New  
perspectives in chronic obstructive pulmonary  
disease.

Autor:  
Sonia Zúñiga Quílez

Directores:  
David Sanz-Rubio  
José María Marín Trigo

Residente de Neumología en el Hospital Universitario Miguel Servet  
Máster de Iniciación a la Investigación en Medicina  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA  
Curso 2022/2023

# INDICE

Abreviaturas .....	0
<b>1. RESUMEN</b> .....	2
Abstract .....	3
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	4
2.1. Etiología y Factores de riesgo .....	4
2.2. Epidemiología.....	5
2.2.1 Epidemiología del tabaco .....	5
2.2.2 Epidemiología de la EPOC .....	5
2.3. Diagnóstico .....	6
2.4. Clínica .....	7
2.4.1 Exacerbación EPOC.....	8
2.5. Tratamiento .....	9
2.5.1 Tratamiento durante la estabilidad clínica .....	9
2.5.2 Tratamiento durante la exacerbación.....	11
2.6. Supervivencia .....	13
2.7. Medicina personalizada.....	13
2.7.1 Vesículas extracelulares: Exosomas y microRNAs .....	13
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	16
3.1 Hipótesis.....	16
3.2 Objetivos .....	16
3.2.1 Objetivo principal .....	16
3.2.2 Objetivos secundarios .....	16
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	17
4.1 Población a estudio .....	17
4.2 Procesamiento primario de las muestras.....	17
4.2 Aislamiento de Exosomas.....	18
4.3 Caracterización de exosomas .....	18
4.3.1 Caracterización proteica: ELISA .....	18
4.3.2 Caracterización morfológica: Microscopía electrónica de transmisión.....	19
4.3.3 Cuantificación de exosomas: NTA.....	19
4.4 Evaluación de los microRNAs .....	20
4.4.1 Extracción del RNA .....	20
4.4.2 Retrotranscripción.....	21
4.4.3 RT-qPCR (PCR a tiempo real o PCR cuantitativa) .....	21
4.5 Análisis Estadístico.....	21

<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	22
5.1 Características de la muestra a estudio.....	22
5.2 Caracterización de exosomas .....	23
5.2.1 Caracterización proteica mediante ELISA indirecto.....	23
5.2.2 Caracterización morfológica mediante TEM .....	24
5.2.3 Cuantificación de exosomas mediante NTA .....	25
5.3 Cuantificación del ADN mediante RT-qPCR .....	25
5.2 Rutas metabólicas .....	30
5.2.1 Vía de señalización MAPK .....	30
5.2.2. Vía de señalización TGF- $\beta$ .....	31
5.2.3. Regulación del citoesqueleto de actina.....	31
5.2.4. Vía de señalización RAS .....	32
<b>6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO</b> .....	32
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	33
Anexo 1. Cuestionario CAT .....	34
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b> .....	35

## Abreviaturas

**AAT-**  $\alpha$ 1-antitripsina

**ADN-** Ácido Desoxirribonucleico

**ARN-** Ácido Ribonucleico

**ATS-** *American Thoracic Society* - Sociedad Americana de Cirugía Torácica

**BODE-** *Body Mass Index* – Índice de Masa Corporal Multidimensional

**CAT-** *COPD Assessment Test* – Test de evaluación de la EPOC

**CO<sub>2</sub>**- Dióxido de Carbono

**DLCO-** *Diffusing Capacity for Carbon Monoxide* – Difusión de Monóxido de Carbono

**DLP-** Dislipemia

**DM-** Diabetes Mellitus

**DMEM-** *Dulbecco's Modified Eagle Medium* – Medio Basal de Crecimiento Celular

**EAEPOC-** Exacerbación Aguda de Enfermedad Obstructiva Crónica

**ELISA** -*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*- Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

**EPOC-** Enfermedad Obstructiva Crónica

**ERS-** *European Respiratory Society*- Sociedad Europea del Aparato Respiratorio

**ESCRT-** *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport* – Complejos de Clasificación Endosómica necesarios para la Maquinaria de Transporte

**FA-** Fibrilación Auricular

**FEV<sub>1</sub>**- *Forced Expiratory Volume in one second* -Volumen espiratorio máximo en el primer segundo de la espiración forzada

**FRCV-** Factores de Riesgo Cardiovascular

**FVC-** *Forced Vital Capacity* - Capacidad Vital Forzada

**GOLD-** *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*- Iniciativa Global de la Enfermedad Obstructiva Crónica

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**- Peróxido de hidrógeno

**HO-1-** Hemooxigenasa 1

**HTA-** Hipertensión arterial

**ICC-** Insuficiencia Cardíaca Congestiva

**IL-** Interleuquina

**IMC-** Índice de Masa Corporal

**IPA-** Índice Paquetes/Año

**LABA-** Agonista  $\beta$ 2 adrenérgico de acción prolongada

**LAMA-** Anticolinérgicos/antimuscarínico de acción prolongada

**LTB-4** – Leucotrieno B4

**miRNA** – *Micro Ribonucleic Acid* – micro Ácido Ribonucleico

**mMRC-** Escala de disnea modificada del Medical Research Council

**mRNA** – Ácido Ribonucleico mensajero

**MV-** Microvesículas

**MVB-** *Multivesicular Bodies* – Cuerpos multivesiculares

**NF-  $\kappa$ B-** Factor Nuclear Potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

**NK-** Células Natural Killer

**NRF2-** Factor nuclear (derivado de eritroide 2) similar al 2

**NTA-** *Nanoparticle Tracking Analysis*

**O<sub>2</sub>-** Oxígeno

**PCR-** Proteína C Reactiva

**PIBM-** Países de Ingresos Medianos/Bajos

**PSB-** *Phosphate Buffered Saline*- Tampón o buffer fosfato salino

**SOD-** Enzima Superóxido Dismutasa

**TC-** Tomografía Computarizada

**TNF- $\alpha$ -** *Tumor Necrosis Factor* - Factor de necrosis tumoral

**VE-** Vesículas Extracelulares

**VMNI-** Ventilación Mecánica No Invasiva

## 1. RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** La EPOC es una enfermedad crónica, progresiva, no reversible, infradiagnosticada y con alta prevalencia. Su fisiopatología es poco clara, su clínica es heterogénea y su tratamiento poco efectivo para frenar la progresión de la enfermedad. Los exosomas son vesículas extracelulares que contienen microRNAs, los cuales desempeñan un papel primordial en la comunicación intercelular. En este estudio evaluamos un conjunto de miRNAs en tejido pulmonar de pacientes con y sin EPOC, con el objetivo de conocer mejor su fisiopatología, así como de abrir la puerta a nuevas dianas terapéuticas.

**METODOLOGÍA:** Se obtuvo una muestra de tejido pulmonar de 2x2cm de 20 pacientes (8 EPOC y 12 no EPOC) intervenidos quirúrgicamente por un nódulo pulmonar solitario, distal a dicha lesión. No hubo diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto a sexo y edad.

Tras digerir enzimáticamente la muestra, se obtuvieron los exosomas por precipitación con Exoquick TC (System BioScience). Los exosomas se caracterizaron utilizando ELISA frente a CD63 y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se seleccionaron 9 miRNAs en base a la bibliografía existente en relación con la EPOC y se analizaron mediante RT-PCR cuantitativa, comparando los resultados entre ambos grupos. Se utilizó MirTarget para predecir la diana de estos miRNAs para posteriormente aplicar el análisis de la ruta de la Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG).

**RESULTADOS:** Las imágenes TEM mostraron estructuras en forma de copa con diámetros de 70 a 140 nanómetros. El marcador proteico específico de exosomas, CD63, fue confirmado mediante el análisis ELISA. Tras analizar con RT-PCR se identificaron 4 miRNAs sobreexpresados de manera significativa en pacientes EPOC, en comparación con pacientes no EPOC (miRNA-21  $p=0.02$ ; miR-133a  $p=0.002$ , miR-133b  $p=0.006$  y miR-143  $p=0.003$ ). El análisis mediante la KEGG de estos 4 miRNA señaló 4 vías metabólicas: la vía de señalización MAPK, la vía de señalización TGF-beta, la regulación del citoesqueleto de actina y la vía de señalización RAS.

**CONCLUSIONES:** Esta sobreexpresión de miRNAs en tejido pulmonar en pacientes con EPOC puede significar que estas moléculas desempeñan un papel importante en la fisiopatología y en la progresión de esta enfermedad. Todo ello abre la puerta a su uso como dianas terapéuticas en esta enfermedad, siendo necesarios nuevos estudios en esta línea de investigación.

**Palabras clave:** enfermedad pulmonar obstructiva crónica, RNA, exosomas, vesículas extracelulares, biomarcador, parénquima pulmonar.

## Abstract

**INTRODUCTION:** COPD is a chronic, progressive, non-reversible and underdiagnosed disease with a high prevalence. Its pathophysiology is unclear, its symptoms are heterogeneous, and its treatment is ineffective in slowing the progression of the disease. Exosomes are extracellular vesicles that contain microRNAs, which play a primary role in intercellular communication. In this study we evaluated a set of miRNAs in lung tissue from patients with and without COPD, with the aim of better understanding their pathophysiology as well as opening the door to new therapeutic targets.

**METHODOLOGY:** A 2x2cm lung tissue sample was obtained from 20 patients (8 COPD and 12 non-COPD) who underwent surgery for a solitary lung nodule, distal to that lesion. There were no significant differences between both groups in terms of sex and age.

After enzymatically digesting the sample, exosomes were obtained by precipitation with Exoquick TC (System BioScience). Exosomes were characterized using ELISA against CD63 and transmission electron microscopy (TEM). 9 miRNAs were selected based on the existing literature related to COPD and analyzed by quantitative RT-PCR, comparing the results between both groups. MirTarget was used to predict the target of these miRNAs and then apply Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis.

**RESULTS:** TEM images show cup-like structures with diameters from 70 to 140 nanometers. The exosome-specific protein marker, CD63, was confirmed by ELISA analysis. After analyzing with RT-PCR, 4 miRNAs were identified that were significantly overexpressed in COPD patients, compared to non-COPD patients (miRNA-21  $p=0.02$ , miR-133a  $p=0.002$ , miR-133b  $p=0.006$  and miR-143  $p=0.003$ ). KEGG analysis of these 4 miRNAs pointed out 4 metabolic pathways: the MAPK signaling pathway, the TGF-beta signaling pathway, the regulation of actin cytoskeleton and the RAS signaling pathway.

**CONCLUSIONS:** This overexpression of miRNAs in lung tissue in patients with COPD may mean that these molecules play an important role in the pathophysiology and progression of this disease. All of this opens the door to their use as therapeutic targets in this disease, requiring new studies in this line of research.

**Keywords:** chronic obstructive pulmonary disease, RNA, exosomes, extracellular vesicles, biomarker, lung parenchyma.

## 2. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) se define en la guía GOLD 2023 como una condición pulmonar heterogénea caracterizada por síntomas respiratorios crónicos (disnea, tos, producción de esputo y/o exacerbaciones) debido a anomalías de las vías aéreas (bronquitis, bronquiolitis) y/o alvéolos (enfisema) que provocan una obstrucción persistente, a menudo progresiva, del flujo aéreo (1).

La EPOC es una enfermedad crónica, como su nombre indica, que constituye una de las principales causas de morbi-mortalidad en todo el mundo, causando la muerte prematura de muchos de los individuos que la padecen (1). En la actualidad, la EPOC es la cuarta causa de muerte a nivel mundial (2).

Se estima que su incidencia aumentará globalmente en las próximas décadas debido a la persistente exposición a los factores de riesgo relacionados con la misma, así como al envejecimiento de la población (1).

Además, a medida que aumenta la incidencia de EPOC, lo hacen también las exacerbaciones, las cuales suponen una carga económica muy importante para los sistemas de atención de la salud (3).

### 2.1. Etiología y Factores de riesgo

El principal factor de riesgo de desarrollo de EPOC es el humo del tabaco. Si bien, puede desarrollarse también tras la exposición a otros tóxicos inhalados como los gases de combustión de biomasa (carbón o madera) u otros gases, humos, polvo o vapores que se producen en algunos ambientes profesionales, así como la exposición a la contaminación atmosférica (4).

Como se ha comentado, la principal causa de EPOC es el tabaquismo, sin embargo, solo el 15% de los fumadores desarrollarán dicha enfermedad. Este hecho sugiere que la exposición al humo del tabaco no es un factor suficiente por sí mismo y parece que han de existir otros factores que favorezcan el desarrollo de la misma, ya sean genéticos o la combinación de estos con otros factores ambientales (4).

La susceptibilidad genética a padecer EPOC no presenta un patrón de herencia mendeliano, por lo que el estudio genético de la misma es complejo. Se ha establecido una herencia de tipo poligénica en cuanto a la patogenia de la EPOC, múltiples genes que pueden actuar a diferentes niveles de la vía aérea y de la funcionalidad pulmonar (4).

También se ha descrito variabilidad genética en cuanto a genes que modulan la respuesta inflamatoria. Esto es importante ya que la EPOC, a nivel sistémico, se caracteriza por una inflamación crónica debido a una respuesta inflamatoria anormal (numerosos tóxicos aéreos, activan a los macrófagos que liberan TNF- $\alpha$ , leucotrieno B4, diferentes interleucinas y numerosas moléculas quimiotácticas y proteasas) (4).

El factor genético más relevante y mejor estudiado, aunque raro, es la mutación en el gen SERPINA1 que se manifiesta con la deficiencia de  $\alpha$ 1-antitripsina (AAT)(1). Se ha relacionado este déficit con una aparición temprana de la EPOC. La AAT es una glucoproteína con actividad antiproteasa que inhibe irreversiblemente las enzimas serina proteasas, evitando la degradación



de la matriz extracelular pulmonar. Además, poseen efecto antiinflamatorio con capacidad para neutralizar las defensas de los neutrófilos, el LTB-4 y la citocina Interleucina 8. Se han identificado 4 variantes alélicas del gen que codifica esta proteína, y en dependencia de la variante, la deficiencia de ATT plasmática será más o menos grave. La prevalencia del déficit de ATT en pacientes con EPOC es <1% (4,5).

