

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**



**LA FOSFORILACIÓN DE CAVEOLINA-1 EN TIROSINA-14 REGULA LAS  
PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES  
PROVENIENTES DE CÉLULAS METASTÁSICAS DE MELANOMA  
INDUCIENDO MAYOR AGRESIVIDAD EN LÍNEAS TUMORALES MENOS  
METASTÁSICAS.**

**RICARDO ANDRÉS HUILCAMÁN BUSTOS**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**DIRECTORES DE TESIS:**

**Dr. Andrew Quest Minikus**

**Dra. Lisette Leyton Campos**

**2020**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS  
BIOMEDICAS**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas presentada por el candidato:

**RICARDO ANDRÉS HUILCAMÁN BUSTOS**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biomédicas en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 19 de noviembre del 2021.

**Directores de Tesis:**

**Dr. Andrew Quest Minikus**

**Dra. Lisette Leyton Campos.**

**COMISIÓN EVALUADORA DE TESIS**

**Dr. Ricardo Soto**

Presidente de Comisión

**Dr. Mario Galindo**

**Dr. Julio Tapia**

**Dr. Manuel Varas**

*“There is not a discovery in science, however revolutionary, however sparkling with insight that does not arise out of what went before.”*

Isaac Asimov.

**A mis padres,  
y a cada maestro que fue parte de mi vida.**

## **AGRADECIMIENTOS PROFESIONALES**

Esta tesis de doctorado se realizó bajo la tutoría del Dr. Andrew Quest y Dra. Lisette Leyton en el Laboratorio de Comunicaciones Celulares del Centro de Estudios Avanzados de Enfermedades Crónicas (ACCDiS) y el Centro de estudios de Ejercicio, Metabolismo y Cáncer (CEMC) del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad Norte de la Universidad de Chile gracias a los siguientes financiamientos:

Financiamiento otorgado al Dr. Andrew Quest:

CONICYT-FONDAP N° 15130011

FONDECYT N° 1170925

Financiamiento otorgado a la Dra. Lisette Leyton:

FONDECYT N° 1150744

Financiamiento otorgado a Ricardo Huilcamán Bustos:

Beca CONICYT doctorado nacional N° 21161246, período 2016-2020.

Beneficio de Gastos Operacionales N° 21161246, período 2018-2020.

**Parte de la investigación derivada de este trabajo, o bien relacionada con éste, ha sido publicada en los siguientes artículos:**

Campos, A.; Burgos-Ravanal, R.; González, M.F.; **Huilcaman, R.**; Lobos González, L.; Quest, A.F.G. Cell Intrinsic and Extrinsic Mechanisms of Caveolin-1-Enhanced Metastasis. *Biomolecules* 2019, 9, 314.

Samuel Martínez-Meza, Jorge Díaz, Alejandra Sandoval-Bórquez, Manuel Valenzuela-Valderrama, Natalia Díaz-Valdivia, Victoria Rojas-Celis, Pamela Contreras, **Ricardo Huilcaman**, María Paz Ocaranza, Mario Chiong, Lisette Leyton, Sergio Lavandero, and Andrew F.G. Quest. AT2 Receptor Mediated Activation of the Tyrosine Phosphatase PTP1B Blocks Caveolin-1 Enhanced Migration, Invasion and Metastasis of Cancer Cells. *Cancers* 2019, 11(9) 1299.

**Presentaciones a congresos nacionales:**

**Huilcamán R.**; Campos A.; Varas-Godoy M.; Leyton L.; Quest A.F. Extracellular vesicles from Caveolin1-expressing highly metastatic B16F10 melanoma cells enhance the migration and invasion of less metastatic Cells. *Nanotechnology in diagnosis and treatment of cancer*, Symposium 2018. Facultad de Medicina, de la Universidad de Chile, auditorio Alberto Donoso A y B, Independencia, Santiago, Chile. 1 de octubre del 2018

**Huilcamán R.**; Campos A.; Varas-Godoy M.; Leyton L.; Quest A.F. Extracellular vesicles from Caveolin1-expressing highly metastatic B16F10 melanoma cells enhance the migration and invasion of less metastatic cells. *XXXII Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile*, Centro de Convenciones Hotel Enjoy Patagónico, Puerto Varas, Chile. 22 al 26 de octubre, 2018.

## **ÍNDICE GENERAL**

<b>1.</b>	<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>8</b>
<b>2.</b>	<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>10</b>
<b>3.</b>	<b>ABREVIATURAS</b>	<b>11</b>
<b>4.</b>	<b>RESUMEN</b>	<b>13</b>
<b>5.</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>15</b>
<b>6.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>17</b>
<b>6.1.</b>	<b>Cáncer y sus generalidades</b>	<b>17</b>
<b>6.2.</b>	<b>Vesículas extracelulares</b>	<b>17</b>
<b>6.3.</b>	<b>Vesículas extracelulares en cáncer y metástasis</b>	<b>21</b>
<b>6.4.</b>	<b>Caveolina-1</b>	<b>22</b>
<b>6.5.</b>	<b>Caveolina-1 en migración celular y metástasis</b>	<b>22</b>
<b>6.6.</b>	<b>Caveolina-1 en vesículas extracelulares y su contenido</b>	<b>24</b>
<b>6.7.</b>	<b>Resumen de Antecedentes</b>	<b>26</b>
<b>7.</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>27</b>
<b>8.</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>27</b>
<b>9.</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>27</b>
<b>10.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>29</b>
<b>11.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>39</b>

<b>11.1.</b>	<b>OBJETIVO 1. Purificar y caracterizar las vesículas extracelulares pequeñas provenientes de líneas celulares de melanoma murino B16F10 que expresan CAV1 y mutantes de CAV1 en Y14</b>	<b>39</b>
<b>11.2.</b>	<b>OBJETIVO 2. Determinar si las vesículas extracelulares pequeñas provenientes de líneas tumorales que expresan CAV1 y mutantes de CAV1 en Y14 aumentan las características migratorias e invasivas de líneas celulares de melanoma murino B16F10 de menor capacidad metastásica</b>	<b>50</b>
<b>11.3.</b>	<b>OBJETIVO 3. Determinar el perfil proteómico de las vesículas extracelulares pequeñas de las líneas celulares de melanoma murino B16F10 que expresan CAV1 y mutantes de CAV1 en Y14</b>	<b>59</b>
<b>12.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>68</b>
<b>13.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>83</b>
<b>14.</b>	<b>MATERIAL COMPLEMENTARIO</b>	<b>91</b>

## 1. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura I.</b> Clases de vesículas extracelulares según su biogénesis	<b>20</b>
<b>Figura II.</b> Cascada de señalización activada en la migración celular dependiente de CAV1	<b>24</b>
<b>Figura 1.</b> Esquema de los métodos usados en la obtención de vesículas extracelulares pequeñas y condiciones de cultivo	<b>40</b>
<b>Figura 2.</b> Caracterización por NTA y MET de vesículas extracelulares obtenidas de las líneas celulares B16F10(Mock) y (CAV1) purificados por Exo-Spin (ES) y ultracentrifugación (UC)	<b>43</b>
<b>Figura 3.</b> Caracterización por Western blot de vesículas extracelulares obtenidas de las líneas celulares B16F10(Mock) y (CAV1) purificados por Exo-Spin y ultracentrifugación	<b>44</b>
<b>Figura 4.</b> Caracterización mediante análisis de seguimiento de nanopartículas de vesículas extracelulares purificadas de las líneas celulares B16F10(Mock) y (CAV1)	<b>46</b>
<b>Figura 5.</b> Caracterización por Western blot de la línea celular B16F10 y las vesículas extracelulares que produce	<b>49</b>
<b>Figura 6.</b> Ensayo de internalización de vesículas extracelulares en células B16F10(Mock)	<b>51</b>
<b>Figura 7.</b> Ensayos de migración y viabilidad de células B16F10(Mock) después del tratamiento con distintas vesículas extracelulares	<b>54</b>
<b>Figura 8.</b> Ensayos de migración transendotelial de B16F10(Mock) después del tratamiento con distintas vesículas extracelulares	<b>58</b>
<b>Figura 9. Proteínas detectadas por proteómica en vesículas extracelulares provenientes de las líneas celulares B16F10wt, (Mock), (CAV1), (CAV1/Y14E) y (CAV1/Y14F)</b>	<b>62</b>

