



**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile
Programa de Doctorado en Bioquímica**

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

**Estudio del rol pro-metastásico de Caveolina-1 en vesículas
extracelulares de líneas celulares de cáncer de mama
metastásico**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al grado de Doctora en Bioquímica por:**

América Vanessa Campos González

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Andrew FG Quest

CO-DIRECTOR DE TESIS

Dra. Lorena Lobos González

Santiago – Chile
201

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

**Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:**

AMÉRICA VANESSA CAMPOS GONZÁLEZ

**Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar
al grado de Doctor en Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendida el
día _____ de _____ de 2018.**

Director de Tesis:

Dr. Andrew Quest _____

Co-Director de Tesis:

Dra. Lorena Lobos-González _____

Comisión Informante de Tesis:

Dra. Margarita Vega B. (Presidente) _____

Dra. Katherine Marcelain _____

Dra. Jenny Fiedler _____

Dr. Enrique Castellón _____

“Sometimes you wake up. Sometimes the fall kills you. And
sometimes, when you fall, you fly”

–Neil Gaiman. Fables and Reflections.

Dedicado a mis Padres

Esta tesis de Doctorado se realizó tanto en Andes Biotechnologies SpA, Fundación Ciencia & Vida como en el Laboratorio de Comunicaciones Celulares del Centro de Estudios Avanzados de Enfermedades Crónicas (ACCDiS) y el Centro de estudios en Ejercicio, Metabolismo y Cancer (CEMC) del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile gracias a los siguientes financiamientos:

Financiamiento otorgado al Dr. Andrew Quest.

- CONICYT-FONDAP 15130011
- FONDECYT 1130250 y 1170925

Financiamiento otorgado a la Dra. Lorena Lobos-González.

- FONDECYT 11140204
- Proyecto BASAL PFB-16

Financiamiento otorgado a América Campos:

- Beca Conicyt para estudios de Doctorado Nacional n° 21130102, periodo 2013-2017.
- Beca de Gastos Operacionales para la realización de Tesis Doctoral n°21130102, periodo 2015-2016.
- Beca de Extensión de Tesis n° 21130102.
- Beca Conicyt de Pasantía doctoral 2016-2017.
- Beca Conicyt de asistencia a eventos y cursos cortos para estudiantes de doctorado.
- Convocatoria 2016.

PUBLICACIONES OBTENIDAS DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA

TESIS

Campos A, Salomon C, Bustos R, Díaz J, Martínez S, Silva V, Reyes C, Díaz-Valdivia N, Varas-Godoy M, Lobos-González L & Quest AF. (2018) Caveolin-1-containing extracellular vesicles transport adhesion proteins and promote malignancy in breast cancer cell lines. *Nanomedicine*, 13(20), 2597-2609.

TRABAJOS EN PREPARACIÓN

Gold nanoparticle targeting to early metastatic nodules by encapsulation in tumor cell-derived exosomes. Lara P, Palma S, Salas E, Polakovicova I, Guerrero S, Lobos-González L, **Campos A**, Muñoz L, Varas-Godoy M, Villegas J, Cruz L, Albericio F, Araya E, Quest AFG, Kogan M. *Biomaterials* (en revisión).

Lactadherin and VE-Cadherin incorporated into exosomes secreted post-knockdown of ASncmtRNAs decrease tumorigenic properties in MDA-MB-231 cells. Lobos-González L, Bustos R, **Campos A**, Silva V, Silva V, Jeldes E, Salomon C, Varas-Godoy M, Caceres-Verchae A, Villegas J, Ezquer F, Ezquer M, Burzio VA, Burzio LO.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

INTERNACIONALES

EMBL Course: Extracellular vesicles purification, identification and translation. 30 de Noviembre al 3 de Diciembre 2015. EMBL Advanced Training Centre. Heidelberg, Alemania.

- POSTER: Caveolin-1 expression in metastatic breast cancer cells regulates extracellular vesicle formation. **Campos A**, Bustos R, Quest AFG, Lobos-González L.

NACIONALES

XXXVIII Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. 22 al 25 de Septiembre 2015. Hotel Dreams, Los Volcanes, Puerto Varas, Chile.

- POSTER: Caveolin-1 expression in metastatic breast cancer promotes exosome formation. **Campos A**, Bustos R, Lobos-González L, Quest AFG.

CELL BIOLOGY SUMMER COURSE: The cell in times of interdisciplinary research. 18 al 22 de Enero, 2016. Institut Curie - Fundación Ciencia & Vida, Santiago, Chile.

- POSTER: Caveolin-1 in metastatic breast cancer-derived extracellular vesicles promotes invasion in breast cancer cell lines. **Campos A**, Bustos R, Quest, AFG, Lobos-González, L.

XXXIX Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular. 27 al 30 de Septiembre del 2016, Puerto Varas, Chile.

- PRESENTACIÓN ORAL: Caveolin-1 in exosomes from metastatic breast cancer cells enhances metastasis in a novel model of intraperitoneal carcinomatosis. **Campos A**, Bustos R, Díaz-Valdivia N, Carrasco M, Guevara F, Varas-Godoy M, Lobos-González L., Quest A.F.G.

XXXI Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile. 22 al 26 de Octubre 2017. Puerto Varas, Chile.

- PRESENTACIÓN ORAL: Caveolin-1-containing exosomes from metastatic breast cancer cells contain adhesion proteins and enhance migration in recipient cells. **Campos A**, Lobos-González L, Bustos R, Varas-Godoy M, Salomon C, Quest AFG. *Premio 2º Lugar: Mejor Presentación oral.

Simposio: “NANOTECHNOLOGY IN DIAGNOSIS AND TREATMENT OF CANCER”. 1 de Octubre 2018. Universidad de Chile, Santiago, Chile.

- POSTER: Extracellular vesicles from Caveolin1-expressing highly metastatic B16F10 melanoma cells enhance the migration and invasion of less metastatic cells”. Huilcamán R. **Campos A**. Varas-Godoy M., Leyton L. Quest A.F.G.

XXXII Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile. 22 al 26 de Octubre

2018. Puerto Varas, Chile.

- POSTER: Promotors of metastasis incorporated into Exosomes increases the tumor nodules in breast cancer model. Lobos-González L, Silva V, Duran E, Avila A, **Campos A**, Ezquer M.

XXXII Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile. 22 al 26 de Octubre

2018. Puerto Varas, Chile.

- PRESENTACIÓN ORAL: Caveolin-1-containing extracellular vesicles promote malignant ascites formation in vitro an in vivo model of peritoneal carcinomatosis. **Campos A**, Lobos-González L, Bustos R, Silva V, Carrasco M, Guevara F, Díaz J, Burgos R, Díaz-Valdivia N, Varas-Godoy M, Quest AFG.

PASANTÍAS EN EL EXTRANJERO:

- Octubre 2016 a Marzo 2017

Pasantía Doctoral en Laboratorio de Biología de Exosomas del Dr. Carlos Salomon, Centre for Clinical Research, University of Queensland, Brisbane, Australia. Se realizó cuarto objetivo de tesis doctoral: Proteómica de vesículas extracelulares de líneas celulares de cáncer de mama.

AGRADECIMIENTOS:

Esta tesis no hubiese sido posible sin el apoyo y ayuda de muchas personas que me han acompañado durante este largo proceso. Primero quisiera agradecer a mis Padres, Miguel Campos y América González, mis modelos y ejemplos a seguir. Gracias por todo el apoyo y amor incondicional que siempre me han brindado, los amo mucho, gracias por alentarme siempre y enseñarme el verdadero significado de la palabra Resiliencia, ustedes son y siempre serán un pilar fundamental en mi vida.

Quisiera agradecer a mis directores de tesis, a la Dra. Lorena Lobos y Dr. Andrew Quest, gracias por creer en mí, por la paciencia, comprensión, dedicación e invaluable *feedback* entregado. Ustedes son los exponentes científicos que más me han marcado y por ello, son mi modelo a seguir. Al Dr. Manuel Varas, gracias por su invaluable ayuda, voluntad y amistad. Quisiera agradecer también a la Dra. Lisette Leyton, cuyo gran “*feedback*” ha ido moldeando mi lado analítico y científico. A mi comisión de Doctorado, muchas gracias por sus críticas constructivas y guía en especial a la Dra. Margarita Vega por todo su apoyo.

Agradezco al Laboratorio de Comunicaciones Celulares y a Andes Biotechnologies, ambos laboratorios fueron/son mi segunda casa y a todos los que forman parte de él, en especial a Natalia Díaz y Pamela Contreras, estaré por siempre agradecida por haber cruzado nuestros caminos, que pese a la distancia siempre han estado ahí para escucharme y ayudarme en lo que sea. También quisiera agradecer el enorme apoyo de Jorge Díaz, Samuel Martínez, Pablo Lara, Sujey Palma, Lorena Oróstica y Renato Burgos grandes compañeros y amigos apañadores con los que he desarrollado una productiva camaradería. A mis amigas y ex compañeras de Laboratorio Verónica Silva y Rocío Bustos, testigos de mis comienzos científicos que pese a la distancia están siempre presentes. Gracias por siempre hacerme

barra. A mi tutor de pregrado, Dr. Claudio Villota, gracias por su constante apoyo y por siempre estar dispuesto a ayudarme a crecer científicamente. A mis amigos de la vida científica y no tan científica, mis confidentes Fernanda Morales, Francisca Alvarez, Juan José Haristoy, Macarena Carrasco, Cristian Doñas y Nicolás Mueña, gracias por las risas, la complicidad y el apoyo brindado. Les agradezco por recordarme constantemente que a veces puedo ser un hámster increíblemente impredecible *in a good way*. Esta tesis me permitió conocer un laboratorio al otro lado del mundo donde no sólo aprendí nuevas técnicas, sino que también conocí nuevos lugares, grandes personas y amigos. Quisiera agradecer al Dr. Carlos Salomon por recibirme en su laboratorio de Biología de exosomas en el UQCCR. Le estaré eternamente agradecida junto a su esposa Katty, ya que me hicieron sentir como si fuera una integrante más de su familia. Quisiera agradecer a Carlos Palma, Nanthini Jayabalan, Mona Ghazi Alharbi, Shayna Sharma, Andrew Lai y Vyjayanthi Kinhal por su amistad, inmenso apoyo y alegría brindada durante toda mi estadía en Australia.

Por último, a Emanuel Jeldes, mi compañero de vida, soporte y apoyo en estos últimos años, creo que sin ti mi motivación no hubiese llegado tan lejos. Te agradezco por todo el amor brindado y por siempre impulsarme a darlo todo, aunque a veces crea que no pueda lograrlo. Has sido un verdadero regalo. Te amo infinité.

ÍNDICE GENERAL

INDICE GENERAL.....	I-IV
INDICE DE FIGURAS.....	V-VI
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	VII
TABLAS SUPLEMENTARIAS.....	VIII
ABREVIATURAS.....	IX-XI
RESUMEN.....	XII-XV
ABSTRACT.....	XVI-XIX
1.- INTRODUCCIÓN	
A.- Cáncer de mama.....	1-2
B.- Caveolina-1 y su rol en cáncer.....	2-6
C.- Rol de vesículas extracelulares (EVs) en cáncer.....	6-10
RESUMEN DE LOS ANTECEDENTES.....	11
HIPÓTESIS.....	11
OBJETIVO GENERAL.....	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12

2.-METODOLOGÍA.....	13-15
A.- Cultivo de líneas celulares.....	15-16
B.- Preparación de suero fetal bovino libre de EVs.....	16
C.- Optimización del protocolo de ultracentrifugación para obtención de EVs.....	16-17
D.- Cuantificación de muestras de EVs obtenidos por ultracentrifugación* mediante ELISA.....	18
E.- Purificación de EVs mediante Exospin™.....	18
F.- Purificación de EVs mediante ultracentrifugación.....	19
G.- Análisis de tamaño de EVs mediante dispersión de luz dinámica (DLS).....	19
H.- Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA).....	19-20
I.- Microscopía electrónica de transmisión (MET).....	20
J.- Purificación y cuantificación de proteínas totales.....	20-21
K.- Electroforesis y electrotransferencia.....	21-22
L.- Preparación de muestras para el análisis de perfil proteómico utilizando Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas (LC-MS / MS).....	22-23
M.- Análisis de datos de espectrometría de masas e identificación de proteínas.....	23-24
N.- Pre-tratamiento de células T47-D, MDA-MB-231 y MDA-MB-231(shCAV1) con EVs.....	24
Ñ.- Ensayo de Migración.....	24-25
O.- Ensayo de Invasión.....	25
P.- Modelo <i>in vivo</i> de carcinomatosis intraperitoneal.....	25-26
Q.- Análisis estadísticos.....	26

3.- RESULTADOS.....	27
OBJETIVO ESPECÍFICO 1: Purificar y caracterizar vesículas extracelulares de líneas celulares de cáncer de mama metastásico.....	27
I) Caracterización morfológica de las EVs secretadas por las diferentes líneas celulares MDA-MB-231 WT, shC y shCAV1 obtenidas mediante Exospin.....	27-28
II) Detección de la presencia de CAV1 proveniente de células WT y shC junto con marcadores más comunes de EVs.....	29
OBJETIVO ESPECÍFICO 2: Estudio del efecto de EVs con CAV1 en las propiedades de invasión in vitro en líneas de cáncer de mama.....	30-33
OBJETIVO ESPECÍFICO 3: Evaluar el perfil proteómico de EVs de las sublíneas de cáncer de mama MDA-MB-231 WT, shC y shCAV1.....	34
III) Análisis de espectrometría de masas de proteínas contenidas en EVs.....	34
IV) Las proteínas identificadas en preparaciones de EVs de WT y shC se vinculan a las vías de señalización asociadas con adhesión celular.....	34-36
OBJETIVO ESPECÍFICO 4: Evaluar la capacidad metastásica en un modelo murino xenograft inoculado vía intraperitoneal con EVs que contienen CAV1.....	37
V) Células metastásicas de cáncer de mama que contienen CAV1 promueven metástasis en un modelo de carcinomatosis peritoneal.....	37

VI) EVs de células metastásicas de cáncer de mama que contienen CAV1 promueven metástasis en un modelo de carcinomatosis peritoneal.....	38-46
4.- DISCUSIÓN.....	47-61
Espectrometría de masa y ontología génica.....	53-55
Lactadherina.....	55-56
Modelo de carcinomatosis intraperitoneal.....	56-57
Fibronectina.....	57-58
Tenascina.....	58-61
5.- REFERENCIAS.....	63-69
6.- ANEXO.....	70
FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	70
I) Optimización del protocolo de ultracentrifugación para la obtención de EVs.....	70-71
II) Análisis mediante DLS.....	71-76
III) Caracterización de EVs mediante Microscopía electrónica de transmisión (MET).....	77
IV) Caracterización de EVs mediante Western blot.....	77-80
V) Cuantificación de EVs mediante exo-ELISA.....	80-81
VI) Evaluación del efecto biológico de EVs shC y EVs shCAV1 en células parentales mediante ensayo de invasión en matrigel.....	81-82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Tipos de carcinoma mamario.....	1
Figura 2.- Esquema de la estructura de Caveolina-1 (CAV1) y la formación de la caveola.....	3
Figura 3.- Modelo de biogénesis de vesículas extracelulares.....	8-9
Figura 4.- Células MDA-MB-231 liberan EVs independiente de la presencia de CAV1.....	28
Figura 5.- Caracterización por <i>Western blot</i> de la presencia de CD9, Alix y TSG101 (marcadores de EVs) y CAV1 en lisado celular y EVs	29
Figura 6.- Las EVs de las líneas celulares de cáncer de mama metastásico promueven migración e invasión en células T47-D y MDA-MB-231	31
Figura 7.- Las EVs de las líneas celulares de cáncer de mama metastásico promueven migración e invasión en células T47-D y MDA-MB-231 y MDA-MB-231(shCAV1).....	32
Figura 8.- Proteínas de EVs provenientes de MDA-MB-231 WT y shC están involucradas en vías de señalización asociadas con adhesión celular.....	36
Figura 9.- Modelo de carcinomatosis intraperitoneal realizado con la línea celular MDA-MB-231.....	38
Figura 10.- EVs que contienen CAV1 promueven la formación de tumores sólidos y tumorogenicidad líquida en modelo in vivo de carcinomatosis intraperitoneal de cáncer de mama.....	40-42

Figura 11.- EVs que contienen CAV1 promueven la formación de ascitis maligna y de tumores en el mesenterio de un modelo murino de carcinomatosis peritoneal de cáncer de mama T47-D.....	43-44
Figura 12.- EVs que contienen CAV1 promueven la formación de ascitis maligna y de tumores retroperitoneales en un modelo de carcinomatosis peritoneal de cáncer de mama.....	45-46
Figura 13: Modelo esquemático de cómo CAV1 junto a proteínas asociadas a adhesión como Cyr61, Tenascina (TNC) y S100A9 podrían estar favoreciendo migración, invasión y metástasis.....	61-62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Lista de reactivos utilizados.....	13-15
Tabla 2: Describe los protocolos de ultracentrifugación* más relevantes utilizados para purificar EVs a partir de la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231.....	17
Tabla 3: Anticuerpos utilizados en <i>Western blot</i>	22

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura 1.- Tamaño de vesículas presentes usando el protocolo 2 de cada paso de purificación de EVs provenientes de células MDA-MB-231.....	71-73
Figura 2.- Análisis de muestras obtenidas de protocolos de purificación de EVs descritos en tabla 1.....	75-76
Figura 3.- Imagen representativa de EVs de MDA-MB-231 obtenidos con el protocolo 5 mediante microscopía electrónica de transmisión.....	77
Figura 4.- <i>Western blot</i> de EVs y lisado celular de MDA-MB-231 WT, shC y shCAV1.....	79
Figura 5.- Cuantificación de EVs obtenidos por ultracentrifugación provenientes de MDA-MB-231 WT, shC y shCAV1 mediante exo-ELISA (detección de vesículas CD63+).....	80
Figura 6.- Efecto biológico de EVs obtenidos por ultracentrifugación de MDA-MB-231(shC) y MDA-MB-231(shCAV1) en MDA-MB-231 WT.....	81
Figura 7.- Inoculación vía intraperitoneal de células MDA-MB-231 con o sin EVs que contienen CAV1 no promueven formación de tumores en pulmón, hígado o riñones en modelo de carcinomatosis peritoneal de cáncer de mama.....	83-84

TABLAS SUPLEMENTARIAS

TABLA SUPLEMENTARIA 1: Análisis de ontología génica vía PANTHER de proteínas de EVs de MDA-MB-231 WT y shC.....	85-90
TABLA SUPLEMENTARIA 2: Análisis de ontología génica vía PANTHER de proteínas exclusivas de EVs de MDA-MB-231(shCAV1).....	90-92

ABREVIATURAS

CAV1	Caveolina-1
EVs	Vesículas extracelulares
CLIS	Carcinoma lobulillar in situ
CDIS	Carcinoma ductal in situ
MMPs	Metaloproteinasas
MVBs	Cuerpos o endosomas multivesiculares
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute 1640
BSA	Albúmina de suero bovino
SFB	Suero fetal bovino
PSN	Penicilina/Estreptomicina
PBS	Tampón fosfato salino
EZ-ECL	Solución de peróxido de hidrógeno, luminol y un compuesto fenólico
SDS	Dodecilsulfato sódico
NP-40	Detergente no denaturante no-iónico
BAL	Benzamidina/Antipaína/Leupeptina
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
OVA	Ortovanadato de sodio
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético
RIPA	Tampón de lisis celular y extracción de proteínas
DTT	Ditiotreitol

IAA	Ácido yodoacético
ACN	Acetonitrilo
h	Hora
min	Minuto
seg	Segundo
TFA	Ácido trifluoroacético
DAPI	Dihidrocloreto de 4', 6-diamidino-2-fenilindol
mL	Mililitro
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
mm	Milímetro
DLS	Dispersión de luz dinámica
MET	Microscopía electrónica de transmisión
mM	Milimolar
nm	Nanómetro
kDa	Kilodalton
Tween	Detergente no denaturante no-iónico
LC-MS/MS	Cromatografía líquida-Espectrometría de masas
IDA	Adquisición dependiente de la información Litro
FDR	Tasa de descubrimiento falso
PANTHER	Análisis de proteínas mediante relaciones evolutivas
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
PdI	Índice de polidispersión

WT	<i>Wild type</i>
shC	Horquilla de RNA control
shCAV1	Horquilla de RNA dirigida contra Caveolina-1
GO	Ontología génica
NaCl	Cloruro de sodio
V	Volts

RESUMEN

El cáncer de mama corresponde a una de las neoplasias malignas que más se asocia a mortalidad en el género femenino a nivel mundial. Aunque su incidencia ha disminuido gracias a la implementación de mamografías de exploración y aplicación de terapias adyuvantes, esta disminución no parece ser suficiente, ya que el desarrollo de metástasis aún sigue siendo responsable de más del 90% de las muertes asociadas a cáncer de mama, entre otros tipos de cáncer. La progresión de células tumorales hacia un estado metastásico implica la adquisición de características, tales como resistencia a apoptosis, migración e invasividad elevada etc. Teniendo en cuenta esto último, se ha descrito que muchas de estas características son potenciadas por la expresión de Caveolina-1 (CAV1), involucrando a esta proteína de la membrana en la progresión del cáncer. Específicamente en cáncer de mama avanzado se ha observado que una elevada expresión de CAV1 se asocia a una menor supervivencia del paciente. Por otro lado, estudios *in vitro* realizados en nuestro laboratorio en la línea celular de cáncer de mama metastásico humano, MDA-MB-231, han indicado que el silenciamiento de CAV1 conduce a una disminución en la migración, polarización y recambio de adhesiones focales en comparación con células MDA-MB-231 control.

La pregunta que surge ahora es de qué manera CAV1 es capaz de promover migración e invasión, favoreciendo metástasis, considerando que este proceso en sí es ineficiente debido a que menos del 0,1% de las células diseminadas están implicadas en iniciar este proceso. Una de las respuestas puede deberse a que se genera el transporte de CAV1 junto a otras moléculas a través de vesículas

extracelulares (EVs), las cuales serían capaces de llevar a esta proteína como mensaje a células contiguas dentro del mismo microambiente tumoral o a células pertenecientes a tejidos distantes idóneos para la formación de un nicho pre-metastásico. En este contexto, se tienen registros de que vesículas de células de la línea celular MDA-MB-231 que contiene niveles endógenos elevados de CAV1 son capaces de promover migración en células de cáncer de mama humano carentes de CAV1, como MCF-7 de carácter no metastásico, pero se desconoce el contenido y su rol en este proceso.

Estos antecedentes nos llevaron a plantear la hipótesis que: **CAV1 en vesículas extracelulares aumenta el potencial migratorio e invasivo *in vitro* en células de cáncer de mama y metastásis *in vivo* en un modelo de xenotrasplante de cáncer de mama.** Por consiguiente el objetivo principal de esta tesis fue evaluar la capacidad migratoria e invasora de células de cáncer de mama *in vitro* y el desarrollo de metástasis *in vivo* en un modelo de xenotrasplante mamario expuesto a EVs que contienen CAV1. Para abordar la hipótesis de trabajo se plantearon los siguientes objetivos específicos: (1) Purificar y caracterizar vesículas extracelulares de las líneas celulares humanas de cáncer de mama metastásico y no metastásico; (2) Estudiar del efecto de EVs con CAV1 en las propiedades de migración e invasión *in vitro* en líneas celulares de cáncer de mama humano; (3) Evaluar el perfil proteómico de EVs de las sublíneas de cáncer de mama MDA-MB-231 WT, shC y shCAV1 y por último (4) Evaluar la capacidad metastásica en un modelo murino de xenotrasplante inoculado por la vía intraperitoneal con EVs que contienen CAV1. Los resultados mostraron la obtención de EVs enriquecidos en vesículas del tamaño de exosomas de <200 nm de diámetro a partir de medios condicionados de las líneas

celulares de cáncer de mama metastásico humano, MDA-MB-231 WT y MDA-MB-231(shC) que expresan niveles endógenos elevados de CAV1 y en células carentes de CAV1 como MDA-MB-231(shCAV1). Esta caracterización se complementó con imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de las vesículas aisladas que mostró tamaños de vesículas de alrededor de 100 nm de diámetro en general y con el hallazgo de CAV1 en vesículas provenientes de MDA-MB-231 WT y shC y no así en vesículas de MDA-MB-231(shCAV1). Cabe añadir que se detectaron marcadores de EVs en todas las muestras mediante *Western blot*. Para evaluar el efecto biológico de vesículas que contienen o no CAV1 en células de cáncer de mama de carácter metastásico o no metastásico, se evaluaron parámetros de migración e invasión de estas células una vez expuestas a EVs. Los resultados indicaron que independiente del tipo celular utilizado como célula recipiente de EVs, aquellas células que son tratadas con EVs que contienen CAV1 aumentan su potencial migratorio e invasivo en comparación con células no tratadas o tratadas con EVs que no contienen CAV1. El análisis por espectrometría de masas reveló la presencia de proteínas específicas relacionadas con la adhesión celular, como Cyr61, tenascina (TNC) y S100A9 sólo en EVs de MDA-MB-231 WT y shC y no en EVs de MDA-MB-231 carentes de CAV1. De manera de evaluar el rol pro-metastásico de CAV1 en EVs en un modelo animal, se inyectaron estas vesículas junto con células de cáncer de mama metastásico o no metastásico por la vía intraperitoneal en un modelo murino denominado Carcinomatosis intraperitoneal. Los resultados indicaron que animales inoculados con células más EVs que contienen CAV1 presentaron un aumento en el número de células tumorales en el líquido ascítico hallado en la cavidad peritoneal junto con un aumento en la masa tumoral en bazo/páncreas y

mesenterio en comparación con aquellos animales que no fueron tratados o tratados sólo con células o tratados con células más EVs que no contienen CAV1. Cabe recalcar que nuevamente el efecto de las EVs con CAV1 se dio independiente a que se inoculara junto con células de cáncer de mama que contenían o no CAV1 en el modelo murino. Esto nos lleva a sugerir que la importancia del efecto biológico de estas vesículas en la célula recipiente no sólo recae en la presencia de CAV1, sino que en el tipo de *cargo molecular* que puedan traer consigo CAV1 en estas vesículas.

ABSTRACT

Breast cancer is the leading cause of cancer-related deaths in women. Although the incidence of this disease has decreased thanks to the implementation of screening mammograms and application of adjuvant therapies, this decrease does not seem to be enough, since the development of metastasis is still responsible for more than 90% of deaths associated with breast cancer, among other types of cancer. The progression of tumor cells towards a metastatic state implies the acquisition of characteristics, such as resistance to apoptosis, migration and high invasiveness, etc. Taking into account the latter, it has been described that many of these characteristics are enhanced by the expression of Caveolin-1 (CAV1), thereby implicating this membrane protein in the progression of cancer. Specifically in advanced breast cancer it has been observed that a high expression of CAV1 is associated with a shorter survival of the patient. On the other hand, *in vitro* studies conducted in our laboratory using the human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB-231, have indicated that the silencing of CAV1 leads to a decrease in migration, polarization and focal adhesion turnover in comparison with control MDA-MB-231 cells.

The question that arises is how CAV1 may promote migration, invasion and metastasis, considering that this process is very inefficient because less than 0.1% of the disseminated cells successfully establish a metastatic nodule. One possibility may be that CAV1 is present together with other molecules in extracellular vesicles (EVs), which serve as vectors to transport these components to adjacent cells within the same tumor microenvironment and/or to distant sites where they may condition

the pre-metastatic niche. Here, it should be noted that EVs from MDA-MB-231 cells reportedly promote migration of non-metastatic MCF-7 human breast cancer cells, but the precise content of these EVs and their role in this process were not defined.

This led us to propose the following hypothesis: **CAV1 in extracellular vesicles increases the migratory and invasive potential of breast cancer cells in vitro and in a breast cancer xenotransplant model in vivo.** Therefore, the main goal of this thesis was to evaluate the migratory and invasive capacity in vitro and metastatic breast cancer cells in vivo in a xenotransplant model exposed to EVs containing CAV1. To address the working hypothesis, the following specific objectives were proposed: (1) To purify and characterize extracellular vesicles from human metastatic and non-metastatic breast cancer cell lines; (2) To study the effect of CAV1-containing EVs on migration and invasion *in vitro* of human breast cancer cell lines; (3) To evaluate the protein content by mass spectrometry of EVs from the three breast cancer sub lines MDA-MB-231 WT, shC and shCAV1; and finally (4) To evaluate the metastatic potential *in vivo* in a murine xenotransplant model inoculated intraperitoneally with EVs containing or not CAV1.

The results showed that we were able to isolate an EV preparation enriched in vesicles of <200 nm in diameter, which is characteristic of exosomes. The EVs were purified from conditioned media of the human metastatic breast cancer cell lines, MDA-MB-231 and MDA-MB-231(shC), both expressing elevated endogenous levels of CAV1, as well as from cells lacking CAV1, such as MDA-MB-231(shCAV1) cells. This characterization was complemented by transmission electron microscopy of the isolated vesicles, which revealed that vesicles were around 100 nm in diameter. Finally, by western blotting, CAV1 was detected

together with exosome markers in vesicles from MDA-MB-231 WT and shC but not in MDA-MB-231(shCAV1) EVs.

To evaluate the biological effects of vesicles with or without CAV1 on metastatic or non-metastatic breast cancer cells, migration and invasion parameters of these cells were evaluated following exposure to EVs. Regardless of the cell type that was used as a recipient cell, those cells that were treated with EVs containing CAV1 increased their migratory and invasive potential in comparison with cells that were either not treated or treated with EVs lacking CAV1.

Analysis by mass spectrometry revealed the presence of specific proteins related to cell adhesion, such as Cyr61, tenascin (TNC) and S100A9 only in MDA-MB-231 WT and shC EVs but not in EVs from MDA-MB-231 lacking of CAV1. These results were confirmed by western blotting analysis.

In order to evaluate the role of CAV1 in EVs in a murine carcinoma model, these vesicles were injected intraperitoneally together with metastatic or non-metastatic breast cancer cells into recipient mice. For animals inoculated with cells plus EVs containing CAV1, the number of tumor cells found in the ascitic fluid generated within the peritoneal cavity was dramatically increased. Also, a substantial increase in the tumor mass in spleen/pancreas and mesentery was observed in these mice compared to those animals that were either not treated, treated only with cells or treated with cells plus EVs that did not contain CAV1. It should be noted that again these effects of CAV1-containing EVs were observed regardless of whether the recipient breast cancer cell type employed in these experiments expressed CAV1 or not. Thus, the biological effects of these vesicles in the recipient cell

appear not to be attributable to CAV1 per se, but rather to depend on differences in the molecular cargos that are incorporated into EVs in the presence of CAV1.

1.- INTRODUCCIÓN

A.- Cáncer de mama

El cáncer de mama es el segundo cáncer más común diagnosticado en el mundo, afectando a 1 de cada 8 mujeres durante su vida (Torre y cols., 2015) por lo que corresponde a una de las neoplasias malignas que más se asocia a mortalidad en el género femenino a nivel mundial (Bray y cols., 2018). En Chile, es el cáncer más frecuente, en donde se registran 40 casos por cada 100.000 mujeres (Banegas y cols., 2012). Reportes clínicos recientes de la Sociedad de Mastología, indican que 4 mujeres mueren al día por cáncer de mama en nuestro país (datos no publicados), lo que posiciona a esta neoplasia en segundo lugar entre las causas de muertes dados por cáncer en este género. El cáncer de mama puede encontrarse en una etapa previa a la invasión, en forma de carcinoma *in situ* de los conductos o lobulillos mamarios, lo que constituye un factor de riesgo para el desarrollo de un carcinoma ductal o lobulillar invasivo (Figura 1).