Cabe destacar que el desarrollo pulmonar anómalo temprano, incluido el desarrollo alveolar y de las vías respiratorias, podría ser la base de la susceptibilidad a la EPOC y al deterioro de la función pulmonar (2), por lo que cualquier factor que afecte a dicho desarrollo durante la gestación y/o la infancia (bajo peso al nacer, infecciones respiratorias, exposición pasiva al humo en el útero, etc.) puede incrementar el riesgo de desarrollar EPOC en un futuro (4,6). Aunque algunas infecciones virales, como el virus sincitial o el adenovirus, se han relacionado con una disminución de la función pulmonar en la edad adulta, el papel de las infecciones respiratorias como factor de riesgo para padecer EPOC está todavía en estudio (4).

## 2.2. Epidemiología

### 2.2.1 Epidemiología del tabaco

El tabaquismo es una enfermedad adictiva crónica que en el 90% de los casos se inicia antes de los 20 años de edad y que se mantiene merced a la dependencia que produce la nicotina (4).

Es la primera causa de muerte evitable en los países desarrollados, siendo la tercera el tabaquismo pasivo (4).

Según la Encuesta Europea de Salud del 2017, en España, la tendencia en cuanto al hábito tabáquico se refiere ha ido disminuyendo y, actualmente, el porcentaje de la población que fuma a diario ha alcanzado el nivel más bajo de las últimas décadas en ambos sexos. Si bien la prevalencia en personas jóvenes no sigue dicha tendencia (7).

### 2.2.2 Epidemiología de la EPOC

Los datos que existen sobre la prevalencia de la EPOC son muy variables debido a las diferencias en los métodos de encuesta, en los criterios de diagnóstico y en los enfoques analíticos (1).

Según el estudio EPISCAN II (2017) se estima que de entre los 21.4 millones de españoles con edad entre 40-80 años, 2.185.764 padecen EPOC. Si diferenciamos por sexo, 1.571.868 de hombres (14.6%) padecen EPOC frente a 628.102 mujeres (9.4%)(8). Sin embargo, la EPOC es una enfermedad infradiagnosticada, se cree que hasta un 73% de los sujetos con EPOC permanecen sin diagnosticar. Este mismo estudio estableció que la EPOC leve suponía el 56% de todos los pacientes diagnosticados de EPOC (6).

En los últimos años la prevalencia de la EPOC entre las mujeres se ha incrementado debido a su incorporación más tardía al hábito tabáquico (4).

Las personas fumadoras tienen un riesgo absoluto de desarrollar EPOC de entre un 25% y un 30%, además hay que tener en cuenta que el riesgo proporcional va asociado al consumo acumulado de cigarrillos (4).

La prevalencia de EPOC en pacientes nunca fumadores parece ser más prevalente entre las mujeres, especialmente en los países de ingresos medianos bajos (PIBM), donde la exposición a otros contaminantes interiores (humos de cocina y exposición a biomasa) y exteriores es mayor en las mujeres (9).

### 2.3. Diagnóstico

Actualmente, para poder diagnosticar la EPOC es necesaria la realización de una espirometría forzada y que esta tenga un cociente volumen espirado máximo en el primer segundo de la espiración forzada entre capacidad vital forzada (FEV1/FVC) post-broncodilatador  $<0,7$ . Cabe señalar que el uso de este cociente puede dar lugar a un sobrediagnóstico de EPOC en ancianos, ya que su disminución con la edad es natural, y a un infradiagnóstico en adultos jóvenes, especialmente en caso de enfermedad leve. (1,10)

Es importante señalar que la obstrucción irreversible al flujo aéreo no es específica de la EPOC, puede encontrarse en pacientes con asma u otras enfermedades pulmonares (1).

Debe considerarse la realización de una espirometría ante cualquier paciente que presente disnea, tos crónica o producción de esputo y/o antecedentes de exposición a factores de riesgo de la enfermedad (1).

Personas con un cociente FEV1/FVC conservado que están expuestas al humo del tabaco y además presentan tos, expectoración, disnea y una baja capacidad de difusión (DLCO) tienen más riesgo de desarrollar EPOC en los próximos años. Del mismo modo, personas sin obstrucción al flujo aéreo que presentan un valor de FEV1 en el extremo inferior del rango de normalidad y/o con una reducción  $>40\text{mL/año}$  de la FEV1, tienen mayor probabilidad de desarrollar EPOC en los próximos 5 años. Podemos clasificar a este grupo de pacientes, de forma popular, dentro del grupo “pre-EPOC” (11).

Además, hay pacientes que presentan un cociente FEV1/FVC  $< 0,7$  pero  $\geq 0,7$  tras broncodilatadores inhalados, estos pacientes tienen 6.2 veces más riesgo de desarrollar EPOC (1).

Cabe reseñar que, la espirometría no solo es importante para el diagnóstico de la EPOC, sino también para clasificar la gravedad de la limitación del flujo aéreo, como se refleja en la Tabla 1 (10):

**Tabla 1:** Grado de obstrucción según FEV1 postbroncodilatador.

Grado de obstrucción	FEV1 postbroncodilatador
1 = leve	$\geq 80\%$
2 = moderada	50-79%
3 = grave	30-49%
4 = muy grave	$<30\%$

## 2.4. Clínica

Los síntomas que con mayor frecuencia presentan estos pacientes son disnea, tos crónica y sibilancias recurrentes. La disnea crónica es el síntoma más característico de la EPOC. La presencia de todos o alguno de estos síntomas y/o de infecciones recurrentes de la vía aérea y/o antecedentes de factores de riesgo (humo del tabaco, combustión de biomasa, etc.) aumenta la probabilidad de padecer EPOC, si bien para su diagnóstico sigue siendo necesaria la realización de una espirometría, como ya se ha comentado (1).

Estos síntomas pueden ser constantes o variar a lo largo del día, de hecho, suelen tener una distribución bimodal, siendo más marcados a primera hora de la mañana y al atardecer o durante la noche (1,10). Además, pueden preceder al desarrollo de obstrucción del flujo aéreo o, por el contrario, puede haber ausencia de estos síntomas con obstrucción al flujo aéreo en la espirometría (1).

Es interesante resaltar que, en muchas ocasiones, los pacientes tardan en consultar por dichos síntomas, especialmente si estos son de predominio nocturno, ya que piensan que no es algo patológico y que está en relación con el envejecimiento, la exposición al humo del tabaco o a contaminación en su lugar de trabajo (10,12).

La tos crónica suele ser el primer síntoma de la EPOC y está presente en hasta un 30% de los pacientes. Inicialmente suele ser intermitente, pero a medida que pasa el tiempo aparece a lo largo de todo el día. Puede ir acompañada o no de expectoración (1). Cabe citar que la aparición de tos productiva en fumadores jóvenes aumenta el riesgo de desarrollar EPOC en la edad adulta (10).

La producción regular de esputo durante tres o más meses en dos años consecutivos, en ausencia de otra etiología, es lo que se conoce clásicamente como bronquitis crónica. Es un factor de riesgo de agudizaciones frecuentes y tiene un impacto importante en la calidad de vida de los pacientes (13). Ante la producción de grandes volúmenes de esputo debemos descartar la presencia de bronquiectasias subyacentes. Cuando este se vuelve purulento debemos descartar una exacerbación bacteriana, aunque la asociación es relativamente débil (1).

La pérdida de peso, la pérdida de masa muscular y la anorexia son problemas comunes en pacientes con EPOC grave y muy grave y tienen importancia pronóstica. Pueden ser signo de otras enfermedades, como tuberculosis o cáncer de pulmón. El edema de los tobillos puede indicar la presencia de *cor pulmonale* (1).

El TC de tórax se ha convertido en una herramienta muy útil a la hora de clasificar a los pacientes con EPOC según su fenotipo: enfisematoso o bronquítico. El paciente “enfisematoso” se asocia frecuentemente con la pérdida de tejido mesenquimatoso (hueso, músculo y grasa), además tienen un mayor riesgo de cáncer de pulmón. Este fenotipo “bronquítico” se asocia con una mayor incidencia de síndrome metabólico, enfermedad de las arterias coronarias y un mayor riesgo de muerte. Por ello, es interesante realizar dicha prueba de imagen a todos o a casi todos los pacientes con EPOC (11).

Los pacientes con EPOC, cuyo factor de riesgo principal ha sido la exposición al humo del tabaco, se asocian con un enfisema más grave y una disminución más rápida de la función pulmonar en comparación con la EPOC ocasionada por la exposición a la biomasa, que se caracteriza principalmente por el engrosamiento de las paredes de las vías respiratorias y una mejoría de la

función pulmonar después del uso de broncodilatadores. Los pacientes con asma que a consecuencia desarrollan EPOC suelen presentar más síntomas basales, más exacerbaciones y más hospitalizaciones, sin embargo, suelen presentar una tasa de mortalidad más baja que los pacientes con EPOC asociada al tabaquismo (11).

Bajos niveles de DLCO (medida indirecta de enfisema) son un buen predictor de desaturación de oxígeno, hipertensión pulmonar coexistente y cáncer de pulmón (11).

Las pacientes EPOC tienen una peor calidad de vida y comienzan a experimentar síntomas a una edad más temprana y con un grado de obstrucción al flujo aéreo menor, que en comparación con los pacientes varones (4).

Los pacientes con EPOC suelen padecer otras patologías de forma concomitante, las cuales aparecen a edades más tempranas de las esperadas en población no EPOC. Dichas enfermedades son: cardiopatía isquémica, fibrilación auricular, insuficiencia cardíaca, osteoporosis, cáncer de pulmón, reflujo gastroesofágico, ansiedad y depresión (11).

Los síntomas de depresión y/o ansiedad son más frecuentes en pacientes EPOC que en la población general, y se asocian a peor estado de salud, mayor riesgo de exacerbaciones e ingreso hospitalario (1).

Existen diversos cuestionarios para la evaluación de los síntomas en pacientes con EPOC (12):

- El Test de Evaluación de la EPOC (CAT) (ANEXO 1)(14) tiene como objetivo medir rápidamente el impacto de la EPOC en la calidad de vida relacionada con la salud y facilitar la comunicación médico-paciente. Algunos de los ítems que analiza son la presencia de tos, expectoración, disnea al subir colinas y escaleras, confianza al salir de casa, la calidad del sueño, etc. Además, se ha demostrado modificaciones en la puntuación del CAT tras rehabilitación pulmonar y tras la recuperación de una exacerbación.

- La escala de disnea modificada del Medical Research Council (mMRC) se usa para indicar el grado en que la disnea afecta a las actividades de la vida diaria, sus valores van del 0 al 4. Es muy fácil de utilizar, sin embargo, mide la disnea de una forma grosera, por lo que es poco sensible a los cambios de la misma.

#### 2.4.1 Exacerbación EPOC

La guía GOLD 2022 define las exacerbaciones de EPOC como un empeoramiento agudo de los síntomas respiratorios que requiere de una terapia adicional (1). Dichos síntomas respiratorios son principalmente: aumento de la disnea basal, tos o esputo purulento con o sin síntomas de infección de las vías respiratorias superiores (11). También pueden presentar otros síntomas como secreción nasal, sibilancias, odinofagia, tos, fiebre, opresión torácica o malestar general (3).

Son eventos muy heterogéneos que se asocian con aumento de la inflamación sistémica y de las vías respiratorias, así como con cambios fisiológicos (3). Por ello, algunos autores abogan por la adición de parámetros objetivos a la definición de exacerbación: neutrófilos en sangre circulantes ( $\geq 9000$  neutrófilos mm) y proteína C reactiva (PCR) ( $\geq 10$  mg L<sup>-1</sup>) (15).

Como se ha comentado con anterioridad, los pacientes con EPOC suelen presentar comorbilidades asociadas, y pueden presentar empeoramiento de sus síntomas respiratorios sin presentar necesariamente una exacerbación. Las patologías que con mayor frecuencia imitan a la EAEPOC y por tanto con las que hacer un diagnóstico diferencial son: neumonía, neumotórax, embolia pulmonar, insuficiencia cardíaca descompensada y arritmias cardíacas (15).

Durante las exacerbaciones se produce un aumento de la inflamación de las vías respiratorias, lo que provoca edema de las mismas, producción de moco y broncoconstricción (10).

En el 30-50% de las ocasiones, las agudizaciones son desencadenadas por bacterias (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* y *Chlamydia pneumoniae*), y hasta en el 30% de los casos intervienen virus, como el virus de la gripe y los rinovirus (11). Estas infecciones provocan un aumento en la inflamación de las vías respiratorias, dando lugar a la aparición de síntomas (3).

Los contaminantes ambientales también juegan un papel importante en el desarrollo de exacerbaciones de EPOC, desencadenando nuevos episodios o potenciando los existentes, además puede aumentar la susceptibilidad a las infecciones. Por lo tanto, la exposición a contaminantes aéreos puede precipitar exacerbaciones tanto infecciosas como no infecciosas (15).

Cabe citar que, a lo largo del año, podemos encontrar dos picos de incidencia de las exacerbaciones, durante el otoño y durante el invierno (10).

Hay pacientes más susceptibles a padecer estas exacerbaciones (fenotipo exacerbador), generalmente este tipo de pacientes presentan peor calidad de vida y una progresión más rápida y agresiva de la enfermedad (3). Esto se debe a que las exacerbaciones son responsables de una disminución acelerada de la función pulmonar y de un deterioro de la calidad de vida, además aumentan el riesgo de infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, embolia pulmonar y, consecuentemente, aumento de la mortalidad (3,11).