<b>Figura 10. Proteínas detectadas por proteómica en vesículas extracelulares</b>	<b>64</b>
<b>provenientes de las líneas celulares B16F10(CAV1), (CAV1/Y14E) y (CAV1/Y14F)</b>	
<b>Figura 11. Propuesta de la actividad y respuestas de células tumorales bajo el estímulo con vesículas extracelulares provenientes de las líneas celulares B16F10(CAV1) o (CAV1/Y14F)</b>	<b>82</b>
<b>Figura suplementaria 1. Cuantificación de lactato en el sobrenadante de células B16F10(Mock) después del tratamiento con vesículas extracelulares provenientes de las líneas celulares B16F10(Mock) y (CAV1)</b>	<b>91</b>
<b>Figura suplementaria 2. Western blot de la expresión de PTEN en células B16F10(Mock) tratadas con vesículas extracelulares provenientes de las líneas celulares B16F10(Mock) y (CAV1)</b>	<b>92</b>

## 2. ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Anticuerpos utilizados en los análisis por Western blot	<b>33</b>
<b>Tabla 2.</b> Medición de la permeabilidad de la monocapa endotelial	<b>55</b>
<b>Tabla 3.</b> Procesos biológicos enriquecidos en proteínas comunes y únicas entre vesículas extracelulares provenientes de las líneas celulares B16F10(CAV1) y (CAV1/Y14E)	<b>67</b>
<b>Tabla 4.</b> Proteínas de procesos biológico de adhesión celular presentes en vesículas extracelulares provenientes de las líneas celulares B16F10(CAV1) y (CAV1/Y14E)	<b>67</b>
<b>Tabla suplementaria 1.</b> Proteínas detectadas en vesículas extracelulares provenientes de la línea celular B16F10wt	<b>93</b>
<b>Tabla suplementaria 2.</b> Proteínas detectadas en vesículas extracelulares provenientes de la línea celular B16F10(Mock)	<b>95</b>
<b>Tabla suplementaria 3.</b> Proteínas detectadas en vesículas extracelulares provenientes de la línea celular B16F10(CAV1)	<b>99</b>
<b>Tabla suplementaria 4.</b> Proteínas detectadas en vesículas provenientes de la línea celular B16F10(CAV1/Y14F)	<b>106</b>
<b>Tabla suplementaria 5.</b> Proteínas detectadas en vesículas extracelulares provenientes de la línea celular B16F10(CAV1/Y14E)	<b>113</b>

### 3. ABREVIATURAS

<b>CAV1</b>	Caveolina-1
<b>CAV1/Y14E</b>	Caveolina-1 mutada en tirosina 14 por ácido glutámico
<b>CAV1/Y14F</b>	Caveolina-1 mutada en tirosina 14 por fenilalanina
<b>Cat</b>	Catálogo
<b>CD</b>	Clúster de diferenciación
<b>CMV</b>	Cuerpo o endosoma multivesicular
<b>DAVID</b>	Base de Datos para anotación visualización y descubrimiento integrado
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>EASE</b>	Explorador sistemático de análisis de expresión
<b>ES</b>	Exo-spin
<b>ESCRT</b>	Complejo de clasificación endosomal necesarios para el transporte
<b>GO</b>	Ontología génica
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
<b>LC-MS/MS</b>	Cromatografía líquida-Espectrometría de masas
<b>MET</b>	Microscopía electrónica de transmisión
<b>miRNA/miR</b>	Micro ácido ribonucleico
<b>Mock</b>	Transfección con vector vacío
<b>MTE</b>	Migración Transendotelial
<b>MV</b>	Microvesícula
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>NTA</b>	Análisis de seguimiento de nanopartículas
<b>PANTHER</b>	Análisis de proteínas mediante relaciones evolutivas
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>pLAC-IOP</b>	Plasmidio IPTG inducible
<b>RPMI</b>	Medio Roswell Park Memorial Institute 1640
<b>SD</b>	Desviación estándar

<b>SEM</b>	Error estándar de la media
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>UC</b>	Ultracentrifugación
<b>VE</b>	Vesículas extracelulares
<b>VIL</b>	Vesículas intraluminales
<b>wt</b>	Wild type
<b>x g</b>	Fuerza G

#### 4. RESUMEN

El diagnóstico del cáncer ha aumentado en las últimas décadas y su mortalidad debido a la metástasis crece mundialmente. Las vesículas extracelulares (VE) contribuyen a la comunicación celular normal y patológica, como en el cáncer, llevando moléculas biológicamente activas (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, entre otros) hacia células receptoras. En VE de pacientes con melanoma metastásico se ha detectado la proteína Caveolina-1 (CAV1), la cual se relaciona con un peor pronóstico de la enfermedad. La expresión de CAV1 en células de melanoma metastásico aumenta su capacidad migratoria e invasiva, contribuyendo al proceso de metástasis, y está demostrado que esos efectos son dependientes de la fosforilación de CAV1 en tirosina 14. Dado que en modelos distintos al melanoma hay diferencias entre el contenido de VE provenientes de células altamente metastásicas versus las menos invasivas, cobra interés la relación entre la presencia de CAV1 en las VE de tumores y su contenido. Por lo tanto, hipotetizamos que *las vesículas extracelulares provenientes de líneas tumorales metastásicas que expresan CAV1 y su mutante Y14E aumentan la migración e invasión de líneas tumorales debido a la transferencia de proteínas que favorecen la motilidad celular*. Para ensayar esta hipótesis se aislaron VE mediante ultracentrifugación desde las líneas celulares B16F10wt, B16F10(Mock), B16F10(CAV1) y mutantes de CAV1 como B16F10(CAV1/Y14F), mutación en Y14 no fosforilable y B16F10(CAV1/Y14E), mutación en Y14 fosfomimética. Las vesículas fueron caracterizadas usando Nanotracking análisis y Western blotting. Células B16F10(Mock) fueron tratadas con VE de líneas que expresan niveles bajos o altos de CAV1 o CAV1 mutado. Los efectos en las células tratadas fueron determinados usando ensayos de migración en transwell y transmigración endotelial. Se realizó un ensayo de internalización de VE marcadas fluorescentes y se evaluó la cinética de captación por las células tratadas. Se profundizó en el contenido proteico de las VE mediante un análisis por proteómica *shotgun*.

Las vesículas obtenidas mostraron características de exosomas, vesículas de origen endosomal. El tratamiento con vesículas provenientes de células que expresan CAV1 y

CAV1/Y14E indujo un aumento en la migración y transmigración de células B16F10(Mock). En los ensayos de internalización se observó una mayor marca en células tratadas con vesículas con CAV1 a las 3 h, pero después de 24 h, la mayoría de las células poseían marca, independiente del tipo de vesícula utilizada. Los análisis proteómicos evidencian una riqueza amplia de proteínas relacionadas con migración celular en las vesículas con CAV1 o CAV1/Y14E. Entre las proteínas de interés relacionadas con eventos biológicos como migración e invasión se encontraron enriquecidas principalmente moléculas de adhesión celular. También es destacable el número de proteínas únicas que se encuentran en las VE que poseen las distintas formas de CAV1, con un gran número de proteínas únicas en VE CAV1/Y14E, sugiriendo la importancia de CAV1 y su forma fosforilada en el cargo de proteínas a las VE.

Estos hallazgos sugieren un importante papel de la CAV1 y su fosforilación en Y14 en la definición del contenido de las VE, favoreciendo la presencia de una gran variedad de proteínas involucradas en procesos metastásicos. Por lo tanto, será de gran interés identificar los mecanismos por los cuales estas vesículas promueven el desarrollo del cáncer.

## 5. ABSTRACT

Cancer incidence worldwide has increased notably in recent decades and although some improvements in treatment have been achieved, the disease essentially becomes incurable once cancer cells disseminate from the primary tumor to distant sites in the body, in a process referred to as metastasis. Thus, understanding the molecular underpinnings of this process becomes essential to the development of potential treatments. In this context, extracellular vesicles (EV) are receiving widespread interest because they participate in both normal and pathological communication between cells, by serving as vectors for the delivery of biologically active molecules, such as proteins, lipids, and nucleic acids, among others. Interestingly, the detection of Caveolin-1 (CAV1) in EVs from patients with metastatic melanoma is associated with a worse prognosis and disease outcome. In addition, the expression of CAV1 in metastatic melanoma cells increases migration and invasion, traits that favor metastasis, and these effects are dependent on CAV1 phosphorylation on tyrosine-14 (Y14). Establishing a connection between the presence of CAV1 in EVs from cancer cells and their content is of interest because EVs from highly metastatic and non-metastatic cancer cells are known to differ considerably. Therefore, we hypothesized that EVs from metastatic tumor lines that express CAV1 or the mutant Y14E increase the migration and invasion of tumor cell lines due to the transfer of proteins that favor cell motility.