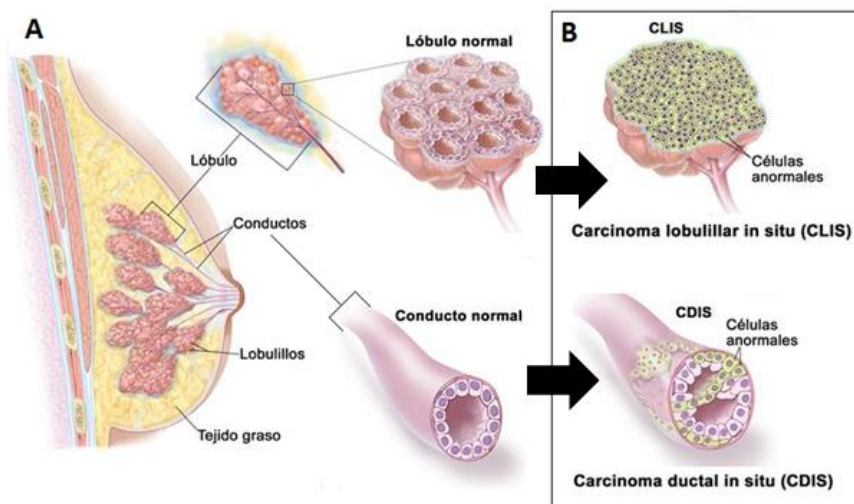


Figura 1: Tipos de carcinoma mamario. Esquema de los dos tipos de carcinoma mamario: **A)** Se muestra el tejido normal de un lóbulo (superior) y de un conducto mamario (inferior), los cuales pueden derivar en el desarrollo de cáncer, como se indica con la flecha. **B)** Se muestra la proliferación de células anormales (en verde) en un lóbulo mamario, dando lugar al desarrollo de un carcinoma lobulillar in situ o CLIS (superior). En la parte inferior, se muestra proliferación de células anormales (en verde) en el lumen del conducto mamario, llevando al desarrollo de un carcinoma ductal in situ (CDIS). Imagen modificada de ref. 1.

La progresión de células tumorales hacia un estado metastásico implica la adquisición de ciertas características distintivas, tales como el aumento de señalización mitogénica, desensitización en respuesta a señales inhibitorias de crecimiento, potencial de replicación ilimitado, resistencia a apoptosis, inducción de angiogénesis, migración e invasividad elevada junto con la adquisición de resistencia a múltiples drogas (Hanahan y Weinberg, 2011). Teniendo en cuenta esto último, se ha descrito que muchas de estas características son potenciadas por la expresión de Caveolina-1 (CAV1), involucrando a esta proteína en la progresión del cáncer (Ravid y cols., 2006; Núñez-Wehinger y cols., 2014; Chatterjee y cols., 2015).

B.- Caveolina-1 y su rol en cáncer

CAV1 es una proteína integral de membrana de 21-24 kDa que representa el componente proteico principal de una estructura de composición lipídica característica de la membrana plasmática denominada Caveola (50 – 100 nm) (Figura 2C), cuya génesis dependen también de la presencia de otras proteínas denominadas Cavininas (no mostrados). CAV1 se ha visto implicada en una amplia variedad de funciones como endocitosis, tráfico de vesículas, homeostasis de colesterol, regulación del recambio de proteínas, transporte y almacenaje de lípidos (procesos dependiente de caveolas), como también en señalización y muerte celular, que en los últimos casos puede ocurrir en forma independiente de caveolas (Boscher y cols., 2012; Quest y cols., 2008; Quest y cols., 2013). Cabe señalar, que esta proteína es capaz de interactuar y regular la actividad de varias proteínas de señalización (Quest y cols., 2008) a través de su dominio de andamiaje (Figura 2B). Sin embargo, es importante destacar que también existen interacciones de proteínas con CAV1 que son independientes del dominio de andamiaje.

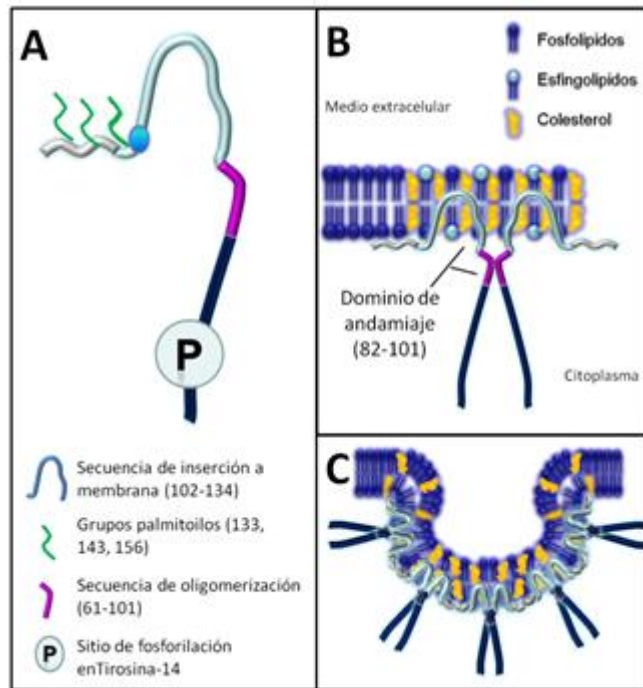


Figura 2: Esquema de la estructura de Caveolina-1 (CAV1) y la formación de la caveola

A) Distintos sitios, dominios y residuos aminoacídicos relevantes para la función de CAV1. B) Esquema del anclaje de CAV1 formando un homodímero en la membrana plasmática en sitios ricos en colesterol y esfingolípidos. C) Estructura oligomérica de CAV1 en un microdominio de membrana que genera una pequeña invaginación llamada Caveola (50-100 nm). Imagen modificada de Tesis Doctoral de Dra. Lorena Lobos.

Al momento de evaluar la expresión de CAV1 tanto en líneas tumorales, como en muestras de tumores humanos de distinto origen, los resultados han sido ambiguos. Ya que se ha observado que CAV1 muestra un comportamiento dual según el tipo/etapa del tumor del que se trate, contexto celular o disponibilidad de moléculas capaces de interactuar con CAV1 (Quest y cols., 2004; Burgermeister y cols., 2008; Williams y cols., 2006; Felicetti y cols., 2009). Un ejemplo de esto último, es el complejo que se forma entre CAV1 y E-cadherina en la membrana plasmática. En este caso, en células tumorales en donde se observa la presencia de E-cadherina, una proteína transmembrana implicada en adhesión celular, el rol de CAV1 es de carácter anti-proliferativo y pro-apoptótico, dado que CAV1 promueve la secuestración de β -catenina hacia la membrana plasmática disminuyendo de esta manera la expresión de genes como survivin y ciclooxigenasa-2. En células metastásicas de colon, melanoma y de mama en donde E-cadherina está ausente, CAV1 pierde la capacidad de impedir la expresión de estos genes y por el otro lado desarrolla un papel pro-metastásico (Torres y cols., 2006, 2007; Rodríguez y cols., 2009; Urra y cols., 2012). Esto también se corroboró *in vivo*,

mostrando que al sobre-expresar CAV1 junto con E-cadherina en estas mismas células, el efecto supresor era extremadamente potente, mostrando incluso que en algunos animales se formaran tumores de volúmenes tumorales bajo los 100 mm³ al día 26, mientras en el grupo control ya al día 14 superaba los 1000 mm³. Sorprendentemente, la sobre-expresión de CAV1 por si sola sin E-cadherina en células B16F10 de melanoma murino también resultó en una disminución en la formación de tumores subcutáneos. Sin embargo, el efecto era mucho menos pronunciado, pero indica que CAV1 tiene la capacidad de actuar como supresor de tumores en ausencia de E-cadherina por mecanismos que aún se están descubriendo, pero que probablemente involucran regulación/inhibición de la comunicación entre organelos intracelulares, como el retículo endoplasmico y las mitocondrias (Bravo y cols., 2018).

Por otra parte, al inyectar las mismas células con CAV1 (sin E-cadherina) en la vena de la cola, CAV1 promovió el desarrollo de metástasis pulmonar en comparación con células control (Lobos-González y cols., 2013). Entonces, paradójicamente, CAV1 es capaz de actuar como supresor de tumores y promotor de metástasis en las mismas células y el rol que predomina dependería principalmente de la vía de administración/inyección de las células. Importantemente, estas mismas células al co-expresar CAV1 y E-cadherina simplemente no desarrollaron tumores pulmonares distinguibles *in vivo* (Lobos-González y cols., 2013). Esto se explicaría en parte por qué el incremento en la actividad de Rac-1 debido a CAV1 se pierde en presencia de E-cadherina. Vale destacar que Rac-1 es miembro de la familia Rho GTPasas, cuya actividad es responsable de la regulación de varios comportamientos celulares, incluyendo la migración e invasión celular (Jaffe y cols., 2005; Davis y cols., 2013; Núñez-Wehinger y cols., 2014).

También se debe mencionar que el potencial metastásico de células tumorales recae en su capacidad de migración e invasión en respuesta a cambios en la matriz extracelular que rodean al tumor (Senetta y cols., 2013; Quest y cols., 2013). En lo que concierne a CAV1, esta proteína es capaz de controlar la movilidad celular al interactuar con el citoesqueleto y regular la interacción celular con la matriz extracelular (Navarro y cols., 2004). En células de cáncer de mama metastásico humano, MDA-MB-231(shCAV1) en donde se ha silenciado a CAV1 mediante un “*small hairpin*”, hay una disminución en la migración, polarización y recambio de adhesiones focales en comparación con células MDA-MB-231 control (Urta y cols., 2012). En este contexto, otra de las funciones que tiene CAV1 es regular la degradación de la matriz e interactuar con diversas moléculas (Goetz y cols., 2008), como por ejemplo, las metaloproteinasas (MMPs) que corresponden a enzimas proteolíticas implicadas en invasión celular (Senetta y cols., 2013).

Este rol dual de CAV1 también se ve reflejado a nivel de las modificaciones post-traduccionales. Uno de estos ejemplos es la fosforilación de tirosina-14 mediada por proteínas tirosina quinasas no receptoras como Src, Fyn y Abl (Li y cols., 1996; Cao y cols., 2002). La fosforilación de este sitio aumenta en respuesta a varios estímulos, como insulina (Mastick y cols., 1995; Mastick y cols., 1997; Kimura y cols., 2002), radiación ultravioleta (Volonte y cols., 2001), peróxido de hidrógeno (Cao y cols., 2004), hiperosmolaridad (Volonte y cols., 2001) y estrés mecánico (Rizzo y cols., 2003). Aquí, la fosforilación de tirosina-14 ha sido asociada a la translocación de esta proteína y su agrupamiento con integrinas en adhesiones focales (Salanueva y cols., 2007; del Pozo y cols., 2005; Ortiz y cols., 2016) lo que sugieren nuevamente su rol en adhesión celular, migración e invasión (Felicetti y cols., 2009).

La pregunta que surge ahora es de qué manera CAV1 es capaz de promover migración e invasión, favoreciendo metástasis, considerando que este proceso en sí es ineficiente debido a que menos del 0,1% de las células diseminadas logran iniciar este proceso (Weiss., 1990; Sugarbaker., 1993; Chambers y cols., 2002). Se tiene evidencia que CAV1 está enriquecido en el compartimiento endolisosómico de células de melanoma humano, donde se sugiere que participa en la regulación de algunas funciones de células tumorales mediado por vesículas, como por ejemplo el canibalismo celular que generalmente se refiere a la capacidad de una célula de engullir a otra célula más pequeña (Lugini y cols., 2006). Sin embargo, otros han proporcionado evidencia que indica que CAV1 también puede hacerlo como un componente de las vesículas extracelulares (EVs) (He y cols., 2015; Lazar y cols., 2015; Llorente y cols., 2004; Logozzi y cols., 2009), donde incluso puede tener un papel como un posible biomarcador para la progresión del cáncer (Logozzi y cols., 2009; Cappello y cols., 2017; Zhao y cols., 2018). En este contexto, postulamos que CAV1 puede lograr este papel por la entrega a las células adyacentes dentro del mismo microambiente tumoral o a sitios distantes para favorecer la formación de un nicho premetastásico (Azmi y cols., 2013; Felicetti y cols., 2009; Kahlert y cols., 2013; Senetta y cols., 2013).

C.- Rol de vesículas extracelulares (EVs) en cáncer

Las EVs son vesículas compuestas por una bicapa fosfolipídica heterogénea, las cuales son secretadas activamente por una variedad de células de mamíferos, especialmente en células en división (Shao y cols., 2018). Su estudio las ha llevado a ser reconocidas como promotores genuinos de la progresión del cáncer dado que funcionan como mediadores de la comunicación mediante el intercambio de componentes entre células, que varían desde ácidos nucleicos a lípidos y proteínas, entre la célula de origen y las

células adyacentes, así como también como tejidos distantes (van Niel y cols., 2018; Zijlstra y cols., 2018). Con base en el conocimiento actual de su biogénesis, las vesículas extracelulares se pueden dividir ampliamente en dos categorías principales: exosomas y microvesículas (van Niel y cols., 2018).

Los exosomas son pequeñas vesículas de membrana (30 a 150 nm) que se originan a partir del endosoma (Figura 3). Se almacenan como vesículas intraluminales dentro de cuerpos multivesiculares (MVBs) del endosoma tardío y son liberados cuando estos cuerpos multivesiculares se fusionan con la membrana celular (Camussi G y cols., 2010). Los exosomas son capaces de transportar proteínas citosólicas y de membrana, como también moléculas de mRNA y RNAs no codificantes, siendo liberadas mediante exocitosis por varios tipos celulares (van Niel y cols., 2018; Yang C y cols., 2011). Su liberación parece estar regulada bajo condiciones fisiológicas y patológicas. En cáncer, en particular existe un aumento sustancial de la liberación de exosomas (Taylor y cols., 2011; Logozzi y cols., 2009). Es por ello que se ha propuesto que cumplen un papel pro-tumorigénico, facilitando la progresión tumoral y el desarrollo de metástasis al modificar el microambiente del hospedero (Senetta R y cols., 2013).

En los últimos años, se ha investigado ampliamente la liberación de exosomas a partir de células neoplásicas en fluidos corporales, como sangre y orina (Welton y cols., 2016). En el carcinoma mamario, se ha descrito que los exosomas que se originan a partir de las células tumorales son capaces de convertir células madre mesenquimáticas de tejido adiposo en miofibroblastos, los cuales constituyen una fuente rica en proteínas remodeladoras de la matriz dentro del microambiente del tumor, además de participar en la formación de nuevos vasos sanguíneos en este lugar (Kahlert C y cols., 2013). Por otro lado, se sabe que la liberación de exosomas a partir de las células tumorales

metastásicas 4T1 de cáncer de mama es dependiente de Rab27a, una GTPasa pequeña capaz de regular exocitosis de endosomas multivesiculares (Bobrie A y cols., 2012). Se ha visto que el bloqueo de la secreción de exosomas mediante la inhibición de esta proteína conduce a una disminución en el crecimiento del tumor primario, como también una disminución en la metástasis al pulmón (Kahlert C y cols., 2013). Por otro lado, se tienen registros de que exosomas de la línea celular de cáncer de mama humano metastásico MDA-MB-231 son capaces de promover migración en células de cáncer de mama humano no metastásico, como MCF-7 (Harris y cols., 2015). Con estos ejemplos se evidencia que este tipo de vesículas condiciona el microambiente tumoral y sitios distantes a éste, potenciando de esta manera el desarrollo de metástasis.

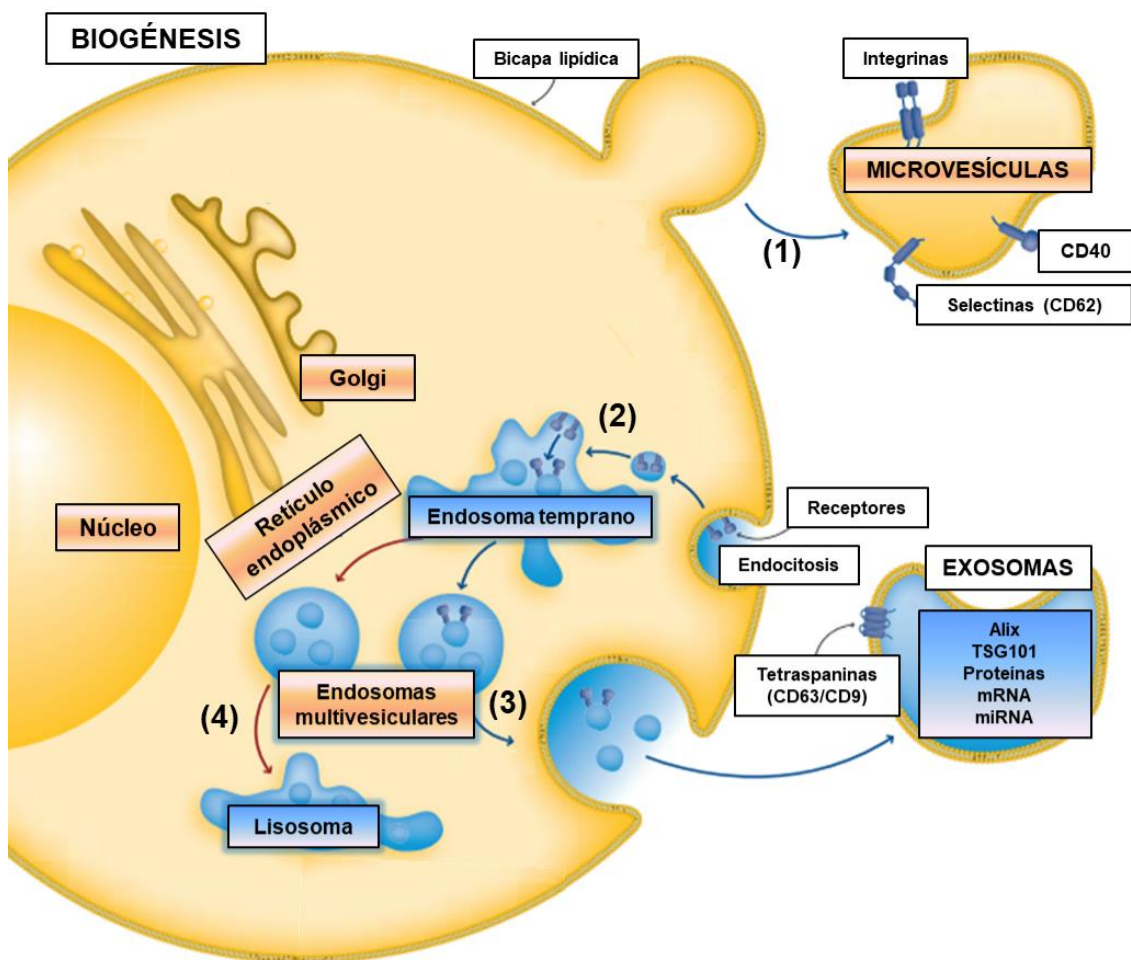


Figura 3: Modelo de biogénesis de vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares se pueden dividir ampliamente en dos categorías principales: exosomas y microvesículas. (1) Las microvesículas son generadas por yemación a partir de la membrana plasmática y son ricas en selectinas e integrinas. *Continúa en la siguiente página*

(2) Los exosomas que se caracterizan por contener una variedad de moléculas como tetraspaninas, mRNA y miRNA, corresponden a vesículas intraluminales formadas por la invaginación de la membrana endosomal durante la maduración de los endosomas multivesiculares. (3) Los exosomas son secretados cuando estos endosomas multivesiculares se fusionan con la superficie celular o (4) son enviadas a lisosomas para su degradación (van Niel y cols., 2018 y ref. 2)

En lo que concierne el estudio del transporte de CAV1, esto ha sido corroborado desde un principio por registros de su secreción en páncreas, glándulas salivales (Liu y cols., 2002), osteoblastos (Sawada y cols., 2007) y en cáncer (Tahir y cols., 2001). Lo que es más, la secreción de esta proteína se ha visto asociada a microvesículas liberadas por células de cáncer de próstata o prostasomas, los cuales son capaces de potenciar tumorigenicidad *in vitro* e *in vivo* (Tahir y cols., 2001; Llorente y cols., 2004; Ayala y cols., 2006; Bartz y cols., 2008). Aquí cabe recalcar que CAV1 se ve presente en prostasomas derivados de pacientes con cáncer de próstata, no así en pacientes sanos (Tahir y cols., 2006). Esto último también se ha visto en un modelo murino con elevados niveles de exosomas que contienen CAV1 en comparación con ratones sanos, lo que también fue observado en pacientes humanos con melanoma en comparación con pacientes sanos (Logozzi y cols., 2009; Lazar y cols., 2015). Como consecuencia, la detección de CAV1 en estas vesículas puede representar una característica distintiva de cáncer de naturaleza agresiva que identifica a pacientes con mal pronóstico (Senetta y cols., 2013).

Dentro de estos antecedentes, cabe recalcar que el grupo de He y cols identificó a CAV1 como una de las moléculas pro-tumorigénicas presente en exosomas de líneas de cáncer hepático metastásico capaces de potenciar migración e invasión en células inmortalizadas de hígado (He y cols., 2015).

En este proyecto se enfocó en estudiar el rol de CAV1 en EVs y cómo esta proteína es capaz de favorecer migración e invasión celular en cáncer de mama. En este estudio, se postuló que el rol pro-metastásico de CAV1 podría estar desencadenado tanto por su propio rol promotor de metástasis que podría conducir a la activación de Rac-1 y con ello a un aumento de la capacidad invasiva de las células tumorales (Urrea y cols., 2012; Lobos-González y cols., 2013), como también este rol podría ser potenciado por la interacción de CAV1 en las EVs con otras moléculas.

RESUMEN DE LOS ANTECEDENTES:

1. El cáncer de mama es una de las neoplasias malignas que más se asocia a mortalidad en el género femenino en Chile y la metastásis es la causa de más de un 80% de las muertes asociado a cáncer.

2. Caveolina-1 (CAV1) promueve migración e invasión en modelo *in vitro* de cáncer de mama metastásico humano MDA-MB-231.

3. Pacientes con cáncer avanzado presentan elevados niveles de vesículas extracelulares con CAV1 en comparación con individuos sanos.

4. Exosomas de células metastásicas MDA-MB-231 son capaces de promover migración en células de cáncer de mama humano MCF-7 de carácter no metastásico.

Esto nos lleva a preguntar, ¿Encontraremos CAV1 en EVs de líneas de cáncer de mama metastásico? ¿CAV1 en EVs tendrá un rol pro-metastásico en cáncer de mama? En base a estos antecedentes, se propone la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

CAV1 en vesículas extracelulares aumenta el potencial migratorio e invasivo *in vitro* en células de cáncer de mama e *in vivo* en un modelo de xenotrasplante de cáncer de mama.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad migratoria e invasora de células de cáncer de mama *in vitro* y metastásica *in vivo* en un modelo de xenotrasplante mamario expuesto a EVs que contienen CAV1.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Purificar y caracterizar vesículas extracelulares de las líneas celulares humanas de cáncer de mama metastásico y no metastásico.

1.1 Purificación de EVs.

1.2 Caracterización de EVs (Western blot, microscopía electrónica de transmisión).

1.3 Cuantificación de EVs (BCA, Exo-ELISA, análisis de seguimiento de partículas).

2.- Estudiar el efecto de EVs con CAV1 en las propiedades de migración e invasión *in vitro* en líneas celulares de cáncer de mama humano.

2.1 Evaluar potencial migratorio e invasivo.

3. Determinar el perfil proteómico de EVs de las sublíneas de cáncer de mama MDA-MB-231 WT, shC y shCAV1.

3.1 Identificación de contenido proteico de EVs mediante espectrometría de masas.

4. Evaluar la capacidad metastásica en un modelo murino de xenotrasplante inoculado por la vía intraperitoneal con EVs que contienen CAV1.

4.1 Evaluar el crecimiento de tumores y metástasis en ratones BALB/c NOD/SCID inoculados con la línea celular MDA-MB-231 y T47-D junto con EVs derivados de MDA-MB-231 y de sus sublíneas.

2. METODOLOGÍA

Tabla 1: Lista de reactivos utilizados

NOMBRE	ABREV.	DESCRIPCIÓN	FABRICANTE	Nº CÁT.
Puromicina	-	Antibiótico de selección	Sigma	P8833
Medio Roswell Park Memorial Institute 1640	RPMI	Medio de cultivo	Gibco Life Technologies	23400-021
Suero fetal bovino	SFB	Suplemento para medio de cultivo	Biological Industries	040011 ^a
Penicilina/ Estreptomina	PSN	Mezcla de antibióticos	Gibco Life Technologies	15640-055
Tampón fosfato salino	PBS 1X	Tampón fosfato salino	Gibco Life Technologies	70013
Tripsina-EDTA	-	Tripsina recombinante	Gibco Life Technologies	25200072
Ácido bicinonínico	BCA	Reactivo cromogénico	ThermoFisher Scientific	23223 y 23224
EZ-ECL	-	Solución de peróxido de hidrógeno, luminol y un compuesto fenólico	Biological Industries	20-500-1000
Tampón A	-	Componente de kit Exospin TM	Cell Guidance Systems	EX01-25
Sacarosa	-	Disacárido no reductor compuesto de glucosa y fructosa	Invitrogen	15503-022
Tris	-	Tris base	Sigma	T3253
Paraformaldehído	-	Polioximetileno	Sigma	P6148
Glutaraldehído		Solución de dialdehído glutárico	Sigma	G5882
Acetato de uranilo	-	Solución de tinción negativa	SPI supplies	6159-44-0
Dodecilsulfato sódico	SDS	Detergente denaturante aniónico	US Biological	151-21-3
Igepal ® CA-630	NP-40	Detergente no denaturante no-iónico	Sigma	I3021
Benzamidina/ Antipaína/Leupeptina	BAL	Mezcla de inhibidores de proteasas	Sigma, Calbiochem y US biological	B6506, 178220 y L-2050
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo	PMSF	Inhibidor de proteasas de serina	Sigma	P7626

Ortovanadato de sodio	OVA	Inhibidor de fosfatasa	Sigma	S6508
TWEEN® 20	Tween	Detergente no denaturante no-iónico	Sigma	P1379
Tampón RIPA	RIPA	Tampón de lisis celular y extracción de proteínas	Thermo Scientific	89900-89901
Bolt™ 10% Bis-Tris Plus	-	Gel de poliacrilamida prefabricado	Thermo Scientific	NW00100 BOX
Simply Blue Safe Stain	-	Tinción de Coomassie G-250	Invitrogen	LC6060
Bicarbonato de amonio	NH ₄ HCO ₃	Solución de bicarbonato alcalino	Sigma	1066-33-7
Ditiotreitol	DTT	Agente reductor	Invitrogen	15-508-013
Ácido yodoacético	IAA	Agente alquilante	Sigma	IG125-10G
Trypsin Gold	-	Tripsina para espectrometría de masa	Promega	V528A
Ácido fórmico	-	Ácido carboxílico moderado	Sigma	64-18-6
Acetonitrilo	ACN	Disolvente aprótico polar	Sigma	270717
Ácido trifluoroacético	TFA	Ácido carboxílico fuerte	Sigma	76-05-1
Fibronectina humana	FN	Glicoproteína de matriz extracelular	Gibco	33016-015
Cristal violeta	-	Colorante de triarilmetano	Sigma	C-6158
Metanol	-	Alcohol metílico	Merck	106009
Tritón X-100	-	Detergente no denaturante no-iónico	Merck	108.603
Dihidrocloruro de 4', 6-diamidino-2-fenilindol	DAPI	Contratinción nuclear y cromosómica	Sigma	D9542
Mowiol	-	Mucoadhesivo hidrocoloide	Calbiochem	475904

		soluble en agua a base de poli alcohol vínlico		
Suero fisiológico al 0.9%	NaCl 0.9%	Solución estéril de cloruro de sodio	Ortopedias más vida	SKU 487

A.- Cultivo de líneas celulares

La línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26) denominado WT (*Wild type*) o parental corresponde a un adenocarcinoma metastásico derivado del líquido pleural. A partir de esta última se utilizaron sus sublíneas celulares MDA-MB-231(shCAV1) que incorporó de manera estable el plasmidio pLKO.1 (selección con puromicina 2 µg/mL) que codifica un “*short hairpin*” dirigido contra CAV1 (Urrea y cols., 2012) y la sublínea celular MDA-MB-231(shC) que incorpora un “*short hairpin*” no relacionado. Estas líneas celulares se cultivaron en botellas T225cm² (Nunc) en medio RPMI suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) y mezcla de antibióticos (estreptomomicina 10 µg/mL y penicilina 10000 U/mL) (Tabla 1). La línea celular de cáncer de mama humano T47-D (ATCC ® HTB-133) corresponde a un carcinoma ductal derivado del líquido pleural, y fue cultivada en botellas T75cm² (Nunc) en medio RPMI suplementado con 10% de SFB y mezcla de antibióticos. Cuando ambas líneas celulares alcanzaron una confluencia de un 70-80%, se realizó el subcultivo, en donde se descartó el medio y luego se lavó con PBS estéril. Luego las células fueron incubadas con Tripsina/EDTA por 5 min a 37°C, donde la cantidad de tripsina a agregar dependió de la botella que se utilizó, en caso de T225 se agregó 3 mL y en T75 se agregó 1mL. Una vez que éstas células se soltaron completamente de la superficie de las botellas, fueron recolectadas mediante pipeteo, agregando 5 mL de medio de cultivo. Luego se centrifugó a 300 x g por 5 min y el sedimento obtenido se resuspendió en medio de cultivo fresco y se agregó 0.5 mL de esta suspensión a una

botella T225 o T75 dependiendo el caso, la cual contenía 39.5 mL o 9.5 mL de medio de cultivo respectivamente. Las líneas celulares se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ en incubadora (HERA cell 150).

B.- Preparación de suero fetal bovino libre de vesículas extracelulares (EVs) (SFB EV-Free)

El SFB se distribuyó en 6 tubos (Thinwall Ultra-Clear, Beckman Coulter) con 23 mL en cada uno. Luego se centrifugó a 100.000 x *g* durante 18 h a 4°C usando un rotor SW28 en una ultracentrífuga Beckman Coulter XPN-90 (Théry y cols, 2006). Una vez finalizado este proceso, se recolectó el sobrenadante de cada tubo y se filtró en filtros de jeringa de 0.2 µm (GE Healthcare). Después de este paso, el SFB fue almacenado a -20°C hasta su posterior uso en la preparación de medios de cultivo.

C.- Optimización del protocolo de ultracentrifugación para obtención de EVs

Cabe mencionar que debido a la discrepancia hallada en la literatura en cuanto al rendimiento obtenido usando los protocolos de purificación de EVs mediante ultracentrifugación a partir de sobrenadante de líneas celulares tumorales (Melo y cols., 2014; Lazar y cols., 2015; He y cols., 2015; Greening y cols., 2015; Théry y cols., 2006), se decidió al inicio de este proyecto optimizar dicho protocolo utilizando primero a nuestro modelo de estudio, la línea celular de cáncer de mama metastásico humano MDA-MB-231, luego se aplicó el protocolo ya optimizado en las sublíneas celulares MDA-MB-231(shC) y MDA-MB-231(shCAV1) y posteriormente en la línea celular de cáncer de mama no metastásico humano, T47-D.

Entre los 5 protocolos evaluados (ver tabla 2), la mayor diferencia está en el uso del filtro de 0,2 µm al inicio del protocolo (Protocolo 1) o previo al uso de la

ultracentrífuga (Protocolo 4), como también el uso de un filtro de 0,45 μm previo al uso de la ultracentrífuga (Protocolo 5) o la ausencia de un filtro (Protocolo 2 y 3) pero con el uso de un colchón de sacarosa (25%) en el protocolo 3.