Para su prevención es fundamental realizar ejercicio de manera regular, dejar de fumar, empleo de medicamentos apropiados, vacunarse contra el virus de la influenza y el neumococo, y evitar la exposición a espacios con alta contaminación ambiental. A pesar de todo ello, no se consigue eliminar completamente el riesgo de exacerbación (11).

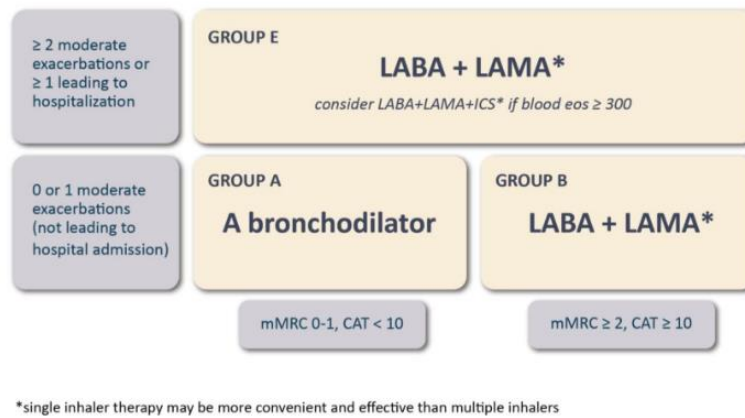
## 2.5. Tratamiento

### 2.5.1 Tratamiento durante la estabilidad clínica

La terapia inhalada es la piedra angular del tratamiento de mantenimiento en la EPOC. Los beta agonistas de acción prolongada (LABA), los antagonistas muscarínicos de acción prolongada (LAMA) y los broncodilatadores duales combinados (LABA/LAMA) disminuyen el número de exacerbaciones al mejorar la FEV1 y reducir la hiperinsuflación (15).

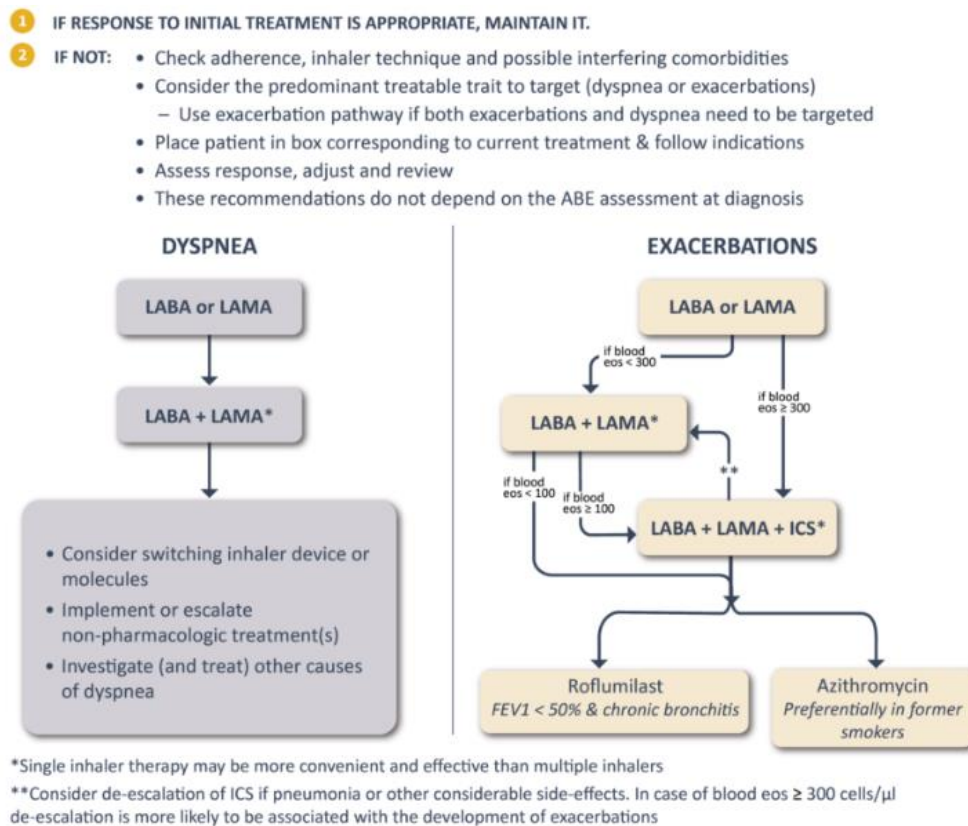
El tratamiento farmacológico se centra en el alivio sintomático, en reducir la frecuencia y gravedad de las exacerbaciones y mejorar la tolerancia al ejercicio y el estado de salud (1,12).

Para orientar el tratamiento farmacológico inicial, la GOLD 2023 propone realizar una evaluación combinada, basada en el nivel de los síntomas (mMRC o CAT™) y en la frecuencia de exacerbaciones durante el último año, como se refleja en la Figura 1 (1).



**Figura 1:** Tratamiento inicial de la EPOC según clínica diaria y exacerbaciones.

La heterogeneidad de la EPOC da como resultado respuestas variables a las intervenciones farmacológicas, por ello tras el inicio del tratamiento los pacientes deben ser reevaluados en múltiples ocasiones a lo largo del tiempo para modificar dicho tratamiento si fuera necesario (1,16). Previo al cambio de tratamiento, es recomendable evaluar la técnica y la adherencia al dispositivo, así como las estrategias no farmacológicas. Para el ajuste de tratamiento la guía GOLD propone el algoritmo de escalada y desescalada que se muestra en la Figura 2 (1):



**Figura 2:** Ajuste del tratamiento farmacológico de la EPOC según disnea y exacerbaciones.

Aunque, por el momento, no se han estandarizado los criterios para definir la EPOC eosinofílica, estos pacientes podrían tener una mejor respuesta al tratamiento con corticoides inhalados, según los estudios realizados hasta el momento (la mayoría retrospectivos) (17). Además, presentan más probabilidades de experimentar exacerbaciones si no reciben dicho tratamiento (15).

Cabe citar que la Sociedad Torácica Americana (ATS) recomienda plantear la retirada de los corticoides inhalados en pacientes con triple terapia y que no hayan tenido exacerbaciones en el último año. Sin embargo, tanto la guía GOLD como la Sociedad Respiratoria Europea (ERS), recomiendan ser cautelosos en su retirada en pacientes con recuentos de eosinófilos en sangre >300 células/ $\mu$ l, independientemente de sus exacerbaciones (16).

En pacientes que están con tratamiento inhalador óptimo y persiste la disnea e intolerancia al ejercicio, hay que estudiar posibles comorbilidades que agraven de forma significativa dichos síntomas (insuficiencia cardíaca congestiva, fibrilación auricular, etc.) (16).

Cabe señalar que los ensayos clínicos realizados hasta ahora no han podido demostrar con suficiente eficacia que estos pacientes se beneficien del tratamiento con fármacos biológicos dirigidos contra la IL-5 (17).

Además, es importante resaltar la importancia de complementar el tratamiento farmacológico con estrategias no farmacológicas. Las más importantes se recogen en la Figura 3 de la guía GOLD 2022 (1):

Patient Group	Essential	Recommended	Depending on Local Guidelines
<b>A</b>	Smoking Cessation (can include pharmacological treatment)	Physical Activity	Flu Vaccination Pneumococcal Vaccination Pertussis Vaccination COVID-19 Vaccinations Shingles Vaccination
<b>B and E</b>	Smoking Cessation (can include pharmacological treatment) Pulmonary Rehabilitation	Physical Activity	Flu Vaccination Pneumococcal Vaccination Pertussis Vaccination COVID-19 Vaccinations Shingles Vaccination

\*Can include pharmacologic treatment

**Figura 3:** Manejo no farmacológico de la EPOC según grupos.

### 2.5.2 Tratamiento durante la exacerbación

El objetivo del tratamiento en fase aguda de la enfermedad es tratar los agentes causales y modular la respuesta del huésped (15).

La guía GOLD 2022 recomienda como tratamiento inhalador inicial, los agonistas  $\beta_2$  de acción corta, con o sin anticolinérgicos de acción corta. Además, recomiendan iniciar el tratamiento de mantenimiento con broncodilatadores de acción prolongada lo más pronto posible, antes del alta del hospital (1).

Para la inflamación sistémica y de las vías respiratorias se utilizan corticoides. Estos han demostrado reducir el fracaso del tratamiento y el riesgo de recaída tanto en el ámbito hospitalario como en el ambulatorio, reducen la duración de la estancia hospitalaria y mejoran con mayor rapidez la función pulmonar y los síntomas. Sin embargo, estos no son inocuos. Aumentan el riesgo de fractura osteoporótica en tratamientos intermitentes y en tandas cortas pueden asociar mayor tasa de sepsis, trombosis venosa y fracturas. Además, en 1 de cada 6 pacientes produce hiperglucemia. También se han asociado a un aumento de las hospitalizaciones por neumonía y a mortalidad por todas las causas en aquellos pacientes tratados de forma ambulatoria con pautas largas (15).

La infección bacteriana está presente en aproximadamente la mitad de las exacerbaciones de la EPOC, por lo que no todos los pacientes requieren terapia con antibióticos (15). La guía GOLD 2022 recomiendan administrar antibióticos si hay purulencia del esputo junto con disnea o aumento del volumen de esputo o si la exacerbación es lo suficientemente grave como para requerir ventilación (1). Un estudio objetivó que si el esputo no era purulento y la PCR no estaba elevada ( $<40$  mg/L), la probabilidad de fracaso sin tratamiento antibiótico era del 2,7 %, en comparación con el 63,7 % si estas características estaban presentes (15).

El coronavirus puede desencadenar una exacerbación de EPOC. En varios estudios realizados con respecto al tratamiento de dicho virus, se analizaron como subgrupo los pacientes con EPOC, obteniendo como resultados la asociación del remdesivir con un menor tiempo de recuperación en pacientes hospitalizados y la reducción de la mortalidad con dexametasona en aquellos que requirieron oxígeno o ventilación mecánica (15).

En algunos casos es necesario el uso de oxigenoterapia dirigida, con el objetivo de conseguir una saturación de  $O_2$  88-92%, pues se ha demostrado que la hiperoxia empeora la acidosis respiratoria y aumenta el riesgo de muerte (15).

Cuando la demanda ventilatoria es mayor que la reserva ventilatoria, se comienza a acumular  $CO_2$  en sangre (hipercapnia), pudiendo requerir, en los casos más graves, ventilación mecánica. Esta debe iniciarse cuando la presión parcial arterial de  $CO_2$  es  $\geq 6,5$  y el pH  $\leq 7,35$  a pesar del tratamiento médico óptimo (15). Su uso mejora el intercambio gaseoso, reduce el trabajo respiratorio y la necesidad de intubación, reduce la duración de la hospitalización y mejora la supervivencia. (1) Sin embargo, la VMNI presenta una tasa de fracasos no despreciable, definidos como acidosis persistente o que empeora, que debemos identificar lo antes posible (idealmente en las 2 primeras horas de tratamiento), ya que los pacientes que requieren intubación tras VMNI fallida tienen un mayor riesgo de mortalidad (15).

Para prevenir el desarrollo de una nueva exacerbación en un corto periodo de tiempo es fundamental la rehabilitación pulmonar. Además, se ha visto beneficio en mantener la VMNI en domicilio en aquellos pacientes que al alta continuaron con hipercapnia y durante el ingreso fue necesario su uso (15).

En cuanto a la prevención de exacerbaciones a largo plazo, hay que tener en cuenta tanto enfoques farmacológicos como no farmacológicos. Se recomiendan las vacunas contra la



influenza y el neumococo. Así como una adecuada cumplimentación de las terapias inhaladas recomendadas en la fase estable de la enfermedad (15).

## 2.6. Supervivencia

El FEV1 define la severidad de la limitación al flujo aéreo. Dicho valor, junto con la intensidad de la disnea, la presencia o ausencia de caquexia y la evaluación de la capacidad para realizar actividades de la vida diaria, tienen valor pronóstico. Además, la presencia de exacerbaciones, especialmente si son  $\geq 2$  por año o una que requiera hospitalización, predice futuras exacerbaciones y malos resultados, lo que indica la necesidad de un seguimiento estrecho y una terapia adecuada (11).

La mayor frecuencia de las exacerbaciones se asocia con una disminución acelerada de la función pulmonar, un deterioro de la calidad de vida y una mayor mortalidad (3).

El índice BODE multidimensional, que integra el índice de masa corporal, el grado de obstrucción del flujo de aire, el grado de disnea y la capacidad de ejercicio (distancia recorrida en 6 minutos), proporciona mejor información pronóstica que el FEV1 únicamente (6,11).

Además, una relación baja entre la capacidad pulmonar inspiratoria y la total ( $<0,25$ ) se asocia con mayor riesgo de muerte (11).

## 2.7. Medicina personalizada

El genoma humano sigue siendo una importante fuente de investigación y actualmente, tiene un gran interés e impacto en la biomedicina. Cada vez se invierte más en estudios relacionados con la denominada medicina personalizada o de precisión. Esta se basa en el individuo en particular; busca la práctica médica individualizada a cada paciente, según pruebas genéticas, biomarcadores y el uso de medicamentos diana (18).

La heterogeneidad de la EPOC en cuanto a clínica y respuesta a las terapias hasta ahora existentes, hace necesario un manejo más específico y holístico de la misma, incorporando los principios básicos de la medicina P4 (predictiva, preventiva, personalizada y participativa) (19).

### 2.7.1 Vesículas extracelulares: Exosomas y microRNAs

Las vesículas extracelulares (VE) son nanopartículas naturales membranosas que contienen moléculas biológicamente activas (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos), son liberadas por todo tipo de células y están presentes en todos los fluidos biológicos (20).