To evaluate this, EVs were isolated by ultracentrifugation from B16F10wt, B16F10(Mock), B16F10(CAV1), phosphomimetic B16F10(CAV1/Y14E), as well as phosphor null B16F10 (CAV1/Y14F) cells. EVs were characterized using Nanotracking analysis and Western blotting. B16F10(Mock) cells were treated with EVs from cell lines expressing low or high levels of CAV1 or mutated CAV1. The biological effects of EVs in treated cells were determined using transwell migration and endothelial transmigration assays. An internalization assay of fluorescently labeled EVs was employed to evaluate the kinetics of EV uptake by cells. The protein content of these EVs was further analyzed using shotgun proteomics.

All vesicles obtained coincide in size characteristics and possess markers indicative of their endosomal origin. Treatment with vesicles containing CAV1, increased migration and transmigration of recipient B16F10(Mock) cells. In internalization assays, CAV1-containing vesicles were initially taken up more rapidly (3 h), but after 24 h essentially all cells were labelled independent of the type of vesicle being used. Proteomics analysis revealed enrichment of proteins related to cell adhesion/migration in vesicles containing CAV1 or CAV1/Y14E. Importantly, CAV1-containing EVs differed significantly from Mock EVs. Moreover, EVs from CAV1/Y14E expressing cells, contained many unique proteins, suggesting that CAV1 and particularly phosphorylation on tyrosine-14 are critical in determining EV protein content. Future studies will seek to identify the precise mechanisms by which CAV1 and particularly phosphorylation on tyrosine-14 modulate EV content.

These findings uncover an important role for CAV1 and phosphorylation on Y14 in determining the content of extracellular vesicles, enriching particularly for proteins involved in metastasis-related processes. Therefore, it will be of great interest to identify the mechanisms by which these vesicles promote effects that advance cancer development.

## **6. INTRODUCCIÓN**

### **6.1. Cáncer y sus generalidades.**

Actualmente, el cáncer corresponde a la segunda causa de muerte en Chile y en el mundo, pronosticándose que será la primera causa de muerte en 15 años más. El cáncer es la consecuencia de un proceso multifactorial que involucra la acumulación secuencial de cambios genéticos y epigenéticos que llevan a la pérdida de una comunicación adecuada entre las células y su microambiente, y a la transformación progresiva de células normales en células altamente malignas (Hanahan and Weinberg, 2011). Una característica que adquieren las células tumorales, generalmente en fases más avanzadas de la enfermedad, es la metástasis, que corresponde a la capacidad de las células de invadir otros tejidos distintos al de origen. La metástasis involucra una serie de eventos como invasión local, intravasación, extravasación y colonización del nuevo tejido huésped (Nguyen et al., 2009). Estos eventos finalmente causan la muerte de aproximadamente un 80% de los pacientes que padecen de cáncer (Harlozinska, 2005). En este sentido, no solo es importante considerar los eventos moleculares intracelulares que llevan a las células tumorales a este comportamiento, sino también aquellos cambios que les permiten comunicarse entre ellas y con su microambiente inmediato, facilitando el proceso de invasión y metástasis.

Considerando la relevancia de la comunicación intercelular, en los últimos años, un grupo específico de vesículas extracelulares (VE), liberadas por las células tumorales y denominadas exosomas han tomado gran relevancia en este proceso (Zhang et al., 2015).

### **6.2. Vesículas extracelulares**

Las VE corresponden a estructuras vesiculares secretadas por una gran variedad de células. Estas VE se forman a partir de membranas en compartimentos intracelulares. Su

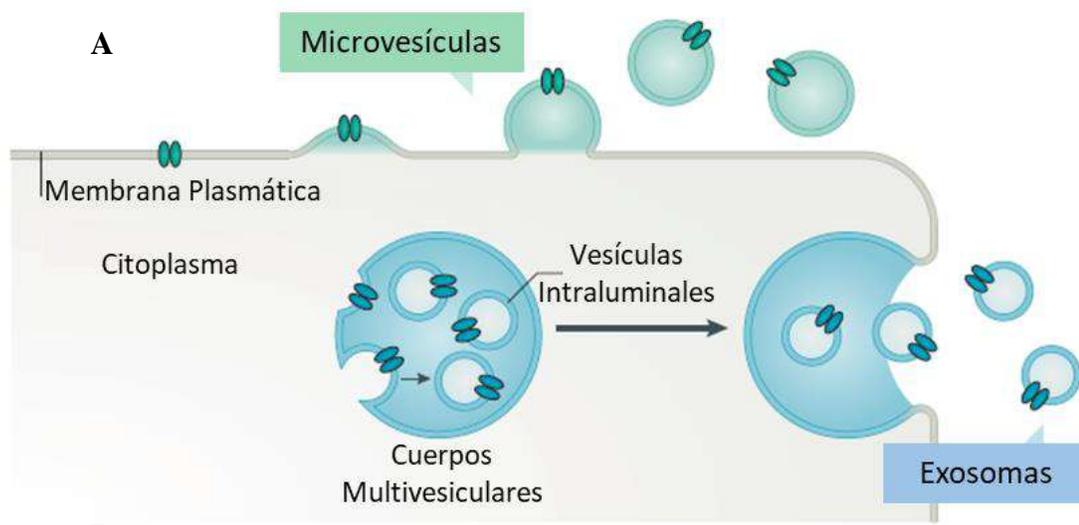
función está relacionada con la eliminación de componentes celulares como receptores en el caso de los reticulocitos (Johnstone et al., 1987), y con otros procesos biológicos incluidos en el cáncer, como son la comunicación y modulación de procesos celulares en células del microambiente tumoral (La Shu et al., 2018; Pfeiler et al., 2019), la preparación del nicho metastásico (Kahlert and Kalluri, 2013), los cambios en la respuesta inmune (Czernek and Duchler, 2017), entre otras funciones. Una forma de clasificar esta gran variedad de vesículas es mediante su origen celular encontrando 2 clases predominantes respecto a su importancia actual: exosomas y microvesículas.

Los exosomas corresponden a VE pequeñas de un tamaño incluido entre los 30 a 150 nanómetros (nm), que se originan de estructuras intracelulares llamadas cuerpos multivesiculares (CMV) (Johnstone et al., 1987) (figura IA). Los CMV, una clase de endosomas tardíos, provienen de la ruta endocítica y se generan a partir de los endosomas tempranos, los que aumentan su tamaño y forman gemaciones de su membrana con contenido citoplasmático llamados vesículas intraluminales (VIL). Los CMV pueden fusionarse con lisosomas, lo que lleva a la degradación del cargo endocitado o pueden fusionarse con la membrana plasmática permitiendo el reciclaje de elementos endocitados, como receptores de membrana. Las VIL pueden también liberarse al espacio extracelular (Gould and Lippincott-Schwartz, 2009; Klumperman and Raposo, 2014). Entre los mecanismos involucrados en la formación de las estructuras VIL encontramos los dependientes y los independientes de ESCRT (Complejo de clasificación endosomal necesarios para el transporte). ESCRT corresponde a una serie de complejos multiprotéicos que entre sus funciones permiten: 1) marcar proteínas para su movilización a dominios específicos para los CMV, 2) armar los microdominios y formar las invaginaciones de la membrana endosomal y 3) escindir y liberar las VIL en el lumen endosomal (Raiborg et al., 2003) Proteínas accesorias de este complejo como Alix y TSG101 se usan como proteínas marcadoras de VE (Colombo et al., 2013). Los mecanismos independientes de ESCRT incluyen aquellos relacionados a microdominios de CMV enriquecidos en proteínas tetraspaninas como CD81, CD9 y CD63 (Buschow et

al., 2009; Phuyal et al., 2014), entre otros, los cuales tienen interacciones con las proteínas destinadas a VIL y son marcadores de mayor especificidad respecto a su origen endosomal. Otro mecanismo es aquel relacionado con el enriquecimiento de lípidos en la membrana destinada a ser VIL, como el caso de ceramida y colesterol (Rappa et al., 2013), siendo estos dominios similares a los descritos como balsas lipídicas encontradas en la membrana plasmática. Posteriormente, estos CMV son transportados a la membrana plasmática, fusionándose ambas membranas. Debido a esta acción, las VIL son liberadas al espacio extracelular pasando a denominarse exosomas (figura IA). Los exosomas pueden transportar una serie de moléculas biológicamente activas, las que incluyen proteínas (asociadas a membrana o solubles), lípidos y ácidos nucleicos como DNA, mRNA y microRNA (miRNA o miR) (Colombo et al., 2014).