Tabla 2: Describe los protocolos de ultracentrifugación* más relevantes utilizados para purificar EVs a partir de la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231

Sobrenadante de línea celular de cáncer de mama metastásico MDA-MB-231					
	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4	Protocolo 5
Volumen de sobrenadante inicial	600 mL	120 mL	120 mL	420 mL y 120 mL	120 mL
Uso de filtro	Sí, filtro de 0,2 μm	NO	NO	NO	NO
Centrifugación a 2000 x g	NO	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
Centrifugación a 12.000 x g	Sí, 30 min	Sí, 45 min	Sí, 45 min	Sí, 45 min	Sí, 45 min
Uso de filtro	NO	NO	NO	Sí, filtro de 0,2 μm	Sí, filtro de 0,45 μm
Colchón de sacarosa 25%	NO	NO	SÍ	NO	NO
Ultracentrifugación	Sí, 70 min 103.000 x g	Sí, 120 min 103.000 x g	Sí, 120 min 103.000 x g	Sí, 90 min 110.000 x g	Sí, 90 min 110.000 x g
Lavado con PBS 1X	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
Ultracentrifugación	Sí, 70 min 103.000 x g	Sí, 120 min 103.000 x g	Sí, 120 min 103.000 x g	Sí, 90 min 110.000 x g	Sí, 90 min 110.000 x g
DLS	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
MET	SÍ	NSR	NSR	SÍ	SÍ
ELISA	SÍ	NSR	NSR	SÍ	NSR
<i>Western blot</i>	SÍ	NSR	NSR	Sí, pero con un volumen inicial de 420 mL de sobrenadante	NSR

- NSR: No se realizó
- MET: Microscopía electrónica de transmisión
- DLS: *Dynamic Light Scattering* (Dispersión de luz dinámica)

D.- Cuantificación de muestras de EVs obtenidos por ultracentrifugación* mediante ELISA

Las muestras de EVs obtenidas por ultracentrifugación fueron cuantificadas utilizando el kit ExoELISA de *System Biosciences*. Para esto, se evaluaron volúmenes equivalentes de muestras de EVs en los pocillos de la placa de microtitulación: ExoELISA CD63 (EXOEL-CD63A-1), los ensayos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

E.- Purificación de EVs mediante Exospin™

El sobrenadante recolectado, se centrifugó a 2.000 x g por 10 min a temperatura ambiental para eliminar restos celulares. Este sobrenadante se centrifugó nuevamente a 3.000 x g por 5 a 15 min a 4°C utilizando la Unidad de Filtro Amicon Ultra-15 (Merck Millipore). Del sobrenadante concentrado que se obtuvo, se aislaron EVs utilizando el Kit Exospin™ (Cell Guidance Systems) de acuerdo a las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Para ello, este concentrado se incubó con Tampón A durante toda la noche a 4°C y en rotación. Luego se centrifugó a 16.000 x g durante 1 h a 4°C, donde se descartó la fracción soluble y el sedimento se resuspendió en 100 µL de PBS y se mantuvo en hielo. Paralelamente, se removió el tapón de la columna y se centrifugó a 100 x g durante 1 min a 4°C para eliminar el tampón presente en la parte superior de la columna. Luego se añadió 200 µL de PBS y se centrifugó a 100 x g durante 1 min a 4°C para equilibrar la columna. Se agregó la muestra obtenida anteriormente en la parte superior de la columna y se centrifugó a 100 x g durante 1 min a 4°C y se descartó el eluido. Se colocó la columna en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se añadió 200 µL de PBS en la parte superior de la columna y se centrifugó a 100 x g

durante 1 min a 4°C. Lo eluido contiene EVs, los cuales fueron almacenados a -80°C hasta su posterior uso.

F.- Purificación de EVs mediante ultracentrifugación

El sobrenadante se centrifugó a 2000 x g durante 10 min usando la centrífuga 3S + Thermo Scientific Multifuge refrigerada para eliminar vesículas más grandes así como restos celulares. Luego, el sobrenadante se centrifugó adicionalmente a 12000 x g durante 10 min utilizando el rotor Hitachi R15A y la centrífuga de alta velocidad VX22G. Después de la centrifugación, el sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 100.000 x g durante 2 h usando un rotor de ángulo fijo 70Ti Beckman en la ultracentrífuga Sorvall a 4°C (Beckman Coulter, Brea, CA, EE. UU.) (Thermo Fisher Scientific). El sobrenadante se descartó y el sedimento de aproximadamente 500 µL se almacenó a -80°C (Protocolo modificado de Salomon y cols., 2013).

G.- Análisis de tamaño de EVs mediante dispersión de luz dinámica (DLS)

El análisis del tamaño de las partículas se llevó a cabo 3 veces con el instrumento de difracción de láser (Malvern Zetasizer Nano ZS90; Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK). Una alícuota de 10 µL de una muestra de EVs se diluyó en hasta 500 µL de PBS filtrado y luego fue transferido a cubeta de plástico para su lectura. El tamaño de las partículas se midió cada 30 seg de lo que duró el análisis. Los resultados fueron grabados automáticamente.

H.- Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA)

Las muestras de EVs se diluyeron en una razón 1:200 en PBS estéril para obtener entre 10 y 100 partículas por campo. El equipo NanoSight NS300 (NanoSight NTA 2.3

Análisis de seguimiento de nanopartículas, versión 0033, NanoSight Ltd) se usó para medir la concentración y el tamaño de partículas en un sistema de dispersión de luz mediante el propio movimiento browniano de las partículas (Zeringer y cols, 2013). Se estableció que la cámara captura 3 videos con una duración de 30 seg por muestra. Luego, los videos fueron analizados y se determinó el promedio y moda de las partículas contenidas en la muestra, como también se realizó una aproximación a la cantidad total de partículas.

I.- Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Los EVs se resuspendieron en paraformaldehído al 2% en PBS frío y se montó sobre una grilla de cobre *300-mesh* recubierta de formvar (Fermelo). Luego se fijó la muestra con glutaraldehído al 1% en PBS frío y se dejó incubar durante 5 min para así estabilizar la inmunoreacción. Posteriormente se lavó la muestra con agua destilada estéril y se agregó una solución de acetato de uranilo al 4% a pH 7.0 y se esperó durante 5 min. Finalmente las imágenes fueron adquiridas en un microscopio electrónico de transmisión Philips Tecnai 12 BioTwin perteneciente a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

J.- Purificación y cuantificación de proteínas totales

Para la extracción de proteínas, se tripsinizaron los cultivos celulares y se recolectó entre 5×10^5 a 1×10^6 células. La suspensión obtenida se sometió a centrifugación a $13.000 \times g$ durante 2 min a 4°C . Luego, dependiendo de la cantidad de sedimento obtenido, se colocó (30 ó 50 μL) el buffer de sonicado 100X (SDS 10% y NP-40) más el *mix* de inhibidores de proteasas compuesto por BAL 1000X; PMSF 500X y OVA 50 mM (Tabla 1) disueltos en PBS. Cada muestra en hielo fue sonicada 2 veces durante

15 seg. Subsecuentemente, se preparó una dilución 1:10 del extracto para la cuantificación de las muestras de proteínas haciendo uso del kit BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, USA) en una placa de 96 pocillos en un espectrofotómetro UltraQuant. En cuanto a la muestra de EVs, 50 µL de tampón de sonicado fue añadido a 50 µL de muestra. Se homogenizó, procurando dejar el sedimento completamente disgregado. La muestra de EVs mantenida en hielo fue sonicada 3 veces durante 5 seg cada vez.

La cuantificación proteica se realizó con el método del ácido bicinconínico o BCA (catálogo No. 23223 y 23224 ThermoFisher Scientific, Grupo Bios) utilizando seroalbúmina bovina (BSA) (200 mg/mL) como proteína patrón para la curva de calibración medida a 562 nm de absorbancia en el equipo UltraQuant. El extracto proteico se conservó a -80°C hasta su posterior uso.

K.- Electroforesis y electrotransferencia

Los extractos proteicos se cargaron en un gel de poliacrilamida/SDS al 12.5% y se resolvieron realizando la electroforesis a un voltaje constante de 100 V durante alrededor de 150 min. Luego, se realizó la electrotransferencia hacia la membrana de nitrocelulosa a 100 V por 75 min en presencia de hielo. Al finalizar la transferencia, se desmontó el sistema. Las membranas se bloquearon en leche descremada 5% PBS-Tween 0,1%. Luego se incubaron con el primer anticuerpo (Tabla 3) y posteriormente se lavó la membrana 3 veces durante 5 min en PBS/Tween 0,1% para luego incubar con el segundo anticuerpo HRP acoplado a peroxidasa. La reacción se reveló por quimioluminiscencia EZ-ECL (tabla 1). Se realizó la adquisición de imágenes a distintos tiempos mediante cámara digital Hamamatsu (Discovery Gene Xpress).

Tabla 3: Anticuerpos utilizados en *Western blot*

Anticuerpo primario (Preparado en leche 5% disuelto en PBS 1X; Tween 0,1%)		Anticuerpo secundario (Preparado en leche 5% disuelto en PBS 1X; Tween 0,1%)	
Cyr61 (1:200) monoclonal	Santa Cruz	Anti-Ratón (1:5000)	Calbiochem
Tenascina (2:1000) monoclonal	Rockland		
S100A9 (1:50) monoclonal	ThermoFisher Scientific		
β -actina (1:1000) monoclonal	Abcam		
CD9 (1:200) monoclonal	Santa Cruz		
TSG101 (1:200) monoclonal	Santa Cruz		
Alix (2:1000) monoclonal	Cell signaling		
VE-cadherina (1:1000) monoclonal	Abcam		
Lactadherina (1:1000) monoclonal	Santa Cruz		
Caveolina-1 (1:10000) policlonal	BD Transduction Laboratories	Anti-Conejo (1:3000)	Calbiochem
Calnexina (2:1000) policlonal	Novus biological		

L.- Preparación de muestras para el análisis de perfil proteómico utilizando Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas (LC-MS/MS)

Las proteínas se extrajeron de EVs obtenidos a partir de células MDA-MB-231 WT, MDA-MB-231(shC) y MDA-MB-231(shCAV1). Éstas se prepararon para espectrometría de masa en tándem o MS/MS usando una serie de etapas de reducción, alquilación, digestión de proteínas y desalinización, así como fraccionamiento en gel. Se diluyeron 35 μ g de muestras de EVs en tampón RIPA (sin inhibidor de proteasas) para alcanzar un volumen total de 30 μ L por muestra. Luego, cada muestra se sonicó durante

10 min a temperatura ambiental para garantizar que las EVs se lisaron por completo. Las muestras se resolvieron en un 10% de Bis-Tris Gel (Invitrogen) y se visualizaron usando la tinción *Simply blue Safe* (Invitrogen). El carril que contiene la muestra se dividió en 3 fracciones y cada fracción se cortó en rodajas de gel de 1 mm y luego se destiñeron usando 200 μ L de bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3 , 50 mM) y acetonitrilo (ACN) seguido de 50 μ L de ditioneitol (DTT, DTT 10 mM diluido en NH_4HCO_3 100 mM) para reducir las muestras. Posteriormente, éstas se colocaron en un bloque de calentamiento durante 30 minutos a 56 °C y luego se alquilaron usando 70 μ L de ácido yodoacético (IAA, IAA 50 mM diluido en NH_4HCO_3 100 mM). Una vez que se finalizó la incubación, las muestras se digirieron con 60 μ L de Tripsin Gold (Promega) y se incubaron toda la noche a 37 °C. Se añadió ácido fórmico a las muestras para extraer los péptidos del gel y se secaron en una centrífuga de vacío. A continuación, cada muestra se reconstituyó en 200 μ L de 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) y se eluyó en 500 μ L de diferentes proporciones de 0,1%(v/v)TFA/ 50%ACN; 0,1%(v/v)TFA/ 80%ACN y 1%(v/v)TFA/ 100%ACN usando una placa de 96 pocillos de extracción en fase sólida C18 (Shimadzu). Las muestras secas se resuspendieron en 100 μ L de ácido fórmico al 0,1% y se transfirieron a viales de muestras automáticas de vidrio con rosca de tornillo (Thermo Fisher).

M.- Análisis de datos de espectrometría de masas e identificación de proteínas

Los péptidos se analizaron mediante cromatografía líquida (LC)/espectrometría de masas (MS) en tándem o LC-MS/MS en un espectrómetro de masas TripleTOFR 5600 (ABSciex) equipado con un sistema Eksigent 1D + NanoLC acoplado a un sistema cHiPLC. Una vez inyectados en la columna, las mezclas de péptidos resultantes se separaron usando un gradiente lineal de Tampón A que contenía 0.1% de ácido

fórmico/agua y Tampón B que contenía acetonitrilo/0.1% de ácido fórmico (Salomon y cols., 2013). Los espectros MS/MS se recogieron usando la adquisición dependiente de la información (IDA) con un escaneo topográfico (m/z 350-1500) junto con 25 escaneos de iones producto dependiente de datos de los 25 iones precursores más intensos. Todos los espectros de masas se analizaron utilizando el software Protein PilotTM con el método Paragon como motor de búsqueda teniendo de referencia la base de datos Uniprot (estableciendo humano como especie por defecto). La tasa de descubrimiento falso (FDR) se estimó utilizando una base de datos de secuencias invertidas. Los datos fueron sometidos a análisis de ontología y vía utilizando el análisis de proteínas a través de la herramienta de relaciones evolutivas (PANTHER: Análisis de proteínas mediante relaciones evolutivas; <http://www.pantherdb.org>) y algoritmos de ontología genética y clasificados según el proceso biológico y categorías de funciones moleculares.

N.- Pre-tratamiento de células T47-D, MDA-MB-231 y MDA-MB-231(shCAV1) con EVs

Se sembraron $3,5 \times 10^5$ células T47-D o $2,5 \times 10^5$ células MDA-MB-231/MDA-MB-231(shCAV1) en placas de 6 cm (Nunc). Al día siguiente, el medio de cultivo de cada una de las placas se reemplazó por medio RPMI con 5% SFB libre de vesículas. A cada placa se le añadieron 10 μ g de proteína total de EVs de MDA-MB-231 WT, MDA-MB-231(shC) o MDA-MB-231(shCAV1), es decir, 3,3 μ g/mL. Las células fueron tratadas con EVs durante 24 h, para luego realizar ensayos funcionales.

Ñ.- Ensayo de Migración

Se sembró 1×10^5 células tratadas o no con EVs en ausencia de suero en un transwell de 6.5 mm de diámetro que posee una membrana de policarbonato con poros de 8 μ m

(Catálogo N° 3422 Genexpress), previamente cubiertos con 100 μ L de fibronectina (2 μ g/mL en PBS). Las células se dejaron migrar en ausencia de suero por 5 h para las T47-D o 2 h para células MDA-MB-231/MDA-MB-231(shCAV1) tiempo después del cual se fijaron y tiñeron las células capaces de migrar con una solución de cristal violeta (cristal violeta 0.1 % en metanol 20 %) durante 30 min. Se contó el número de células que migraron en 8 campos diferentes utilizando un microscopio óptico.

O.- Ensayos de Invasión

Se sembró 2×10^4 células tratadas o no con EVs en un transwell de 6.5 mm de diámetro cubiertos con matrigel (Catálogo N° 354480 Genexpress) y se evaluó la capacidad de las células de invadir por 24 h. Para esto las células que atravesaron el matrigel fueron fijadas con paraformaldehído 4% durante 15 min, se lavaron 3 veces con PBS 1X durante 5 min, posteriormente se permeabilizó con Tritón X-100 al 0,3% con PBS por 10 min para luego repetir 3 lavados con PBS. Se cortó cada inserto y se montó en portaobjetos en donde se le añadió 1-2 gotas de DAPI disuelto en PBS (1:5000) a cada inserto. Finalmente, se descartó exceso de DAPI y se añadió medio de montaje Mowiol. Se contó el número de células inmersas en el matrigel en 8 campos diferentes utilizando un microscopio óptico.

P.- Modelo *in vivo* de carcinomatosis intraperitoneal

Ratones BALBc NOD/SCID de 9 a 12 semanas de vida fueron inoculados por vía intraperitoneal con 2×10^6 de células MDA-MB-231 en 250 μ L de suero fisiológico junto con 10 μ g de EVs de MDA-MB-231 WT, MDA-MB-231(shC) o MDA-MB-231(shCAV1). Cabe destacar que los animales del grupo sin tratar fueron inoculados con 250 μ L de suero fisiológico. La misma dosis de EVs se repitió 4 veces cada 4 días

por vía intraperitoneal. Al día 28 pos-inoculación, se realizó eutanasia y se evaluó la presencia o no de líquido ascítico y formación de masa tumoral en la cavidad peritoneal y en todos los tejidos. El mesenterio y bazo/páncreas se fijaron en paraformaldehído 4% (Dikmen y cols., 2005). Una vez fijados, se procedió a masar y comparar dichos órganos en presencia o no de masa tumoral.

Q.- Análisis estadísticos

Todos los datos se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM) de tres experimentos independientes. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico Kruskal-Wallis y un post test de Dunns o se analizaron usando las pruebas t de datos no apareados y se corroboraron con un análisis de Tukey mediante pruebas de comparación múltiple. La significancia (valor de p con IC 95%) se estableció en el nivel nominal de $p < 0.05$ o menos. Todos los datos se procesaron utilizando el software GraphPad (<http://www.graphpad.com>).

3.- RESULTADOS

OBJETIVO ESPECÍFICO 1:

Purificar y caracterizar vesículas extracelulares de líneas celulares de cáncer de mama metastásico.

Por motivos de optimización del rendimiento en la obtención de vesículas a partir de la línea celular MDA-MB-231, las cuales se justifican en la sección de ANEXO, se escogió el método de aislamiento de EVs que hace el uso de tampón A de precipitación de vesículas y columnas de exclusión molecular incluidas en el kit Exospin™.

I) Caracterización morfológica de las EVs secretadas por las diferentes líneas celulares MDA-MB-231 WT, shC y shCAV1 obtenidas mediante Exospin

Las EVs secretadas por MDA-MB-231 WT, shC y shCAV1 mostraron una distribución de tamaño que variaba aproximadamente entre 40 a 350 nm de diámetro con concentraciones de $7,6 \times 10^6$; $9,9 \times 10^6$ y $1,1 \times 10^7$ vesículas por mL, respectivamente para cada muestra (Figura 4A). La separación de estas vesículas en fracciones específicas por tamaño (Figura 4B) reveló que aproximadamente el 47% de la población de EVs shC eran menores de 150 nm, mientras que para las otras preparaciones, más del 50% de los EVs pertenecían a este fracción. En todos los casos, la moda (Figura 4C), que describe el valor de tamaño de partícula más frecuente encontrado en la muestra, varió entre 124 a 135 nm de diámetro y el tamaño promedio de las partículas (Figura 4D) varió de 160 a 174 nm de diámetro. Por otro lado, la integridad de las vesículas purificadas y el tamaño de las EVs de células MDA MB 231 WT, shC y (shCAV1) también fueron evaluadas mediante microscopía electrónica de transmisión (MET)

(Figura 4E) donde las imágenes revelaron EVs con forma esférica, pero con un diámetro de aproximadamente 100 nm.

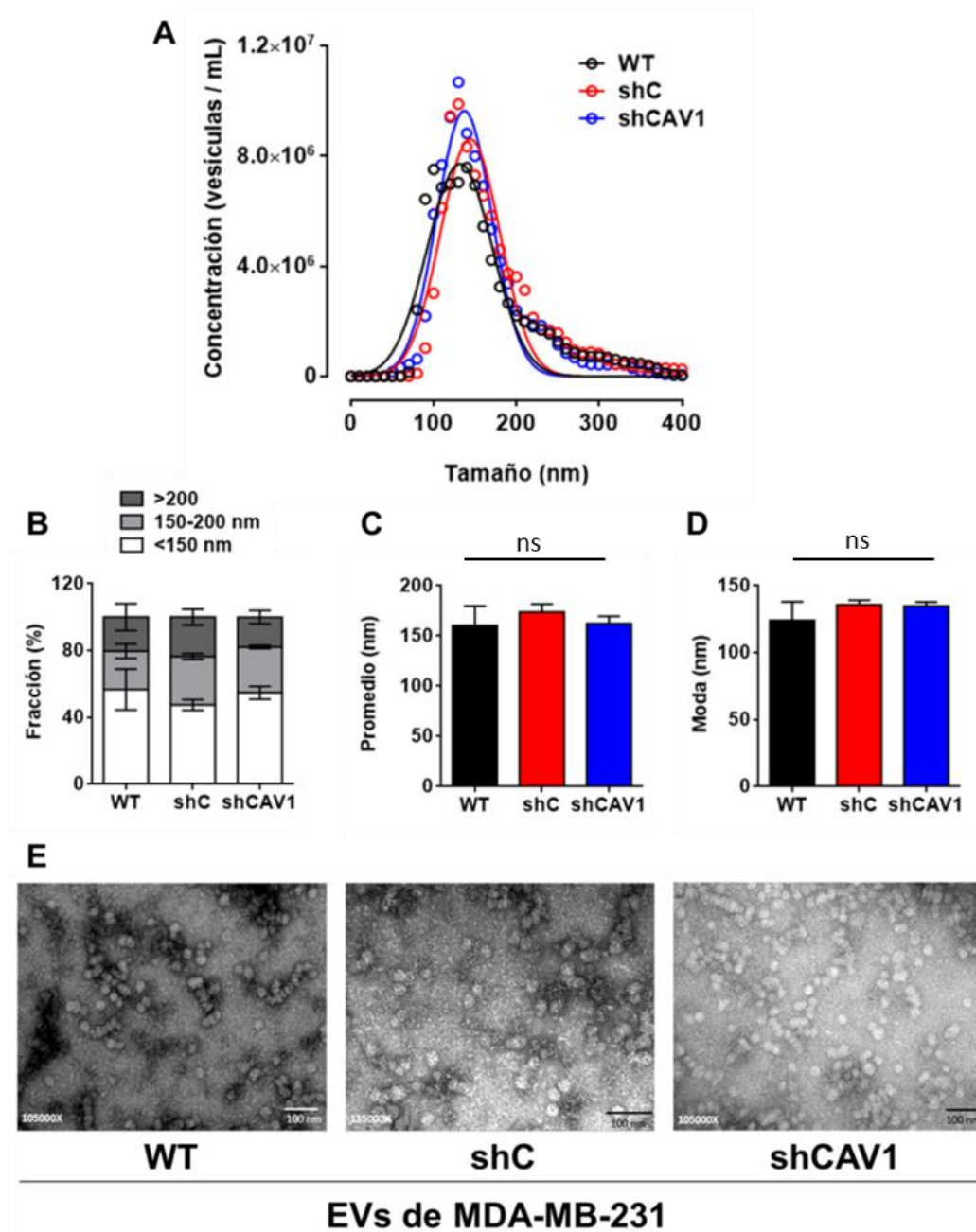


Figura 4. Células MDA-MB-231 liberan EVs independiente de la presencia de CAV1. A) la concentración de vesículas versus tamaño (nm) revela la heterogeneidad del tamaño para las EVs de las células MDA-MB 231 WT, (shC) y (shCAV1). B) Gráfico que describe la heterogeneidad de las EVs al indicar el porcentaje de vesículas que pertenecen a fracciones > 200 nm, 150-200 nm y <150 nm de cada muestra. Los gráficos hacia la esquina superior derecha describen el tamaño promedio (C) y la moda (D) de cada muestra de EVs utilizando el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA). Se analizaron 3 muestras independientes de EVs de MDA-MB-231 WT; 4 muestras independientes de EVs de MDA-MB-231(shC) y 4 muestras independientes de MDA-MB-231(shCAV1). E) MET muestra la morfología y el tamaño aproximado de cada muestra de EVs. Se muestra una barra de aumento de 100 nm para cada imagen. (n=3) ns p> 0.001 T-test.

II) Detección de la presencia de CAV1 en EVs provenientes de células MDA-MB-231 WT y shC junto con típicos marcadores de exosomas.

La presencia de CAV1 junto con los marcadores de EVs como CD9, TSG101 y Alix fueron evaluados en EVs y en el lisado celular de MDA-MB-231 WT, MDA-MB-231(shC) y MDA-MB-231(shCAV1) mediante la técnica de *Western blot* (Figura 5). Se detectaron niveles disminuidos de CAV1 en lisados de células de MDA-MB-231(shCAV1) y en EVs como se esperaba. Calnexina se utilizó nuevamente como control negativo para descartar la presencia de contaminación de componentes de retículo endoplásmico en todas las preparaciones de EVs obtenidas (Figura 5).

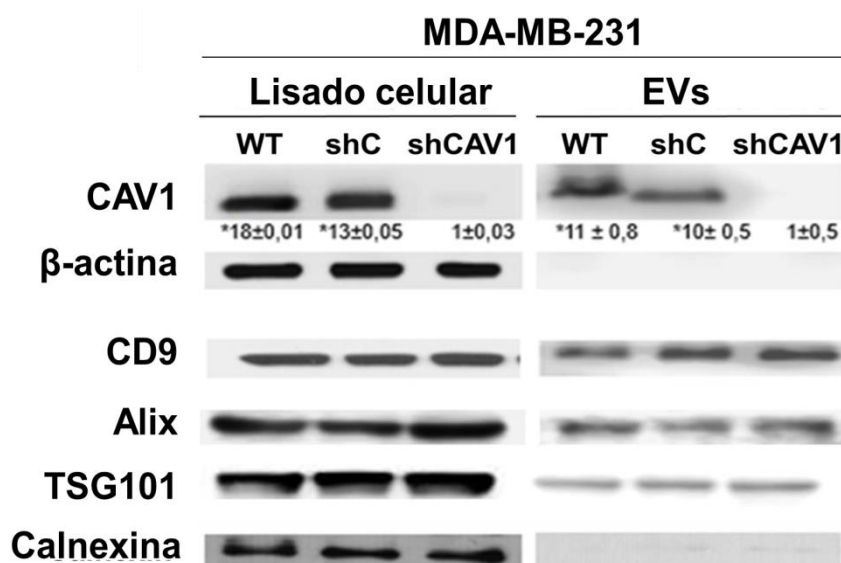


Figura 5. Caracterización por *Western blot* de la presencia de CD9, Alix y TSG101 (marcadores de EVs) y CAV1 en lisado celular y EVs. Extractos proteicos de las líneas celulares MDA-MB-231 WT, shC y shCAV1 junto con sus respectivos extractos proteicos de EVs obtenidos a partir de un volumen de sobrenadante menor a 200 mL mediante el uso del kit Exospin™. Los extractos fueron separados mediante SDS-PAGE 12,5% y analizados mediante western blot con los anticuerpos: anti-CAV1, anti-β-actina, anti-CD9, anti-Alix, anti-TSG101 y anti-Calnexina. n=3; los resultados se analizaron estadísticamente con un t-test no paramétrico. Diferencias significativas en relación a las células y EVs de MDA-MB-231(shCAV1) están indicadas (*p<0.05). Cuantificación realizada asumiendo como valor = 1 para la señal de MDA-MB-231(shCAV1).

OBJETIVO ESPECÍFICO 2:

Estudio del efecto de EVs con CAV1 en las propiedades de invasión *in vitro* en líneas de cáncer de mama humano.

Posteriormente se evaluó el efecto biológico a nivel de vesículas que contienen CAV1 en células de cáncer de mama humano no metastásico T47-D, que no expresan CAV1, como también en células de cáncer de mama metastásico MDA-MB-231 WT (parentales) mediante ensayos de migración en cámara boyden y ensayos de invasión en matrigel (Figura 6B y C, respectivamente). La razón por la cual se escoge a T47-D y no, MCF-7 como modelo de cáncer de mama humano no metastásico a evaluar que carece de CAV1, el cual ya está descrito en literatura se debe a que ésta última no logra dar lugar a la formación de tumores en un modelo *in vivo* (datos no mostrados), lo que dificultaría la evaluación del efecto biológico de las EVs en el modelo *in vivo* que se planteó evaluar en el objetivo n°4.

Los resultados indicaron un aumento casi al doble de células T47-D halladas en matrigel cuando éstas fueron previamente incubadas con EVs de shC en comparación con células T47-D que fueron incubadas con EVs de shCAV1 (Figura 6A). Cabe notar que no se observaron diferencias cuando estas células se incubaron con sobrenadante de MDA-MB-231 WT durante 24 h (Figura 6A). Por otro lado, la migración de estas células aumentó significativamente en al menos dos veces cuando fueron previamente incubadas con EVs de shC en comparación con células T47-D expuestas a EVs de shCAV1 (Figura 6B). Esto se complementó al evaluar células MDA-MB-231 WT previamente expuestas a 10 µg de EVs, lo que conllevó a un aumento en la invasión de estas células en al menos dos a tres veces cuando fueron expuestas a EVs de shC y EVs de WT, respectivamente, cuando fueron comparadas con células MDA-MB-231 WT expuestas a EVs de shCAV1. Interesantemente, se observó una disminución

significativa en la invasión de células MDA-MB-231 WT previamente incubadas con EVs de MDA-MB-231(shCAV1) en comparación con células MDA-MB-231 WT sin tratar (Figura 6C). En términos de migración, estas células aumentaron su migración en al menos dos veces cuando fueron expuestas a EVs de WT o shC en comparación con células MDA-MB-231 WT expuestas a EVs de shCAV1.

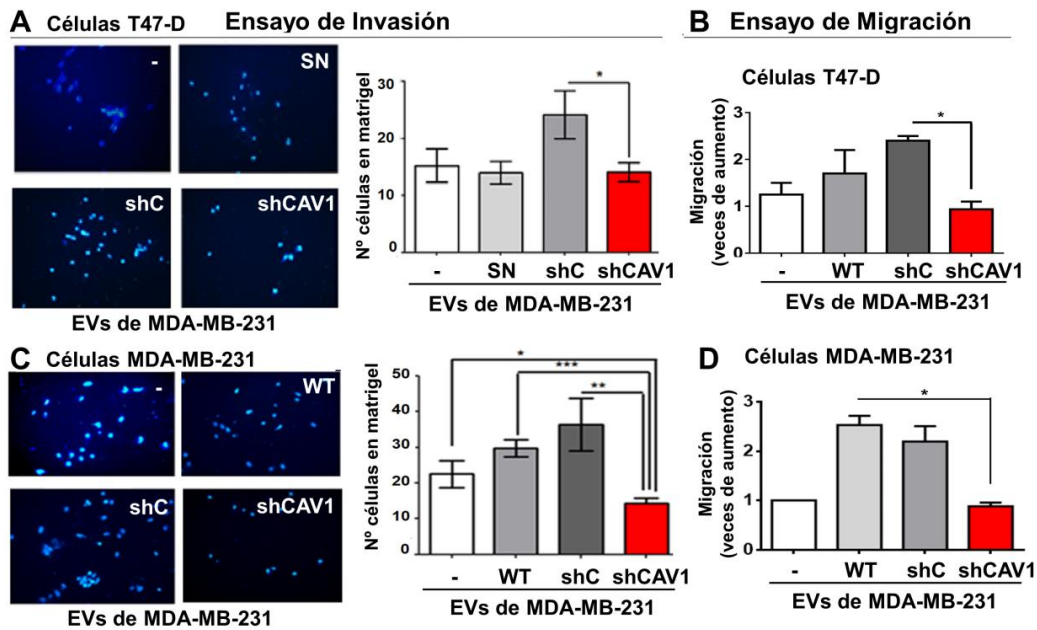


Figura 6. Las EVs de las líneas celulares de cáncer de mama metastásico promueven migración e invasión en células T47-D y MDA-MB-231. Imágenes representativas de las membranas de los ensayos de invasión (izquierda) donde se ven los núcleos en azul (DAPI) y migración (derecha) realizadas con células T47-D de cáncer de mama no metastásico (A y B) y células de cáncer de mama metastásico, MDA-MB-231 (C y D) pre-incubadas durante 24 h con 10 µg de las muestras de EVs indicadas. SN: sobrenadante MDA-MB-231. A cada lado de estos paneles está la cuantificación de tres repeticiones independientes. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico Kruskal-Wallis y un post test de Dunns. (n=3 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

De manera de comparar el efecto de estas vesículas en las líneas celulares: T47-D, MDA-MB-231 WT o parentales y en la línea celular en donde se había silenciado CAV1, MDA-MB-231(shCAV1). Nuevamente se evaluaron los parámetros de migración e invasión de estas células una vez expuestos o no durante 24 h a EVs de células MDA-MB-231 WT, shC y shCAV1.