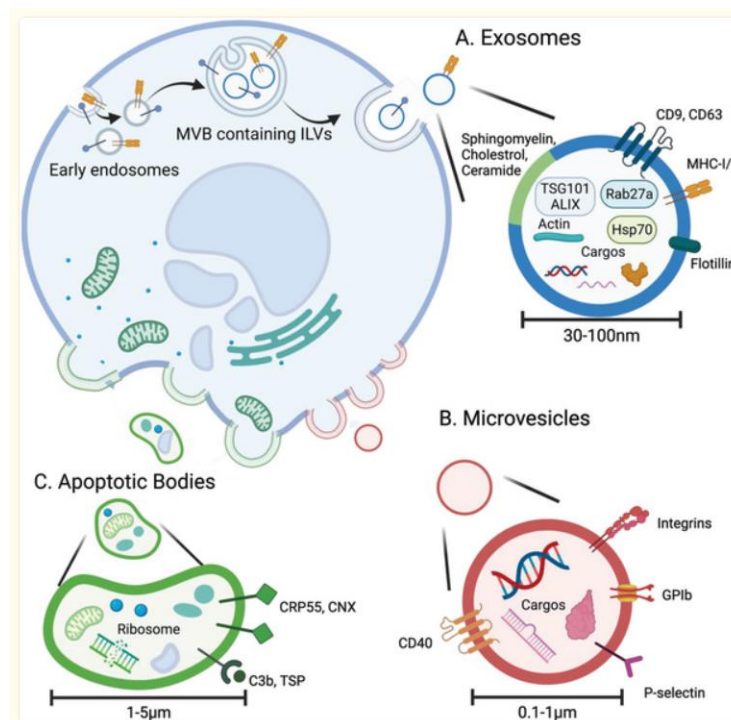
Inicialmente, se demostró que estas moléculas se encargaban de eliminar materiales no deseados de las células, posteriormente se observó, además, que son mediadores importantes de la comunicación intercelular que participa en el proceso fisiológico normal, así como en la progresión patológica (21). Por ello, actualmente se están estudiando desde diversos enfoques de bioingeniería para el diagnóstico y/o tratamiento de múltiples enfermedades (20).

Al ser nanopartículas propias de la naturaleza su uso como *vehículos* en biomedicina tiene importantes ventajas: tolerancia inmune, estabilidad en los sistemas circulatorios y capacidad de cruzar barreras biológicas para llegar a órganos distantes como el cerebro (20).

Dentro de las VE podemos diferenciar tres subtipos principales, según su biogénesis, su tamaño y contenido y su función biológica: microvesículas (MV), exosomas y cuerpos apoptóticos (20).

Las VE se pueden originar fundamentalmente por dos procesos, como se muestra en la Figura 4 (21):

- A través de la gemación hacia afuera de la membrana plasmática, lo que se denominada microvesículas desprendidas (MV) o ectosomas. Su tamaño varía entre 50 a 10 000 nm.
- A través de la gemación interna de la membrana endosómica, lo que resulta en la formación de cuerpos multivesiculares (MVB), que liberan exosomas por la fusión de la membrana externa de MVB con la membrana plasmática. Su tamaño es más pequeño, entre 30 a 150 nm.



**Figura 4:** Génesis de vesículas extracelulares (22)

Una vez liberados, las VE pueden internalizarse mediante endocitosis o fusión de membranas, liberando su contenido en las células "receptoras" (21).

Aunque se pensaba que el complejo clasificador requerido para el transporte (o ESCRT por sus siglas en inglés) eran el principal impulsor de la biogénesis exosomal, estudios recientes han demostrado la existencia de vías alternativas e independientes, como la vía sindecansintentina-ALIX. Así, los diferentes contenidos que pueden presentar los exosomas se deben a la combinación, o la falta de ella, de dichas vías (21).

En cuanto a los miRNAs que se encuentran en las VE, tienen pequeñas diferencias en comparación con el contenido de ARN de las células de las que se deriva (21).

Los microRNAs (miRNAs) desempeñan un papel importante en procesos como la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. Estudios demuestran su implicación en el desarrollo de los pulmones y enfermedades pulmonares como la EPOC. La exposición ambiental a los contaminantes del aire y al tabaco puede provocar la desregulación de algunos miRNAs lo que genera estrés oxidativo, inflamación y el desequilibrio entre la apoptosis y la reposición de células estructurales en el pulmón. Algunos miRNAs, como miR-34 a/b/c, 130a, 133, miR-146a, miR-203, miR-218 y la familia let-7, pueden servir como marcadores potenciales basados en su concentración en fluidos o biopsias como indicadores de riesgo de exposición ambiental y EPOC (2,23,24).

Se ha visto que algunos microRNA, como miR-122-5p y miR-218-5p/miR-15<sup>a</sup>, tienen un papel en la EPOC independientemente de la exposición al tabaco, mientras que otros están relacionados directamente con dicha exposición, como Let-7. Mizuno et al. analizaron el tejido pulmonar de 55 pacientes con EPOC y descubrieron que el miR-34a y miR-199a-5p estaban sobreexpresados en comparación con pulmones histológicamente sanos (25).

Uno de los miRNAs más estudiados en la enfermedad obstructiva crónica es el miR21. En un estudio realizado por Kim R. et al. (26) constataron su elevación en muestras bronquiales y del tejido pulmonar en pacientes EPOC y lo utilizaron como posible diana terapéutica en ratones.

## 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 3.1 Hipótesis

La hipótesis que nos ha llevado a la realización de nuestro trabajo es que existen vesículas extracelulares, en concreto exosomas, en el tejido pulmonar de pacientes EPOC y sujetos sin EPOC, en cuantía y contenido de miRNAs con diferencias significativas entre ambos grupos, lo que podría estar implicado en la patogenia de la enfermedad.

### 3.2 Objetivos

#### 3.2.1 Objetivo principal

El objetivo principal de nuestro trabajo es conocer si existen diferencias estadísticamente significativas entre los miRNAs presentes en los exosomas del tejido pulmonar de pacientes EPOC, con respecto a pacientes no EPOC.

#### 3.2.2 Objetivos secundarios

- Conseguir tejido pulmonar alejado de la lesión a reseca de pacientes EPOC y no EPOC
- Aislar los exosomas presentes en las muestras de tejido pulmonar de cada uno de los sujetos participantes.
- Realizar una caracterización morfológica y proteica de dichos exosomas para confirmar su presencia en nuestra muestra.
- Cuantificar la expresión de cada uno de los 9 miRNAs seleccionados para compararla entre los dos grupos de pacientes a estudio.
- Conocer las rutas metabólicas afectadas por la sobreexpresión o infraexpresión significativa de dichos microRNAs.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 Población a estudio

Este trabajo se encuentra dentro de los objetivos del estudio ExVeLP (Extracellular Vesicles from Lung Parenchyma).

El reclutamiento de los pacientes incluidos en este trabajo tuvo lugar durante el año 2022 y fue llevado a cabo por el servicio de Cirugía Torácica del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza.

Los pacientes seleccionados presentaban un nódulo pulmonar solitario diagnosticado mediante TC torácico, sugestivo de malignidad y abordable por cirugía con intención curativa. Todos los pacientes fueron valorados por el servicio de Anestesiología corroborando la operabilidad de los mismos y excluyendo aquellas intervenciones que no fueran seguras para el paciente. Tras ello, todos los sujetos fueron intervenidos por el servicio de Cirugía Torácica del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza.

La muestra de tejido obtenida para nuestro estudio se recogió en la misma intervención de extracción de la lesión sospechosa, del mismo lóbulo intervenido, pero de una zona alejada y de tejido sano. La pieza tenía unas dimensiones de 2x2 cm<sup>2</sup>.

Por último, para evitar sesgos, se seleccionaron las muestras de tejido pulmonar sano de los pacientes cuyos resultados histopatológicos de la lesión intervenida, estudiados y procesados por el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza, revelaban un Adenocarcinoma pulmonar.

Todos los pacientes fueron informados previamente a su inclusión en dicho estudio y dieron su aceptación firmando un consentimiento informado. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (CEICA). Además, todos los procedimientos y actos llevados a cabo tanto en lo que respecta al paciente como a las muestras obtenidas, procesadas y estudiadas siguen los principios éticos de la última actualización de la Declaración de Helsinki, así como de las guías de Buena Práctica Clínica y de las guías de Buena Práctica de Laboratorio.

### 4.2 Procesamiento primario de las muestras

La pieza obtenida para estudio fue procesada inmediatamente después de la extracción de la misma para preservarla en las mejores condiciones posibles para su posterior análisis.

El procesamiento de la muestra se llevó a cabo bajo campana y en condiciones de esterilidad. Una vez extraída, previa división en pequeños fragmentos, se obtuvo una imagen macroscópica de la pieza. Posteriormente se dividieron estos fragmentos en dos tubos de microcentrifugadora (tubos eppendorf) de 5mL, y se introdujeron en un congelador a -80°C, donde se preservarían hasta el momento del análisis.

## 4.2 Aislamiento de Exosomas

Para poder procesar la muestra en los kits de aislamiento preestablecidos, se necesitaba que esta estuviera en un estado de suspensión, por lo que se sometió a una digestión enzimática. Posteriormente, para la aplicación del kit comercial de precipitación fue necesario realizar una serie de adaptaciones al protocolo recomendado.

Se comenzó con el aislamiento descongelando la muestra de tejido y pensándola una vez descongelada, con el objetivo de preparar el medio de digestión en una placa. Este medio estaba constituido por DMEM, colagenasa, DNAsa y dipasa.

Una vez preparado el medio, la muestra se cortó en pedazos más pequeños para aumentar la superficie de contacto con el medio, y se sumergió en la placa. Tras esto, se incubó en agitación dos horas a 37°C. Posteriormente, esta muestra se neutralizó con medio DMEM suplementado al 1% (mezcla de Vitamina E, acetato de vitamina E, superóxido dismutasa, catalasa, glutatión y vitamina A) y el resultado se dividió en tubos de microcentrifuga de 1.5mL.

A continuación, se comenzó con el aislamiento de exosomas propiamente dicho. Para ello, se realizó una primera centrifugación a 6000 rpm (2000g) durante 20 minutos a una temperatura de 20°C, tras la que se descartó el sedimento o *pellet*, quedándonos con el sobrenadante. Posteriormente, se realizó una segunda centrifugación a 12000 rpm (10000g) durante otros 20 minutos a la misma temperatura, volviéndonos a quedar con el sobrenadante y descartando el sedimento. Finalmente, a la muestra se le añadió el factor precipitante *ExoQuick-TC* y se incubó a 4°C durante toda la noche.

Al día siguiente, se realizó una nueva centrifugación a 12000 rpm (10000g) durante 75 minutos a 4°C, descartando el sobrenadante y quedándonos, en esta ocasión, con el sedimento.

Este sedimento se resuspendió en un tampón fosfato salino (PSB), el cual es una solución isotónica no tóxica para la muestra a analizar, siendo muy utilizado en biomedicina. Y posteriormente se conservaron los tubos a -20°C.

## 4.3 Caracterización de exosomas

Una vez aislados los exosomas de las piezas quirúrgicas, se llevaron a cabo diferentes técnicas de cuantificación y caracterización de los mismos para objetivar la presencia de miRNAs específicos, así como su morfología.

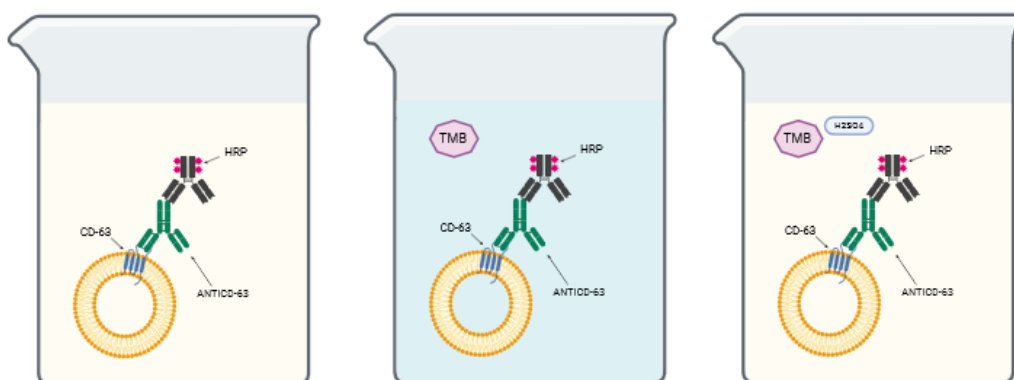
### 4.3.1 Caracterización proteica: ELISA

En primer lugar, se cuantificó la cantidad de proteína que estaban presentes en nuestras muestras para tener una concentración de 100 µg. Para llevar a cabo este procedimiento se utilizó un método de ELISA indirecto frente a CD63. El CD63 es una proteína de membrana liposomal, perteneciente a la familia de las tetraspaninas, presente en los exosomas y que utilizaremos para identificar su presencia (27).

Tras añadir las muestras, estas fueron incubadas una hora a 37°C para mejorar la fijación de los exosomas en los pocillos. A continuación, se lavaron los pocillos con un tampón o solución de buffer. Posteriormente se añadió el anticuerpo primario anti-CD63 y se dejó una hora a temperatura ambiente, tras lo cual, se volvieron a lavar los pocillos con el tampón.

Seguidamente, se añadió a la muestra el anticuerpo secundario HRP (*Horseradish Peroxidase*), esta enzima se utiliza como biosensor para detectar otras moléculas, fundamentalmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero también ARN, como es en nuestro caso (28). Tras la adición de dicho anticuerpo se dejó incubar la muestra a temperatura ambiente otra hora, tras lo que se realizó un nuevo lavado.

Para finalizar con la caracterización de exosomas, se añadió el sustrato TMB y se incubó durante 10 minutos. El TMB o tetrametilbenzidina es una enzima que cuando se combina con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produce color azul debido a una reacción de oxidación (29). Tras la incubación se observó la muestra con un espectrofotómetro a 450 nm. Posteriormente, se añadió ácido sulfúrico a la muestra para detener la reacción, tornándose la muestra amarilla. Este proceso se muestra en la Figura 5.