Otro tipo de VE de importancia son las microvesículas (MV), VE formadas a partir de la gemación y fisión de la membrana plasmática, los que antiguamente poseían diversos nombres dependiendo del tipo o estado de la célula de donde se aíslan (figura IB). Estas vesículas son más heterogéneas desde el punto de vista del tamaño que los exosomas (50 a 1000 nm e incluso más), sin embargo, en características físicas como en bioquímicas comparten características con exosomas, como elementos de la maquinaria ESCRT (Alix y TSG101), por lo tanto, es complejo el proceso de separar ambas poblaciones de vesículas extracelulares mediante técnicas de ultracentrifugación diferenciada y kits comerciales que usan columnas de exclusión por tamaño.

Debido a esta dificultad, la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares dicta otra forma de clasificar las VE obtenidas después de su aislamiento usando rangos de tamaño (Théry et al., 2018) y el campo de estudio de vesículas extracelulares se enfoca actualmente en las VE pequeñas, vesículas de tamaño inferior a los 200 nanómetros, las cuales pueden obtenerse actualmente mediante técnicas de separación usando ultracentrifugación diferenciada o kits comerciales.



**B**

	Exosomas	Microvesículas
<b>Origen</b>	Endosoma	Membrana Plasmática
<b>Tamaño</b>	50-150 nm	50-500 nm (hasta 1000 nm)
<b>Otros Nombres</b> (De acuerdo a su origen, tamaño y morfología)	Prostasomas Tolerosomas Dexosomas Nanovesículas Vesículas like-exosomas	Micropartículas Oncosomas Migrasomas Neuroesferas Cuerpos apoptóticos

**Figura I. Clases se vesículas extracelulares según su biogénesis.** A) Las vesículas extracelulares provienen de distintas estructuras membranas. Las microvesículas provienen a partir de la gemación de la membrana plasmática y los exosomas provienen a partir de los cuerpos o endosomas multivesiculares que se fusionan con la membrana plasmática. B) Características principales de las vesículas exosomas y microvesículas. Modificado de (van Niel et al., 2018).

### **6.3. Vesículas extracelulares en cáncer y metástasis.**

Esta clase de VE se han relacionado con procesos tanto fisiológicos como patológicos (Zhang et al., 2015). Así, los exosomas han tomado real relevancia en cáncer, donde la producción de estas vesículas por parte de células tumorales pareciera favorecer el desarrollo y metástasis del tumor. Ejemplos destacables son la supresión de la respuesta inmune (Czernek and Duchler, 2017) y el acondicionamiento del microambiente tumoral cercano junto con la preparación de tejidos lejanos, dando los cimientos para la futura colonización por las células tumorales (Kahlert and Kalluri, 2013; Yang et al., 2017; Zhang et al., 2015). Modelos celulares que dan cuenta de esto son aquellos relacionados con procesos de migración, invasión y metástasis. Por ejemplo, modelos de hepatocarcinoma, así como cáncer de mama humano muestran cómo el tratamiento con VE proveniente de líneas altamente metastásicas es capaz de promover mayor migración en células tumorales de bajo poder metastásico (Campos et al., 2018; He et al., 2015)

Así como hay una relación entre el grado de avance del cáncer y las características cualitativas y cuantitativas de los exosomas asociados, se ha encontrado también una relación entre la gravedad del cáncer y la expresión de Caveolina-1 (CAV1), una proteína importante en la señalización celular que aumenta en las células tumorales, siendo esto evidente en modelos de cáncer *in vitro* e *in vivo* (Núñez-Wehinger et al., 2014). Interesantemente, en pacientes con melanoma se ha observado que existen exosomas con CAV1, donde la presencia de esta proteína, así como el número de exosomas presentes en la sangre se asocian con tumores más agresivos (Senetta et al., 2013). Sin embargo, aún queda por conocer la función precisa de esta proteína en exosomas y su contribución en generar características más agresivas en células tumorales. Una posibilidad es que mediante la transferencia de exosomas con CAV1 procedente de células metastásicas, los exosomas entreguen características de metástasis a las células tumorales.

#### **6.4. Caveolina-1.**

Las caveolinas son proteínas integrales de membrana de 21-24 kDa que han sido descritas como el principal componente funcional y estructural de las caveolas (Brown and London, 1998). CAV1 posee un dominio hidrofóbico central entre los residuos 102 y 134 que se inserta en la bicapa de membranas adoptando una conformación similar a una horquilla. Además, en su región N-terminal, adyacente al dominio hidrofóbico, entre los residuos 82-101 se encuentra el dominio de andamiaje (CSD), responsable de las interacciones entre CAV1 y numerosas proteínas de señalización celular que poseen un dominio de unión a caveolina (CBD), tales como proteínas G heterotriméricas, H-Ras, tirosinas quinasas de la familia Src, Proteína quinasa C (PKC), óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF-R) y componentes de la cascada p42/44 MAPK (Okamoto et al., 1998).

Debido a esto, 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, señalización y muerte celular (Quest et al., 2008). Sin embargo, es importante destacar que también existen interacciones de proteínas con CAV1 que son independientes del dominio de andamiaje (ver más adelante).

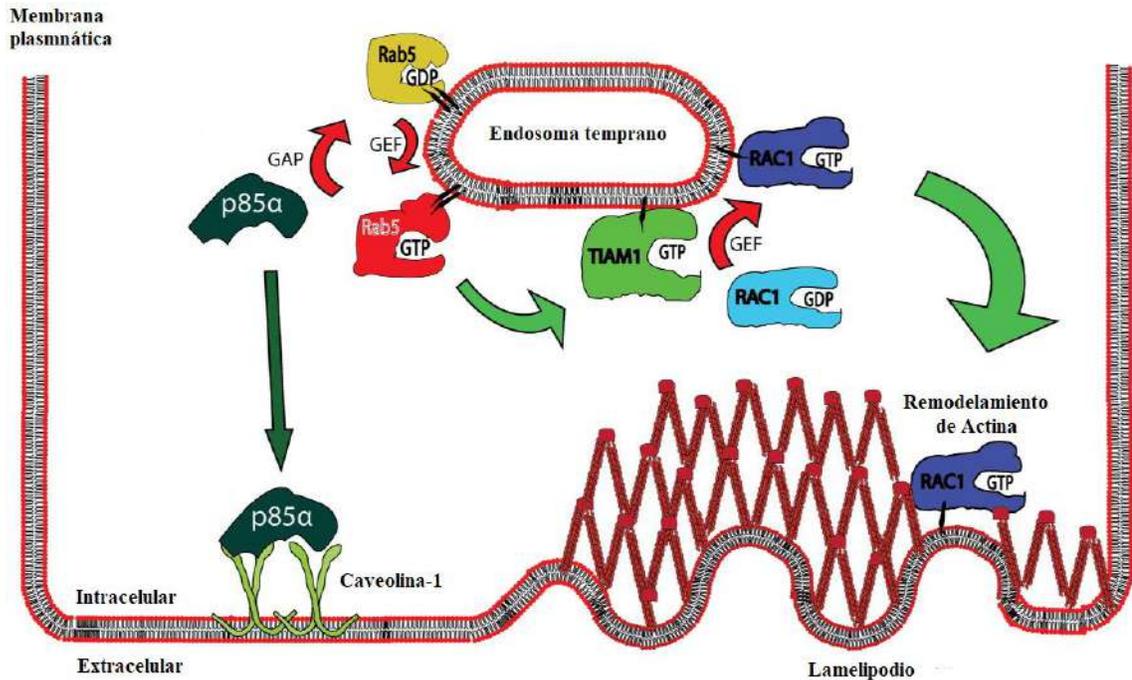
#### **6.5. Caveolina-1 en migración celular y metástasis.**

CAV1 promueve procesos de etapas avanzadas del cáncer como migración, invasión y metástasis (Goetz et al., 2008; Núñez-Wehinger et al., 2014; Quest et al., 2008). En cáncer de próstata, CAV1 promueve el crecimiento tumoral de manera autocrina y paracrina mediante la secreción de CAV1 (Llorente et al., 2004), y en modelos celulares de melanoma murino y humano, la expresión inducida de CAV1 aumenta el potencial metastásico de estas células (Lobos-Gonzalez et al., 2014; Lobos-González et al., 2013) en comparación con las células que tienen niveles bajos de CAV1. Además, casos más

agresivos de líneas tumorales de cáncer de mama y colon se han asociado a una mayor expresión de CAV1 (Bender et al., 2000; Savage et al., 2007).