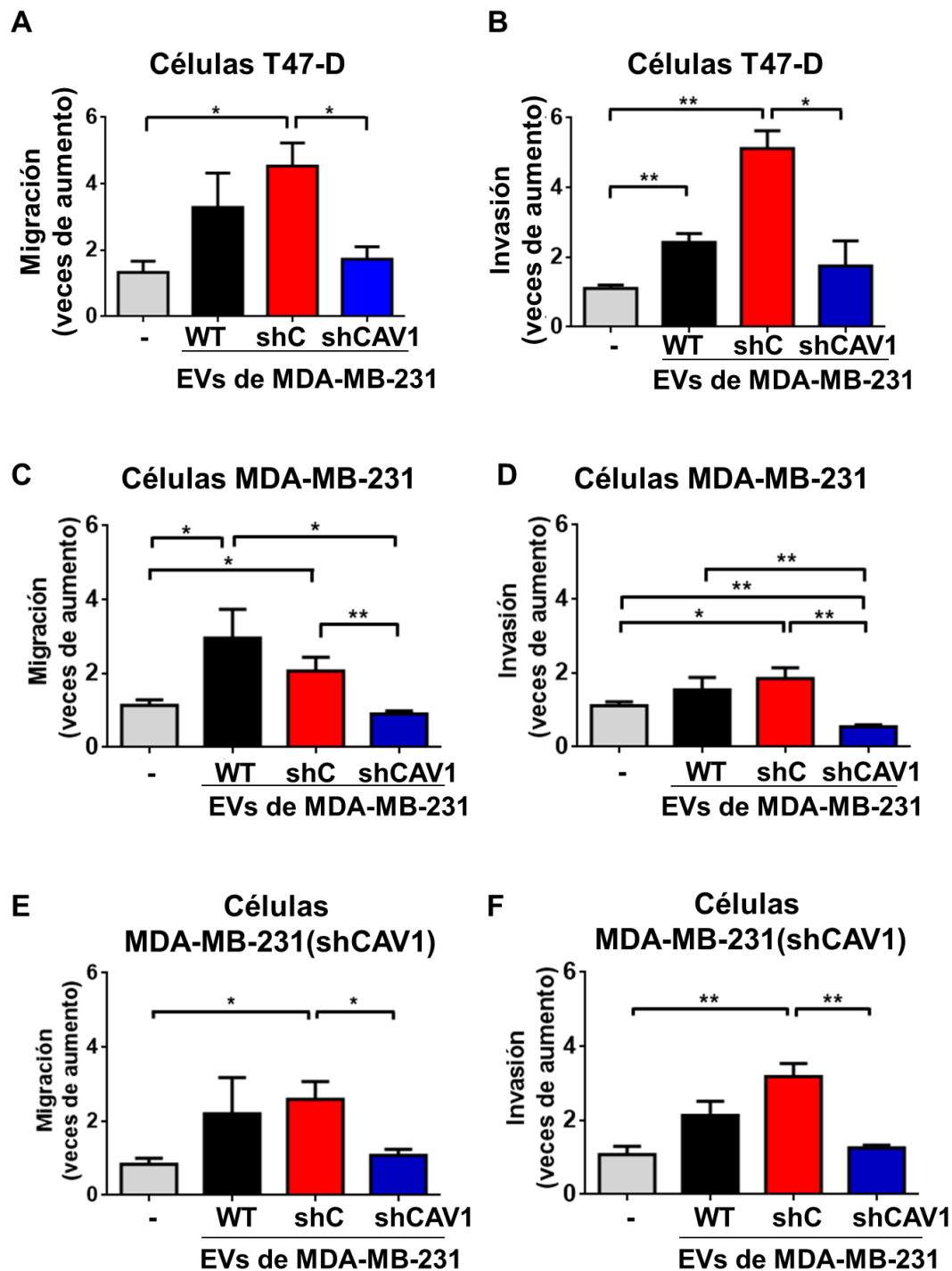


Figura 7. Las EVs de las líneas celulares de cáncer de mama metastásico promueven migración e invasión en células T47-D, MDA-MB-231 y MDA-MB-231(shCAV1). Ensayos de invasión (derecha) y migración (izquierda) realizadas con células T47-D de cáncer de mama no metastásico (**A y B**), células de cáncer de mama metastásico, MDA-MB-231 o WT (**C y D**) y células de cáncer metastásico silenciadas para CAV1 (MDA-MB-231(shCAV1)) (**E y F**) preincubadas durante 24 h con 10 μ g de las muestras de EVs indicadas. El gráfico muestra el promedio (promedio \pm SEM) de 3 experimentos donde el número de células que migraron e invadieron en cada condición fue normalizado por el número de células MDA-MB-231 sin tratar (-). Los resultados se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico Kruskal-Wallis y un post test de Dunns. (n=3 *p<0.05, **p<0.01).

Se puede observar un aumento en casi cuatro y cinco veces en la migración de células T47-D expuestas a EVs de células MDA-MB-231 WT y shC, respectivamente con respecto al control sin tratar o tratado con EVs de MDA-MB-231(shCAV1) (Figura 7A). Este patrón se repitió en invasión sólo para las células T47-D expuestas a EVs de MDA-MB-231(shC), ya que la invasión de células expuestas a EVs de WT sólo logró aumentar en al menos 2 veces con respecto al control sin tratar (Figura 7B). El efecto es menos pronunciado en células MDA-MB-231 parentales que fueron expuestas a EVs que contienen CAV1, ya que se observa un aumento de la migración de estas células en al menos cuatro y dos veces cuando fueron tratados con EVs de MDA-MB-231 WT y shC, respectivamente en comparación con células tratadas con EVs de MDA-MB-231(shCAV1) (Figura 7C). En términos de invasión, sólo se observó un aumento en al menos dos veces cuando células MDA-MB-231 parentales fueron tratadas con EVs de WT o shC en comparación con células tratadas con EVs de shCAV1 (Figura 7D).

Finalmente, se pudo observar que hubo un aumento en casi dos a tres veces en la invasión de células MDA-MB-231(shCAV1) cuando fueron expuestas a EVs de WT y shC, respectivamente en comparación con células expuestas a EVs de shCAV1 o sin tratar (Figura 7F). Este comportamiento se repitió al momento de evaluar la migración de estas células, ya que se pudo observar que hay un aumento en casi tres veces en la migración de células MDA-MB-231(shCAV1) expuestas a EVs de shC en comparación con células tratadas con EVs de shCAV1 o sin tratar (Figura 7E).

OBJETIVO ESPECÍFICO 3:

Evaluar el perfil proteómico de EVs de las sublíneas de cáncer de mama MDA-MB-231 WT, shC y shCAV1.

III) Análisis de espectrometría de masas de proteínas contenidas en EVs

Subsecuentemente, se caracterizaron los perfiles proteómicos de las EVs de células MDA-MB-231 WT, MDA-MB-231(shC) y MDA-MB-231(shCAV1) utilizando espectrometría de masas e identificamos un total de 113 proteínas en EVs de WT, 121 proteínas en EVs de shC y 131 proteínas en EVs de shCAV1 (Figura 8A). El diagrama de Venn para las preparaciones de EVs reveló 76 proteínas en común entre las tres muestras. Alternativamente, 27 proteínas fueron exclusivas de EVs de WT, 19 proteínas exclusivas de EVs de shC y 23 proteínas sólo se encontraron en EVs de shCAV1.

IV) Las proteínas identificadas en preparaciones de EVs de WT y shC se vincularon a las vías de señalización asociadas con adhesión celular

Para obtener una mayor comprensión de las vías de señalización que podrían controlarse mediante las proteínas identificadas en las diferentes preparaciones de EVs, se realizó un análisis de enriquecimiento GO (Ontología génica) utilizando el sistema de clasificación PANTHER de las proteínas que eran exclusivas de EVs de MDA-MB-231 WT, shC y shCAV1 (Figura 8B). El análisis reveló que los componentes del proceso biológico "adhesión celular" eran exclusivos de las EVs de WT y de shC y no estaban presentes en las preparaciones de EVs de shCAV1 (Figura 8B y Tabla suplementaria 1). Se identificaron un total de 5 proteínas cuya función se relaciona con el proceso de adhesión y estaban exclusivamente presentes en las EVs de WT y de shC (Figura 8C). La presencia de Cyr61, tenascina y S100A9 se corroboró mediante *Western blot* en

extractos de líneas celulares MDA-MB-231 WT, shC y shCAV1 (Figura 8D) así como de las preparaciones de EVs (Figura 8E). Es importante destacar que las tres proteínas mencionadas anteriormente estaban presentes en niveles similares en los extractos celulares, así como en las EVs de células MDA-MB-231 WT y shC, mientras que los niveles de S100A9 y Cyr61 disminuyeron y tenascina no se detectó en EVs de shCAV1. Cabe notar que se utilizaron VE-cadherina y lactadherina como proteínas control que estaban presentes en niveles similares en todas las preparaciones de EVs (Figura 8D y E).

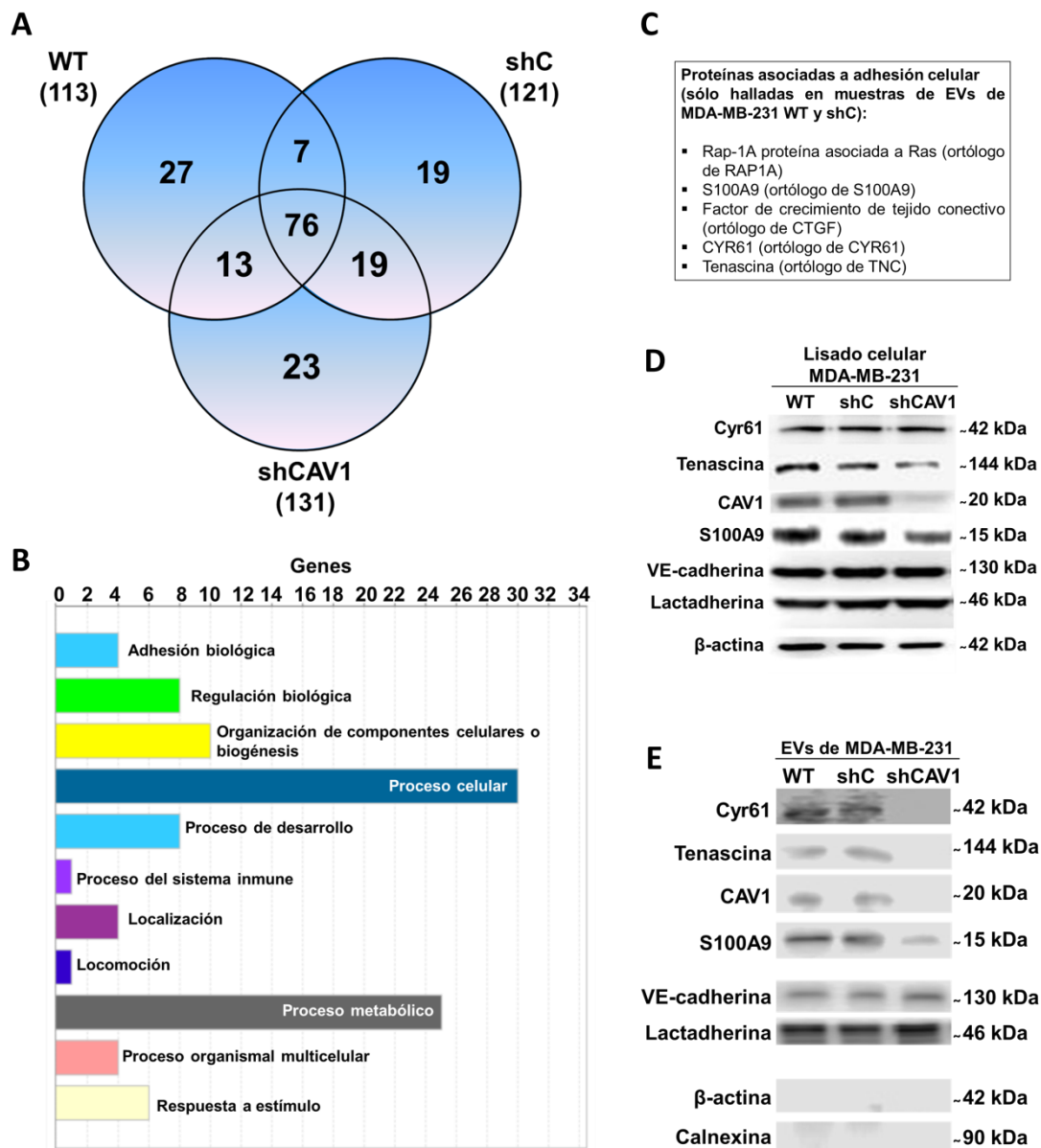


Figura 8: Proteínas de EVs provenientes de MDA-MB-231 WT y shC están involucradas en vías de señalización asociadas con adhesión celular. **A)** diagrama de Venn de proteínas identificadas en EVs de WT, shC y shCAV1. Los números en círculos indican proteínas de EVs que son exclusivas de una línea celular determinada o comunes a dos o a tres líneas celulares. **B)** análisis de enriquecimiento de ontología genética (GO) de las proteínas de EVs de WT y/o shC (53 proteínas en total descritas en detalle en la Tabla suplementaria 1) en las que están indicadas las 12 principales categorías GO significativamente enriquecidas en el proceso biológico. **C)** Se enumeraron las proteínas de EVs exclusivamente de MDA-MB-231 WT y shC asociadas con "adherencia biológica". **D)** Las proteínas de EVs asociadas con adherencia biológica - Cyr61, tenascina (TNC) y S100A9 se validaron por *Western blot* en cada muestra de lisado celular. VE-cadherina y lactadherina se usaron como controles positivos. **E)** Las proteínas de EVs asociadas con adhesión biológica - Cyr61, TNC y S100A9 se validaron por *Western blot* en cada muestra de EVs. VE-cadherina y lactadherina también se detectaron en todas las muestras.

OBJETIVO ESPECÍFICO 4:

Evaluar la capacidad metastásica en un modelo murino de xenotransplante inoculado vía intraperitoneal con EVs que contienen CAV1.

V) Células metastásicas de cáncer de mama que contienen CAV1 promueven metástasis en un modelo de carcinomatosis peritoneal

Considerando que los ensayos *in vitro* mostraron que CAV1 contenida en EVs promueve migración e invasión, nuestro siguiente paso fue evaluar *in vivo* si había un cambio en el potencial metastásico de células expuestas a EVs. Para ello, se evaluó un modelo de metástasis experimental denominado carcinomatosis intraperitoneal que contempló la inyección intraperitoneal de células MDA-MB-231 o sus sublíneas shC o shCAV1 en ratones BalbC NOD/SCID. Con este experimento se pudo determinar que las líneas celulares de cáncer de mama metastásico humano, MDA-MB-231 y MDA-MB-231(shC) que presentan elevados niveles de CAV1 en comparación con la sublínea MDA-MB-231(shCAV1), eran capaces de promover el desarrollo tumoral en la cavidad peritoneal en comparación la sublínea MDA-MB-231(shCAV1) (Figura 9).

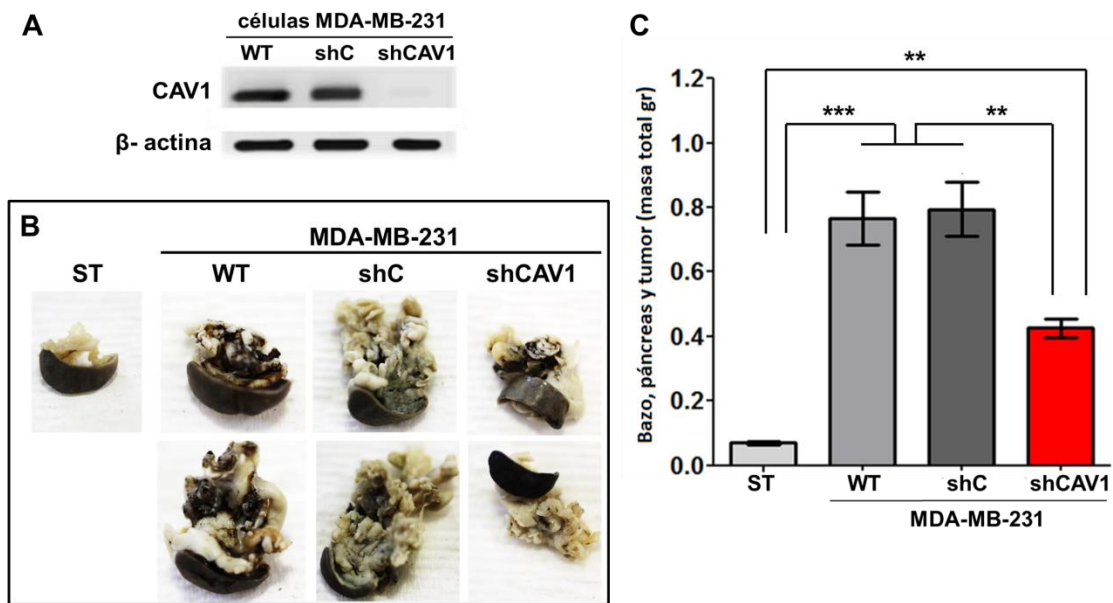
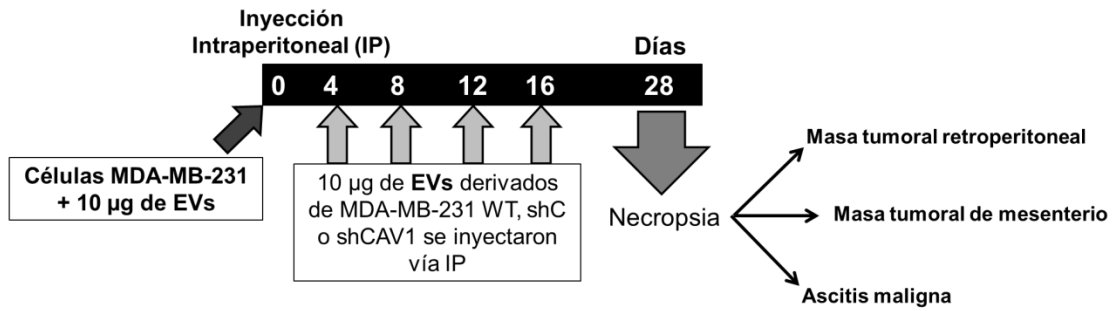
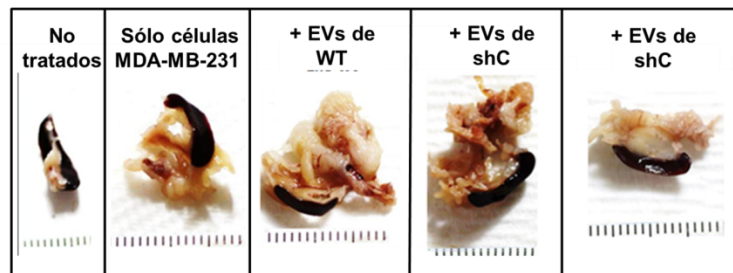
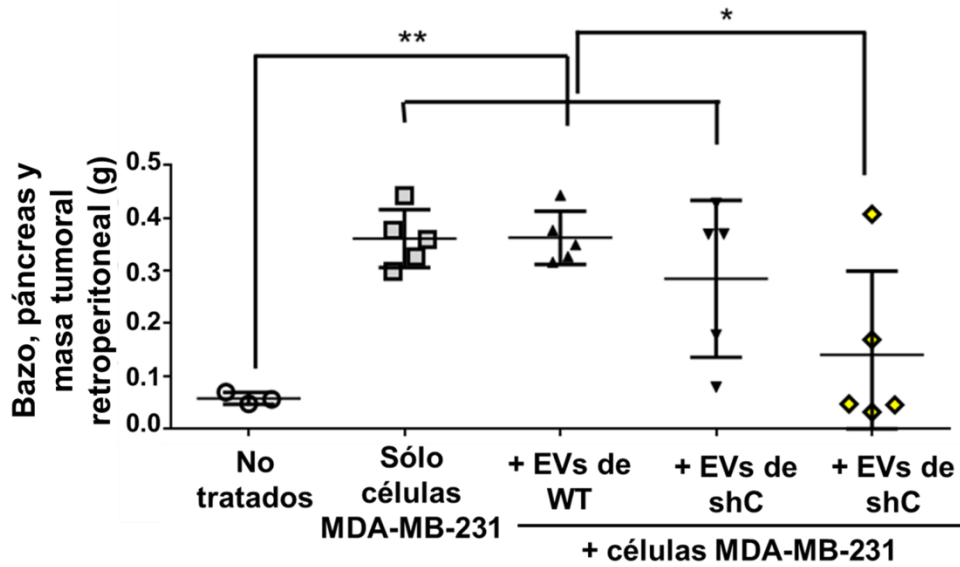


Figura 9: Modelo de carcinomatosis intraperitoneal realizado con la línea celular MDA-MB-231. A) *Western blot* representativo de los niveles relativos de la proteína CAV1 en las líneas celulares evaluadas en B y C. **B)** Ratones BalbC NOD/SCID fueron inyectados por la vía intraperitoneal con células MDA-MB-231 y las sublíneas, MDA-MB-231(shC) y MDA-MB-231 (shCAV1). Se realizó eutanasia en todos los animales al día 21 y se realizó la necropsia correspondiente. Se observa foto representativa de animal con presencia de masa tumoral adyacente al bazo y páncreas. **C)** Gráfico que agrupa los 4 grupos experimentales, cuya masa tumoral adyacente a los órganos descritos anteriormente fue masado y comparados entre sí.

VI) EVs de células metastásicas de cáncer de mama que contienen CAV1 promueven metástasis en un modelo de carcinomatosis peritoneal

Para evaluar el efecto de las EVs en este modelo, los animales fueron inoculados por la vía intraperitoneal con células MDA-MB-231 WT junto con 10 µg de EVs y posteriormente, cada 4 días se inyectaron dosis de 10 µg de EVs según cada grupo experimental, es decir 5 dosis en total contando la inoculación de EVs en el día cero (Figura 10A). El experimento finalizó a los 28 días en donde la formación de tumores en la cavidad peritoneal (Figura 10B y C) y la presencia de ascitis fue evaluado en cada grupo (Figura 10D). Se pudo observar que en aquellos grupos que fueron inoculados sólo con células MDA-MB-231 WT o con células MDA-MB-231 WT más EVs de WT y de shC mostraron un aumento significativo de la masa tumoral retroperitoneal hallada adyacente al bazo y páncreas de cada animal en comparación con aquellos animales no inoculados o en comparación con el grupo inoculado con células más EVs de

MDA-MB-231(shCAV1) (Figura 10B). En cuanto a la masa tumoral ocupada en el mesenterio de cada animal, se pudo observar que aquellos grupos experimentales inoculados con células más EVs de MDA-MB-231 WT y MDA-MB-231(shC) mostraron un aumento significativo del tamaño tumoral en este tejido en comparación con el grupo de animales inoculado sólo con células (Figura 10C). Esta diferencia fue más notoria cuando fue comparada con el grupo experimental inoculado con células más EVs de shCAV1 o con el grupo de animales sin tratar. Posteriormente, también se evaluó la presencia de ascitis en este modelo, en donde se observó su presencia sólo en aquellos grupos inoculados con células MDA-MB-231 WT junto con EVs WT o shC (Figura 10D). No obstante, no hubo formación de tumores en órganos como pulmón, hígado o riñones en ninguno de los grupos experimentales evaluados (Figura suplementaria 7)

A**B**

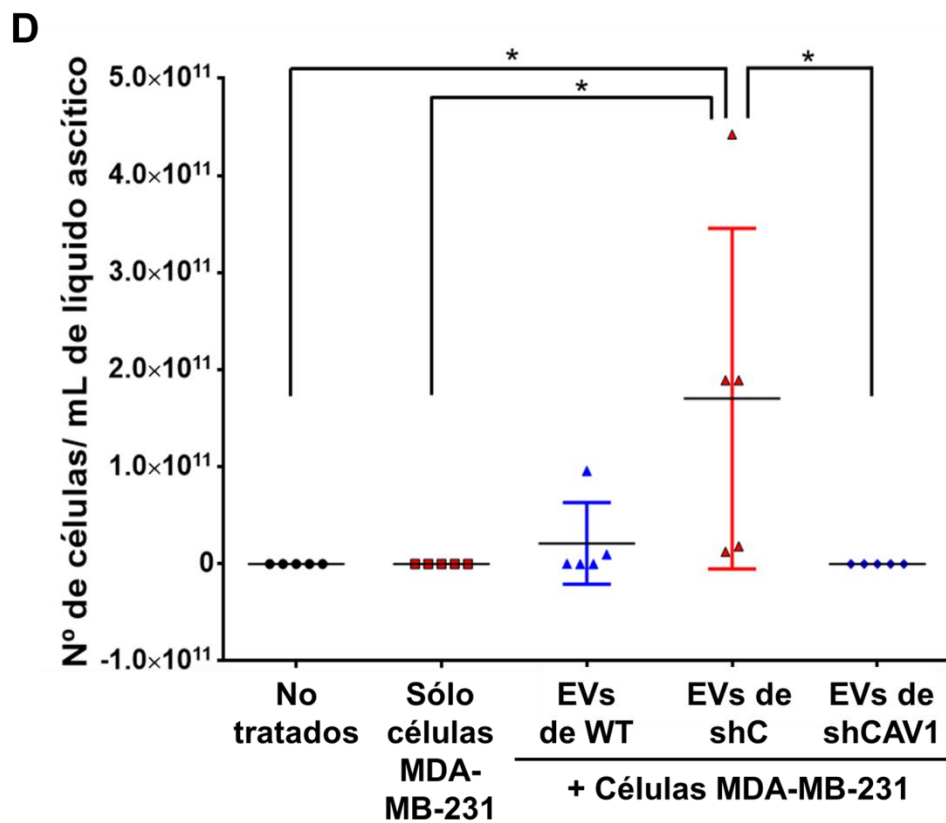
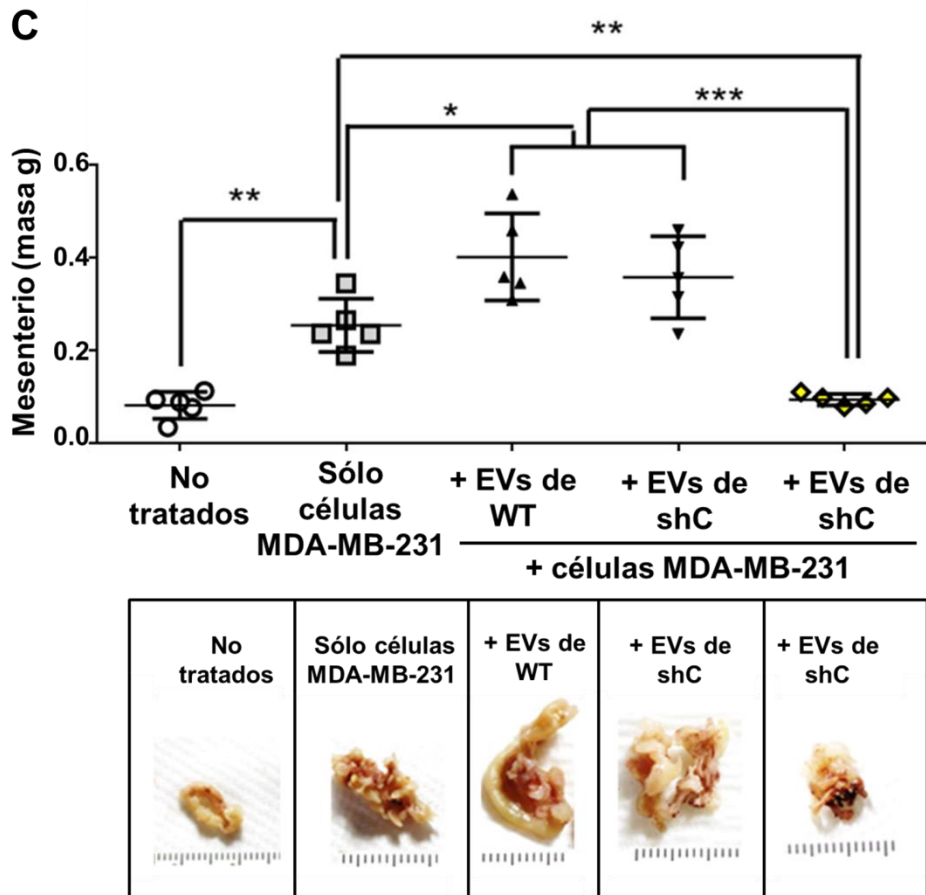


Figura 10: EVs que contienen CAV1 promueven la formación de tumores sólidos y tumorogenicidad líquida en modelo *in vivo* de carcinomatosis intraperitoneal de cáncer de mama. **A)** Esquema de curso temporal de inyección intraperitoneal (IP) de ratones BalbC NOD/SCID con células MDA-MB-231 junto con 10 µg de EVs de MDA-MB-231 WT, MDA-MB-231 (shC) o MDA-MB-231(shCAV1). La misma concentración de EVs se inyectó vía intraperitoneal cada cuatro días y la formación de tumores se evaluó el día 28. **B)** El peso total de bazo y páncreas ocupado por tumor se evaluó en cada condición. **C)** El peso total del tejido mesentérico ocupado por tumor se evaluó en cada condición. **D)** Cuantificación de número de células/mL de líquido ascítico fue evaluado en cada grupo experimental. Se indican diferencias estadísticamente significativas *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Hacia la derecha de figuras A y B se muestran fotografías de experimentos representativos donde se observa el crecimiento del tumor en este tejido.

Si bien el modelo de carcinomatosis peritoneal de cáncer de mama se realizó para evaluar el efecto biológico de EVs de WT, EVs de shC y EVs de shCAV1, cabe notar que este ensayo fue realizado en presencia de células metastásicas de cáncer de mama, MDA-MB-231 WT, las cuales se caracterizan por presentar niveles endógenos elevados de CAV1 (Figura 5). Es por esto que fue preciso evaluar el efecto biológico de estas EVs en presencia de células que tuvieran niveles carentes o disminuidos de CAV1, como T47-D o MDA-MB-231(shCAV1), respectivamente. Para esto, se inocularon células T47-D junto con 10 µg de EVs de shC o shCAV1 vía intraperitoneal y posteriormente, cada 4 días se inyectaron dosis de 10 µg de EVs según cada grupo experimental, es decir 6 dosis en total en lo que perduró el experimento (Figura 11A). El experimento finalizó a los 28 días en donde la presencia de ascitis (Figura 11B) y la formación de tumores en la cavidad peritoneal (Figura 11C) fue evaluado en cada grupo. Se pudo observar que el grupo inoculado con la línea de cáncer de mama no metastásico, T47-D más EVs de shC dio lugar a un aumento significativo de la masa retroperitoneal hallada en mesenterio en comparación con los grupo no tratado, grupo inoculado sólo con células T47-D o grupo inoculado con células T47-D más EVs de shCAV1 (Figura 11B). Lo que es más, el número de células/mL de líquido ascítico de los animales inoculados con estas células más EVs de shC fue significativamente mayor en comparación con el grupo que sólo fue inoculado con células T47-D (Figura 11C).