**Figura 5:** Caracterización de exosomas mediante ELISA indirecto (Realizado en BioRender.com).

#### 4.3.2 Caracterización morfológica: Microscopía electrónica de transmisión

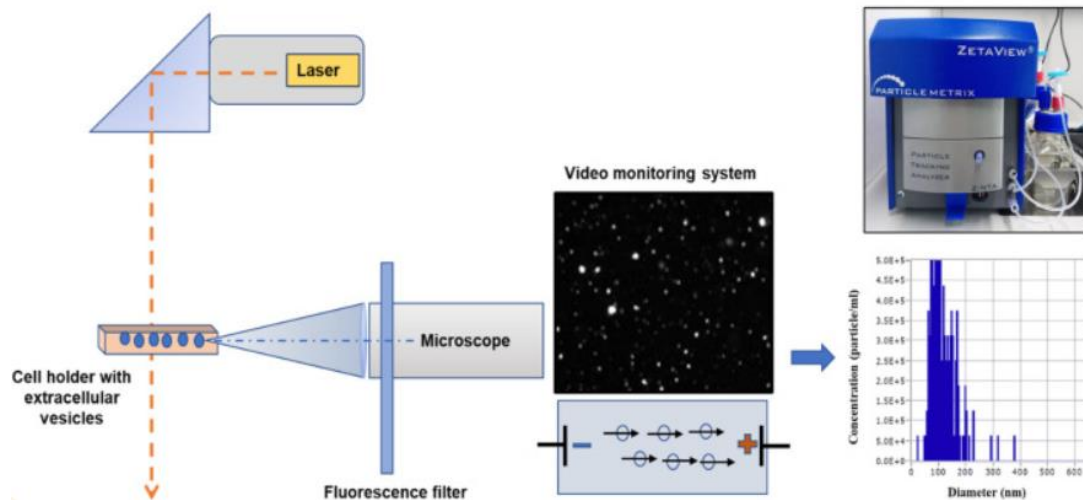
Se analizaron 3 muestras de cada grupo. Para ello, fueron diluidas 1:50 en PBS, tras lo cual las muestras se llevaron a la Facultad de Medicina de Zaragoza donde fueron analizadas por el Servicio de Microscopía de Muestras Biológicas de la Universidad de Zaragoza. Allí, fijaron las y añadieron a las muestras acetato de uranilo sobre una capa de carbono activado para su tinción negativa.

El análisis de las muestras fue llevado a cabo por un técnico especialista del INMA (Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón).

#### 4.3.3 Cuantificación de exosomas: NTA

El método NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) combina dos principios físicos diferentes, la dispersión de la luz y el movimiento browniano, para la caracterización de exosomas.

Como se muestra en la Figura 6, las partículas en suspensión líquida se irradian con un rayo láser y se rastrea la trayectoria 2D de cada partícula mediante una cámara CMOS colocada a 90° con respecto al plano de iluminación, que captura el desplazamiento de cada partícula bajo el movimiento browniano, lo que permite la determinación simultánea del tamaño y la concentración. El radio hidrodinámico de partículas individuales se calcula mediante las ecuaciones de Stokes-Einstein (30).



**Figura 6:** Método NTA para la cuantificación de exosomas (30).

Nuestro análisis se realizó mediante un equipo Nanosight NS300 de *Malvern Panalytical*. Para ello se llevó a cabo la dilución de las muestras 1:1000 en una solución con PBS y EDTa para evitar que se agregara y después, se introdujeron en la cámara de lectura.

#### 4.4 Evaluación de los microRNAs

Se analizó la presencia, en los exosomas de nuestras muestras, de una serie de miRNA (miR375, miR1299, miR143, miR363, miR181b, miR133b, miR133b, miR130a, miR26a y el miR21) que han sido asociados a la EPOC en estudios previos de la literatura, y posteriormente se procedió a la cuantificación de los mismos para compararlos entre los dos grupos a estudio.

Para llevar a cabo este procedimiento, en primer lugar, se extrajo el RNA de los exosomas aislados de nuestra muestra. A continuación, se realizó una retrotranscripción para obtener una copia de ADN a partir del RNA aislado, el cual se cuantificó a través del método RT-qPCR.

##### 4.4.1 Extracción del RNA

Para llevar a cabo este procedimiento, utilizamos un kit comercial (Qiagen) para extraer el total del RNA de nuestra muestra.



Primero, se mezclaron 60 µl de buffer de RPL y 200 µl de la solución con nuestros exosomas aislados y se dejaron incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente. Después, esta mezcla se centrifugó durante otros 3 minutos a 12000g y nos quedamos con el sobrenadante.

A continuación, añadimos a la mezcla seleccionada 250 µl de isopropanol y lo transferimos todo a una columna de RNeasy. Tras esto, se volvió a centrifugar la muestra durante 15 segundos a 8000g y se realizaron varios ciclos de lavado de la columna. Lo siguiente que se hizo fue añadir 500 µl de etanol al 80% y se volvió a centrifugar para eliminar el eluido.

Finalmente, se añadió 20 µl de agua sobre la columna, se incubó 1 minuto y se centrifugó a velocidad máxima durante otro minuto. De esta manera, se consiguió el RNA aislado en el tubo colector, el cual se conservó a -80°C.

#### 4.4.2 Retrotranscripción

La retrotranscripción es el proceso celular en el que una enzima retrotranscriptasa sintetiza una copia de ADN a través de ARN.

Para ello se utilizó el kit comercial *miRCURY LNA RT kin (Qiagen)*.

#### 4.4.3 RT-qPCR (PCR a tiempo real o PCR cuantitativa)

Con este proceso lo que se busca es cuantificar el DNA que tenemos en nuestra muestra. Para ello, le añadiremos reactivos e indicadores del kit *miRCURY LNA SYBR Green PCR kit (Qiagen)*.

Este kit contiene un fluorocromo que se unirá al producto de la PCR, y mediremos la fluorescencia emitida por este a través de un termociclador *StepOnePlus (Applied Biosystems)*. Para que la cuantificación de la fluorescencia fuese correcta fue necesario añadir a la muestra una concentración ROX al kit de la reacción.

### 4.5 Análisis Estadístico

En la tabla de caracterización demográfica y clínica de la población a estudio, se recogió la media y la mediana de la edad y del índice de comorbilidad de Charlson. En cuanto al IMC, al IPA y a la función pulmonar, se recogió la media de los datos de nuestros pacientes. El resto de los parámetros (Nº de casos, sexo, FRCV, Asma, DLCO, enfisema y bronquiectasias) fueron expuestos en números absolutos. Como nuestra muestra es pequeña utilizamos la prueba de Mann Whitney para saber si había diferencias estadísticamente significativas en las características demográficas y clínicas de nuestros pacientes a estudio.

Para comparar la cuantificación de los diferentes miRNAs entre los dos grupos, EPOC y no EPOC, se usó la prueba de Mann Whitney, tomando como umbral de significación el 0.05.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Características de la muestra a estudio

Nuestro estudio analizó las muestras de 20 pacientes que fueron intervenidos por el servicio de Cirugía Torácica del Hospital Universitario Miguel Servet por presencia de nódulo solitario, 8 de los cuales tenían EPOC.

En cuanto a las características demográficas (sexo, edad, IMC, comorbilidades asociadas) no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Todos los participantes en el estudio eran de raza caucásica y todos ellos fueron diagnosticados de adenocarcinoma gracias a la muestra reseca. En la Tabla 2 se recoge información sobre la localización de dichas lesiones.

**Tabla 2:** Localización de las lesiones pulmonares intervenidas.

	EPOC	No EPOC
LSD	3	5
LM	0	1
LID	1	1
LSI	3	4
LII	1	1

Si bien, hubo diferencias significativas en cuanto al hábito tabáquico. Todos los pacientes habían fumado en algún momento de su vida, sin embargo, el grupo no EPOC presentaba un IPA significativamente más bajo en comparación con el grupo EPOC y la mayoría eran exfumadores, lo que posiblemente esté en relación con el hecho de desarrollar o no esta enfermedad. Además, los pacientes EPOC presentaban todos ellos enfisema, mientras en el grupo control solo lo hacía un 33% de la muestra. De igual forma, los pacientes EPOC presentaban menores cifras de DLCO, comprándolos con el grupo no EPOC. Todos estos datos quedan recogidos en la Tabla 3.

**Tabla 3:** Características demográficas y clínicas de la población a estudio.

		EPOC	No EPOC
Nº Casos		8	12
Sexo	Hombre	4	7
	Mujer	4	5
Edad (años)	Media	65	65.9
	Mediana	66	67.5
IMC (media)		26.44	25.32
Hábito tabáquico	Fumador	6	2
	Exfumador	2	10
	IPA (media)	52.25	28
HTA		2	3
DM		2	3
DLP		0	3
Asma		0	0
Índice de Charlson	Media	5	4.4
	Mediana	5	4
Función pulmonar	FEV1 absoluto (media)	1.84	2.56
	FVC absoluto (media)	3.09	3.25
	FEV1/FVC (media)	59.86	79.63
Disminución DLCO		6	6
Enfisema		8	4
Bronquiectasias		1	0

## 5.2 Caracterización de exosomas

### 5.2.1 Caracterización proteica mediante ELISA indirecto

Se utilizó la cuantificación proteica de CD63 mediante ELISA indirecto para verificar que en nuestra muestra las vesículas extracelulares eran realmente exosomas y no otras partículas.

Se utilizó un espectrofotómetro a 450nm para medir la absorbancia de cada una de las muestras. Después hicimos lo mismo con una muestra sin exosomas, y el resultado se le resta a los valores obtenidos en las muestras con exosomas. A continuación, los valores se insertaron en la recta de calibrado, y así se pudo determinar la abundancia de exosomas en cada una de las muestras aisladas. Los resultados quedan recogidos en la Tabla 4.

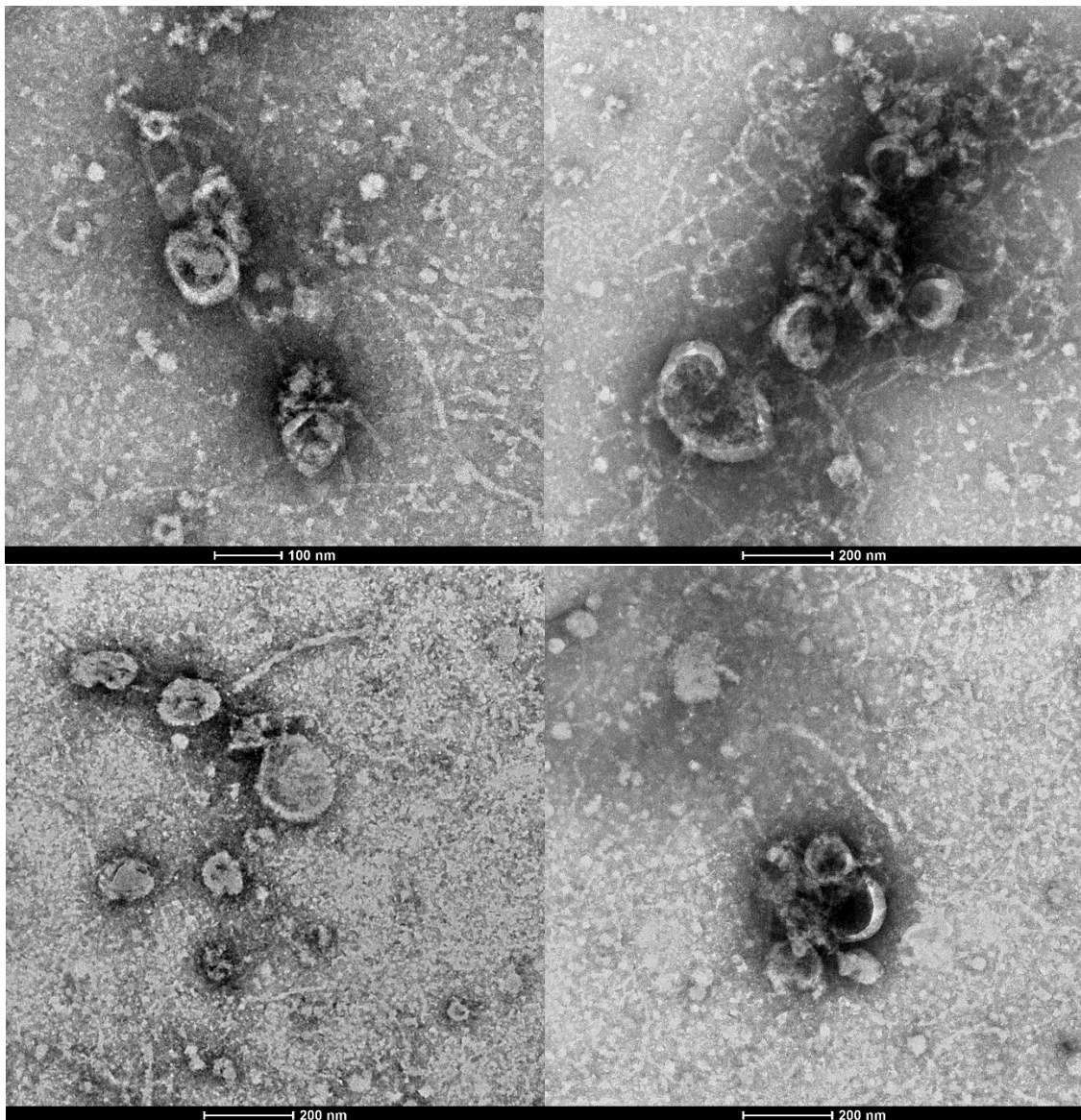
**Tabla 4:** Cuantificación proteica de CD63 mediante ELISA indirecto de las muestras analizadas.