Se han descrito varios mecanismos para explicar cómo CAV1 promueve tales características, siendo el paso inicial, la fosforilación de CAV1 en el residuo de tirosina-14 mediante quinasas de la familia Src (Li et al., 1996; Sanguinetti and Mastick, 2003). El mecanismo desencadenado, descrito por nuestro laboratorio, ocurre mediante la activación de una vía de señalización celular que incluye las proteínas p85alfa-Rab5-Rac1 (Díaz et al., 2014a). CAV1 secuestra a p85alfa (también conocido como PIK3R1, unidad reguladora de PI3K), una proteína activadora de la actividad GTPasa (GAP) de la proteína G pequeña Rab5, lo que mantiene activa a Rab5 en los endosomas tempranos. Esta a su vez recluta a un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) llamado TIAM que a su vez activa a Rac1, otra proteína G pequeña involucrada en el remodelamiento del citoesqueleto, específicamente la formación de lamelipodios, promoviendo de esta manera migración celular e invasión (Díaz et al., 2014b) (figura II). Sin embargo, no basta sólo con la expresión de CAV1, se requiere además su fosforilación en Y14 para desencadenar esa propiedad.

Estudios realizados en el laboratorio utilizando el compuesto PP2 (inhibidor selectivo de tirosinas quinasas de la familia Src) (Urrea et al., 2012) y mutantes de CAV1 fosfomiméticas y no fosforilables (Ortiz et al., 2016) indican que el efecto de CAV1 sobre la migración vía p85alfa-Rab5-Rac1 es dependiente de la fosforilación en la tirosina 14 por las quinasas de la familia Src. Esta modificación además favorece procesos de invasión y metástasis *in vivo*. Al inhibir la actividad quinasa de la familia Src usando PP2 y Dasatinib (inhibidor de Src/Abl aprobado clínicamente para el tratamiento de leucemia), se observó una baja en la actividad de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 en células de melanoma que sobreexpresan CAV1 [B16F10(CAV1)]. Esto tiene como consecuencia un menor número de células tumorales capaces de degradar matriz extracelular y una masa tumoral reducida en pulmones (Ortiz et al., 2020).



**Figura II. Cascada de señalización activada en la migración celular dependiente de Caveolina-1.** CAV1 al secuestrar p85α promueve la activación de Rab5, desencadenando el reclutamiento de TIAM1 hacia los endosomas tempranos. TIAM1 activa a Rac1, el cual promueve el remodelamiento del citoesqueleto de actina favoreciendo la migración celular. Modificado de Diaz et al, 2014.

Sin embargo, no se ha estudiado en profundidad si exosomas u otras VE que provienen de células metastásicas y que expresan CAV1, en especial su forma fosforilada en Y14 provenientes de células de alta agresividad, promueven comportamientos más agresivos en células de menor capacidad metastásica.

## 6.6. Caveolina-1 en vesículas extracelulares y su contenido.

CAV1 se ha detectado en VE aisladas de sobrenadantes de cultivos celulares tumorales, así como de sueros de pacientes con grados avanzados de melanoma (Logozzi et al., 2009). Trabajos previos demuestran la presencia de CAV1 en VE provenientes de líneas celulares metastásicas de cáncer de mama (Campos et al., 2018). También muy relevante desde el punto de vista diagnóstico y de seguimiento de esta enfermedad, fue posible detectar en

pacientes con melanoma metastásico, un incremento en el número de VE, sumado al aumento en la detección de CAV1 en esas vesículas, lo que sugiere que en estadios avanzados, las células tumorales producen un mayor número de vesículas con CAV1 (Logozzi et al., 2009).

Para que CAV1 pase a ser parte de las vesículas extracelulares, necesita formar parte de la ruta endocítica. Se ha determinado que CAV1 posee varios sitios de ubiquitinación, y un grupo de estos sitios más la fosforilación en Y14, son fundamentales en la movilización de CAV1 a las vesículas intraluminales (Albacete-Albacete et al., 2018). Además, la presencia de CAV1 en las células afecta la composición proteica de las VE producidas por las células, lo que confiere cambios en su actividad biológica. Campos y colaboradores observaron que el silenciamiento de CAV1 cambió la composición proteica de las VE, mostrando una disminución de proteínas involucradas en procesos de adhesión y migración celular, como las proteínas de matriz extracelular, Cyr61 y Tenascina (Campos et al., 2018). Resultados similares de Albacete, muestran que la presencia de Tenascina-C en exosomas provenientes de fibroblastos estimulan procesos migratorios, similares a los vistos en transformaciones epitelio-mesénquima, además de favorecer los depósitos de matriz extracelular en áreas alrededor del tumor (Albacete-Albacete et al., 2018).

También hay evidencia de que la presencia de CAV1 influye en el cargo de otras biomoléculas, como el caso del miRNA en VE del tipo microvesícula, presente en modelos de neumocitos tipo 1. Los miRNA detectados en estas VE favorecen procesos proinflamatorios, siendo relevantes en procesos tumorales (Lee et al., 2019a; Lee et al., 2019b).

Estos antecedentes apoyan la idea que CAV1 juega un papel determinante en definir el cargo de diferentes moléculas biológicamente activas en las vesículas extracelulares.

## 6.7. Resumen de Antecedentes.

- Los exosomas son VE de origen endocítico y transportan moléculas biológicamente activas que pueden ser importantes tanto en procesos fisiológicos como patológicos, por ejemplo, la metástasis.
- Exosomas de origen tumoral promueven invasión y metástasis mediante la preparación del nicho a invadir.
- Exosomas con CAV1 están presentes en pacientes en estadios de cáncer más avanzados.
- CAV1 y su fosforilación en Y14 promueve la migración, invasión y metástasis en modelos *in vitro* e *in vivo*.
- La presencia de CAV1 en células de cáncer metastásico de mama influye en el contenido de moléculas biológicamente activas presentes en las VE.

## **7. HIPÓTESIS**

*Las vesículas extracelulares provenientes de líneas tumorales metastásicas que expresan CAV1 y su mutante foafomimética en tirosina 14 (Y14E) aumentan la migración e invasión de líneas tumorales menos metastásicas debido a la transferencia de proteínas que favorecen la motilidad celular.*

## **8. OBJETIVO GENERAL**

Determinar si el estado de fosforilación en Y14 de CAV1 en células de melanoma metastásicas afecta la producción, características físicas y bioquímicas de las vesículas extracelulares, ejerciendo efectos biológicos sobre células receptoras de menor capacidad metastásica.

La novedad de este proyecto reside en relacionar la capacidad de CAV1 de promover migración, invasión y metástasis, con la capacidad que tienen las VE provenientes de líneas tumorales agresivas que expresen CAV1 (fosforilada o no en Y14), de aumentar la agresividad de células tumorales menos malignas mediante transferencia de proteínas desde las células más agresivas.

## **9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

### **9.1. Purificar y caracterizar las VE pequeñas provenientes de líneas celulares de melanoma murino B16F10 que expresan CAV1 y mutantes de CAV1 en Y14.**

9.1.1. Recolectar y purificar VE a partir de sobrenadante de líneas celulares B16F10wt, B16F10(Mock), B16F10(CAV1), B16F10(CAV1/Y14E) y B16F10(CAV1/Y14F).

9.1.2. Caracterizar las VE derivadas de células B16F10wt, B16F10(Mock), B16F10(CAV1), B16F10(CAV1/Y14E) y B16F10(CAV1/Y14F).

### **9.2. Determinar sí las VE pequeñas provenientes de líneas tumorales que expresan CAV1 y mutantes de CAV1 en Y14 inducen respuestas biológicas en líneas**

**celulares de melanoma murino B16F10 de menor capacidad metastásica que no expresan CAV1.**

9.2.1. Evaluar la interacción entre la VE derivadas de células B16F10wt, B16F10(Mock), B16F10(CAV1), B16F10(CAV1/Y14E) y B16F10(CAV1/Y14F) y células receptoras que no expresan CAV1.