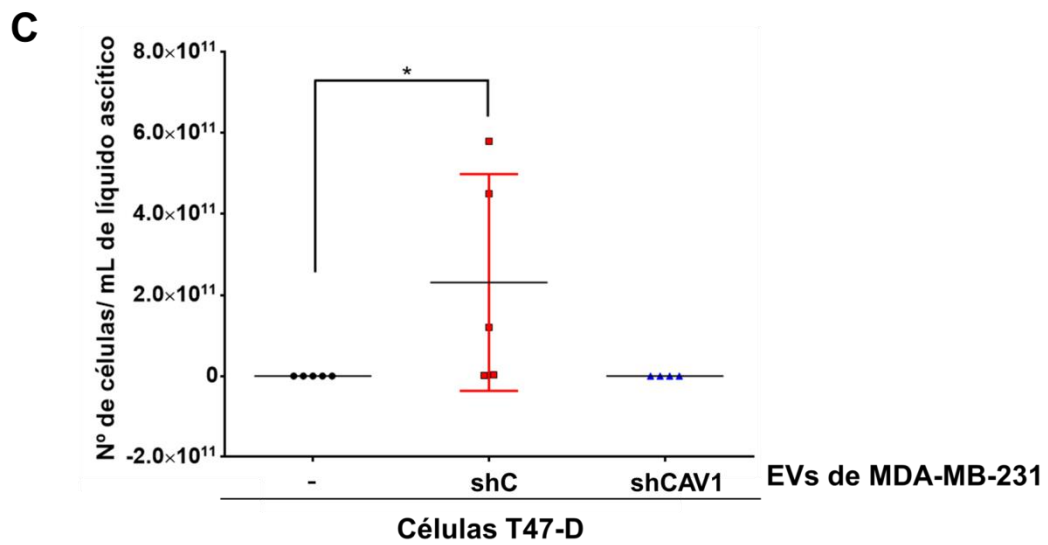
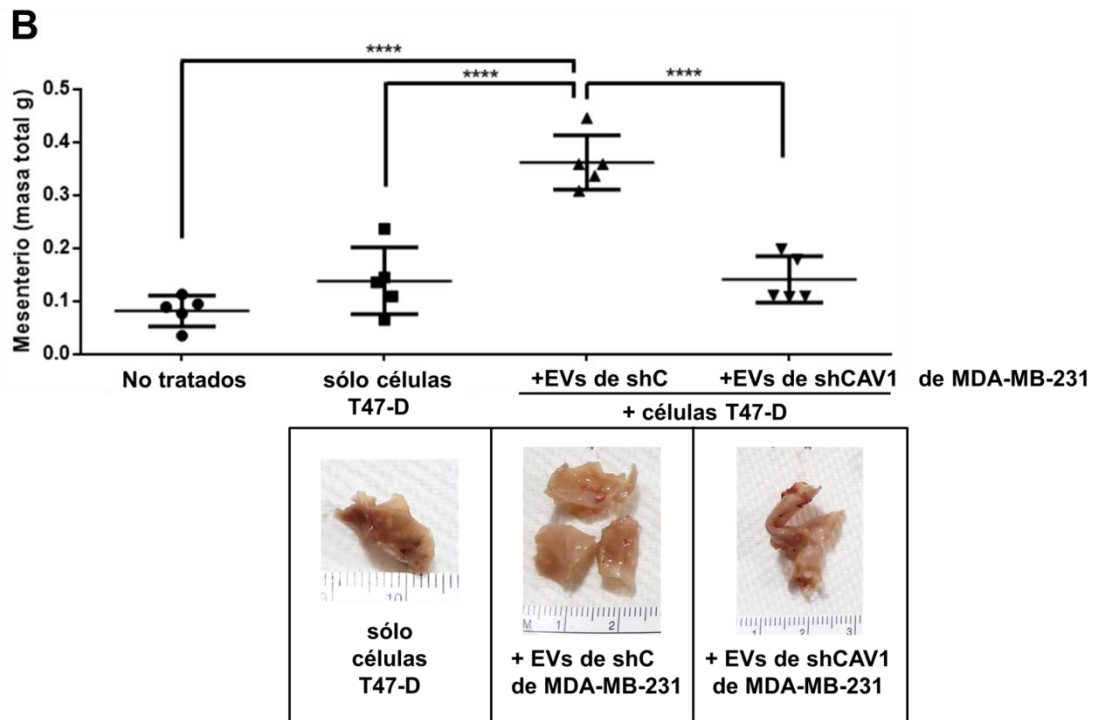
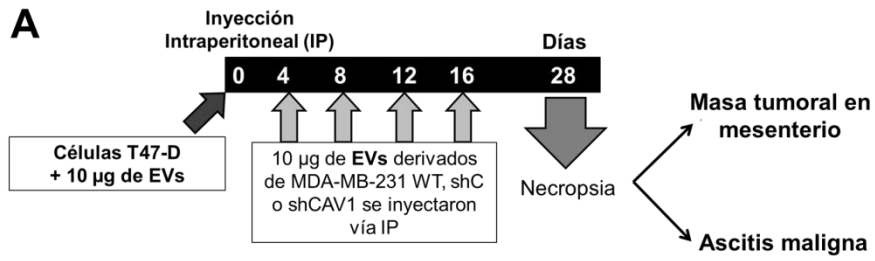


Figura 11: EVs que contienen CAV1 promueven la formación de ascitis maligna y formación de tumores en mesenterio de modelo murino de carcinomatosis peritoneal T47-D de cáncer de mama. A) Esquema de curso temporal de inyección intraperitoneal (IP) de ratones BalbC NOD/SCID con células T47-D junto con 10 µg de EVs de shC o shCAV1. La misma concentración de EVs se inyectó por vía intraperitoneal cada cuatro días (6 dosis en total) y la formación de tumores y presencia de ascitis se evaluó al día 28. B) Cuantificación del número de células/mL de líquido ascítico en cada grupo experimental. C) El peso total de mesenterio ocupado por tumor se evaluó en cada condición mostrada en B. Hacia la parte inferior de esta figura se muestran fotografías de experimentos representativos donde se observó el crecimiento del tumor en este tejido. Se indican diferencias estadísticamente significativas **** p <0.0001, * p <0.05.

Ahora, para evaluar el efecto biológico de EVs sobre células MDA-MB-231(shCAV1) se inocularon éstas últimas, células MDA-MB-231(shC) o células MDA-MB-231 parentales junto con 10 µg de EVs de shC o shCAV1 inyectadas por la vía intraperitoneal y posteriormente, cada 4 días se inyectaron dosis de 10 µg de EVs según cada grupo experimental, es decir 6 dosis en total en lo que perduró el experimento (Figura 12A). El experimento finalizó a los 21 días en donde la presencia de ascitis (Figura 12B) y la formación de tumores en la cavidad peritoneal (Figura 12C) fue evaluado en cada grupo. Los resultados dieron a conocer que el grupo experimental que fue inoculado con células MDA-MB-231(shCAV1) junto con EVs de shC presentó un número de células/mL de líquido ascítico significativamente mayor cuando fue comparado con el grupo inoculado con células MDA-MB-231 WT más EVs de shC e incluso aún mayor cuando fue comparado con el grupo que fue inoculado con células MDA-MB-231(shC) junto con EVs de shCAV1 (Figura 12B). Esto se complementa con el hallazgo de una masa tumoral retroperitoneal adyacente a bazo y páncreas de mayor tamaño y peso en aquellos animales inoculados con células MDA-MB-231(shCAV1) más EVs de shC en comparación con el grupo experimental inoculado con células MDA-MB-231(shC) junto con EVs de shCAV1 (Figura 12C).

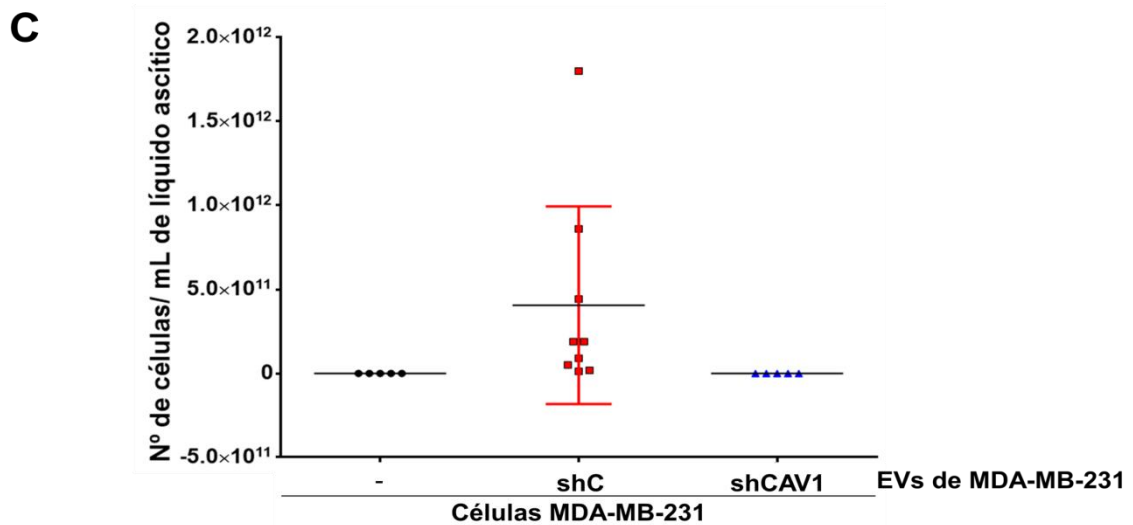
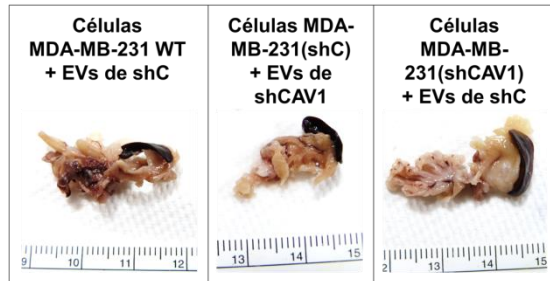
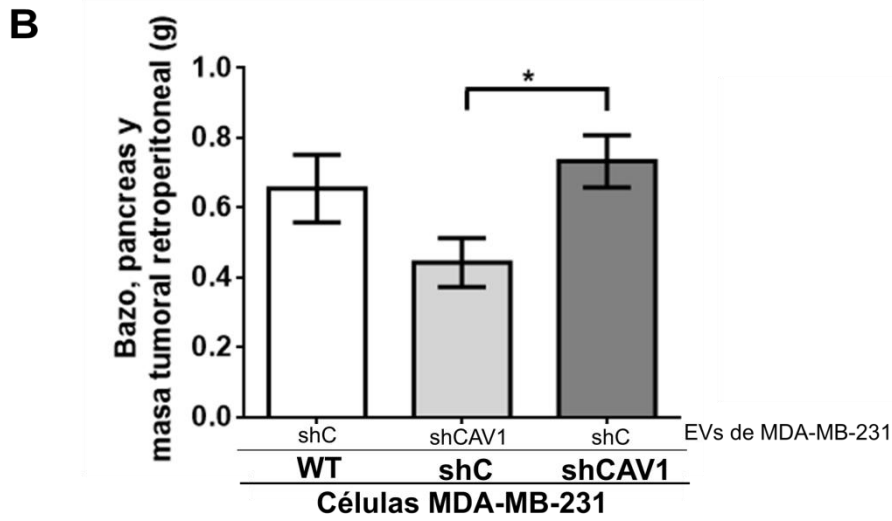
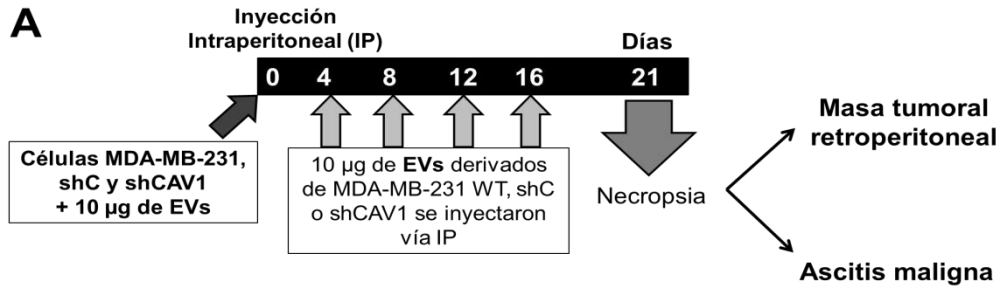


Figura 12: EVs que contienen CAV1 promueven la formación de ascitis maligna y formación de tumores retroperitoneales en un modelo de carcinomatosis peritoneal de cáncer de mama. **A)** Esquema del curso temporal de inyección intraperitoneal (IP) de ratones BalbC NOD/SCID con células MDA-MB-231 WT, MDA-MB-231(shC) y MDA-MB-231(shCAV1) junto con 10 µg de EVs de shC o shCAV1. La misma concentración de EVs se inyectó por la vía intraperitoneal cada cuatro días (6 dosis en total) y la formación de tumores y presencia de ascitis se evaluó al día 21. **B)** Cuantificación del número de células/mL de líquido ascítico en cada grupo experimental. **C)** El peso total de bazo y páncreas ocupado por tumor se evaluó en cada condición mostrada en B. Hacia la derecha de esta figura se muestran fotografías de experimentos representativos donde se observó el crecimiento del tumor en este tejido. Se indican diferencias estadísticamente significativas *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

4.- DISCUSIÓN

Las vesículas extracelulares (EVs) están involucradas en diversos procesos, como por ejemplo en inhibición de la apoptosis, angiogénesis, migración, invasión y proliferación, entre otros (Yang y cols., 2011; Zhang y cols., 2015; Xu y cols., 2018; Zhao y cols., 2018). Sin embargo, comprender qué procesos se desencadenarán por un tipo específico de EVs en las células blanco sigue siendo un desafío considerable (van Niel y cols., 2018). Recientemente, la capacidad de las EVs para promover metástasis en el pulmón y el hígado se demostró en un modelo *in vivo* que depende de la presencia de integrinas $\alpha6\beta1/\alpha6\beta4$ y $\alpha v\beta5$, respectivamente (Hoshino y cols., 2015). Es importante destacar que estos estudios se realizaron con células de cáncer de mama metastásico, como MDA-MB-231, que es el modelo que se escogió para este proyecto de tesis. En nuestro estudio estábamos interesados en evaluar si la proteína CAV1, que se ha demostrado promueve migración, invasión y metástasis, tanto *in vitro* como *in vivo* (Lobos-González y cols., 2013; Urra y cols., 2012) era capaz de hacerlo a través de EVs, usando este mecanismo de comunicación intercelular.

En el desarrollo de esta tesis aislamos y caracterizamos las EVs de células MDA-MB-231 y pudimos mostrar en un contexto *in vitro* que las EVs con CAV1 promueven migración e invasión de las células recipientes.

Como estrategia experimental, utilizamos líneas celulares que tienen altos niveles endógenos de CAV1 (controles MDA-MB-231 WT y shC) y una línea subcelular en la que se silenció la expresión de CAV1 (MDA-MB-231(shCAV1) (Urra y cols., 2012)). A partir de estas células purificamos EVs y observamos que la distribución del tamaño promedio de las muestras de EVs de MDA-MB-231 WT, shC y shCAV1 sugiere la presencia de partículas que variaban en tamaño hasta 350 nm de diámetro (Figura 4A).

Es importante señalar que aproximadamente sólo el 20% de cada una de las muestras de EVs contenía vesículas de más de 200 nm (Figura 4B). Estos datos para cada preparación de EVs concuerdan con los de la literatura en lo que es la moda y tamaño de partículas promedio (Figuras 4C y D, respectivamente), sugiriendo de esta manera que las partículas evaluadas durante este estudio eran predominantemente exosomas (Tahir y cols., 2006; Fais y cols., 2016; van Niel y cols., 2018). En cuanto a las preparaciones de EVs provenientes de MDA-MB-231(shC), éstas contenían partículas de un tamaño ligeramente más grande (173 nm) y de una moda mayor (135 nm) en comparación con las muestras de EVs de MDA-MB-231 WT y MDA-MB-231(shCAV1) con un tamaño promedio de aproximadamente 160 nm en ambos casos y un tamaño de moda de 124 y 134 nm, respectivamente (Figura 4C y D). También se debe añadir que las muestras de EVs de MDA-MB-231(shC) contenían una proporción de al menos la mitad de vesículas con más de 150 nm de diámetro (Figura 4B). Tales diferencias pueden ser posiblemente atribuibles al hecho de que las células MDA-MB-231 se seleccionaron con antibiótico para obtener la sub-línea MDA-MB-231 (shC). Cabe recordar que en estas células, el plásmido pLKO.1 que codifica una horquilla corta no relacionada se incorporó de forma estable en éstas a través de una transducción lentiviral (Urrea y cols., 2012). Dicha transducción podría estar interfiriendo de alguna manera la biogénesis de vesículas y podría estar favoreciendo específicamente la liberación de microvesículas más grandes y no vesículas del tamaño de entre 50 y 150 nm de diámetro (Hessvik y cols., 2013; van Niel y cols., 2018). Sin embargo, debe observarse que el mismo plásmido pLKO.1 se empleó como un vector para las construcciones de horquilla corta específica de CAV1 sin observar alteraciones en el tamaño de las EVs de las células transducidas de forma estable. Por lo tanto, la razón de tal variación aún no se ha determinado.

De manera interesante, las imágenes de MET revelaron que todos las EVs estaban íntegras y tenían una forma esférica, pero de tamaño mucho menor que el esperado en base a los resultados del análisis de seguimiento de nanopartículas (Figura 4E). Dichos cambios en el tamaño de las partículas observado en todas las muestras son probablemente atribuibles a cómo se preparan las EVs para la visualización por TEM (Coumans y cols., 2017). A pesar de estas diferencias, estas observaciones indican que la integridad de las vesículas no se ve afectada por el método de purificación utilizado (Kit Exospin™ de *Cell Guidance systems*). Cabe recalcar que esta característica no siempre se obtiene con otras técnicas de aislamiento, como por ejemplo, al usar la ultracentrifugación como método de purificación de EVs, ya que muchas vesículas se rompen y pierden su integridad de membrana (Jeppesen y cols., 2014; Mol y cols., 2017).

Algunos de los marcadores de EVs más comunes de acuerdo con exocarta.org (Keerthikumar y cols., 2016) son proteínas que participan en la biogénesis de EVs, como la tetraspanina CD9 (Willms y cols., 2018), TSG101 y Alix (Willms y cols., 2018; Andreu y cols., 2014; Lener y cols., 2015) (Figura 5). De estos, CD9 fue fácilmente detectable en las tres preparaciones de EVs, mientras que TSG101 y Alix parecían menos prevalentes. Más aún, la calidad de las preparaciones de EVs obtenidas era muy buena, ya que además de ser positivas para CD9, Alix y TSG101, no se detectó el marcador de retículo endoplásmico, calnexina, lo que implica que no hubo contaminación. La presencia diferencial de proteínas marcadoras de EVs puede apuntar a variaciones en la forma en que se generan estas partículas. CD9 es parte del proceso de biogénesis de EVs, que funciona de forma independiente del complejo *Endosomal Sorting Complex Required for Transport* (ESCRT) (Andreu y cols., 2014). Esto puede sugerir que la vía de producción de las EVs aisladas que podría estar predominando

sería una vía de biogénesis de EVs asociada a tetraspaninas en vez de la maquinaria clásica de ESCRT, en que TSG101 y Alix están involucrados (Hessvik y cols., 2013; Andreu y cols., 2014). Pero para confirmar esto último, se requeriría silenciar los componentes de la vía ESCRT y evaluar si es posible o no purificar EVs.

Por otro lado, consideramos que para nuestros propósitos lo más importante es que CAV1 sólo se detectó en las EVs de MDA-MB-231 WT y shC, pero no en las EVs ni en el lisado celular de MDA-MB-231(shCAV1).

Sabemos por literatura que las EVs de MDA-MB-231 son capaces de estimular la migración en células de cáncer de mama con menos potencial metastásico como las células MCF-7 (Harris y cols., 2015). Sin embargo, los autores no atribuyen esta característica a la presencia selectiva de proteínas específicas, tales como CAV1. Nuestros resultados revelaron que las células T47-D que carecían de CAV1 aumentaban su migración e invasión después de la incubación con EVs que contienen CAV1 (Figura 6A y 6B; Figura 7A y 7B). Es importante mencionar que estos efectos que se desencadenó en las células T47-D no se relacionaron a la capacidad de ingreso de las EVs a las células recipientes, porque los resultados de citometría de flujo mostraron que la captación de EVs fluorescentes fue similar en todos los casos (datos no mostrados). Quizás algo contrario a lo que se esperaba, las EVs que contenían CAV1 de MDA-MB-231 WT y MDA-MB-231(shC) también promovieron migración e invasión en células MDA-MB-231 WT con altos niveles endógenos de CAV1 (Figura 6C y 6D; 7C y 7D). Esto puede sugerir que no sólo es la presencia de CAV1 *per se* en EVs lo que contribuye a los efectos biológicos observados, sino que i) los componentes específicos que co-segregan con CAV1 y ii) mecanismos aún no definidos para alterar la función biológica de CAV1 contenida en EVs, podrían ser parte del cambio de comportamiento que hemos observado (aumento de capacidad tumorogénica).

Esto nos impulsó a plantearnos que si las células que sobreexpresan CAV1 a su vez son capaces de promover metástasis, entonces si al mismo tiempo las vesículas que secretan dichas células tienen CAV1, ¿será posible que tuvieran parte en el rol promotor de metástasis?

Es importante mencionar que los efectos observados por parte de EVs de MDA-MB-231(shC) en células recipientes fue mayor en términos de migración e invasión *in vitro* o formación de ascitis en el modelo murino en comparación al tratamiento de estas mismas células con EVs de MDA-MB-231 WT. Esto se puede explicar por el hecho de que las células MDA-MB-231(shC) han pasado por selección repetitiva con antibióticos para poder obtener una población de células que mantuvieran una secuencia no específica o que no tuviera relación con CAV1 integrada en el genoma de la célula MDA-MB-231. Este último se considera como el verdadero control con el cual se debe comparar a aquellas células que fueron transducidas con vector lentiviral que codificaba una horquilla de RNA dirigida contra la secuencia de CAV1 (MDA-MB-231(shCAV1) (Urrea y cols., 2012).

Recientemente, resultados interesantes han sido descritos por el grupo de del Pozo y colaboradores, los cuales indican que CAV1 sería capaz de regular la biogénesis de exosomas a través de la regulación del contenido de colesterol en estas vesículas (Albacete-Albacete y cols., 2018). Los autores observaron que vesículas provenientes de fibroblastos de ratón silenciados para CAV1 presentan una composición lipídica alterada que se ve reflejada en una acumulación de colesterol, un elevado contenido de dominios ordenados de membrana (o *liquid-ordered domains*) y una disminución de ácido fosfatídico, fosfatidilinositol y ácido lisobifosfatídico (LBPA) lo que conllevaría a una alteración en la formación de invaginaciones de membrana que dan lugar a las vesículas intraluminales que se generan dentro de los cuerpos multivesiculares. Por otra

parte, estos autores describen que la presencia de CAV1 sería capaz de influenciar el tipo de composición proteica de los exosomas (Albacete-Albacete y cols., 2018). Específicamente describen que los exosomas provenientes de fibroblastos de ratón que contienen niveles endógenos de CAV1 se encuentran enriquecidos en componentes de la matriz extracelular, como por ejemplo, tenascina, fibronectina, proteoglicanos heparan sulfato, etc. Estos resultados son el punto de convergencia con nuestro estudio, ya que en la figura 8 nuestros análisis de espectrometría de masas y de ontología génica muestran a tenascina y a Cyr61 como proteínas de carga diferencial entre EVs que contienen o no CAV1. Sin embargo, cuando los autores evaluaron el perfil proteómico de exosomas provenientes de fibroblastos en donde CAV1 fue silenciada, el análisis por ontología génica de estos exosomas sólo mostró la presencia de proteínas asociadas a unión DNA/RNA y proteínas chaperonas como histonas, lo que a su vez concuerda con algunas de las proteínas identificadas en EVs de MDA-MB-231(shCAV1) (Tabla 2 suplementaria).

Por otro lado, Albacete y colaboradores dan mayor énfasis en que la presencia de tenascina promueve el desarrollo de metástasis agresiva y que esta proteína al mismo tiempo colocaliza con CAV1 dentro de cuerpos multivesiculares de fibroblastos y de células de glioblastoma humano U251 que son conocidas por secretar tenascina (Albacete-Albacete y cols., 2018). Cabe destacar que además describen que la acumulación de colesterol en cuerpos multivesiculares generado al tratar fibroblastos con un esteroles catiónico (U18666A) que sería la condición que se genera en ausencia de CAV1, da lugar a exosomas que contienen bajos niveles de tenascina. Esto sugiere que CAV1 estaría directamente relacionada con la regulación del contenido lipídico que a su vez controla también el contenido o *carga proteico* de estas vesículas.

Por otro lado, Albacete y colaboradores describen que al incubar esferoides de células de cáncer de mama no metastático como MDA-MB-468 (Tu y cols., 2011) con exosomas de fibroblastos de ratón que expresan niveles endógenos de CAV1, pero que en donde tenascina fue silenciada conllevó a que estos esferoides no migraran de manera significativa en comparación con esferoides que fueron incubados con exosomas de fibroblastos de ratón sin modificar. Esto sugiere que el efecto observado no se debe exclusivamente a la presencia de CAV1 en EVs, sino más bien a la presencia de tenascina la cual fue separada por *sorting* o colocada en exosomas gracias a CAV1. Este último resultado nos ayuda de alguna forma a explicar el efecto observado en las tres líneas de cáncer de mama expuestas a EVs que contienen CAV1, las cuales potenciaron la capacidad de migración e invasión con respecto a células expuestas a EVs que no contenían esta proteína (Figura 6 y 7). Cabe destacar que no se logró detectar CAV1 cuando se incubaron células T47-D o células MDA-MB-231(shCAV1) con EVs que contenían CAV1 (resultados no mostrados). Así, podemos decir que no es que sea un traspaso de CAV1 a las células recipientes el responsable del efecto observado, sino más bien podría ser que esta proteína modifica el cargo proteico de las vesículas que tienen características que favorecen el desarrollo de metástasis.

Espectrometría de masa y ontología génica

En este sentido, nuestro siguiente paso fue evaluar cuáles fueron los componentes que se segregaron conjuntamente con CAV1 utilizando espectrometría de masas. El análisis enriquecimiento GO (Ontología génica) mostró que entre las distintas proteínas que se encontraron en todas las muestras de EVs (Figura 8 y Tabla 1 suplementaria), las EVs que contienen CAV1 (MDA-MB-231 WT y shC) compartieron varias proteínas relacionadas con adhesión celular que no se encontraron en las EVs carentes de CAV1 (EVs de MDA-MB-231(shCAV1)), como la proteína Rap-1A relacionada con Ras o

proteínas como S100A9, factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF), inductor angiogénico rico en cisteína 61 (Cyr61) y tenascina (TNC) (Figura 8B y C).

Cyr61 pertenece a la familia CCN de proteínas matricelulares que también incluye CTGF (Holbourn y cols., 2008; Cheng y cols., 2014). Además, se ha mostrado que CYR61 promueve el crecimiento, migración e invasión de células tumorales en cánceres de mama, gástrico y de ovario (Tsai y cols., 2002; Huang y cols., 2017). Específicamente, se ha descrito que la expresión elevada de Cyr61 promueve la diseminación peritoneal de las células del cáncer gástrico a través de la integrina $\alpha 2\beta 1$ (Lin y cols., 2007), en lo que además se sugiere que la interacción entre Cyr61 y la integrina $\alpha \nu\beta 3$ promueve la formación de metástasis peritoneales (Holloway y cols., 2005). Coincidentemente dicha interacción permite la unión de CAV1 a este complejo entre Cyr61 y la integrina $\alpha \nu\beta 3$ en modelo de células epiteliales bronquiales (Jin y cols., 2009).

Las proteínas S100 son una familia de proteínas que unen calcio y se encuentran junto a caveolinas como carga en exosomas derivados de muestras de carcinoma hepatocelular metastásico (He y cols., 2015). Entre sus miembros es importante destacar la presencia de S100A9. Ésta se correlaciona con una supervivencia general alterada en pacientes con cáncer de mama (Bergenfelz y cols., 2015; Miller y cols., 2017). Además se ha descrito que promueve el *homing* o destinación de células tumorales a nichos pre-metastásicos (Hiratsuka y cols., 2006).

Los tres candidatos proteicos mencionados, así como CAV1 fueron validados por *Western blot* tanto en muestras de EVs de MDA-MB-231 WT y shC que contienen CAV1 (Figura 8E). Alternativamente, la proteína Rap1A relacionada con Ras, cuya señalización ha demostrado participar en la regulación de la adhesión celular y en la

expresión de metaloproteinasas de matriz (MMP) (Zhang y cols., 2017), fue menos detectada en las EVs de shCAV1 en comparación con las EVs de WT y de shC por *Western Blot* (datos no mostrados). El mismo resultado se observó al momento de validar la presencia de CTGF en las muestras de EVs, lo cual contrasta con el resultado obtenido por análisis de espectrometría de masas. Una posible respuesta a esto último podría deberse al tipo de estrategia utilizada para obtener los péptidos de las muestras de EVs. Si bien la estrategia que se utilizó para identificar a las proteínas de las EVs que contenían o no CAV1 corresponde a una herramienta poderosa para la identificación y caracterización de proteínas con modificaciones post-traduccionales (Shevchenko y cols., 1996), esta se basó en un protocolo en donde inicialmente las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida, el cual posteriormente fue disgregado y digerido enzimáticamente para luego ser analizado por espectrometría de masas. Dicho método puede presentar varios inconvenientes al momento de obtener una identificación detallada de las proteínas de una muestra problema, ya que puede haber una baja accesibilidad de las proteasas y otros reactivos digestivos a las proteínas atrapadas en el gel, así como una baja recuperación de péptidos grandes y/o hidrófobos de los geles (Jonsson y cols., 2001). En lo que se añade que estos inconvenientes pueden ser especialmente problemáticos para el estudio de proteínas de membrana que típicamente contienen péptidos hidrófobos, y para la ubicación y determinación de modificaciones postraduccionales, ya que los residuos modificados y los segmentos de proteínas pueden escapar a la detección (Luque-García y cols., 2006; Luque-García y cols., 2008). Esto también podría evitarse con el uso de espectrometría de masa cuantitativa en el futuro.

Lactadherina

Por otro lado, no se observaron cambios en las tres muestras de EVs para lactadherina, un novedoso marcador de EVs de adherencia celular (van Niel y cols., 2018), y la

cadherina de endotelio vascular (VE-cadherina), una proteína que puede modular la progresión tumoral y la metástasis (Rezaei y cols., 2018). Estas observaciones sugieren que la carga de estas últimas proteínas en EVs no está necesariamente relacionada a la presencia de CAV1. Por lo tanto, aparentemente no serían necesarias para potenciar la capacidad invasora de CAV1 en células MDA-MB-231.

Complementamos estos resultados evaluando como control la presencia de Cyr61, tenascina, S100A9, lactadherina, VE-cadherin y β -actina en lisados celulares (Figura 8D) y observamos que los niveles de todas estas proteínas fueron similares en los lisados de las células MDA-MB-231 WT, MDA-MB-231(shC) y MDA-MB-231(shCAV1). De esta manera podemos sugerir que la ausencia de CAV1 no estaría modulando los niveles totales de las proteínas analizadas aquí. Estos resultados van en la misma línea con varios artículos científicos que muestran que el contenido proteico de las muestras de EVs no necesariamente refleja el contenido proteico general observado en los lisados celulares (Cancemi y cols., 2010; Palazzolo y cols., 2012; Lazar y cols., 2015). Por lo tanto, las alteraciones observadas en el contenido de las EVs en función de la presencia de CAV1 sugieren que esta proteína podría estar involucrada en la regulación de la maquinaria implicada en la determinación del contenido de las EVs como sugiere el grupo de Del Pozo (Albacete-Albacete y cols., 2018). Pero una vez más, los mecanismos por los cuales esto ocurre quedan pendientes en definir en estudios futuros.

Modelo de carcinomatosis intraperitoneal

En relación al modelo *in vivo* de carcinomatosis peritoneal utilizado para evaluar el efecto biológico de las vesículas que contienen o no CAV1, debemos decir que ha sido elegido por su semejanza a uno de los estadios más avanzados del cáncer de mama que

implica el desarrollo de nódulos tumorales y ascitis maligna en la cavidad peritoneal en una paciente donde sólo queda la aplicación de terapias paliativas (Cardi y cols., 2013; Sheen-Chen y cols., 2008; Bertozzi y cols., 2015). Específicamente en este modelo se observan tumores en órganos tales como mesenterio y/o bazo/páncreas como también en casos de peor pronóstico se observa un aumento en el volumen de líquido ascítico que concuerda con un aumento en el número de células tumorales presentes en la cavidad peritoneal (Stollfuss y cols., 2015).

Se debe tener en cuenta que para que la cavidad peritoneal sea un lugar propicio para el desarrollo de tumores y formación de ascitis maligna se requiere que las células tumorales que hayan sido inoculadas en este lugar sean capaces de evadir *anoikis* y adherirse al mesotelio de la cavidad peritoneal (Ceelen y cols., 2015). Entre las moléculas que facilitan la adhesión a este tejido y con ello facilitan la diseminación peritoneal, se han descrito ciertos miembros de la familia de integrinas presentes en las células tumorales, como por ejemplo, las subunidades de integrinas $\alpha 2$ y $\beta 1$ que también han sido descritas en células MDA-MB-231 (Lundström y cols., 1998). Por otro lado, también se mencionan algunas moléculas derivadas de la matriz extracelular que favorecen esta adhesión, como por ejemplo, laminina, colágeno I y fibronectina, las cuales se encuentran presentes en las células mesoteliales de la cavidad peritoneal o en el bazo (Ceelen y cols., 2015 Lokmic y cols., 2008).

Fibronectina

Cabe recalcar que fibronectina es una de las glicoproteínas de matriz extracelular que fue hallada sólo en EVs que cargan CAV1 (EVs de MDA-MB-231 WT y shC (Tabla 1 suplementaria)). De esta manera su carga en EVs con CAV1 podría estar favoreciendo la adhesión tanto de células MDA-MB-231 WT (Figura 10), T47-D (Figura 11) y

MDA-MB-231(shC) y/o shCAV1 (Figura 12) en órganos de la cavidad peritoneal, específicamente en bazo o mesenterio.

Una vez que las células han logrado adherirse, éstas deben crear un microambiente favorable para la proliferación sostenida de estas células, en lo que se incluye capacidad de invasión del mesotelio y membrana basal, supresión de la apoptosis e inducción de la angiogénesis, entre otros (Ceelen y cols., 2015; Jayne y cols., 2007). Si bien ninguna metaloproteinasa fue identificada en las EVs que cargan CAV1 mediante espectrometría de masas como posible responsable del aumento en la invasión observada *in vitro* (Figuras 6 y 7) o en la invasión de los órganos blanco como bazo/páncreas o mesenterio en el modelo *in vivo* (Figuras 10-12), se debe mencionar que las proteínas candidatas asociadas a adhesión biológica descritas sólo en EVs que contienen CAV1 (Figura 8C), como Cyr61, tenascina y S100A9, también se les asocia un rol en invasión y angiogénesis en el tejido blanco idóneo para crecimiento tumoral.