	No exosomas	No EPOC	EPOC
<b>ABS 450 nm</b>	0,007	2,457	2,985
<b>Concentración de exosomas</b>		$3,17 \cdot 10^{11}$	$3,83 \cdot 10^{11}$

### 5.2.2 Caracterización morfológica mediante TEM

Se empleó la microscopía electrónica de transmisión para observar la morfología de los exosomas. Estos adquirieron una forma de copa con diámetros entre los 70 y los 140 nm, como se muestra en la Figura 7.

Los hallazgos fueron compatibles con la bibliografía existente, siendo esta forma de copa un artefacto que puede ocurrir debido al proceso de secado necesario para realizar esta técnica. Si bien se ha visto que, los exosomas en solución acuosa son estructuras esféricas (31).



**Figura 7:** Exosomas aislados de nuestra muestra, observados por microscopía electrónica de transmisión.

### 5.2.3 Cuantificación de exosomas mediante NTA

A través de este método se determinó la concentración de exosomas, así como su tamaño. Los datos se recogen en la Tabla 5.

**Tabla 5:** Concentración y tamaño de los exosomas aislados en nuestra muestra

	Concentración	Tamaño (Moda)
No EPOC	4,75*10 <sup>11</sup>	112,18 nm
EPOC	6,11*10 <sup>11</sup>	119,78 nm

### 5.3 Cuantificación del ADN mediante RT-qPCR

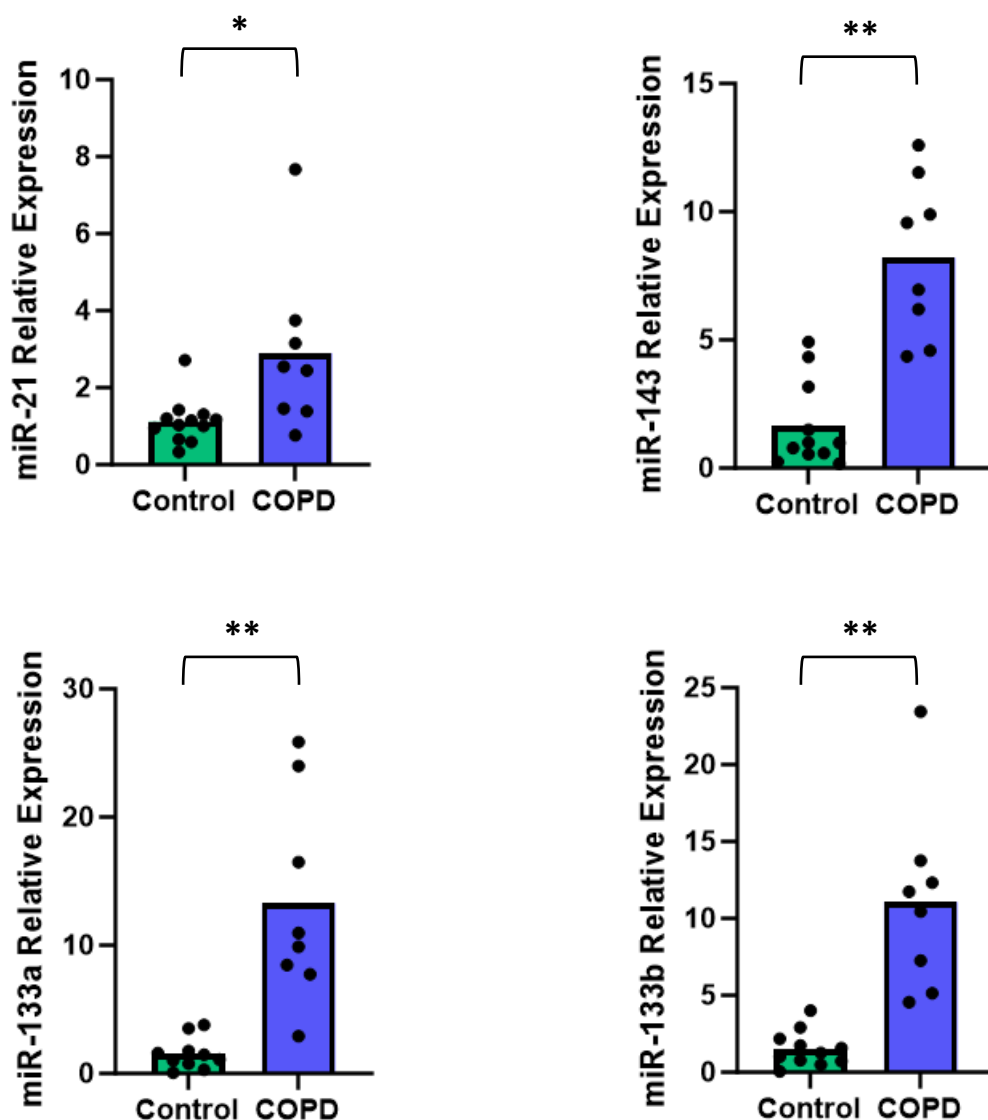
Como se ha comentado con anterioridad, se seleccionaron y analizaron un total de 9 miRNAs en base a la bibliografía existente por su aumento en sangre periférica en la EPOC o por su asociación fisiopatológica in vivo.

Se comparó los valores de  $\Delta C_t$  obtenidos para cada miRNA entre el grupo control (Fumadores no EPOC) y el grupo EPOC mediante un contraste de hipótesis a través del método Mann-Whitney.

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en 4 miRNA, estando estos sobreexpresados en el grupo EPOC: miR21, miR133a, miR133b y miR143. Se tomó como umbral de significación  $p < 0.05$ . Los datos quedan recogidos en la Tabla 6 y Figura 8.

**Tabla 6:** Comparación entre el grupo EPOC y no EPOC de los diferentes miRNAs analizados mediante U de Mann-Whitney.

	P
miR21	0.02
miR133a	0.002
miR133b	0.006
miR143	0.003



**Figura 8:** Expresión relativa de los miR21, miR133a, miR133b y miR143 en el grupo control y en el grupo EPOC. El asterisco implica la significancia estadística: \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$

En el resto de los análisis realizados no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, como se muestra en la Tabla 7 y Figura 9.

**Tabla 7:** Comparación entre el grupo EPOC y no EPOC de los diferentes miRNAs analizados mediante U de Mann-Whitney.

	p
miR130a	0.730
miR181b	0.236
miR363	0.236
miR375	0.114
miR1299	0.189

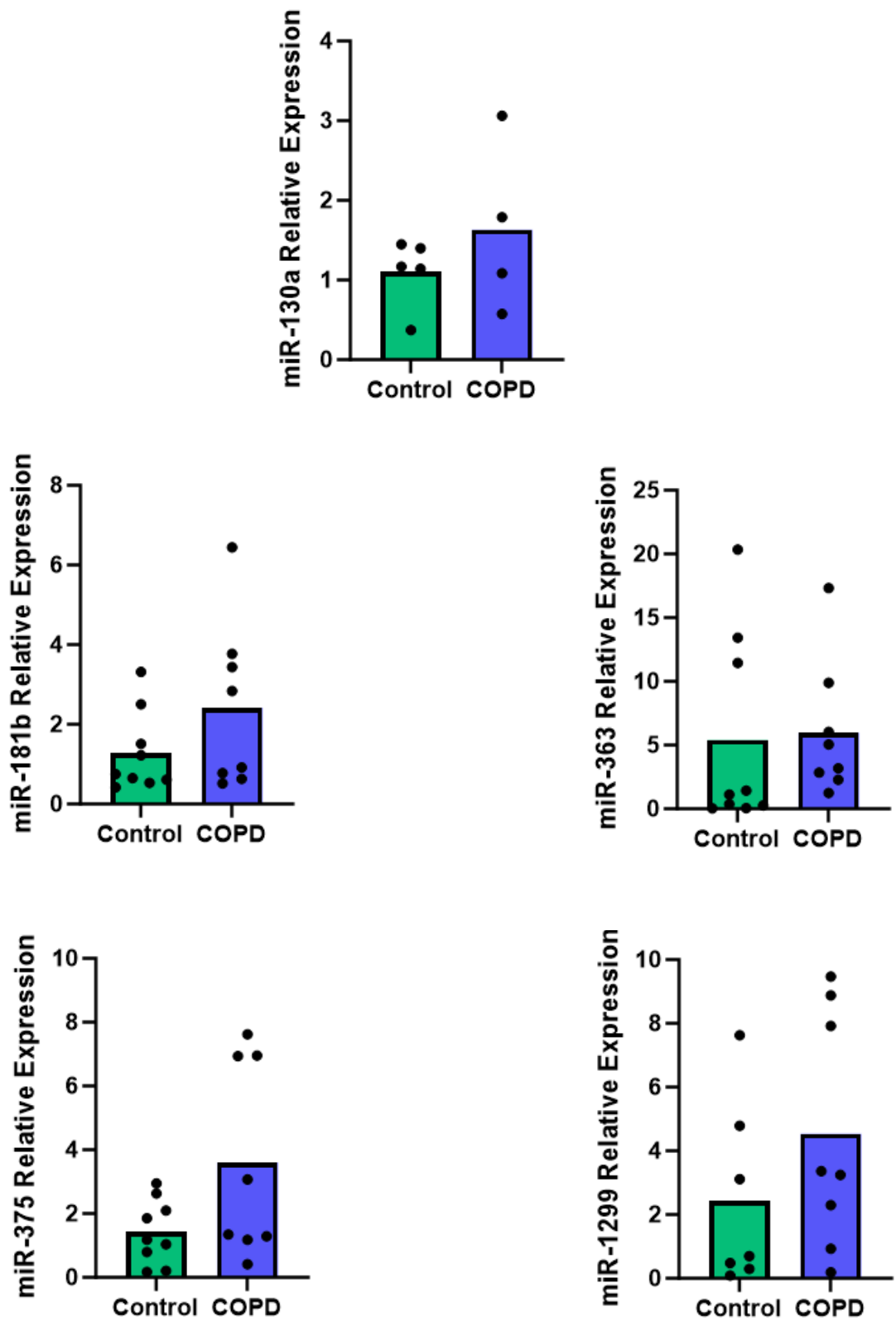


Figura 9: Expresión relativa de los miR130a, miR181b, miR363, miR375 y miR1299 en el grupo control y en el grupo EPOC.

A continuación, se expone de forma más detallada las características de los miRNAs analizados:

Se ha visto que el miR21, ampliamente estudiado, está implicado en gran variedad de enfermedades inflamatorias y diversos cánceres, sin embargo, su papel en la inmunidad es complejo debido a su expresión en múltiples células lo que justifica su gran variedad de dianas, y por su capacidad de inducir respuestas tanto pro como antiinflamatorias (26).

Este miRNA se ha visto aumentado en el suero de pacientes con EPOC y fumadores no EPOC en comparación con sujetos sanos no fumadores. Además, se asocia con un aumento en la actividad del factor nuclear proinflamatorio NF-  $\kappa$ B. Este factor se ha visto sustancialmente elevado en el esputo y en las biopsias bronquiales de pacientes EPOC (26).

Kim R. et al. (26) expusieron a una serie de ratones al humo del cigarrillo e identificaron la elevación del miR21 durante la progresión de la EPOC, además constataron esta elevación en muestras bronquiales y del tejido pulmonar en pacientes EPOC. Además, los ratones del experimento fueron tratados con antagomir específico para el miRNA en cuestión, reduciendo la expresión de este, lo que llevó a una menor inflamación de las vías respiratorias y a una mejora en la fibrosis de la pequeña vía aérea, así como de la función pulmonar, entre otros.

En un estudio previo realizado por Shengyang H. et al (32), también se observó el aumento de este miRNA en el tejido pulmonar de ratones expuestos al humo del tabaco. Además, determinaron que el nivel de miR21 en los pulmones podría ser un indicador de gravedad de la EPOC y bloquearlo podría ser un tratamiento potencial en etapas tempranas de dicha enfermedad.

En cuanto al miRNA133, en el estudio realizado por Shuang L. et al. (23) se analizó el lncRNA MALAT1 y vieron que este aceleraba la inflamación al interactuar con este miRNA, entre otros. En concreto, se vio que amplificaba la inflamación en la lesión pulmonar ocasionada por el mecanismo de isquemia-reperusión.

Donaldson et al. (33) estudiaron la relación entre el músculo esquelético en los pacientes con EPOC y diversos miRNAs. En este estudio, las citocinas plasmáticas se asociaron a la elevación en suero del miR206 y del miR133. Además, observaron un aumento significativo del miR133 en suero en pacientes con enfermedad grave/ muy grave, lo que asociaría la inflamación sistémica relacionada con este aumento del miRNA, entre otras causas, y la sarcopenia de los pacientes EPOC.

También se ha visto que, la disminución del miR-133b regula positivamente la molécula inhibidora apoptótica de Fas (FAIM), que contrarresta la pérdida de viabilidad celular inducida por el estrés oxidativo (34).

En varios estudios se ha relacionado el aumento de los niveles en plasma de miR143 y miR145 en pacientes con HTA, enfermedades de las arterias coronarias e IAM (35). Bien es sabido que los pacientes con EPOC fallecen en muchas ocasiones a causa de enfermedades cardiovasculares, superando a la población sin EPOC. Así, los resultados obtenidos en nuestro estudio en cuanto al miR143 podrían tener que ver con este hecho, si bien es cierto que al estar elevados significativamente en tejido pulmonar nos hacen pensar que puede no ser la única causa de su aumento, especialmente al haberse relacionado con rutas metabólicas específicas que pueden verse relacionadas con la etiopatogenia de la EPOC.

Además, en una revisión realizada en 2022, se observó que el miR143 parece inducir a la apoptosis celular (34).



En este mismo estudio, se vio que el silenciamiento del miR-181 reduce el estrés oxidativo al desreprimir NRF2, aumentando HO-1, SOD y PDRX. Además, la regulación negativa de miR130a y miR-181 puede suprimir la citotoxicidad de los NK (34,36). También se comprobó que, miR375 induce a la inflamación y a la apoptosis (34).