9.2.2. Evaluar los efectos biológicos de VE derivadas de células B16F10wt, B16F10(Mock), B16F10(CAV1), B16F10(CAV1/Y14E) y B16F10(CAV1/Y14F) sobre células receptoras que no expresan CAV1, mediante ensayos de migración y migración transendotelial.

**9.3. Determinar el perfil proteómico de las VE pequeñas de las líneas celulares de melanoma murino B16F10 que expresan CAV1 y mutantes de CAV1 en Y14.**

9.3.1. Procesamiento de muestras de VE usando cromatografía líquida de alta eficacia y espectrometría de masas (LC-MS/MS).

9.3.2. Análisis bioinformáticos de datos obtenidos usando Ontología Génica (GO).

## **10. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **10.1. Modelo y cultivo celular**

Se utilizó la línea celular de cáncer de melanoma murino, B16F10. Esta línea celular fue generada a partir de 10 ciclos de inoculación y recuperación en el pulmón de células B16F0 en ratones C57BL/6. Se caracteriza por ser una línea tumoral adherente y metastásica que no expresa CAV1 por lo que las células wild type (wt) fueron transfectadas establemente con los vectores pLacIOP (Mock) y pLacIOP-CAV1 (CAV1), para expresar CAV1 de manera inducible por IPTG (US Biological Cat. 1850), y con los vectores pLacIOP-CAV1/Y14E (mutante fosfomimética), y pLacIOP-CAV1/Y14F (mutante no fosforilable), para estudiar el efecto de la fosforilación de CAV1 en la tirosina 14 (ver Ortiz et al., 2016). Para generar líneas establemente transfectadas se seleccionó las células con 750 µg/ml de Higromicina B (US Biological. Cat. H9700-05B) por 3 semanas y las líneas celulares fueron caracterizadas mediante Western blot. Estas líneas celulares se cultivan en medio RPMI 1640 (Gibco. Cat. 23400-021) suplementado con 5% suero fetal bovino (SFB) (Biological Industries. Cat. 040011<sup>a</sup>) libre de VE y 1% Penicilina/Estreptomina (Gibco. Cat. 15640-055). Las líneas celulares anteriormente mencionadas se mantienen a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **10.2. Preparación de suero fetal bovino libre de vesículas extracelulares**

Se llevó a cabo la ultracentrifugación a 100000 x g de SFB (Biological Industries. Cat 040011<sup>a</sup>) durante 16 h a 4°C para descartar la presencia de VE de origen bovino. Se utiliza el rotor de ángulo fijo T-1250 en la ultracentrífuga Thermo Fisher Scientific Sorvall a 4°C.

### **10.3. Purificación de vesículas extracelulares pequeñas mediante ultracentrifugación diferenciada**

Se recolectó el sobrenadante de las líneas celulares con un 70-80% de confluencia a partir de placas de 10 cm de diámetro. El sobrenadante primero se centrifugó a 300 x g por 10 min usando la centrífuga Universal 320 R Hettich refrigerada para sedimentar células u

otros residuos celulares de gran tamaño. El sobrenadante se centrifugó a 2000 x g durante 30 min para eliminar vesículas de mayor tamaño, así como restos celulares. Luego, el sobrenadante se centrifugó adicionalmente a 10000 x g durante 40 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 100000 x g durante 90 min usando un rotor de ángulo fijo T-1250 en la ultracentrífuga Thermo Fisher Scientific Sorvall a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de PBS 1X, se juntó toda la suspensión de la misma línea en un tubo único y se volvió a centrifugar a 100000 x g durante 90 min. El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en 200 µl y se almacenó a -80°C hasta su uso.

#### **10.4. Purificación de vesículas extracelulares pequeñas mediante Exo-spin™ modificado**

Se recolectó el sobrenadante de las líneas celulares con un 70-80% de confluencia a partir de placas de 10 cm de diámetro y se sometieron a una centrifugación inicial a 300 x g durante 10 min, posteriormente se rescató el sobrenadante y se centrifugó a 15000 x g por 30 min. Posteriormente, el sobrenadante se concentró con filtro AMICON de 100 K (Merck. Cat. UFC910024) durante 15 min a 3000 x g. Luego, el concentrado de sobrenadante se incubó con *Exosome precipitation reagent* (Cell Guidance systems. Cat. EX06-250) durante 1 h a 4°C. Luego, se sometió a 16000 x g durante 1 h a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en PBS 1X y se utilizó protocolo descrito por *Cell Guidance Systems*, UK para hacer pasar la muestra por la columna de exclusión por tamaño (Cell Guidance systems. Cat. EX01-25) para obtener los exosomas.

#### **10.5. Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA)**

Las muestras de VE se diluyeron en una razón entre 1:1000 a 10:1000 en PBS estéril para obtener entre 20 y 80 partículas por campo. El equipo NanoSight NS300 (NanoSight NTA 2.3 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. Se estableció que la cámara capturara 3 videos por muestra con una duración de 30 s por video. 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.

#### **10.6. Microscopía electrónica de transmisión (MET)**

Se colocó 5 µl de muestra de VE sobre grilla de cobre 300-mesh recubierta con película de Formvar y se dejó secar a temperatura ambiente, absorbiendo el exceso con papel filtro. Posteriormente se añadió 15 µl de acetato de uracilo y se esperó 1 min para luego absorber el exceso con papel filtro. 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.

#### **10.7. Western blot**

##### **10.7.1. Purificación y cuantificación de proteínas totales.**

Para la obtención de extractos celulares, las placas con células se lavaron con PBS 1X frío conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas [PMSF 1 mM (Sigma. Cat. P7626), Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM (Sigma. Cat. S6508), Benzamida 100 µg/ml (Sigma. Cat. B6506), Antipaina 10 µg/ml (Calbiochem. Cat. 178220), Leupeptina 12,5 µg/ml (USBiological. Cat. L2050) y NaF 10 mM (Sigma. Cat. S-1504)]. Se eliminó el sobrenadante y se colocó el buffer de sonicado [Hepes 0.2 mM pH 7.4 (Gibco. Cat. 11344-033), SDS 10 % (USBiological. Cat. 151-21-3), PMSF 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM, Benzamidina 10 µg/ml, Antipaina 1 µg/ml, Leupeptina 1 µg/ml] sobre la placa. Con un *cell scraper* se arrastró el contenido de la placa y se traspasó a un tubo de 0.6 ml. Cada muestra en hielo fue sonicada 2 veces durante 10 s. En cuanto a la muestra de VE, 10 µl de buffer de sonicado 5X fue añadido a 40 µl de muestra. La muestra de VE mantenida en hielo fue sonicada 3 veces durante 10 s cada vez.

Se preparó una dilución 1:10 de cada extracto para la cuantificación de las muestras de proteínas haciendo uso del kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific. Cat. 23225), en placa de 96 pocillos para medir en un espectrofotómetro UltraQuant. La cuantificación proteica se realizó con el método de BCA (ácido bicinconínico) utilizando seroalbúmina bovina como proteína patrón para la curva de calibración medida a 562 nm de absorbancia. El extracto proteico se conservó a -80°C hasta su uso.

#### **10.7.2. Electroforesis, electrotransferencia y revelado.**

Los extractos proteicos se cargaron (5-50 µg proteína total) en un gel de poliacrilamida/SDS al 12% y se sometieron a separación por electroforesis durante 90 min a 100 voltios (V). Luego, se realizó la electrotransferencia hacia la membrana de nitrocelulosa a 100V por 90 min manteniendo frío el proceso. Al finalizar la transferencia, se desmontó el sistema. Las membranas se tiñeron con rojo Ponceau (Sigma. Cat. P3504) para verificar la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon posteriormente en leche 5% diluida en PBS-Tween 0,1%. Luego se incubaron con el anticuerpo primario y posteriormente después de lavados, se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (HRP) (Tabla 1). La reacción se reveló por quimioluminiscencia. Se realizó la adquisición de imágenes a distintos tiempos mediante cámara digital Hamamatsu (Discovery Gene Xpress).