Tenascina

Por otro lado, tenascina que corresponde a una glicoproteína de matriz extracelular, se ha asociado inversamente con bajos niveles estromales de CAV1 en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (Onion y cols., 2018), pero se ha relacionado con vías que apoyan la viabilidad de células de cáncer de mama iniciadoras de metástasis y se ha descrito como un componente de la matriz extracelular del nicho metastásico (Yoshida y cols., 1995; Adams y cols., 2002; Oskarsson y cols., 2011). Adicionalmente, se ha descrito que Tenascina-C es capaz de promover migración y proliferación independiente de anclaje en células de cáncer de mama no metastásico como MDA-MB-435 (Calvo y cols., 2008) y además es capaz de regular la angiogénesis tumoral a través del control de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Tanaka y cols.,

2004). En lo que cabe mencionar que VEGF, en particular VEGF-A sería capaz de incrementar la permeabilidad vascular a nivel local y con ello, aumentar el suministro de nutrientes al tumor en la cavidad peritoneal. Cabe añadir que sería capaz de activar la quinasa de adhesiones focales (FAK), lo cual conllevaría a la desestabilización de las uniones entre células endoteliales lo que finalmente conduciría a la formación de ascitis maligna (Ceelen y cols., 2015). La formación de ascitis *per se* promueve en mayor medida el desarrollo de metástasis a través de la acumulación de nutrientes y citoquinas en el fluido peritoneal, lo que al mismo tiempo es indicativo de mal pronóstico de la enfermedad (Ceelen y cols., 2015). Con respecto al rol de S100A9 descrito en el modelo de melanoma, B16F10, esta proteína junto con S100A8 sería capaz de estimular la expresión de las metaloproteinasas de la matriz asociadas con la metástasis tumoral, como también sería capaz de promover la migración quimiotáctica de estas células de una manera dependiente del receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE) (Srikrishna y cols., 2012).

Por otro lado, se debe mencionar que se identificó también por espectrometría de masa el inhibidor tisular de metaloproteinasa-2 (TIMP-2) hallado exclusivamente en EVs que no cargan CAV1, el cual pudo haber tenido un rol al momento de disminuir la invasión de células MDA-MB-231 expuestas a EVs que no contienen CAV1 a nivel *in vitro* e *in vivo* (Figuras 6D, 7D y 10B y C), ya que por literatura se conoce que células MDA-MB-231 expresan metaloproteinasas de tipo-2 (MMP-2), la cual puede ser inhibida por TIMP-2 (Bernardo y cols., 2003).

En resumen, aquí se logró reportar sobre la presencia de CAV1 en EVs secretados por la línea celular de cáncer de mama metastásico MDA-MB-231, que fue capaz de promover la migración e invasión *in vitro* de las mismas células, así como en una línea celular de cáncer de mama no metastásico. Como consecuencia, estos

hallazgos implican a las EVs en eventos de señalización autocrina y paracrina, que favorecen la migración y la invasión de células recipientes, posiblemente mediante la transferencia de proteínas implicadas en la adhesión (Figura 13). Si bien es claramente prometedor, se requiere mucho más trabajo para determinar cómo la presencia o ausencia de CAV1 en EVs afecta la función de estas vesículas provenientes de cáncer de mama de una manera tan profunda.

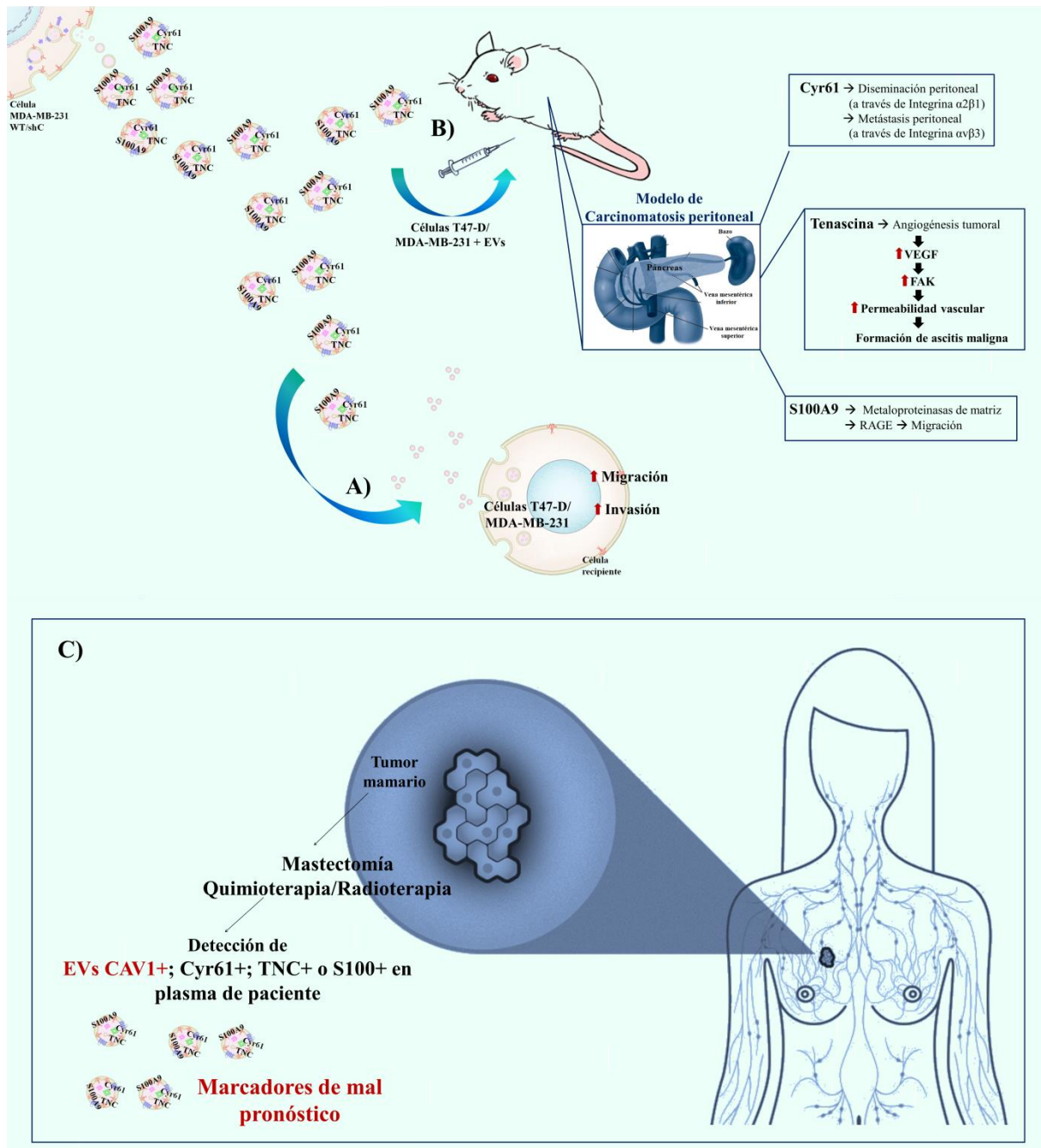


Figura 13: Modelo esquemático de cómo CAV1 junto a proteínas asociadas a adhesión como Cyr61, Tenascina (TNC) y S100A9 podrían estar favoreciendo migración, invasión y metástasis. A) Células MDA-MB-231 WT y shC liberan EVs ricas en CAV1, Cyr61, TNC y S100A9. La incubación de estas EVs con células T47-D o con células MDA-MB-231 da lugar a una mayor capacidad migratoria e invasiva de estas células independiente si expresan o no niveles endógenos de CAV1. **B)** Cuando se evalúa el rol de CAV1 en EVs en el modelo *in vivo* de carcinomatosis peritoneal de cáncer de mama, se observó que estas EVs promovían la formación de tumores retroperitoneales en bazo/páncreas y mesenterio junto con la formación de ascitis maligna en la cavidad peritoneal. Interesantemente, Cyr61 se le ha asignado un rol en promover adhesión e invasión en un modelo de carcinomatosis peritoneal de cáncer gástrico. *Continúa en página siguiente.*

En lo que se añade que TNC puede promover la formación de ascitis maligna a través de un aumento en la permeabilidad celular mediado por el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y a un aumento en la expresión de la quinasa de adhesiones focales (FAK). En el caso de S100A9, se describe que es capaz de promover migración e invasión de células tumorales mediante la activación del receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE) y activación de metaloproteinasas de matriz, respectivamente. C) La posible detección de EVs que contienen CAV1 junto con Cyr61, TNC o S100A9 en muestras de plasma de pacientes con cáncer de mama que ya han pasado por mastectomía, tratamiento con quimioterapia y/o radioterapia puede ser indicativo de mal pronóstico, ya que sería un indicio de una posible recidiva de parte de este cáncer o el desarrollo de metástasis propiamente tal.

6. REFERENCIAS

Referencias de sitios web:

1. <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/seno/Patient/page2>
 2. http://docs.abcam.com/pdf/general/secreted_extracellular_vesicles_web.pdf
 3. http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/wpcontent/uploads/2011/02/DLS_Terms_defined_Malvern.pdf
 4. <http://www.materials-talks.com/blog/2014/10/23/polydispersity-what-does-it-mean-for-dls-and-chromatography/>
- Adams M, Jones J, Walker RA, Pringle JH, Bell SC. (2002) Changes in tenascin-C isoform expression in invasive and preinvasive breast disease. *Cancer Res* 62, 3289-3297.
 - Albacete-Albacete L, Navarro-Lerida I, Lopez JA, Martin-Padura I, Astudillo AM, Van-Der-Heyden M, Balsinde J, Orend G, Vazquez J, del Pozo MA. (2018) ECM deposition is driven by caveolin1-dependent regulation of exosomal biogenesis and cargo sorting. *bioRxiv* 405506; doi: <https://doi.org/10.1101/405506>.
 - Andreu Z, Yanez-Mo M. (2014) Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol* 5, 442.
 - Ayala GE, Dai H, Tahir SA, Li R, Timme T, Ittmann M, Frolov A, Wheeler TM, Rowley D, Thompson TC. (2006) Stromal antiapoptotic paracrine loop in perineural invasion of prostatic carcinoma. *Cancer Res* 66:5159–5164.
 - Azmi AS, Bao B, Sarkar FH. (2013) Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev* 32, 623-642.
 - Banegas MP, Püschel K, Martínez-Gutiérrez J, Anderson JC, Thompson B. (2012). Perceived and objective breast cancer risk assessment in Chilean women living in an underserved area. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 21(10):1716-21.
 - Bartz R, Zhou J, Hsieh JT, Ying Y, Li W, Liu P.(2008) Caveolin-1 secreting LNCaP cells induce tumor growth of caveolin-1 negative LNCaP cells in vivo. *Int J Cancer* 122:520–525.
 - Bergenfelz C, Gaber A, Allaoui R et al. (2015) S100A9 expressed in ER(-)PgR(-) breast cancers induces inflammatory cytokines and is associated with an impaired overall survival. *Br J Cancer* 113, 1234-1243.
 - Bernardo M M, & Fridman R. (2003) TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP. *Biochemical Journal*, 374(3), 739-745.
 - Bertozzi S, Londero AP, Cedolini C, Uzzau A, Seriau L, Bernardi S & Risaliti A. (2015) Prevalence, risk factors, and prognosis of peritoneal metastasis from breast cancer. *SpringerPlus*, 4(1), 688.
 - Bobrie A, Krumeich S, Reyat F, Recchi C, Moita LF, Seabra MC, Ostrowski M, Thery C (2012) Rab27a supports exosomedependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression. *Cancer Res* 72:4920–4930.
 - Boscher C, Nabi IR. (2012) Caveolin-1: role in cell signaling. *Adv Exp Med Biol*. 729:29-50.

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, & Jemal A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*.
- Burgermeister E, Liscovitch M, RÖcken C, Schmid RM, Ebert MP. (2008) Caveats of caveolin-1 in cancer progression. *Cancer Lett.* 268:187–201.
- Calvo A, Catena R, Noble MS, Carbott D, Gil-Bazo I, Gonzalez-Moreno O & Merlino G. (2008). Identification of VEGF-regulated genes associated with increased lung metastatic potential: functional involvement of tenascin-C in tumor growth and lung metastasis. *Oncogene*, 27(40), 5373.
- Camussi G, Derigibus MC, Bruno S, Cantaluppi V & Biancone L. (2010) Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int.* 78, 838–848.
- Cardi, M., Sammartino, P., Framarino, M. L., Biacchi, D., Cortesi, E., Sibio, S., ... & di Giorgio, A. (2013). Treatment of peritoneal carcinomatosis from breast cancer by maximal cytoreduction and HIPEC: a preliminary report on 5 cases. *The Breast*, 22(5), 845-849.
- Cancemi P, Di Cara G, Albanese N et al. (2010) Large-scale proteomic identification of S100 proteins in breast cancer tissues. *BMC Cancer* 10, 476.
- Cao H, Courchesne WE, y Mastick CC. (2002) A phosphotyrosine-dependent protein interaction screen reveals a role for phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14: recruitment of C-terminal Src kinase. *J Biol Chem* 277, 8771-8774.
- Cao H, Sanguinetti AR, y Mastick CC. (2004) Oxidative stress activates both Src kinases and their negative regulator Csk and induces phosphorylation of two targeting proteins for Csk: caveolin-1 and paxillin. *Experimental cell research* 294, 159-171.
- Cappello F, Logozzi M, Campanella C et al. (2017) Exosome levels in human body fluids: A tumor marker by themselves? *Eur J Pharm Sci* 96, 93-98.
- Ceelen, W. P., & Levine, E. (Eds.). (2015). *Intraperitoneal cancer therapy: principles and practice*. CRC Press.
- Chambers AF, Groom AC. & MacDonald IC. (2002) Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* 2, 563–572.
- Chatterjee M, Ben-Josef E, Thomas DG, Morgan MA, Zalupski MM, Khan G & Bekaii-Saab, T. (2015) Caveolin-1 is associated with tumor progression and confers a multi-modality resistance phenotype in pancreatic cancer. *Scientific reports*, 5, 10867.
- Cheng TY, Wu MS, Hua KT, Kuo ML, Lin MT. (2014) Cyr61/CTGF/Nov family proteins in gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 20, 1694-1700.
- Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI et al. (2017) Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circ Res* 120, 1632-1648.
- Davis MJ, Ha BH, Holman EC, Halaban R, Schlessinger J, Boggon TJ. (2013) RAC1P29S is a spontaneously activating cancer-associated GTPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:912–917.
- del Pozo MA, Balasubramanian N, Alderson NB, Kiosses WB, Grande-Garcia A, Anderson RG, Schwartz MA. (2005) Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization. *Nat Cell Biol* 7:901–908.
- Dikmen ZG, Gellert GC, Jackson S et al (2005) In vivo inhibition of lung cancer by GRN163L: a novel human telomerase inhibitor. *Cancer research*, 65(17), 7866-7873.

- Fais S, O'Driscoll L, Borrás FE et al. (2016) Evidence-Based Clinical Use of Nanoscale Extracellular Vesicles in Nanomedicine. *ACS Nano* 10, 3886-3899.
- Felicetti F, Parolini I, Bottero L, Fecchi K, Errico MC, Raggi C, & Carè A. (2009). Caveolin-1 tumor-promoting role in human melanoma. *International journal of cancer*, 125(7), 1514-1522.
- Greening DW, Xu R, Ji H, Tauro BJ, & Simpson RJ. (2015) A Protocol for Exosome Isolation and Characterization: Evaluation of Ultracentrifugation, Density-Gradient Separation, and Immunoaffinity Capture Methods. *Proteomic Profiling: Methods and Protocols*, 179-209.
- Goetz JG, Joshi B, Lajoie P, Strugnell SS, Scudamore T, Kojic LD, & Nabi IR. (2008) Concerted regulation of focal adhesion dynamics by galectin-3 and tyrosinephosphorylated caveolin-1. *J Cell Biol* 180, 1261-1275.
- Hanahan D, and Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Harris DA, Patel SH, Gucek M, Hendrix A, Westbroek W, Taraska JW (2015) Exosomes Released from Breast Cancer Carcinomas Stimulate Cell Movement. *PLoS ONE* 10(3): e0117495.
- He M, Qin H, Poon TC et al. (2015) Hepatocellular carcinoma-derived exosomes promote motility of immortalized hepatocyte through transfer of oncogenic proteins and RNAs. *Carcinogenesis* 36, 1008-1018.
- Hessvik NP, Sandvig K, Llorente A. (2013) Exosomal miRNAs as Biomarkers for Prostate Cancer. *Front Genet* 4, 36.
- Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, Maru Y. (2006) Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol*. Dec;8(12):1369-1375.
- Holbourn KP, Acharya KR, Perbal B. (2008) The CCN family of proteins: structure-function relationships. *Trends Biochem Sci* 33, 461-473.
- Holloway SE, Beck AW, Girard L, Jaber MR, Barnett Jr CC, Brekken RA, & Fleming JB. (2005) Increased expression of Cyr61 (CCN1) identified in peritoneal metastases from human pancreatic cancer. *Journal of the American College of Surgeons*, 200(3), 371-377.
- Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL et al. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527, 329-335
- Huang YT, Lan Q, Lorusso G, Duffey N, Ruegg C. (2017) The matricellular protein CYR61 promotes breast cancer lung metastasis by facilitating tumor cell extravasation and suppressing anoikis. *Oncotarget* 8, 9200-9215.
- Jaffe AB, Hall A (2005) Rho GTPases: Biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:247–269.
- Jayne D. (2007) Molecular biology of peritoneal carcinomatosis. In *Peritoneal Carcinomatosis* (pp. 21-33). Springer, Boston, MA.
- Jeppesen DK, Hvam ML, Primdahl-Bengtson B et al. (2014) Comparative analysis of discrete exosome fractions obtained by differential centrifugation. *J Extracell Vesicles* 3, 25011.
- Jin Y, Kim HP, Cao J, Zhang M, Ifedigbo E, Choi AM. (2009) Caveolin-1 regulates the secretion and cytoprotection of Cyr61 in hyperoxic cell death. *FASEB J* 23, 341-350.
- Jonsson AP, Aissouni Y, Palmberg C, Percipalle P, Nordling E, Daneshmandi B, Jorvall H, Bergman T. (2001) Recovery of gel-separated proteins for in-solution digestion and mass spectrometry. *Anal Chem*. 73:5370–5377.

- Kahlert C, Kalluri R. (2013) Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med (Berl)* 91, 431-437.
- Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D et al. (2016) ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J Mol Biol* 428, 688-692.
- Kesimer M & Gupta R. (2015) Physical characterization and profiling of airway epithelial derived exosomes using light scattering. *Methods*, 87, 59-63.
- Kimura A, Mora S, Shigematsu S, Pessin JE, y Saltiel AR. (2002) The insulin receptor catalyzes the tyrosine phosphorylation of caveolin-1. *J Biol Chem* 277, 30153- 30158.
- Lazar I, Clement E, Ducoux-Petit M et al. (2015) Proteome characterization of melanoma exosomes reveals a specific signature for metastatic cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res* 28, 464-475.
- Lener T, Gimona M, Aigner L et al. (2015) Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles* 4, 30087.
- Li S, Seitz R, y Lisanti MP. (1996) Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. *J Biol Chem* 271, 3863-3868.
- Lin MT, Chang CC, Lin BR, Yang HY, Chu CY, Wu MH, & Kuo ML. (2007). Elevated expression of Cyr61 enhances peritoneal dissemination of gastric cancer cells through integrin $\alpha 2\beta 1$. *Journal of Biological Chemistry*, 282(47), 34594-34604.
- Liu, P., Rudick, M., & Anderson, R. G. (2002). Multiple functions of caveolin-1. *J Biol Chem* 277: 41295–41298.
- Llorente A, de Marco MC, Alonso MA. (2004) Caveolin-1 and MAL are located on prostasomes secreted by the prostate cancer PC-3 cell line. *J Cell Sci* 117, 5343-5351.
- Lobos-Gonzalez L, Aguilar L, Diaz J y cols. (2013) E-cadherin determines Caveolin-1 tumor suppression or metastasis enhancing function in melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res* 26, 555-570.
- Logozzi M, De Milito A, Lugini L y cols. (2009) High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One* 4, e5219.
- Lokmic Z, Lämmermann T, Sixt M, Cardell S, Hallmann R, & Sorokin L. (2008) The extracellular matrix of the spleen as a potential organizer of immune cell compartments. In *Seminars in immunology* (Vol. 20, No. 1, pp. 4-13). Academic Press.
- Lugini L, Matarrese P, Tinari A et al. (2006) Cannibalism of live lymphocytes by human metastatic but not primary melanoma cells. *Cancer research*, 66(7), 3629-3638.
- Luque-Garcia JL, Zhou G, Sun TT & Neubert TA. (2006) Use of nitrocellulose membranes for protein characterization by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem*. 78:5102–5108.
- Luque-Garcia JL, Zhou G, Spellman DS, Sun TT, & Neubert TA. (2008) Analysis of electroblotted proteins by mass spectrometry: protein identification after Western blotting. *Molecular & cellular proteomics*, 7(2), 308-314.
- Lundström A, Holmbom J, Lindqvist C, y Nordström T. (1998) The role of $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$ integrin receptors in the initial anchoring of MDA-MB-231 human breast cancer cells to cortical bone matrix. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 250, no. 3, pp. 735–740.

- Mastick CC, Brady MJ, y Saltiel AR (1995) Insulin stimulates the tyrosine phosphorylation of caveolin. *J Cell Biol* 129, 1523-1531.
- Mastick CC, y Saltiel AR. (1997) Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of caveolin is specific for the differentiated adipocyte phenotype in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 272, 20706-20714.
- Melo SA, Sugimoto H, O'Connell JT, Kato N, Villanueva A, Vidal A & Kalluri R. (2014) Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell*, 26(5), 707-721.
- Miller P, Kidwell KM, Thomas D et al. (2017) Elevated S100A8 protein expression in breast cancer cells and breast tumor stroma is prognostic of poor disease outcome. *Breast Cancer Res Treat* 166, 85-94.
- Navarro A, Anand-Apte B, Parat MO. (2004) A role for caveolae in cell migration. *FASEB J.* 18: 1801–1811.
- Núñez-Wehinger S, Ortiz RJ, Díaz N, Díaz J, Lobos-González L, Quest AF (2014) Caveolin-1 in cell migration and metástasis. *Curr Mol Med.* 14(2):715-735.
- Miller P, Kidwell KM, Thomas D et al. (2017) Elevated S100A8 protein expression in breast cancer cells and breast tumor stroma is prognostic of poor disease outcome. *Breast Cancer Res Treat* 166, 85-94.
- Mol EA, Goumans MJ, Doevendans PA, Sluijter JPG, Vader P. (2017) Higher functionality of extracellular vesicles isolated using size-exclusion chromatography compared to ultracentrifugation. *Nanomedicine* 13, 2061-2065.
- Onion D, Isherwood M, Shridhar N et al. (2018) Multicomponent analysis of the tumour microenvironment reveals low CD8 T cell number, low stromal caveolin-1 and high tenascin-C and their combination as significant prognostic markers in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 9, 1760-1771.
- Ortiz R, Díaz J, Díaz N et al. (2016) Extracellular matrix-specific Caveolin-1 phosphorylation on tyrosine 14 is linked to augmented melanoma metastasis but not tumorigenesis. *Oncotarget*, 7(26), 40571.
- Oskarsson T, Acharyya S, Zhang XH et al. (2011) Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nat Med* 17, 867-874.
- Palazzolo G, Albanese NN, Di Cara G, Gyax D, Vittorelli ML, Pucci-Minafra IDA. (2012) Proteomic analysis of exosome-like vesicles derived from breast cancer cells. *Anticancer research*, 32(3), 847-860.
- Quest AF, Gutierrez-Pajares JL, Torres VA. (2008) Caveolin-1: an ambiguous partner in cell signalling and cancer. *J Cell Mol Med.* 12(4):1130-1150.
- Quest AF, Lobos-Gonzalez L, Nunez S, Sanhueza C, Fernandez JG, Aguirre A, y cols. (2013) The caveolin-1 connection to cell death and survival. *Curr Mol Med.* 13(2):266-281.
- Ravid D, Maor S, Werner H. & Liscovitch M. (2006) Caveolin-1 inhibits anoikis and promotes survival signaling in cancer cells. *Adv Enzyme Regul*, 46, 163-175.
- Rezaei M, Cao J, Friedrich K et al. (2018) The expression of VE-cadherin in breast cancer cells modulates cell dynamics as a function of tumor differentiation and promotes tumor-endothelial cell interactions. *Histochem Cell Biol* 149, 15-30.
- Rizzo V, Morton C, DePaola N, Schnitzer JE, y Davies PF. (2003) Recruitment of endothelial caveolae into mechanotransduction pathways by flow conditioning in vitro. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 285, H1720-1729.

- Salanueva IJ, Cerezo A, Guadamillas MC, Del Pozo MA. (2007) Integrin regulation of caveolin function. *J Cell Mol Med* 11:969–980.
- Salomon C, Ryan J, Sobrevia L et al. (2013) Exosomal signaling during hypoxia mediates microvascular endothelial cell migration and vasculogenesis. *PLoS One* 8, e68451.
- Sawada N, Taketani Y, Amizuka N, Ichikawa M, Ogawa C, Nomoto K, Nashiki K, Sato T, Arai H, Isshiki M, Segawa H, Yamamoto H, et al. (2007) Caveolin-1 in extracellular matrix vesicles secreted from osteoblasts. *Bone* 41:52–58.
- Senetta R., Stella G., Pozzi E., Sturli N., Massi D., Cassoni P. (2013) Caveolin-1 as a promoter of tumour spreading: when, how, where and why. *J. Cell Mol. Med.*, 17 (3): 325–336.
- Shao H, Im H, Castro CM, Breakefield X, Weissleder R, Lee H. (2018) New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles. *Chem Rev* 118, 1917-1950.
- Sheen-Chen SM, Liu YW, Sun CK, Lin SE, Eng HL, Huang WT, Ko SF (2008) Abdominal carcinomatosis attributed to metastatic breast carcinoma. *Dig Dis Sci* 53(11):3043–3045.
- Shen, Q., Lee, E. S., Pitts, R. L., Wu, M. H., & Yuan, S. Y. (2010) Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 Regulates Matrix Metalloproteinase-2–Mediated Endothelial Barrier Dysfunction and Breast Cancer Cell Transmigration through Lung Microvascular Endothelial Cells. *Molecular Cancer Research*, 1541-7786.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 68:850–858.
- Srikrishna, G. (2012). S100A8 and S100A9: new insights into their roles in malignancy. *Journal of innate immunity*, 4(1), 31-40.
- Stollfuss J, Landvogt N, Abenstein M, et al. (2015) Non-invasive imaging of implanted peritoneal carcinomatosis in mice using PET and bioluminescence imaging. *EJNMMI Res.* 5(1):125.
- Sugarbaker PH. (1993) Metastatic inefficiency: the scientific basis for resection of liver metastases from colorectal cancer. *J. Surg. Oncol. Suppl.* 3, 158–160.
- Tahir SA, Yang G, Ebara S, Timme TL, Satoh T, Li L, Goltsov A, Ittmann M, Morrisett JD, Thompson TC. (2001) Secreted caveolin-1 stimulates cell survival/clonal growth and contributes to metastasis in androgen-insensitive prostate cancer. *Cancer Res* 61:3882–3885.
- Tahir SA, Frolov A, Hayes TG et al. (2006) Preoperative serum caveolin-1 as a prognostic marker for recurrence in a radical prostatectomy cohort. *Clin Cancer Res* 12, 4872-4875.
- Tanaka K, Hiraiwa N, Hashimoto H, Yamazaki Y, & Kusakabe M. (2004) Tenascin- C regulates angiogenesis in tumor through the regulation of vascular endothelial growth factor expression. *International journal of cancer*, 108(1), 31-40.
- Taylor DD, Gercel-Taylor C. (2011) Exosomes/microvesicles: mediators of cancer associated immunosuppressive microenvironments. *Semin Immunopathol.* 33:441–454.
- Théry C, Amigorena S, Raposo G, & Clayton A. (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, 3-22.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 65(2):87-108.
- Torres VA, Tapia JC, Rodriguez DA, Lladser A, Arredondo C, Leyton L, y Quest AF (2007). E-cadherin is required for caveolin-1-mediated down-regulation of the

inhibitor of apoptosis protein survivin via reduced beta-catenin-Tcf/Lef-dependent transcription. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7703–7717.

- Tsai MS, Bogart DF, Castaneda JM, Li P, Lupu R. (2002) Cyr61 promotes breast tumorigenesis and cancer progression. *Oncogene* 21, 8178-8185.
- Tu YF, Kaiparettu BA, Ma Y, & Wong LJC. (2011) Mitochondria of highly metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231 exhibits increased autophagic properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807(9), 1125-1132.
- Urrea H, Torres VA, Ortiz RJ et al. (2012) Caveolin-1-enhanced motility and focal adhesion turnover require tyrosine-14 but not accumulation to the rear in metastatic cancer cells. *PLoS One* 7, e33085.
- van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. (2018) Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 213-228.
- Volonte D, Galbiati F, Pestell RG, y Lisanti MP. (2001) Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 (Tyr(14)) via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Src kinase. Evidence for caveolae, the actin cytoskeleton, and focal adhesions as mechanical sensors of osmotic stress. *J Biol Chem* 276, 8094-8103.
- Weiss L. (1990) Metastatic inefficiency. *Adv. Cancer Res.* 54,159–211.
- Welton JL, Brennan P, Gurney M, Webber JP, Spary LK, Carton DG, & Clayton A. (2016) Proteomics analysis of vesicles isolated from plasma and urine of prostate cancer patients using a multiplex, aptamer-based protein array. *Journal of extracellular vesicles*, 5(1), 31209.
- Williams TM, Sotgia F, Lee H, Hassan G, Di Vizio D, Bonuccelli G, Capozza F, Mercier I, Rui H, Pestell RG, Lisanti MP. (2006) Stromal and epithelial caveolin-1 both confer a protective effect against mammary hyperplasia and tumorigenesis: caveolin-1 antagonizes cyclin D1 function in mammary epithelial cells. *Am J Pathol* 169:1784–1801.
- Willms E, Cabanas C, Mager I, Wood MJA, Vader P. (2018) Extracellular Vesicle Heterogeneity: Subpopulations, Isolation Techniques, and Diverse Functions in Cancer Progression. *Front Immunol* 9, 738.
- Xu R, Rai A, Chen M, Suwakulsiri W, Greening DW, & Simpson RJ. (2018) Extracellular vesicles in cancer—Implications for future improvements in cancer care. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 1.
- Yang C, Robbins PD. (2011) The roles of tumor derived exosomes in cancer pathogenesis. *Clin Dev Immunol.* 842849.
- Yoshida T, Ishihara A, Hirokawa Y, Kusakabe M, and Sakakura T. (1995) Tenascin in breast cancer development--is epithelial tenascin a marker for poor prognosis? *Cancer Lett* 90, 65-73.
- Zeringer E, Li M, Barta T. (2013) Methods for the extraction and RNA profiling of exosomes. *World journal of methodology*, 3(1), 11.
- Zhang X, Yuan X, Shi H, Wu L, Qian H, Xu W (2015) Exosomes in cancer: small particle, big player. *J Hematol Oncol* 8, 83.
- Zhang YL, Wang RC, Cheng K, Ring BZ, Su L. (2017) Roles of Rap1 signaling in tumor cell migration and invasion. *Cancer Biol Med* 14, 90-99.
- Zhao H, Achreja A, Iessi E et al. (2018) The key role of extracellular vesicles in the metastatic process. *Biochim Biophys Acta* 1869, 64-77.
- Zijlstra A, Di Vizio D. Size matters in nanoscale communication. (2018) *Nat Cell Biol* 20, 228-230.

6.- ANEXO

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Al inicio de esta tesis doctoral se debió considerar que para obtener una caracterización lo más completa posible de una población enriquecida de vesículas extracelulares del tamaño de exosomas (entre 30 y 150 nm), se requirió del uso de técnicas como dispersión de luz dinámica (DLS) para evaluar el diámetro de las vesículas presentes en la muestra, microscopía electrónica de transmisión (MET) para evaluar su integridad y calidad, como también el tamaño de estas vesículas, ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) para detectar la presencia de marcadores de endosomas presentes en la membrana de las muestras de EVs, como CD63 o CD9 y *western blot* para su caracterización. Es por esto, que se avanzó como descrito a continuación.