El miR1299 se ha visto implicado en la regulación de funciones como la proliferación celular, la migración, la supervivencia y la muerte celular programada (37). En un estudio se observó un aumento de este miRNA en pacientes EPOC (38).

En el estudio realizado por Wu Y. et al. (24), se constató el aumento del miR-130a tanto en células del epitelio bronquial humano como en las células bronquiales de ratones expuestos al humo del tabaco. Este aumento del miR130a parece inducir la regulación negativa de la vía de señalización Wnt1, provocando lesión, proliferación y migración celular en las células del epitelio bronquial humano, mediante la regulación en la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina.

En otro estudio realizado por Green C. E. et al. (39), se analizaron varios miRNAs, entre ellos el miR181b, en las células endoteliales pulmonares, obtenidas tras resección quirúrgica, y se comparó entre pacientes con y sin EPOC. Se observó una sobreexpresión de este miRNA, lo que parece alterar de forma significativa la formación de tubos y la formación de nuevas células endoteliales, lo que sugiere que este miRNA altera la angiogénesis. Los resultados obtenidos también mostraron un aumento de la actividad del potenciador de la cadena ligera kappa del factor nuclear de las células B activadas (NF- $\kappa$ B) en los pacientes con elevación de este marcador.

Se ha visto asociación entre la inflamación producida en la EPOC y la mediación de la misma por células T colaboradoras, especialmente de las Th17. En un estudio realizado in vitro, parece que el miR363 puede jugar un papel importante en la diferenciación de células T helper hacia Th17. Si bien parece que esta asociación es protectora, es decir, se vio una disminución de este miRNA en las células Th17. Por ello, en este estudio se especula con la posibilidad de usar este miRNA como enfoque terapéutico para prevenir la inflamación mediada por dichas células (40). Dados estos resultados, podría ser el motivo por el que en nuestro estudio no hemos visto diferencias estadísticamente significativas con respecto a este miRNA.

Nijnatten J. v. et al. (41), encontraron un aumento del miR375 en biopsias bronquiales de pacientes fumadores con y sin EPOC en comparación con pacientes ex fumadores y pacientes nunca fumadores, lo que indicaría un efecto común del tabaquismo activo y no tanto con el estado de enfermedad. Además, se vio que este miRNA estaba aumentado en las células secretoras, células que aparecen en mayor cantidad en pacientes que están expuestos al humo del tabaco. También se observó relación entre el incremento de este miRNA y un aumento en el número de mastocitos en el tejido bronquial. En el estudio, llegaron a la conclusión de que el aumento de miR375 podría indicar una mayor activación de las células inflamatorias, más que un cambio en el número o la composición de dichas células.

Los estudios de los miRNA implicados en las diferentes enfermedades son cada vez más frecuentes, esto se debe a su potencial valor para el diagnóstico de enfermedades o incluso como dianas terapéuticas, como es nuestro caso. Si bien es cierto que son estudios cuyos resultados son complejos de interpretar pues son moléculas que activan e inactivan multitud de vías de señalización, y según sea el estímulo un mismo miRNA puede comportarse de formas opuestas. Por ello, sigue siendo un campo muy amplio y con multitud de posibilidades.

De los miRNAs estudiados, solo obtuvimos diferencias estadísticamente significativas en cuatro de ellos, mientras que otros estudios sí han podido constatar estas diferencias. Esto puede ser

debido a que la gran mayoría de estudios analizan el miRNA en plasma o en tejido bronquial y no en tejido pulmonar, lo que hace que los pacientes estudiados no puedan extrapolarse por completo a la población general. Además, este estudio presenta como punto diferencial el estudio de miRNAs contenidos en exosomas.

## 5.2 Rutas metabólicas

Una vez se hallaron diferencias estadísticamente significativas en cuatro de los miRNAs estudiados, a través de una base de datos se analizó a qué dianas iban dirigidos nuestros miRNAs y con ello, a qué rutas metabólicas afectaba la elevación de estos.

La base de datos que se utilizó fue la de Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), una base bioinformática que contiene información sobre genes, proteínas, reacciones y rutas metabólicas. Así, el análisis realizado a través de la KEGG mostró que dichos miRNAs afectaban a 4 rutas metabólicas: vía de señalización MAPK, vía de señalización TGF-beta, la regulación del citoesqueleto de actina y la vía de señalización RAS.

### 5.2.1 Vía de señalización MAPK

Hace tiempo se pudo corroborar en modelos animales que el humo del cigarrillo inducía la activación de la vía MAPK, en concreto de la p38, y consecuentemente aumentaba el nivel de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, lo que conlleva una inflamación pulmonar neutrofílica. Posteriormente, estudios realizados en humanos obtuvieron resultados similares (42,43).

Se vio que esta vía estaba sobreexpresada, en comparación con sujetos no EPOC, en macrófagos alveolares y linfocitos T CD8+ obtenidos a partir de tejido pulmonar. Además, se observó que la alteración de esta vía se extendía a las células epiteliales de la pequeña vía aérea, las cuales juegan un papel importante en la patobiología de la EPOC pues liberan una gran cantidad de citocinas y quimiocinas proinflamatorias cuando se exponen al humo del tabaco (42).

En cuanto a los pacientes que presentaron una exacerbación de su EPOC, se objetivaron incrementos adicionales en la inflamación pulmonar y en la actividad de la p38 MAPK (42,43).

También se ha relacionado la sobreexpresión de esta vía con altas concentraciones de neutrófilos y de IL-8 en el esputo de pacientes EPOC, así como disminución en la FEV1 de dichos pacientes (42).

Cabe señalar que, la vía MAPK estimula la biosíntesis del miR570. Este miRNA inhibe la expresión de la proteína antienvjecimiento sirtuina1, lo que sustenta la tasa acelerada de senescencia tanto en el parénquima pulmonar como a nivel de la pequeña vía aérea que presentan los pacientes con EPOC (42).

Por todo lo expuesto, parece que la activación de la MAPK no solo está relacionada fuertemente con la inflamación pulmonar, sino también con el deterioro progresivo de la función respiratoria (42,43).

### 5.2.2. Vía de señalización TGF- $\beta$

La TGF- $\beta$ , en concreto la TGF- $\beta$ 1, es una citocina que modula la respuesta inmune para mantener una homeostasis inmune eficiente, evitando reacciones innecesarias. Esto lo hace desactivando la respuesta inflamatoria y regulando negativamente la producción de mucina (44).

Se ha visto que la alteración en la TGF- $\beta$  podría inducir el desequilibrio Th17/Treg en la sangre periférica, ocasionando un giro del fenotipo regulador a uno inflamatorio (44).

En un estudio realizado por Zhang JC. Et al. (44), se observaron niveles plasmáticos totales de TGF- $\beta$ 1 significativamente aumentados en pacientes con EPOC, así como, una tendencia a la regulación positiva en sujetos fumadores sin EPOC. Esto provocaría una alteración en la homeostasis inmune en pacientes fumadores que acaban desarrollando EPOC.

En otro estudio, realizado por Sun SW. Et al. (45), se observó que los pacientes con EPOC grave y muy grave presentaban una alteración en la función de los macrófagos, así como una activación de la vía de señalización TGF- $\beta$ /Smad, en comparación con sujetos fumadores no EPOC y sujetos sanos. Como consecuencia, esto podría suponer un desequilibrio en la homeostasis por parte de las células T reguladoras en contra de las reacciones antiinflamatorias.

### 5.2.3. Regulación del citoesqueleto de actina

Los filamentos de actina son fundamentales para la citocinesis y el movimiento celular (46).

Se ha visto que la exposición al humo del tabaco provoca cambios en el citoesqueleto de actina en humanos. Cambios en la polimerización de la actina alteran la migración celular, lo que parece desempeñar un papel importante en la patogénesis de varias enfermedades pulmonares, entre ellas la EPOC (46). Esto podría deberse a que la migración celular es un proceso complejo que participa activamente en el crecimiento celular, la motilidad, la angiogénesis y la morfogénesis (47).

La cortactina (CTTN) es una proteína citoesquelética y de unión a actina que juega un papel importante en las células endoteliales vasculares para promover la integridad de la barrera e inhibir la permeabilidad vascular y el edema tisular. Se ha visto una alteración de dicha proteína en pacientes EPOC, lo que parece estar relacionado con la disfunción endotelial presente en estos sujetos (46).

En un estudio retrospectivo realizado en 2018 que buscaba identificar proteínas y vías moleculares relacionadas con la patogenia de la EPOC, se observó una desregulación del citoesqueleto de actina en pacientes femeninas con EPOC, lo que ocasionó la alteración en la fagocitosis y en la absorción de partículas extrañas. Además, se comprobó que la regulación del citoesqueleto de actina se correlacionaba con el nivel de obstrucción, tanto del FEV1 como del FEV1/FVC en estas pacientes (48).

#### 5.2.4. Vía de señalización RAS

Las proteínas RAS son GTPasas de bajo tamaño molecular localizadas en la cara interna de la membrana plasmática, donde pueden permanecer en estado activo o inactivo. Participan en una amplia variedad de rutas de señalización celular que regulan funciones como la integridad del citoesqueleto, la proliferación, diferenciación, adhesión y migración celular y la apoptosis (49,50).

Cabe citar que, entre las rutas de transducción de señales activadas por estas proteínas, se encuentra la de las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK) (49).

En un estudio realizado por Anderson D. et al. (51), se analizaron las proteínas RAS, en concreto RAS p21, en el suero de pacientes con EPOC, pacientes sin EPOC y pacientes con cáncer de pulmón. En el estudio se vieron niveles en plasma de estas proteínas significativamente aumentados en pacientes EPOC y pacientes con cáncer pulmonar que, en la muestra de controles sanos, además se vio un aumento RAS p21 en los pacientes con cáncer con respecto a los pacientes que solo tenían EPOC.

En diferentes estudios se ha visto que el humo del tabaco es directamente mutagénico, y podrían ser estas mutaciones los principales determinantes en el desarrollo de la EPOC. Se han visto mutaciones en las proteínas RAS del epitelio pulmonar en pacientes fumadores. Estas mutaciones son permanentes, lo que explicaría que el abandono del hábito tabáquico no eliminara la inflamación de la vía aérea completamente (52).

## 6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Este trabajo expone un estudio observacional sin intervención, por lo que su objetivo principal es la generación de hipótesis a partir de las cuales desarrollar nuevos ensayos clínicos de tipo experimental.

La limitación principal del estudio es el tamaño muestral, 20 sujetos en total (8 EPOC y 12 sin EPOC). Esto se debe a la gran complejidad tanto técnica como de interpretación de los resultados, así como a un elevado coste de realización.

Además, todos los sujetos fueron diagnosticados de adenocarcinoma pulmonar, lo que podría enmascarar la elevación de ciertos miRNAs que estarían elevados tanto en pacientes con EPOC como en pacientes con adenocarcinoma pulmonar, pues se ha visto que ambas entidades comparten el incremento de ciertos miRNAs.

## 7. CONCLUSIONES

Tras realizar este trabajo se pudieron extraer las siguientes conclusiones:

- El parénquima pulmonar de los pacientes con EPOC contiene vesículas extracelulares, que son mediadores importantes de la comunicación intercelular. Las VE contienen miRNAs que se encargan de activar o inhibir procesos fisiológicos o fisiopatológicos. Se ha observado un incremento significativo en los niveles de miR21, miR133a, miR133b y miR143 en el parénquima pulmonar de pacientes con EPOC en comparación con pacientes no EPOC fumadores o exfumadores, lo que confirma la implicación de las VE en la fisiopatología de la EPOC.
- Estos miRNAs interfieren en 4 rutas metabólicas (la vía de señalización MAPK, la vía de señalización TGF-beta, la regulación del citoesqueleto de actina y la vía de señalización RAS), que pueden ser responsables de la inflamación crónica de la vía aérea presente en los pacientes con EPOC.
- Los miRNAs presentes en el tejido pulmonar pueden utilizarse como dianas terapéuticas específicas, que frenen la progresión de la enfermedad de manera temprana y eficaz.

# Anexo 1. Cuestionario CAT

## APPENDIX: CONTENT AND STRUCTURE OF THE FINAL CAT QUESTIONNAIRE

### How is your COPD?

For each item below, place a mark (✓) in the box that best describes your experience.