**Tabla 1. Anticuerpos utilizados en los análisis por Western Blot.**

Anticuerpo primario diluido en leche 5% PBS-Tween-20 0,1%	Marca	Anticuerpo secundario diluido en PBS-Tween-20 0,1%	Marca2
$\beta$ -actina (1:1000) monoclonal Origen: ratón	Sigma-Aldrich (Cat. A5316)	Anti-IgG de Ratón (1:5000). Origen: cabra	Rockland (Cat. 610-4302)
Alix (1:3000) monoclonal Origen: ratón	Santa Cruz (Cat. sc-53540)		
CD81 (1:3000) monoclonal Origen: ratón	Santa Cruz (Cat. sc-166029)		
TSG101 (1:3000) monoclonal Origen: ratón	Santa Cruz (Cat. sc-7964)		
Calnexina (1:500) policlonal Origen: ratón	Novus biological (Cat. NB100-1965)	Anti-IgG de Conejo (1:3000) Origen: cabra	Rockland (Cat. 611-1302)
Caveolina-1 (1:1000) monoclonal Origen: ratón	BD Transduction Laboratories (Cat. 610406)		

## 10.8. Ensayos funcionales de vesículas extracelulares

### 10.8.1. Ensayo de internalización de vesículas extracelulares

VE purificadas fueron marcadas por 5 min a temperatura ambiente con PKH67 más diluyente C (Green Fluorecent Linker Midi Kit for General Cell Membrane. Sigma-Aldrich. Cat. PKH67GL). Una vez pasados los 5 min, la mezcla se pasó la por columna Exo-spin y se continuó el protocolo según el fabricante (Cell Guidance Systems). La tinción no unida a vesícula queda en la columna.

Se sembró  $5 \times 10^4$  células B16F10(Mock) en placas de 24 pocillos y se dejó incubar por 24 h. Se cambió medio por medio con 5% suero libre de vesículas y se agregó 1000, 3000 o 5000 VE marcadas con PKH 67. Las células fueron tratadas por 3 o 24 h para después tripsinizar, lavar y resuspender en PBS para ser analizadas por citometría de flujo. Como controles de auto fluorescencia se usaron células tratadas con VE sin marcar. Las muestras con células resuspendidas se analizaron con el citómetro BD FACSCanto (centro de servicios del CEMC).

### **10.8.2. Pretratamiento de células B16F10(Mock) con vesículas extracelulares para ensayos de viabilidad, migración e invasión**

Se sembró  $3 \times 10^5$  células B16F10(Mock) en placas de 6 cm. Al día siguiente, el medio de cultivo de cada una de las placas se reemplazó por medio con 5% suero libre de vesículas. A cada placa se le añadieron 10  $\mu\text{g}$  de proteína total de VE (equivalente a 30.000 EV por célula) de B16F10(Mock), B16F10(CAV1), B16F10(CAV1/Y14E) o B16F10(CAV1/Y14F). Las células fueron tratadas con exosomas durante 24 h, para luego realizar ensayos funcionales.

### **10.8.3. Ensayo de viabilidad por exclusión de azul de tripano**

Las células tratadas fueron tripsinizadas y resuspendidas en medio completo y se contó su densidad en hemocitómetro. Se preparó una solución de azul de tripano (Biological Industries) al 0,4% en PBS, pH 7.2-7.3. Se tomó 100  $\mu\text{l}$  de suspensión de células y se agregó a 100  $\mu\text{l}$  de solución de azul de tripano, mezclando bien y después se cargó 10  $\mu\text{l}$  en un hemocitómetro para observar en microscopio a bajo aumento. Se contó las células teñidas de azul y las células totales y se calculó el % de células viables como sigue:

$$\% \text{ células viables} = [1.00 - (\text{Número células azules} / \text{Número células totales})] \times 100.$$

### **10.8.4. Ensayo de Migración**

Se sembró  $2 \times 10^5$  células tratadas o no con exosomas en ausencia de suero en transwell de 6.5 mm de diámetro que poseen una membrana de policarbonato con poros de 8  $\mu\text{m}$ , previamente cubiertos con 100  $\mu\text{l}$  de fibronectina 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Gibco. Cat. 33016-015) en la parte inferior del inserto. Las células se dejaron migrar en ausencia de suero por 2 h, y después se fijaron y tiñeron aquellas 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 6 campos diferentes utilizando un microscopio óptico.

### **10.8.5. Ensayos de Migración Transendotelial (MTE)**

Se sembró  $1 \times 10^5$  células EAHy926 en 200  $\mu$ l de medio IMDM más SFB 20% en cámara de Boyden. 72 h después se verificó que la monocapa de las células endoteliales incubadas en la membrana no era permeable. Para probar lo anterior se adicionó un pocillo extra para la realización de una prueba de permeabilidad. La prueba de la permeabilidad consistió en tomar 200  $\mu$ l el medio de la parte inferior del inserto antes y después de agregar e incubar, por 30 min a 37°C, azul de dextrano (Sigma. Cat. D5751) 10 mM sobre la monocapa. Se midió ambos medios a 620 nm y se definió que la membrana es permeable si la diferencia entre antes y después es mayor a 0,2 unidades de absorbancia.

Después de comprobar lo anterior Las células B16F10(Mock) pretratadas con EV fueron teñidas con CellTracker Green (Life Technologies; ThermoFisher. Cat. C2925) por 30 min en incubadora. Posteriormente, se agregaron 50.000 células B16F10(Mock) en 100  $\mu$ l de medio RPMI sin SFB sobre la monocapa. Se agregó en la parte inferior, medio de cultivo RPMI 10% SFB. Se dejó migrar por 16 h y se agregó a la membrana solución fijadora [Paraformaldehído 4% (Sigma. Cat. P6148), KOH 0,04M (Fluka. Cat. 60369), PIPES 100mM (Sigma. Cat. P1851), EGTA 2mM (Sigma. Cat. E3889), MgCl<sub>2</sub> 2mM (Fluka. Cat. 63072)] a las células. Se eliminaron las células que no migraron usando cotonos de algodón y se contaron las células que quedaron al otro lado de la membrana del inserto en microscopio de fluorescencia.

## **10.9. Análisis proteómicos *Shotgun* de vesículas extracelulares**

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

Las proteínas se extrajeron de VEs obtenidas a partir de células B16F10wt, B16F10(Mock), B16F10(CAV1), B16F10(CAV1/Y14E), B16F10(CAV1/Y14F).

En un tubo Eppendorf se disolvieron 10 µg de solución de proteína de VE en solución de deoxicolato de sodio (SDC, 3% concentración final) y bicarbonato de amonio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , Concentración final 100 mM) para llegar a un volumen final de 55 µl.

Para la reducción se agregó 5 µl de Ditiotreitól (DTT) 100nM y se incubó a 65°C por 45 min en agitación constante. Después de enfriar se agregó 10 µl de Iodoacetamida a 100 mM recién hecha y se incubó en oscuridad por 30 min para después agregar 5 µl de DTT 100 mM, 188 µl de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  500mM y 727 µl de agua.

En el proceso de digestión enzimático se agregó a la solución anterior 6 µl de tripsina 0,05 µg/µl y se verificó que la solución estuviese a un pH > 7,5 para después mezclar en agitación constante por 4 h a 37°C. Posteriormente, se realizó una segunda digestión agregando 4 µl de tripsina 0,05 µg/µl y se dejó incubando en agitación constante toda la noche (>14 h) a 37°C.

Se detuvo la digestión agregando 80 µl de ácido trifluoroacético (TFA) al 20 %, chequeando que el pH bajara a menos de 3,0. Se centrifugó por 20 min a 14400 x rpm y el sobrenadante se traspasó a un tubo Eppendorf nuevo para continuar con la elusión.

#### **10.9.2. Extracción de fase sólida usando cartucho Waters de equilibrio hidrófilo-lipofílico (HLB) 1cc**

Se humedeció el cartucho con 1 ml TFA 0.3 % diluido en acetonitrilo (ACN) y se eliminó el eluido. Se lavó con 1 ml de TFA 0.3 % diluido en ACN 60% y se eliminó el eluido. Luego, se equilibró con 1 ml de TFA 0.3 % diluido en agua y se eliminó el eluido (2 veces). Se cargó toda la muestra al cartucho y se lavó con 1 ml de TFA 0,3 % diluido en agua y se eliminó el eluido (2 veces). Para la etapa de elusión del digerido se eluyó el cartucho lentamente con 1 ml de TFA 0.3 % en ACN 60 % y se secó el eluido obtenido usando el concentrador SpeedVac por 6 h. Las muestras secas se almacenaron a -80°C hasta el análisis MS/MS.

### **10.9.3. Análisis de proteómica *Shotgun* en equipo Lumos.**

Se reconstituyó las muestras digeridas secas en 80 µl de ACN 1 % ácido fórmico 0.1 %. Se agitaron vigorosamente (vortex) y se guardaron toda la noche a 4 °C. Luego, se agitaron nuevamente por 20 min a temperatura ambiente para posteriormente centrifugar la muestra y traspasar cuidadosamente el sobrenadante al vial y centrifugar a alta velocidad 10 min para que baje todo el líquido y sólidos. Se inyectó finalmente 2µl (0,2 µg) al instrumento Lumos.