I) **Optimización del protocolo de ultracentrifugación para la obtención de EVs**

Cabe mencionar que debido a la discrepancia hallada en la literatura en cuanto al rendimiento obtenido de los protocolos de purificación de EVs mediante ultracentrifugación a partir de sobrenadante de líneas celulares tumorales (Melo y cols., 2014; Lazar y cols., 2015; He y cols., 2015; Greening y cols., 2015; Théry y cols., 2006), se decidió optimizar este protocolo utilizando primero a nuestro modelo de estudio, la línea celular de cáncer de mama metastásico humano MDA-MB-231 que se puede adquirir en ATCC (# HTB-26).

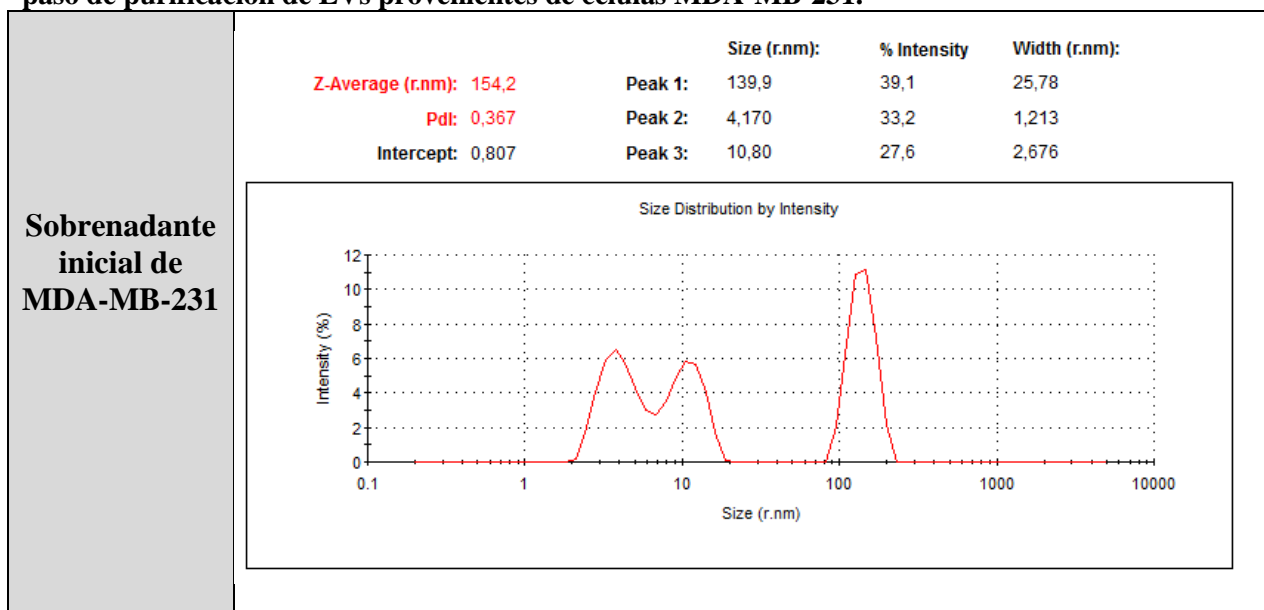
Para esto, en la tabla 2 están resumidos los protocolos realizados, los cuales se diferencian uno del otro de acuerdo al uso del filtro de 0,2 μm al inicio del protocolo (Protocolo 1) o previo al uso de la ultracentrífuga (Protocolo 4), como también el uso de filtro de 0,45 μm previo al uso de la ultracentrífuga (Protocolo 5) o ausencia de filtro

(Protocolo 2 y 3) pero con el uso de colchón de sacarosa (25%) en el protocolo 3. Si bien todos los protocolos dieron lugar a la obtención de una población de partículas que coinciden con el tamaño esperado para exosomas, se debe destacar que todas las muestras analizadas mediante *Dynamic Light Scattering* o dispersión de luz dinámica (DLS) tuvieron una elevada distribución de tamaño y forma, lo cual fue dependiente, en su mayoría, por el tipo de protocolo de purificación utilizado (ref. 3). Teniendo esto en cuenta, el protocolo 4 fue el que presentó una menor distribución de tamaño y forma de las partículas analizadas.

II) Análisis mediante DLS

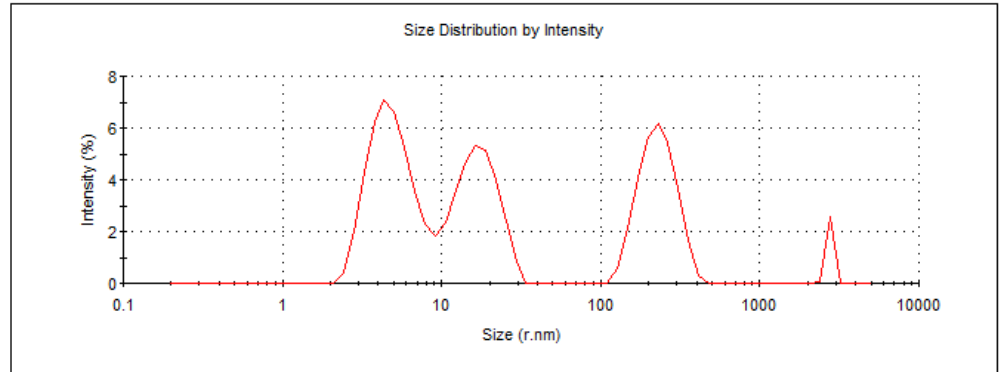
En un principio, quisimos evaluar cada paso de centrifugación de la muestra usando DLS, para así evaluar el tamaño de las partículas que se iban obteniendo y determinar en qué paso ya se iban obteniendo vesículas con el tamaño deseado como para ser considerados una población rica en vesículas del tamaño de exosomas (Figura suplementaria 1).

Figura suplementaria 1: Tamaño de vesículas presentes usando el protocolo 2 de cada paso de purificación de EVs provenientes de células MDA-MB-231.



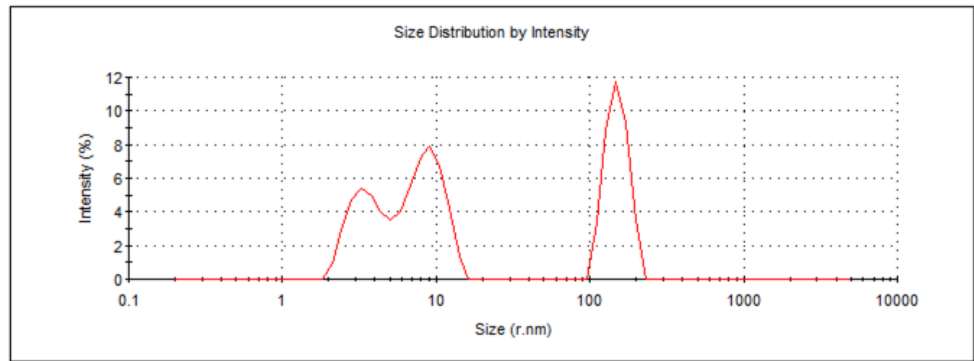
Sobrenadante después de centrifugación a 2000 x g

	Size (r.nm):	% Intensity	Width (r.nm):
Z-Average (r.nm): 65,25	Peak 1: 5,000	38,9	1,604
PdI: 0,396	Peak 2: 16,90	29,4	5,006
Intercept: 0,769	Peak 3: 233,1	29,1	59,76



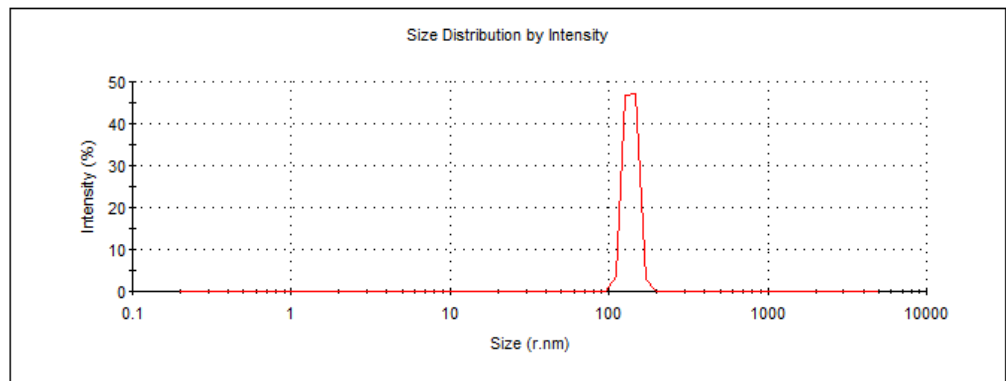
Sobrenadante después de centrifugación a 12.000 x g

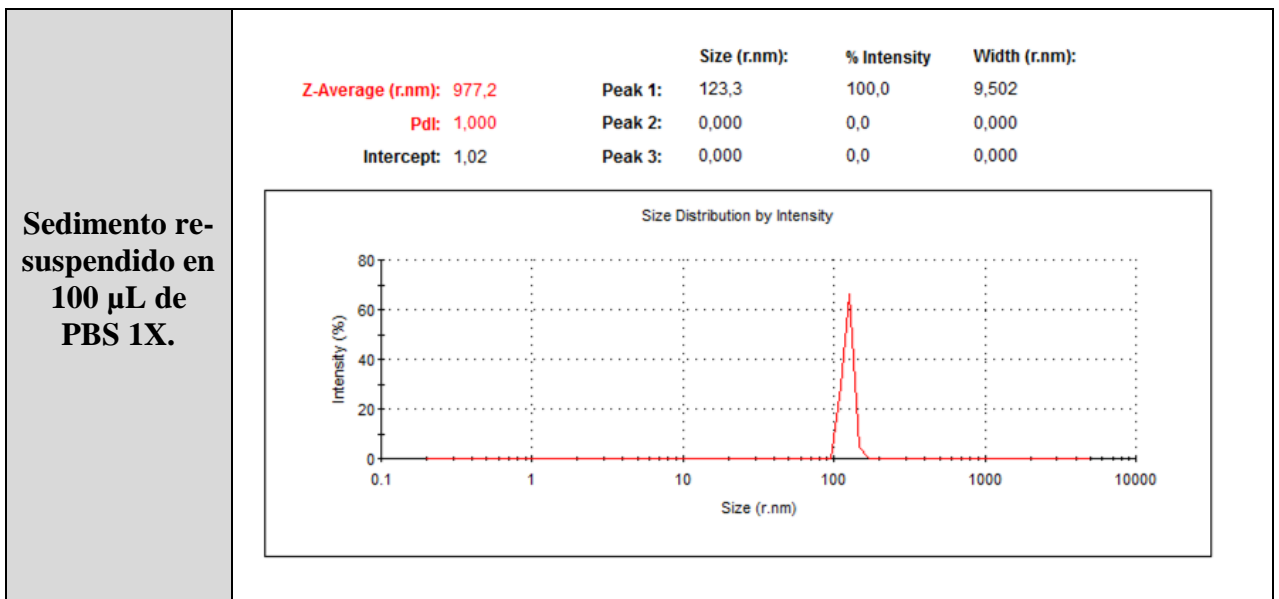
	Size (r.nm):	% Intensity	Width (r.nm):
Z-Average (r.nm): 211,7	Peak 1: 8,605	39,1	2,324
PdI: 0,481	Peak 2: 150,1	35,4	24,49
Intercept: 0,778	Peak 3: 3,542	25,5	0,8579



Sedimento re-suspendido en PBS después de 1° ultra-centrifugación

	Size (r.nm):	% Intensity	Width (r.nm):
Z-Average (r.nm): 561,2	Peak 1: 137,6	100,0	12,30
PdI: 0,866	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,779	Peak 3: 0,000	0,0	0,000





Lo que pudimos observar fue que después de la primera ultracentrifugación, ya se empezó a obtener una población de partículas de 123 nm en promedio que va acorde a las características de tamaño descritas para exosomas (Figura suplementaria 1). Sin embargo, se debe tomar en cuenta el valor del índice de polidispersión (PdI) que indica qué tan estrecha es la distribución Gaussiana de tamaño (Kesimer y cols., 2015; Manual Malvern Zetasizer; ref. 4).

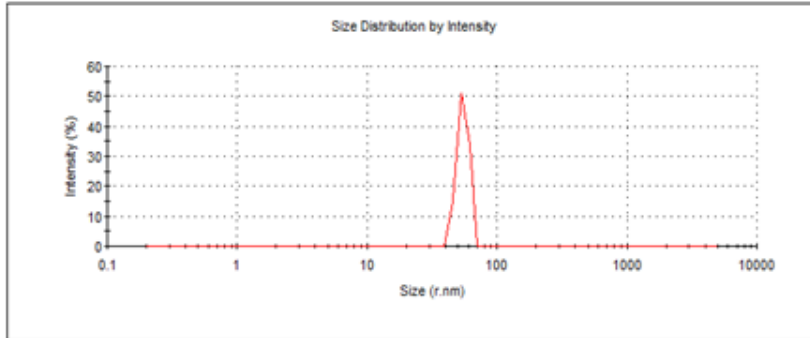
En el caso de la muestra final obtenida mediante el protocolo 2 (Figura suplementaria 1), el valor PdI fue de 1, el cual no se recomienda ya que valores sobre 0.7 indicarían la presencia de una población ampliamente irregular en tamaño y forma (ref. 3), lo cual se puede deber a la presencia de agregados de vesículas o restos de membrana. Es por esto que decidimos modificar el protocolo incluyendo como paso extra el uso un de filtro de 0,2 µm (Protocolo 1 y 4) o de 0,45 µm (Protocolo 5).

Se pudo observar una población enriquecida de este tipo de vesículas que coinciden con el rango de tamaño esperado para una población de exosomas en los 5 protocolos analizados (Figura suplementaria 2) con un tamaño promedio de 54,6 nm para las partículas obtenidas en el protocolo 1; 113,4 nm correspondiente al protocolo 2;

116,5 nm para el protocolo 3; 48,9 nm en el protocolo 4 y 58,4 nm para las partículas pertenecientes al protocolo 5. Debemos confirmar que sólo 3 de ellos son considerados como óptimos para su obtención. La razón de esto último se atribuye al valor denominado *Z-average* (promedio Z) que corresponde al valor más estable dado por la técnica que se calcula a partir de la intensidad de la señal y que provee una medición segura y confiable del tamaño promedio de una distribución de tamaño de las partículas presentes en la muestra. Esto fue observado en los protocolos 1, 4 y 5, no así en los protocolos 2 y 3, cuyos valores de *Z-average* tuvieron una diferencia en más de 200 unidades. Otra razón por la cual estos 3 protocolos fueron considerados como óptimos, se debe nuevamente al valor del índice de polidispersión (PdI) obtenido en cada protocolo que fue menor a 0,7 (ref. 3); en donde se obtuvo un valor PdI para el protocolo 1 de 0,585; 0,442 para el protocolo 4 y 0,533 en el caso del protocolo 5. Específicamente, el protocolo 4 fue considerado como el mejor entre estos 3 protocolos como para ser ocupado en ese momento debido a que la muestra obtenida fue considerada como una población de partículas moderadamente “polidispersas” por encontrarse dentro del rango de 0,1-0,4 (ref. 4).

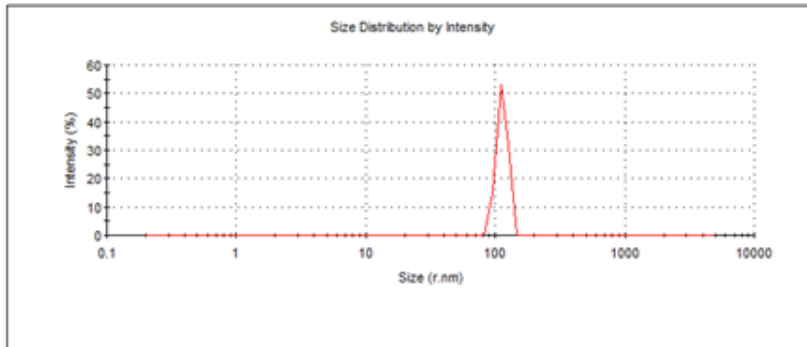
PROTOCOLLO 1

	Size (r.nm):	% Intensity	Width (r.nm):
Z-Average (r.nm): 273,4	Peak 1: 54,61	100,0	5,340
Pdl: 0,585	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 1,16	Peak 3: 0,000	0,0	0,000



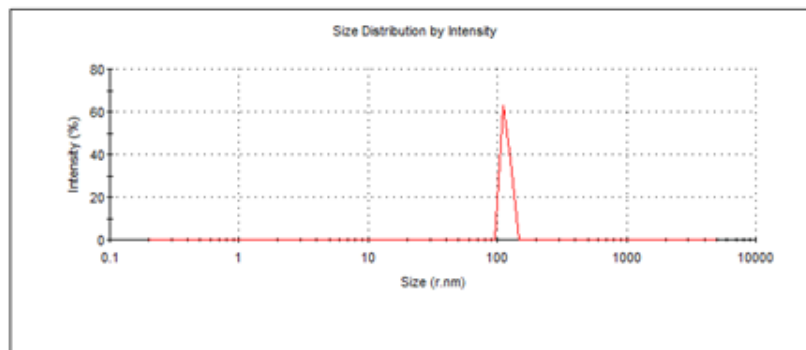
PROTOCOLLO 2

	Size (r.nm):	% Intensity	Width (r.nm):
Z-Average (r.nm): 940,6	Peak 1: 113,4	100,0	10,94
Pdl: 1,000	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,798	Peak 3: 0,000	0,0	0,000



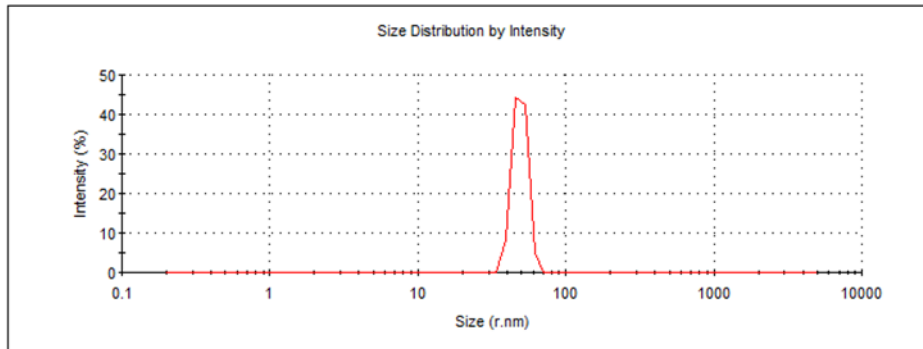
PROTOCOLLO 3

	Size (r.nm):	% Intensity	Width (r.nm):
Z-Average (r.nm): 1152	Peak 1: 116,5	100,0	8,403
Pdl: 1,000	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,837	Peak 3: 0,000	0,0	0,000



PROTOCOLO 4

	Size (r.nm):	% Intensity	Width (r.nm):
Z-Average (r.nm): 238,0	Peak 1: 48,98	100,0	5,134
Pdl: 0,442	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 1,05	Peak 3: 0,000	0,0	0,000



PROTOCOLO 5

	Size (r.nm):	% Intensity	Width (r.nm):
Z-Average (r.nm): 248,0	Peak 1: 58,46	100,0	7,045
Pdl: 0,533	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 1,01	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

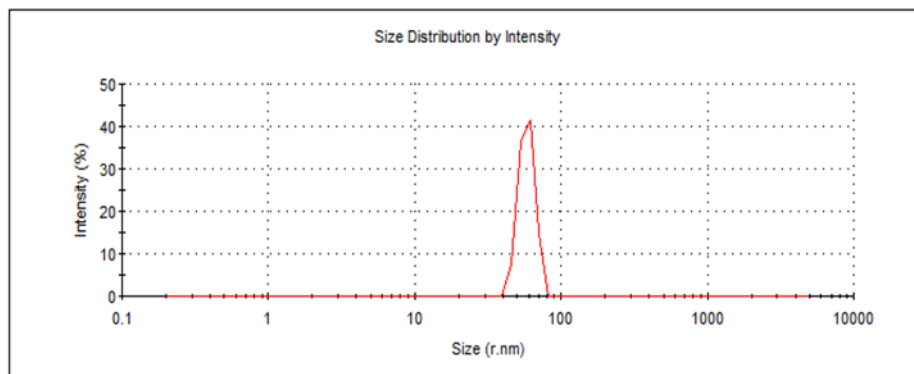


Figura suplementaria 2: Análisis de muestras obtenidas de protocolos de purificación de EVs descritos en tabla 1. Muestras de MDA-MB-231 obtenidas mediante 5 protocolos distintos de ultracentrifugación, en donde hubo variación en el uso de filtro, uso de sacarosa y variación en los tiempos de ultracentrifugación (páginas 74 y 75). Descritos en mayor detalle en la Tabla 2.

III) Caracterización de EVs mediante Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Una vez realizadas las mediciones de las muestras por DLS, se tuvo como objetivo observar la integridad de las vesículas obtenidas de cada protocolo por MET. Cabe destacar que todas las muestras se caracterizaron por la presencia de restos de membrana, lo que explica el valor PDI obtenido de los protocolos realizados, ya que pudo ser atribuido a las desventajas presentadas por la técnica de ultracentrifugación en sí. Sin embargo, pudimos observar vesículas del tamaño esperado (Figura suplementaria 3).

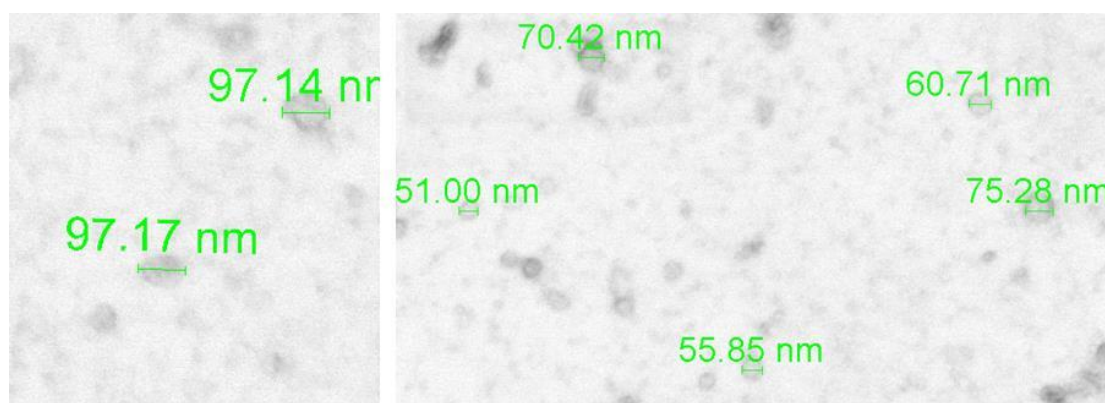


Figura suplementaria 3: Imagen representativa de EVs de MDA-MB-231 obtenidos con el protocolo 5 mediante microscopía electrónica de transmisión. Se midió diámetro de vesículas visualizadas.

Cabe recordar que también tuvimos como objetivo estandarizar un protocolo que nos permitió obtener un mayor rendimiento de estas vesículas, para poder realizar una cuantificación que no exija un volumen abundante de sobrenadante inicial, el cual fue en un principio de 600 mL aproximadamente. Es por esto que decidimos analizar un volumen de sobrenadante de 120 mL.

IV) Caracterización de EVs mediante *Western blot*

Una vez obtenida la muestra de EVs después de varios intentos, se evaluó la presencia del marcador de endosoma, CD9 (~28 kDa), Calnexina (~97 kDa) y CAV1 (~21 kDa)

(Figura suplementaria 4). Cabe mencionar que Calnexina corresponde a un marcador de retículo endoplásmico que no se encuentra en EVs (control negativo). Los resultados confirmaron la presencia de CAV1 en los EVs de la línea celular MDA-MB-231. Por otro lado, también se purificaron EVs a partir de células MDA-MB-231(shC) y MDA-MB-231(shCAV1), las cuales fueron transducidas con una construcción control de horquilla corta para generar células MDA-MB-231 (shC) o fueron silenciadas para CAV1 usando una construcción de horquilla corta específica para CAV1 de manera de generar células MDA-MB-231(shCAV1), como se ha descrito previamente (Urrea y cols., 2012).

Se ve que al silenciar CAV1 en las células MDA-MB-231(shCAV1), no se detectó esta proteína en las EVs cuando se utilizó el protocolo 4 descrito en la tabla 2 (figura suplementaria 4A en el bolsillo 5). Al mismo tiempo es importante mencionar que en el *western blot* también se utilizó el lisado total de las células como control para cada purificación. Al comparar la línea celular MDA-MB-231 con la sublínea celular MDA-MB-231(shCAV1), hubo efectivamente una disminución de los niveles de CAV1 (bolsillo 8 en comparación con el bolsillo 6, respectivamente).

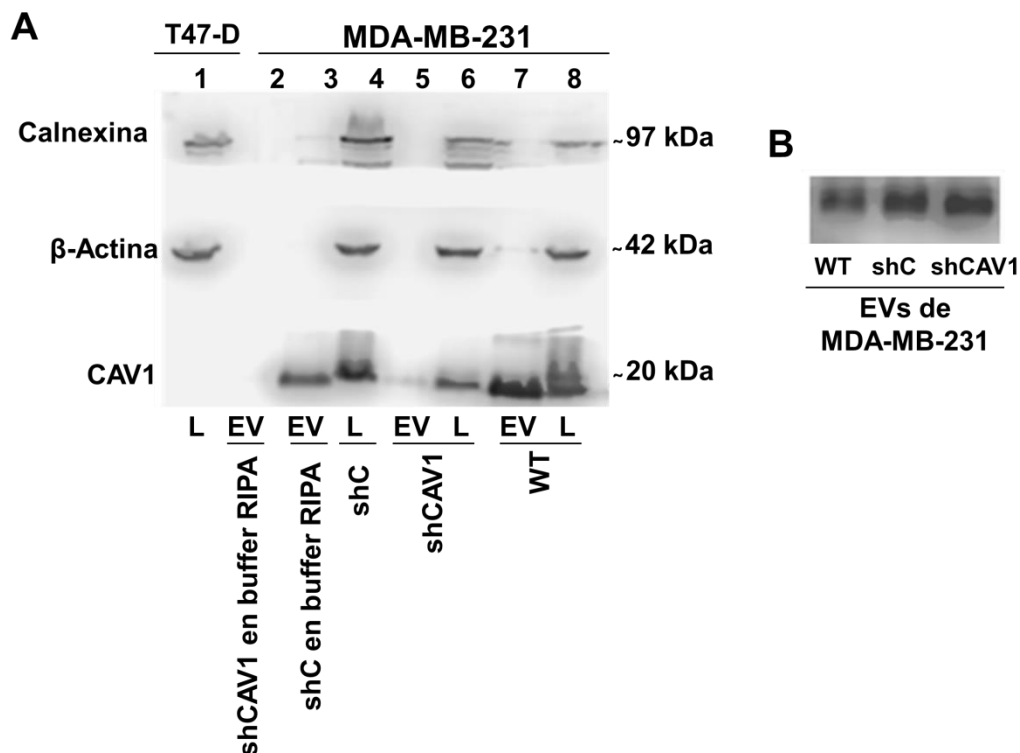


Figura suplementaria 4: Western blot de EVs y lisado celular de MDA-MB-231 WT, shC y shCAV1. Los extractos proteicos de las líneas celulares T47-D, MDA-MB-231 WT, MDA-MB-231(shC) y MDA-MB-231(shCAV1) junto con los extractos proteicos de EVs purificados a partir de 420 mL de sobrenadante de MDA-MB-231 WT, MDA-MB-231(shC) y MDA-MB-231(shCAV1) fueron separados mediante SDS-PAGE 15% y analizados mediante western blot con los anticuerpos: A) anti-CAV1, anti-β-actina, anti-Calnexina y B) anti-CD9. L: Lisado celular; EV: Muestra de vesículas; buffer RIPA: Muestras de EVs tratadas con tampón RIPA y cóctel de inhibidores de proteasas.

Cabe destacar que en las 3 muestras de EVs obtenidas de las líneas celulares MDA-MB-231 (EVs WT), MDA-MB-231(shC) (EVs shC) y MDA-MB-231(shCAV1) (EVs shCAV1) se pudo detectar el marcador de endosoma, CD9 (Figura suplementaria 4B), lo que indica que el protocolo de purificación realizado daría lugar a una muestra rica en exosomas.

Por otra parte, es importante mencionar que contamos con una línea celular de cáncer de mama que no expresa CAV1 que corresponde a un carcinoma no metastásico denominado T47-D (Figura suplementaria 4A, pocillo 1). De esta manera contamos con una línea celular que puede ser estimulada con EVs con CAV1 sin tener el ruido de

CAV1 endógena, lo que facilita evaluar si CAV1 de por sí podría estar promoviendo migración e invasión a través de una comunicación autocrina y/o endocrina.

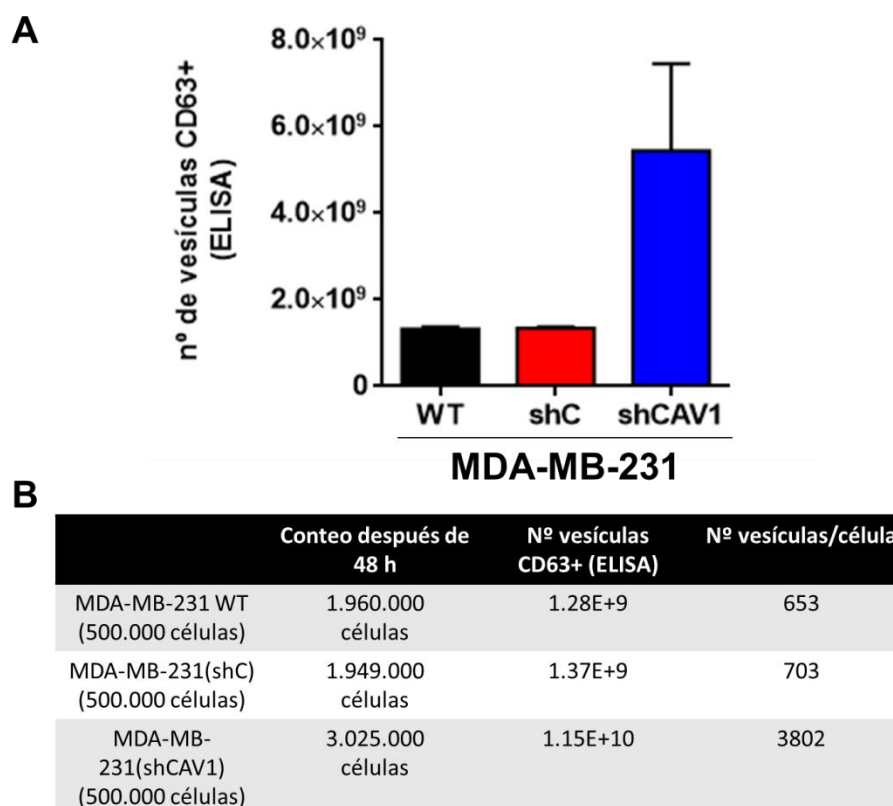


Figura suplementaria 5: Cuantificación de EVs obtenidos por ultracentrifugación provenientes de MDA-MB-231 WT, shC y shCAV1 mediante exo-ELISA (detección de vesículas CD63+). Vesículas fueron purificadas a partir de 100 mL de sobrenadante de cada condición. (N=2). **A)** nº de vesículas se cuantificó en base a nº de células obtenidas a las 48 h de retirar el sobrenadante y posterior purificación de estas vesículas. **B)** Tabla representativa de nº de células obtenidas después de 48h, nº de vesículas CD63+ correspondiente a cada condición y nº de vesículas por célula de cada muestra.

V) Cuantificación de EVs mediante exo-ELISA

Además de su caracterización por Western blot, también se tuvo como objetivo cuantificar de manera indirecta el número de vesículas contenidas en un determinado volumen de sobrenadante (100 mL de sobrenadante) de las EVs WT, EVs shC y EVs shCAV1 aisladas por ultracentrifugación (Figura suplementaria 5) mediante la detección de CD63 en estas vesículas. Para esto, se sembró una cantidad inicial de 500.000 células en cada condición y al cabo de 48 h, el número de células se cuantificó

nuevamente para así establecer una correlación entre el número de células con el número de vesículas positivas para CD63 obtenidas (Figura suplementaria 5B). Al cabo de 48 h, se obtuvieron 1.960.000 células MDA-MB-231 WT y aproximadamente 1.28×10^9 EVs WT positivas para CD63; 1.949.000 células MDA-MB-231(shC) y aproximadamente 1.37×10^9 EVs shC y por último 3.025.000 células MDA-MB-231(shCAV1) con 1.15×10^{10} EVs shCAV1. Esto se traduce en que células MDA-MB-231(shCAV1) liberarían 10 veces más vesículas ricas en CD63 en comparación con las células de MDA-MB-231 WT y MDA-MB-231(shC) (Figura suplementaria 5A).