**Example:** I am very happy 

0	✓ 1	2	3	4	5
---	-----	---	---	---	---

 I am very sad

		SCORE						
I never cough	<table border="1" style="display: inline-table;"><tr><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td></tr></table>	0	1	2	3	4	5	I cough all the time
0	1	2	3	4	5			
I have no phlegm (mucus) in my chest at all	<table border="1" style="display: inline-table;"><tr><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td></tr></table>	0	1	2	3	4	5	My chest is completely full of phlegm (mucus)
0	1	2	3	4	5			
My chest does not feel tight at all	<table border="1" style="display: inline-table;"><tr><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td></tr></table>	0	1	2	3	4	5	My chest feels very tight
0	1	2	3	4	5			
When I walk up a hill or one flight of stairs I am not breathless	<table border="1" style="display: inline-table;"><tr><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td></tr></table>	0	1	2	3	4	5	When I walk up a hill or one flight of stairs I am very breathless
0	1	2	3	4	5			
I am not limited doing any activities at home	<table border="1" style="display: inline-table;"><tr><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td></tr></table>	0	1	2	3	4	5	I am very limited doing activities at home
0	1	2	3	4	5			
I am confident leaving my home despite my lung condition	<table border="1" style="display: inline-table;"><tr><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td></tr></table>	0	1	2	3	4	5	I am not at all confident leaving my home because of my lung condition
0	1	2	3	4	5			
I sleep soundly	<table border="1" style="display: inline-table;"><tr><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td></tr></table>	0	1	2	3	4	5	I don't sleep soundly because of my lung condition
0	1	2	3	4	5			
I have lots of energy	<table border="1" style="display: inline-table;"><tr><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td></tr></table>	0	1	2	3	4	5	I have no energy at all
0	1	2	3	4	5			

**SCORE**

--	--

Reproduced with permission from GlaxoSmithKline. GlaxoSmithKline is the copyright owner of the COPD Assessment Test (CAT). However, third parties will be allowed to use the CAT free of charge. The CAT must always be used in its entirety. Except for limited reformatting the CAT may not be modified or combined with other instruments without prior written approval. The eight questions of the CAT must appear verbatim, in order, and together as they are presented and not divided on separate pages. All trademark and copyright information must be maintained as they appear on the bottom of the CAT and on all copies. The final layout of the final authorised CAT questionnaire may differ slightly but the item wording will not change. The CAT score is calculated as the sum of the responses present. If more than two responses are missing, a score cannot be calculated; when one or two items are missing their scores can be set to the average of the non-missing item scores.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. GLOBAL INITIATIVE FOR CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE GLOBAL STRATEGY FOR THE DIAGNOSIS, MANAGEMENT, AND PREVENTION OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE (2023 REPORT) [Internet]. 2022. Available from: [www.goldcopd.org](http://www.goldcopd.org)
2. Huang X, Mu X, Deng L, Aili F, Pu E, Tang T, et al. The etiologic origins for chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* [Internet]. 2019 [cited 2023 Jul 10];14:1139–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31213794/>
3. Ritchie AI, Wedzicha JA. Definition, Causes, Pathogenesis, and Consequences of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbations. *Clin Chest Med* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2023 Jul 10];41(3):421–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32800196/>
4. Barcelona: SEPAR [Internet]. 2023 [cited 2023 Jul 30]. Manual SEPAR de Neumología y Cirugía Torácica. Available from: <https://separ.wademi.com/neumo/index.php#contenido>
5. Cazzola M, Stolz D, Rogliani P, Matera MG.  $\alpha$ 1-Antitrypsin deficiency and chronic respiratory disorders. *European Respiratory Review*. 2020;29(155).
6. Soriano JB, Polverino F, Cosio BG. What is early COPD and why is it important? *European Respiratory Journal*. 2018 Dec 1;52(6).
7. sanidad.gob.es [Internet]. 2017 [cited 2023 Jul 30]. ENSE Encuesta Nacional de Salud España 2017. Available from: [https://www.mscbs.gob.es/estadEstudios/estadisticas/encuestaNacional/encuestaNac2017/ENSE17\\_pres\\_web.pdf](https://www.mscbs.gob.es/estadEstudios/estadisticas/encuestaNacional/encuestaNac2017/ENSE17_pres_web.pdf)
8. Soriano J, Alfageme I, Miravetlles M, et al. Prevalence and Determinants of COPD in Spain: EPISCAN II. *Arch Bronconeumol*. 2021 Jun;61–9.
9. Rodríguez García C, Ruano-Ravina A, Pérez Ríos M, Martín Gisbert L, Varela-Lema L, Candal-Pedreira C, et al. Clinical characteristics of chronic obstructive pulmonary disease in never-smokers: A systematic review. *Respir Med*. 2023 Aug 1;214.
10. Sandelowsky H, Weinreich UM, Aarli BB, Sundh J, Høines K, Stratelis G, et al. COPD – do the right thing. *BMC Fam Pract*. 2021 Dec 1;22(1).
11. Celli BR, Wedzicha JA. Update on Clinical Aspects of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2019 Sep 26 [cited 2023 Jul 30];381(13):1257–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31553837/>
12. Vogelmeier CF, Román-Rodríguez M, Singh D, Han MLK, Rodríguez-Roisin R, Ferguson GT. Goals of COPD treatment: Focus on symptoms and exacerbations. *Respir Med*. 2020 May 1;166.
13. Miravetlles M, Calle M, Molina J, Almagro P, Gómez JT, Trigueros JA, et al. Actualización 2021 de la Guía Española de la EPOC (GesEPOC). Tratamiento farmacológico de la EPOC

- estable. Elsevier [Internet]. 2021 [cited 2023 Jul 31]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300289621001034>
14. Jones PW, Harding G, Berry P, Wiklund I, Chen WH, Kline Leidy N. Development and first validation of the COPD Assessment Test. *European Respiratory Journal*. 2009 Sep;34(3):648–54.
  15. MacLeod M, Papi A, Contoli M, Beghé B, Celli BR, Wedzicha JA, et al. Chronic obstructive pulmonary disease exacerbation fundamentals: Diagnosis, treatment, prevention and disease impact. *Respirology*. 2021 Jun 1;26(6):532–51.
  16. Singh D. Pharmacological treatment of stable chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology*. 2021 Jul 1;26(7):643–51.
  17. Garudadri S, Woodruff PG. Targeting chronic obstructive pulmonary disease phenotypes, endotypes, and biomarkers. *Ann Am Thorac Soc*. 2018 Dec 1;15:S234–8.
  18. publica JIC de saude, 2019 undefined. Medicina de precisão/medicina personalizada: análise crítica dos movimentos de transformação da biomedicina no início do século XXI. *SciELO Brasil* [Internet]. [cited 2023 Sep 20]; Available from: <https://www.scielo.br/j/csp/a/MDnkgxSFz89BSRM45zhNM3D/>
  19. Franssen FME, Alter P, Bar N, Benedikter BJ, Iurato S, Maier D, et al. Personalized medicine for patients with COPD: Where are we? *International Journal of COPD*. 2019;14:1465–84.
  20. Gupta D, Zickler AM, El Andaloussi S. Dosing extracellular vesicles. *Adv Drug Deliv Rev*. 2021 Nov 1;178.
  21. Abels ER, Breakefield XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol*. 36.
  22. Lai JJ, Chau ZL, Chen SY, Hill JJ, Korpany K V., Liang NW, et al. Exosome Processing and Characterization Approaches for Research and Technology Development. *Advanced Science*. 2022 May 1;9(15).
  23. Liu S, Liu M, Dong L. The clinical value of lncRNA MALAT1 and its targets miR-125b, miR-133, miR-146a, and miR-203 for predicting disease progression in chronic obstructive pulmonary disease patients. *J Clin Lab Anal* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2023 Nov 2];34(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32583510/>
  24. Wu Y, Guan S, Ge Y, Yang Y, Cao Y, Zhou J. Cigarette smoke promotes chronic obstructive pulmonary disease (COPD) through the miR-130a/Wnt1 axis. *Toxicol In Vitro* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2023 Nov 7];65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31935487/>
  25. Climent M, Viggiani G, Chen YW, Coulis G, Castaldi A. MicroRNA and ROS Crosstalk in Cardiac and Pulmonary Diseases. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2023 Sep 25];21(12):1–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32575472/>
  26. Kim RY, Sunkara KP, Bracke KR, Jarnicki AG, Donovan C, Hsu AC, et al. A microRNA-21-mediated SATB1/S100A9/NF-κB axis promotes chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis. *Sci Transl Med* [Internet]. 2021 Nov 24 [cited 2023 Oct 31];13(621). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34818056/>



27. Pols M, research JKE cell, 2009 undefined. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. Elsevier [Internet]. [cited 2023 Oct 9]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482708003935>
28. Krainer FW, Glieder A. An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015 Feb 1;99(4):1611–25.
29. Wei SC, Lin YW, Chang HT. Carbon dots as artificial peroxidases for analytical applications. *J Food Drug Anal* [Internet]. 2020 Dec 15 [cited 2023 Oct 9];28(4):558–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35696142>
30. Sharma V, Nikolajeff F, Kumar S. Employing nanoparticle tracking analysis of salivary neuronal exosomes for early detection of neurodegenerative diseases. *Transl Neurodegener* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2023 Oct 9];12(1):7. Available from: </pmc/articles/PMC9903484/>
31. Jung MK, Mun JY. Sample Preparation and Imaging of Exosomes by Transmission Electron Microscopy. *J Vis Exp* [Internet]. 2018 Jan 4 [cited 2023 Nov 14];2018(131):56482. Available from: </pmc/articles/PMC5908436/>
32. He S, Li L, Sun S, Zeng Z, Lu J, Xie L. A Novel Murine Chronic Obstructive Pulmonary Disease Model and the Pathogenic Role of MicroRNA-21. *Front Physiol* [Internet]. 2018 [cited 2023 Oct 31];9:503. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29780331>
33. Donaldson A, Natanek SA, Lewis A, Man WDC, Hopkinson NS, Polkey MI, et al. Increased skeletal muscle-specific microRNA in the blood of patients with COPD. 2012 [cited 2023 Nov 6]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/>
34. Ginckels P, Holvoet P. Focus: The Science of Stress: Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Diseases and Cancer: Role of Non-coding RNAs. *Yale J Biol Med* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2023 Nov 7];95(1):129. Available from: </pmc/articles/PMC8961704/>
35. Zhao W, Zhao SP, Zhao YH. MicroRNA-143/-145 in cardiovascular diseases. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
36. Ostrycharz E, Hukowska-Szematowicz B. Micro-Players of Great Significance—Host microRNA Signature in Viral Infections in Humans and Animals. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2023 Nov 8];23(18). Available from: </pmc/articles/PMC9504570/>
37. Kaiyuan D, Lijuan H, Xueyuan S, Yunhui Z. The role and underlying mechanism of miR-1299 in cancer. *Future Sci OA* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2023 Nov 8];7(6). Available from: </pmc/articles/PMC8147741/>
38. Zhang L, Liu X, Zheng Y, Du F, He G. MiR-548ar-3p increases cigarette smoke extract-induced chronic obstructive pulmonary disease (COPD) injury through solute carrier family 17 member 9 (SLC17A9). *Arch Biol Sci* [Internet]. 2022 Apr 1 [cited 2023 Nov 8];74(1):97–105. Available from: <https://www.serbiosoc.org.rs/arch/index.php/abs/article/view/7465>
39. Green CE, Clarke J, Bicknell R, Turner AM. Pulmonary microRNA changes alter angiogenesis in chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer. *Biomedicines* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2023 Nov 8];9(7). Available from: </pmc/articles/PMC8301412/>

40. Kästle M, Bartel S, Geillinger-Kästle K, Irmeler M, Beckers J, Ryffel B, et al. microRNA cluster 106a~363 is involved in T helper 17 cell differentiation. *Immunology* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2023 Nov 8];152(3):402–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28617945/>
41. van Nijnatten J, Brandsma CA, Steiling K, Hiemstra PS, Timens W, van den Berge M, et al. High miR203a-3p and miR-375 expression in the airways of smokers with and without COPD. *Sci Rep* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 Nov 8];12(1). Available from: </pmc/articles/PMC8980043/>
42. Pelaia C, Vatrella A, Gallelli L, Lombardo N, Sciacqua A, Savino R, et al. <p>Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Asthma and COPD: Pathogenic Aspects and Potential Targeted Therapies</p>. *Drug Des Devel Ther* [Internet]. 2021 Mar 23 [cited 2023 Nov 7];15:1275–84. Available from: <https://www.dovepress.com/role-of-p38-mitogen-activated-protein-kinase-in-asthma-and-copd-pathog-peer-reviewed-fulltext-article-DDDT>
43. Pelaia C, Vatrella A, Sciacqua A, Terracciano R, Pelaia G. Role of p38-mitogen-activated protein kinase in COPD: pathobiological implications and therapeutic perspectives. *Expert Rev Respir Med* [Internet]. 2020 May 3 [cited 2023 Nov 7];14(5):485–91. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17476348.2020.1732821>
44. Zhang JC, Chen G, Chen L, Meng ZJ, Xiong XZ, Liu HJ, et al. TGF- $\beta$ /BAMBI pathway dysfunction contributes to peripheral Th17/Treg imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Aug 23 [cited 2023 Nov 7];6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27549738/>
45. Sun SW, Chen L, Zhou M, Wu JH, Meng ZJ, Han HL, et al. BAMBI regulates macrophages inducing the differentiation of Treg through the TGF- $\beta$  pathway in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* [Internet]. 2019 Feb 6 [cited 2023 Nov 7];20(1):26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30728014/>
46. Bandela M, Belvitch P, Garcia JGN, Dudek SM. Cortactin in Lung Cell Function and Disease. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 May 1 [cited 2023 Nov 7];23(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35562995/>
47. Usatyuk P V., Fu P, Mohan V, Epshtein Y, Jacobson JR, Gomez-Cambronero J, et al. Role of c-Met/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3k)/Akt signaling in hepatocyte growth factor (HGF)-mediated lamellipodia formation, reactive oxygen species (ROS) generation, and motility of lung endothelial cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2014 [cited 2023 Nov 7];289(19):13476–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24634221/>
48. Yang M, Kohler M, Heyder T, Forsslund H, Garberg HK, Karimi R, et al. Proteomic profiling of lung immune cells reveals dysregulation of phagocytotic pathways in female-dominated molecular COPD phenotype. *Respir Res* [Internet]. 2018 Mar 8 [cited 2023 Nov 7];19(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29514663/>
49. Mukhopadhyay S, Vander Heiden MG, McCormick F. The Metabolic Landscape of RAS-Driven Cancers from biology to therapy. *Nat Cancer* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2023 Nov 7];2(3):271. Available from: </pmc/articles/PMC8045781/>

50. Chen K, Zhang Y, Qian L, Wang P. Emerging strategies to target RAS signaling in human cancer therapy. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Nov 7];14(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34301278/>
51. Anderson D, Hughes JA, Cebulska-Wasilewska A, Nizankowska E, Graca B. Ras p21 protein levels in human plasma from patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) compared with lung cancer patients and healthy controls. *Mutat Res* [Internet]. 1998 Jul 17 [cited 2023 Nov 7];403(1–2):229–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9726023/>
52. Anderson GP, Bozinovski S. Acquired somatic mutations in the molecular pathogenesis of COPD. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2003 Feb 1 [cited 2023 Nov 7];24(2):71–6. Available from: <http://www.cell.com/article/S0165614702000524/fulltext>