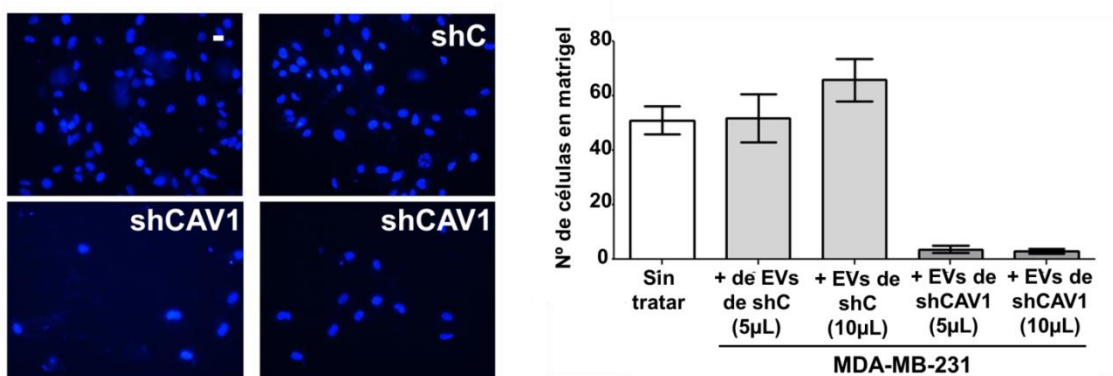


Figura suplementaria 6. Efecto biológico de EVs obtenidos por ultracentrifugación de MDA-MB-231(shC) y MDA-MB-231(shCAV1) en MDA-MB-231 WT. Para esto, se realizó un ensayo de invasión en donde se sembraron 90.000 células MDA-MB-231 con 5 ó 10 µL de cada muestra de EVs en un inserto con matrigel. Después de 56 h, se tiñeron células inmersas en matrigel con DAPI y posteriormente, se realizó su conteo. En el panel de la izquierda, se ve imagen representativa de cada condición (N=2).

VI) Evaluación del efecto biológico de EVs shC y EVs shCAV1 en células parentales mediante ensayo de invasión en matrigel

A continuación se quiso evaluar si las vesículas aisladas por ultracentrifugación eran capaces de promover invasión en células que ya contenían niveles endógenos elevados de CAV1 (células parentales) (Figura suplementaria 6). Para ello, se sembraron células junto con 5 o 10 µL de EVs en cámaras boyden con matrigel durante 56 h y posteriormente, se cuantificó el número de células que invadieron esta matriz. Se pudo

observar que menos de 10 células expuestas a 5 o 10 μ L de EVs shCAV1 fueron capaces de invadir la matriz y entre 40 y 70 células expuestas a 5 o 10 μ L de EVs shC, respectivamente fueron halladas en el matrigel. Cabe notar que el número de células sin tratar fue similar a las tratadas con EVs shC.

A pesar de los resultados obtenidos, de igual manera se hizo muy difícil la obtención de vesículas a partir de estas sublíneas celulares utilizando ultracentrifugación, ya que se requerían volúmenes superiores a los 400 mL de sobrenadante para lograr una caracterización completa por *Western blot*, MET, DLS y exo-ELISA de estas vesículas. En lo que se añade que el remanente de muestra posterior a su caracterización no alcanzaba para realizar los ensayos de efecto biológico correspondientes al objetivo 2, 3 y 4. Por lo que se decidió utilizar el kit ExospinTM que nos permitió realizar la caracterización completa de las vesículas utilizando un volumen de sobrenadante inicial menor a 200 mL.

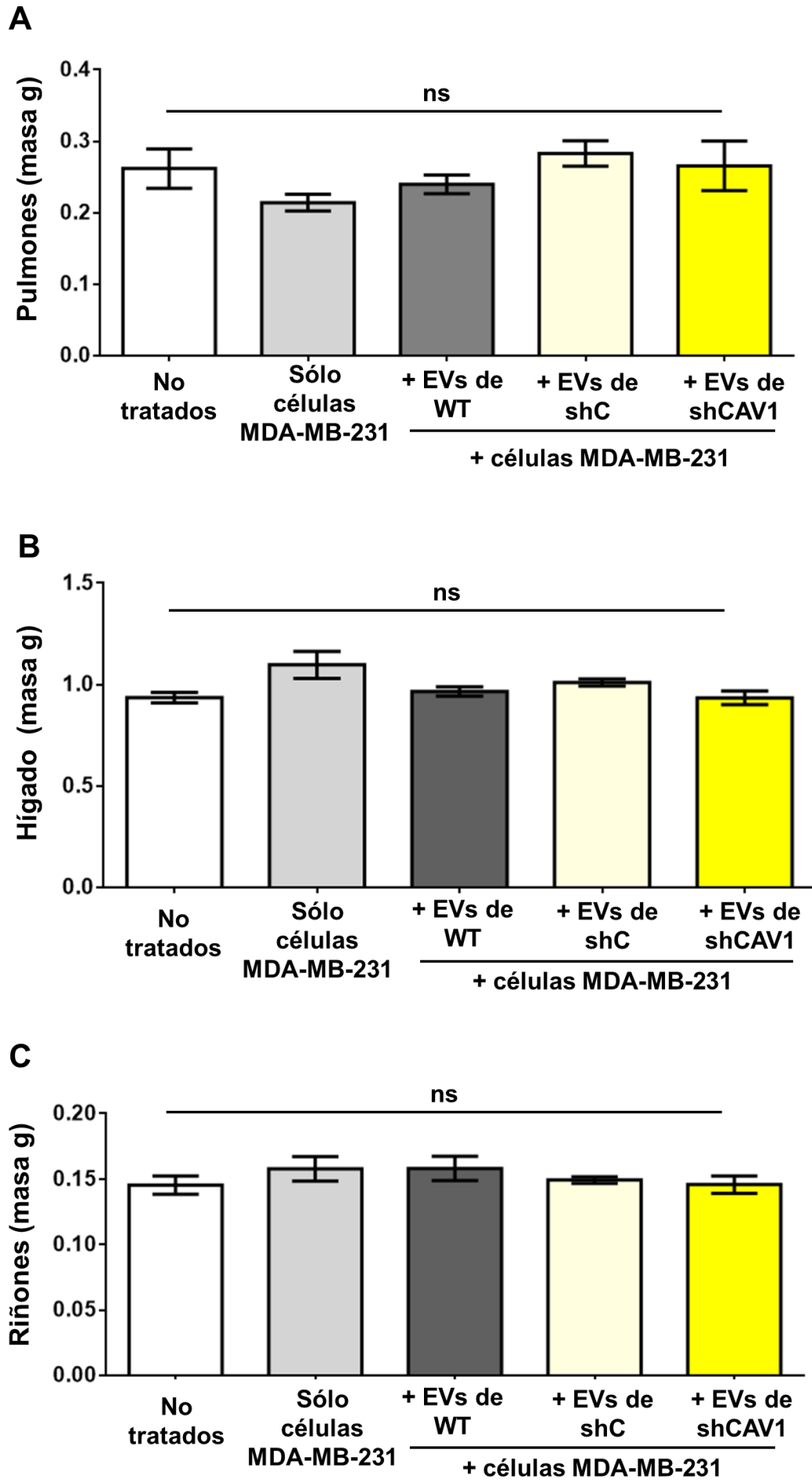


Figura suplementaria 7: Inoculación vía intraperitoneal de células MDA-MB-231 con o sin EVs que contienen CAV1 no promueven formación de tumores en pulmón, hígado o riñones en modelo de carcinomatosis peritoneal de cáncer de mama. Ratones BalbC NOD/SCID fueron inyectados con células MDA-MB-231 parentales con 10 µg de proteína total de EVs que contienen CAV1 (EVs de WT y shC) o de EVs que carecen de CAV1 (EVs de shCAV1) vía intraperitoneal. Se sacrificaron los animales al día 28 y se evaluó la formación de tumores en cada grupo experimental. No hubo diferencias significativas (ns) en las masas totales de los pulmones (A), hígado (B) y riñones (C) evaluados en cada condición.

TABLA SUPLEMENTARIA 1: Análisis de ontología génica vía PANTHER de proteínas de EVs de MDA-MB-231 WT y shC.

	Mapped IDs	Gene Name Gene Symbol	Ortholog	PANTHER Family/Subfamily	PANTHER Protein Class
1.	HUMAN HGNC=9532 UniProtKB=P25788	P25788 PSA3_H UMAN	Proteasome subunit alpha type-3 PSMA3 ortholog	PROTEASOME SUBUNIT ALPHA TYPE-3 (PTHR11599:SF10)	protease
2.	HUMAN HGNC=18304 UniProtKB=Q14019	COTL1_ HUMAN Q14019	Coactosin-like protein COTL1 ortholog	COACTOSIN-LIKE PROTEIN (PTHR10829:SF2)	non-motor actin binding protein
3.	HUMAN HGNC=537 UniProtKB=P07355	ANXA2_ HUMAN P07355	Annexin A2 ANXA2 ortholog	ANNEXIN A2-RELATED (PTHR10502:SF18)	-
4.	HUMAN HGNC=6535 UniProtKB=P00338	LDHA_ HUMAN P00338	L-lactate dehydrogenase A chain LDHA ortholog	L-LACTATE DEHYDROGENASE A CHAIN (PTHR43128:SF10)	dehydrogenase
5.	HUMAN HGNC=11788 UniProtKB=P35443	TSP4_H UMAN P35443	Thrombospondin-4 THBS4 ortholog	THROMBOSPONDIN-4 (PTHR10199:SF92)	-
6.	HUMAN HGNC=8881 UniProtKB=P07737	P07737 PROF1_ HUMAN	Profilin-1 PFN1 ortholog	PROFILIN-1 (PTHR13936:SF14)	-
7.	HUMAN HGNC=4883 UniProtKB=P08603	P08603 CFAH_ HUMAN	Complement factor H CFH ortholog	COMPLEMENT FACTOR H (PTHR45785:SF7)	-
8.	HUMAN HGNC=9253 UniProtKB=P62937	P62937 PPIA_H UMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A PPIA ortholog	PEPTIDYL-PROLYL CIS-TRANS ISOMERASE-RELATED (PTHR11071:SF278)	-
9.	HUMAN HGNC=2654 UniProtKB=O00622	O00622 CYR61_ HUMAN	Protein CYR61 CYR61 ortholog	PROTEIN CYR61 (PTHR11348:SF18)	growth factor
10	HUMAN HGNC=9750 	P20742	Pregnancy	PREGNANCY	complement

.	UniProtKB=P20742	PZP_HUMAN	zone protein <u>PZP</u> ortholog	<u>ZONE PROTEIN</u> (<u>PTHR11412:SF92</u>)	<u>component cytokine serine protease inhibitor</u>
11.	HUMAN HGNC=3611 UniProtKB=P30273	FCERG_HUMAN P30273	High affinity immunoglobulin epsilon receptor subunit gamma <u>FCER1G</u> ortholog	<u>HIGH AFFINITY IMMUNOGLOBULIN EPSILON RECEPTOR SUBUNIT GAMMA</u> (<u>PTHR16803:SF0</u>)	-
12.	HUMAN HGNC=5157 UniProtKB=P00492	P00492 HPRT_HUMAN	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase <u>HPRT1</u> ortholog	<u>HYPOXANTHINE-GUANINE PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE</u> (<u>PTHR43340:SF6</u>)	<u>glycosyltransferase mutase</u>
13.	HUMAN HGNC=7373 UniProtKB=P26038	MOES_HUMAN P26038	Moesin <u>MSN</u> ortholog	<u>MOESIN</u> (<u>PTHR23281:SF26</u>)	<u>actin family cytoskeletal protein</u>
14.	HUMAN HGNC=9536 UniProtKB=O14818	O14818 PSA7_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-7 <u>PSMA7</u> ortholog	<u>PROTEASOME SUBUNIT ALPHA TYPE-7</u> (<u>PTHR11599:SF40</u>)	<u>protease</u>
15.	HUMAN HGNC=5394 UniProtKB=P05156	CFAI_HUMAN P05156	Complement factor I <u>CFI</u> ortholog	<u>COMPLEMENT FACTOR I</u> (<u>PTHR24253:SF91</u>)	-
16.	HUMAN HGNC=3661 UniProtKB=P02671	P02671 FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain <u>FGA</u> ortholog	<u>FIBRINOGEN ALPHA CHAIN</u> (<u>PTHR47221:SF1</u>)	-
17.	HUMAN HGNC=5171 UniProtKB=P02790	P02790 HEMO_HUMAN	Hemopexin <u>HPX</u> ortholog	<u>HEMOPEXIN</u> (<u>PTHR10201:SF136</u>)	<u>metalloprotease</u>
18.	HUMAN HGNC=870 UniProtKB=P35670	ATP7B_HUMAN P35670	Copper-transporting ATPase 2 <u>ATP7B</u> ortholog	<u>COPPER-TRANSPORTING ATPASE 2</u> (<u>PTHR43520:SF9</u>)	<u>cation transporter hydrolase ion channel</u>
19.	HUMAN HGNC=2500 UniProtKB=P29279	CTGF_HUMAN P29279	Connective tissue growth factor <u>CTGF</u> ortholog	<u>CONNECTIVE TISSUE GROWTH FACTOR</u> (<u>PTHR11348:SF7</u>)	<u>growth factor</u>
20.	HUMAN HGNC=9483 UniProtKB=P07478	TRY2_HUMAN	Trypsin-2 <u>PRSS2</u> ortholog	<u>TRYPSIN-2</u> (<u>PTHR24264:SF15</u>)	<u>serine protease</u>

		P07478			
21	HUMAN HGNC=13671 UniProtKB=Q96KK5	Q96KK5 H2A1H_HUMAN	Histone H2A type 1-H HIST1H2AH ortholog	HISTONE H2A TYPE 1-H (PTHR23430:SF213)	histone
22	HUMAN HGNC=95461 UniProtKB=P28065	PSB9_HUMAN P28065	Proteasome subunit beta type-9 PSMB9 ortholog	PROTEASOME SUBUNIT BETA TYPE-9 (PTHR11599:SF50)	protease
23	HUMAN HGNC=36621 UniProtKB=P02675	FIBB_HUMAN P02675	Fibrinogen beta chain FGB ortholog	FIBRINOGEN BETA CHAIN (PTHR19143:SF332)	signaling molecule
24	HUMAN HGNC=16986 UniProtKB=Q12907	LMAN2_HUMAN Q12907	Vesicular integral-membrane protein VIP36 LMAN2 ortholog	VESICULAR INTEGRAL-MEMBRANE PROTEIN VIP36 (PTHR12223:SF28)	membrane traffic protein
25	HUMAN HGNC=7581 UniProtKB=P00966	P00966 ASSY_HUMAN	Argininosuccinate synthase ASS1 ortholog	ARGININOSUCCINATE SYNTHASE (PTHR11587:SF2)	ligase
26	HUMAN HGNC=12855 UniProtKB=P63104	P63104 1433Z_HUMAN	14-3-3 protein zeta/delta YWHAZ ortholog	14-3-3 PROTEIN ZETA/DELTA (PTHR18860:SF7)	chaperone
27	HUMAN HGNC=65411 UniProtKB=P07195	LDHB_HUMAN P07195	L-lactate dehydrogenase B chain LDHB ortholog	L-LACTATE DEHYDROGENASE B CHAIN (PTHR43128:SF2)	dehydrogenase
28	HUMAN HGNC=95431 UniProtKB=P28072	PSB6_HUMAN P28072	Proteasome subunit beta type-6 PSMB6 ortholog	PROTEASOME SUBUNIT BETA TYPE-6 (PTHR11599:SF46)	protease
29	HUMAN HGNC=17432 UniProtKB=Q9BZP6	CHIA_HUMAN Q9BZP6	Acidic mammalian chitinase CHIA ortholog	ACIDIC MAMMALIAN CHITINASE (PTHR11177:SF188)	-
30	HUMAN HGNC=78501 UniProtKB=P22392	P22392 NDKB_HUMAN	Nucleoside diphosphate kinase B NME2 ortholog	NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE KINASE B (PTHR11349:SF57)	
31	HUMAN HGNC=34411 UniProtKB=P07478	C3P1_HUMAN	Putative	PROTEIN C3P1-	complement

.	4 UniProtKB=Q6ZMU1	UMAN Q6ZMU 1	protein C3P1 <u>C3P1</u> ortholog	<u>RELATED</u> (<u>PTHR11412:SF111</u>)	<u>component</u> <u>cytokine</u> <u>serine protease</u> <u>inhibitor</u>
32	HUMAN HGNC=13916 UniProtKB=O95445	O95445 APOM_ HUMA N	Apolipoprotein M <u>APOM</u> ortholog	<u>APOLIPOPROTEIN M</u> (<u>PTHR32028:SF1</u>)	-
33	HUMAN HGNC=2171 UniProtKB=Q12860	Q12860 CNTN1_ HUMA N	Contactin-1 <u>CNTN1</u> ortholog	<u>CONTACTIN-1</u> (<u>PTHR44170:SF10</u>)	-
34	HUMAN HGNC=6423 UniProtKB=P08779	P08779 K1C16_ HUMA N	Keratin, type I cytoskeletal 16 <u>KRT16</u> ortholog	<u>KERATIN, TYPE I CYTOSKELETAL 16</u> (<u>PTHR23239:SF105</u>)	-
35	HUMAN HGNC=11256 UniProtKB=Q13103	Q13103 SPP24_ HUMA N	Secreted phosphoprotein 24 <u>SPP2</u> ortholog	<u>SECRETED PHOSPHOPROTEIN 24</u> (<u>PTHR15444:SF4</u>)	-
36	HUMAN HGNC=17447 UniProtKB=O94985	CSTN1_ HUMA N O94985	Calsyntenin-1 <u>CLSTN1</u> ortholog	<u>CALSYNTENIN-1</u> (<u>PTHR14139:SF4</u>)	<u>calcium-binding protein</u> <u>cell adhesion</u> <u>molecule</u>
37	HUMAN HGNC=7910 UniProtKB=P06748	P06748 NPM_H UMAN	Nucleophosmin <u>NPM1</u> ortholog	<u>NUCLEOPHOSMIN</u> (<u>PTHR22747:SF28</u>)	<u>chaperone</u>
38	HUMAN HGNC=20778 UniProtKB=P07437	P07437 TBB5_H UMAN	Tubulin beta chain <u>TUBB</u> ortholog	<u>TUBULIN BETA CHAIN</u> (<u>PTHR11588:SF61</u>)	<u>tubulin</u>
39	HUMAN HGNC=5318 UniProtKB=P24821	TENA_ HUMA N P24821	Tenascin <u>TNC</u> ortholog	<u>TENASCIN</u> (<u>PTHR46708:SF1</u>)	-
40	HUMAN HGNC=708 UniProtKB=O15511	ARPC5_ HUMA N O15511	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5 <u>ARPC5</u> ortholog	<u>ACTIN-RELATED PROTEIN 2/3 COMPLEX SUBUNIT 5</u> (<u>PTHR12644:SF1</u>)	<u>actin family</u> <u>cytoskeletal</u> <u>protein</u>
41	HUMAN HGNC=5235 UniProtKB=P54652	P54652 HSP72_ HUMA N	Heat shock-related 70 kDa protein 2 <u>HSPA2</u> ortholog	<u>HEAT SHOCK-RELATED 70 KDA PROTEIN 2</u> (<u>PTHR19375:SF352</u>)	-
42	HUMAN HGNC=9857 UniProtKB=P61224	RAP1B_ HUMA	Ras-related protein Rap-	<u>RAS-RELATED PROTEIN RAP-</u>	<u>small GTPase</u>

		N P61224	1b <u>RAP1B</u> ortholog	<u>1B-RELATED</u> (<u>PTHR24070:SF3</u> <u>93</u>)	
43	<u>HUMAN HGNC=1037 </u> <u>UniProtKB=P00751</u>	CFAB_ HUMA N P00751	Complement factor B <u>CFB</u> ortholog	<u>COMPLEMENT</u> <u>FACTOR B-</u> <u>RELATED</u> (<u>PTHR46393:SF1</u>)	-
44	<u>HUMAN HGNC=4748 </u> <u>UniProtKB=Q99880</u>	Q99880 H2B1L_ HUMA N	Histone H2B type 1-L <u>HIST1H2BL</u> ortholog	<u>HISTONE H2B</u> <u>TYPE 1-L</u> (<u>PTHR23428:SF1</u> <u>90</u>)	<u>histone</u>
45	<u>HUMAN HGNC=3189 </u> <u>UniProtKB=P68104</u>	EF1A1_ HUMA N P68104	Elongation factor 1- alpha 1 <u>EEF1A1</u> ortholog	<u>ELONGATION</u> <u>FACTOR 1-</u> <u>ALPHA 1</u> (<u>PTHR23115:SF2</u> <u>22</u>)	<u>G-protein</u> <u>hydrolase</u> <u>translation</u> <u>elongation</u> <u>factor</u> <u>translation</u> <u>initiation factor</u>
46	<u>HUMAN HGNC=1599</u> <u>8 UniProtKB=Q8IVL0</u>	NAV3_ HUMA N Q8IVL0	Neuron navigator 3 <u>NAV3</u> ortholog	<u>NEURON</u> <u>NAVIGATOR 3</u> (<u>PTHR12784:SF1</u> <u>8</u>)	-
47	<u>HUMAN HGNC=2076</u> <u>8 UniProtKB=Q9BQE3</u>	TBA1C_ HUMA N Q9BQE 3	Tubulin alpha-1C chain <u>TUBA1C</u> ortholog	<u>TUBULIN</u> <u>ALPHA-1C</u> <u>CHAIN</u> (<u>PTHR11588:SF6</u> <u>4</u>)	<u>tubulin</u>
48	<u>HUMAN HGNC=4141 </u> <u>UniProtKB=P04406</u>	P04406 G3P_H UMAN	Glyceraldeh yde-3- phosphate dehydrogena se <u>GAPDH</u> ortholog	<u>GLYCERALDEH</u> <u>YDE-3-</u> <u>PHOSPHATE</u> <u>DEHYDROGENA</u> <u>SE</u> (<u>PTHR10836:SF8</u> <u>1</u>)	<u>dehydrogenase</u>
49	<u>HUMAN HGNC=602 </u> <u>UniProtKB=P06727</u>	P06727 APOA4 _HUMA N	Apolipoprot ein A-IV <u>APOA4</u> ortholog	<u>APOLIPOPROTEI</u> <u>N A-IV</u> (<u>PTHR18976:SF1</u>)	-
50	<u>HUMAN HGNC=1049</u> <u>6 UniProtKB=P06703</u>	S10A6_ HUMA N P06703	Protein S100-A6 <u>S100A6</u> ortholog	<u>PROTEIN S100-</u> <u>A6</u> (<u>PTHR11639:SF8</u> <u>0</u>)	<u>calmodulin</u> <u>signaling</u> <u>molecule</u>
51	<u>HUMAN HGNC=9036 </u> <u>UniProtKB=P0C869</u>	PA24B_ HUMA N P0C869	Cytosolic phospholipa se A2 beta <u>PLA2G4B</u> ortholog	<u>CYTOSOLIC</u> <u>PHOSPHOLIPAS</u> <u>E A2 BETA</u> (<u>PTHR10728:SF3</u> <u>2</u>)	<u>phospholipase</u>
52	<u>HUMAN HGNC=166 </u> <u>UniProtKB=O43707</u>	O43707 ACTN4 _HUMA N	Alpha- actinin-4 <u>ACTN4</u> ortholog	<u>ALPHA-</u> <u>ACTININ-4</u> (<u>PTHR11915:SF4</u> <u>25</u>)	-
53	<u>HUMAN HGNC=654 </u> <u>UniProtKB=P61204</u>	ARF3_H UMAN P61204	ADP- ribosylation factor 3	<u>ADP-</u> <u>RIBOSYLATION</u> <u>FACTOR 3</u>	-

			<u>ARF3</u> ortholog	<u>(PTHR11711:SF3</u> <u>16)</u>	
--	--	--	-------------------------	-------------------------------------	--

TABLA SUPLEMENTARIA 2: Análisis de ontología génica vía PANTHER de proteínas de EVs exclusivas de MDA-MB-231(shCAV1).

	<u>Gene ID</u>	<u>Mapped IDs</u>	<u>Gene Name</u> <u>Gene Symbol</u>	<u>PANTHER Family/Subfamily</u>	<u>PANTHER Protein Class</u>
1.	<u>HUMAN HGNC=4727 UniProtKB=Q99878</u>	H2A1J_H UMAN Q99878	Histone H2A type 1-J <u>HIST1H2AJ</u> ortholog	<u>HISTONE H2A TYPE 1-J</u> <u>(PTHR23430:SF198)</u>	<u>histone</u>
2.	<u>HUMAN HGNC=30217 UniProtKB=Q9UNQ2</u>	Q9UNQ2 DIM1_H UMAN	Probable dimethyladenosine transferase <u>DIMT1</u> ortholog	<u>DIMETHYLADE NOSINE TRANSFERASE-RELATED</u> <u>(PTHR11727:SF7)</u>	<u>RNA methyltransferase</u>
3.	<u>HUMAN HGNC=3529 UniProtKB=P03951</u>	P03951 FA11_H UMAN	Coagulation factor XI <u>F11</u> ortholog	<u>COAGULATION FACTOR XI</u> <u>(PTHR24253:SF44)</u>	<u>serine protease</u>
4.	<u>HUMAN HGNC=8896 UniProtKB=P00558</u>	P00558 PGK1_H UMAN	Phosphoglycerate kinase 1 <u>PGK1</u> ortholog	<u>PHOSPHOGLYCERATE KINASE 1</u> <u>(PTHR11406:SF14)</u>	<u>carbohydrate kinase</u>
5.	<u>HUMAN HGNC=10576 UniProtKB=Q9Y240</u>	Q9Y240 CLC11_H UMAN	C-type lectin domain family 11 member A <u>CLEC11A</u> ortholog	<u>C-TYPE LECTIN DOMAIN FAMILY 11 MEMBER A</u> <u>(PTHR22799:SF1)</u>	<u>extracellular matrix structural protein</u>
6.	<u>HUMAN HGNC=7754 UniProtKB=Q92859</u>	Q92859 NEO1_H UMAN	Neogenin <u>NEO1</u> ortholog	<u>NEOGENIN</u> <u>(PTHR44170:SF14)</u>	-
7.	<u>HUMAN HGNC=5233 UniProtKB=P0DMV9</u>	P0DMV9 HS71B_H UMAN	Heat shock 70 kDa protein 1B	<u>HEAT SHOCK 70 KDA PROTEIN 1A-RELATED</u> <u>(PTHR19375:SF2)</u>	-

			<u>HSPA1B</u> ortholog	<u>23)</u>	
8.	<u>HUMAN HGNC=4248 UniProtKB=Q92820</u>	Q92820 GGH_HUMAN	Gamma-glutamyl hydrolase <u>GGH</u> ortholog	<u>GAMMA-GLUTAMYL HYDROLASE</u> (<u>PTHR11315:SF2</u>)	<u>cysteine protease</u>
9.	<u>HUMAN HGNC=11821 UniProtKB=P16035</u>	P16035 TIMP2_HUMAN	Metalloprotease inhibitor 2 <u>TIMP2</u> ortholog	<u>METALLOPROTEINASE INHIBITOR 2</u> (<u>PTHR11844:SF24</u>)	<u>protease inhibitor</u>
10.	<u>HUMAN HGNC=9531 UniProtKB=P25787</u>	PSA2_HUMAN P25787	Proteasome subunit alpha type-2 <u>PSMA2</u> ortholog	<u>PROTEASOME SUBUNIT ALPHA TYPE-2</u> (<u>PTHR11599:SF16</u>)	<u>protease</u>
11.	<u>HUMAN HGNC=7036 UniProtKB=Q08431</u>	MFGM_HUMAN Q08431	Lactadherin <u>MFGE8</u> ortholog	<u>LACTADHERIN</u> (<u>PTHR24543:SF298</u>)	<u>cell adhesion molecule hydrolase membrane-bound signaling molecule receptor</u>
12.	<u>HUMAN HGNC=1764 UniProtKB=P33151</u>	CADH5_HUMAN P33151	Cadherin-5 <u>CDH5</u> ortholog	<u>CADHERIN-5</u> (<u>PTHR24027:SF89</u>)	-
13.	<u>HUMAN HGNC=9475 UniProtKB=P07477</u>	P07477 TRY1_HUMAN	Trypsin-1 <u>PRSS1</u> ortholog	<u>TRYPSIN-1</u> (<u>PTHR24264:SF49</u>)	<u>serine protease</u>
14.	<u>HUMAN HGNC=1063 UniProtKB=P30043</u>	P30043 BLVRB_HUMAN	Flavin reductase (NADPH) <u>BLVRB</u> ortholog	<u>FLAVIN REDUCTASE (NADPH)</u> (<u>PTHR43355:SF2</u>)	<u>reductase</u>
15.	<u>HUMAN HGNC=7166 UniProtKB=P08253</u>	P08253 MMP2_HUMAN	72 kDa type IV collagenase <u>MMP2</u> ortholog	<u>72 KDA TYPE IV COLLAGENASE</u> (<u>PTHR10201:SF29</u>)	<u>metalloprotease</u>
16.	<u>HUMAN HGNC=3528 UniProtKB=P00742</u>	P00742 FA10_HUMAN	Coagulation factor X <u>F10</u> ortholog	<u>COAGULATION FACTOR X</u> (<u>PTHR24278:SF28</u>)	<u>serine protease</u>
17.	<u>HUMAN HGNC=652 UniProtKB=P84077</u>	P84077 ARF1_HUMAN	ADP-ribosylation factor	<u>ADP-RIBOSYLATION FACTOR 1</u>	-

			1 <u>ARF1</u> ortholog	<u>(PTHR11711:SF308)</u>	
18.	<u>HUMAN HGNC=12407 UniProtKB=P68366</u>	P68366 TBA4A_ HUMAN	Tubulin alpha-4A chain <u>TUBA4A</u> ortholog	<u>TUBULIN</u> <u>ALPHA-4A</u> <u>CHAIN</u> <u>(PTHR11588:SF53)</u>	<u>tubulin</u>
19.	<u>HUMAN HGNC=3694 UniProtKB=P02679</u>	P02679 FIBG_H HUMAN	Fibrinogen gamma chain <u>FGG</u> ortholog	<u>FIBRINOGEN</u> <u>GAMMA CHAIN</u> <u>(PTHR19143:SF338)</u>	<u>signaling</u> <u>molecule</u>
20.	<u>HUMAN HGNC=4458 UniProtKB=P06744</u>	P06744 G6PI_H HUMAN	Glucose- 6- phosphate isomerase <u>GPI</u> ortholog	<u>GLUCOSE-6-</u> <u>PHOSPHATE</u> <u>ISOMERASE</u> <u>(PTHR11469:SF42)</u>	<u>isomerase</u>
21.	<u>HUMAN HGNC=4760 UniProtKB=Q16778</u>	Q16778 H2B2E_ HUMAN	Histone H2B type 2-E <u>HIST2H2</u> <u>BE</u> ortholog	<u>HISTONE H2B</u> <u>TYPE 2-E</u> <u>(PTHR23428:SF153)</u>	<u>histone</u>
22.	<u>HUMAN HGNC=9760 UniProtKB=P62491</u>	P62491 RB11A_ HUMAN	Ras- related protein Rab-11A <u>RAB11A</u> ortholog	<u>RAS-RELATED</u> <u>PROTEIN RAB-</u> <u>11A</u> <u>(PTHR24073:SF625)</u>	-
23.	<u>HUMAN HGNC=7883 UniProtKB=Q9UM47</u>	Q9UM47 NOTC3_ HUMAN	Neurogen ic locus notch homolog protein 3 <u>NOTCH3</u> ortholog	<u>NEUROGENIC</u> <u>LOCUS NOTCH</u> <u>HOMOLOG</u> <u>PROTEIN 3</u> <u>(PTHR45836:SF17)</u>	-