### **10.9.4. Análisis de datos de espectrometría de masas e identificación de proteínas**

El análisis de LC-ESI-MS/MS fue hecho en modo ion positivo con el Espectrómetro de Masas Orbitrap Fusion Lumos Tribid acoplado al Cromatógrafo líquido de ultra nanoACQUITY. Una vez inyectadas en la columna, las mezclas de péptidos resultantes se separaron usando un gradiente lineal de solvente A que contenía ácido fórmico/agua 0.1 % y Solvente B que contenía ACN/ácido fórmico 0.1 %. Las muestras reconstituidas fueron desalinizadas en columna de extracción en fase sólida C-18 y luego separada en columna analítica C-18. Las columnas se mantuvieron a temperatura ambiente y los péptidos fueron eluidos desde la columna a 0.5 µl/min y separados usando el siguiente gradiente: 1 a 7 % de solvente B en 1 min; 7 a 25 % de solvente B en 75 min; 25 a 35 % en 15 min y 35 a 80 % en solvente B en 10 min. La columna posteriormente se lavó por 5 min en solvente B 80 % y se reequilibró con solvente A 99 % por 13 min. El espectrómetro de masa se usó en modo de adquisición data-dependiente.

Los espectros MS/MS fueron buscados usando la base de datos UniProtKB de ratón (MOUSE.REF.fasta.20190114) usando el motor de búsqueda Comet MS/MS con modo fijo de modificaciones por alquilaciones en cisteína y modo variable para modificaciones por metilación en metionina. Se permitieron dos sitios de corte para búsquedas restringidas para tripsina. Los resultados de Comet fueron validados usando PeptideProphet y ProteinProphet, usando una probabilidad ajustada menor a 0,90 en

péptidos y menor a 0,95 para proteínas. Para la identificación de una proteína, al menos 2 péptidos únicos de la proteína de interés deben ser detectados. Esto permite disminuir las probabilidades de detectar falsos positivos. El total de conteo de péptidos fue usado para comparar la abundancia de una proteína.

#### **10.10. Análisis bioinformáticos**

Las proteínas identificadas fueron filtradas manualmente para dejar la lista de proteínas con al menos 2 péptidos en promedio. Las listas de proteínas obtenidas fueron analizadas utilizando el análisis de proteínas a través de la herramienta de relaciones evolutivas. (PANTHER: Análisis de proteínas mediante relaciones evolutivas; <http://www.pantherdb.org>) para filtrar los códigos con identificación. Se diseñaron diagramas de Venn con las listas finales usando la herramienta interactiVenn (<http://www.interactivenn.net/>). Los análisis de Ontología Génica (GO: Gene Ontology) para mostrar enriquecimiento de proteínas en compartimientos celulares GO y procesos celulares GO fue hecho usando la plataforma de anotación funcional DAVID (Base de Datos para anotación, visualización y descubrimiento integrado) Bioinformatic Database 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) (Huang et al., 2009). Se usó el indicador EASE para representar nivel de enriquecimiento de una lista de proteínas en una categoría GO. EASE corresponde al valor p de la prueba exacta de Fisher modificada. Para cada categoría GO un valor de EASE < 0.01 es considerado altamente enriquecido en la categoría anotada.

#### **10.11. Análisis estadístico**

Todos los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) de tres o más experimentos independientes según se indique. Los resultados entre 2 grupos se analizaron usando la prueba no paramétrica Mann-Whitney. Los resultados entre 3 o más grupos se analizaron estadísticamente con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y un post test de Dunns. La significancia (valor de p con IC 95%) se estableció en el nivel nominal de p < 0.05. Todos los datos se procesaron utilizando el software GraphPad 7.0.

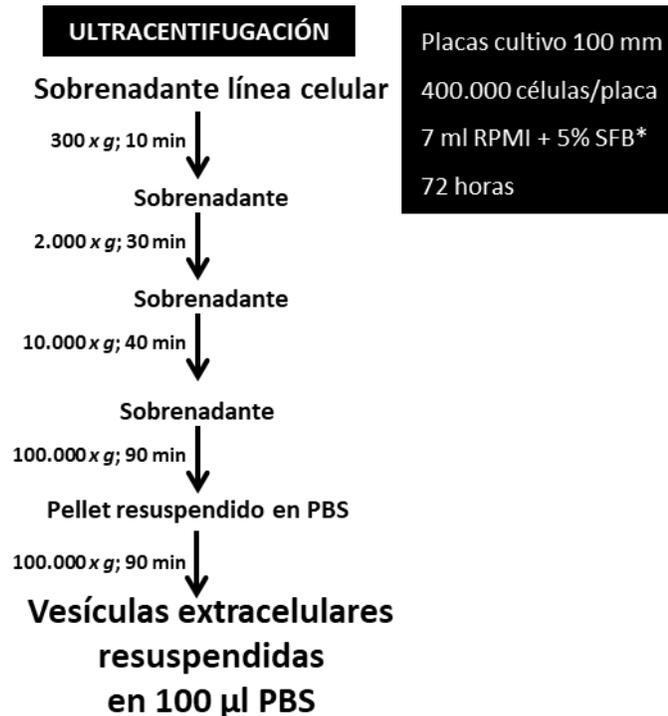
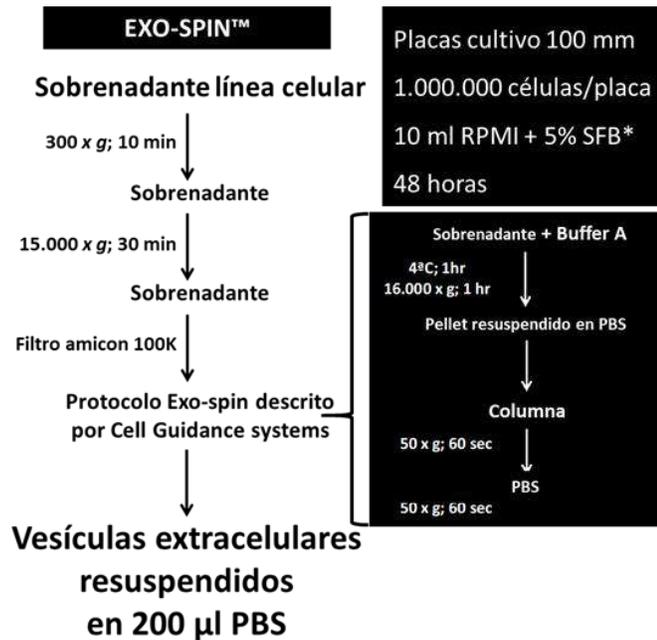
## 11. RESULTADOS

### 11.1. OBJETIVO 1. Purificar y caracterizar las vesículas extracelulares pequeñas provenientes de líneas celulares de melanoma murino B16F10 que expresan CAV1 y mutantes de CAV1 en Y14.

Para la obtención de VE se recolectó aproximadamente 200 ml de sobrenadante (medio condicionado) por cada línea celular, con un 80% de confluencia por 72 h. Todas las líneas se trataron de la misma forma, utilizando el mismo medio e incluyendo un tratamiento con Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) para favorecer la expresión del plasmidio pLac-IOP, y como consecuencia, la traducción de la proteína CAV1 en las células transfectadas.

Se compararon 2 tipos de metodologías para la obtención de VE usando en primera instancia sobrenadante de células B16F10(Mock) y B16F10(CAV1). La primera fue usando el kit Exo-spin (ES, figura 1A), donde el sobrenadante pasa por una fase de precipitación mediante la interacción de elementos membranosos (exosomas o microvesículas pequeñas) con Polietilenglicol (PEG), y posterior separación por columna de exclusión por tamaño. La segunda metodología usada fue la ultracentrifugación diferencial (UC, figura 1 B), donde el sobrenadante es sometido a centrifugaciones de baja velocidad y luego a centrifugaciones de alta velocidad. Esto permite la separación de VE de diferentes tamaños.

A



**Figura 1. Esquema de los métodos usados en la obtención de vesículas extracelulares pequeñas y condiciones de cultivo. A) Metodología de kit comercial Exo-spin. B) Metodología de ultracentrifugación diferenciada.**

Se comparó ambas metodologías de purificación, usando *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) y microscopía electrónica de transmisión (MET) (figura 2).

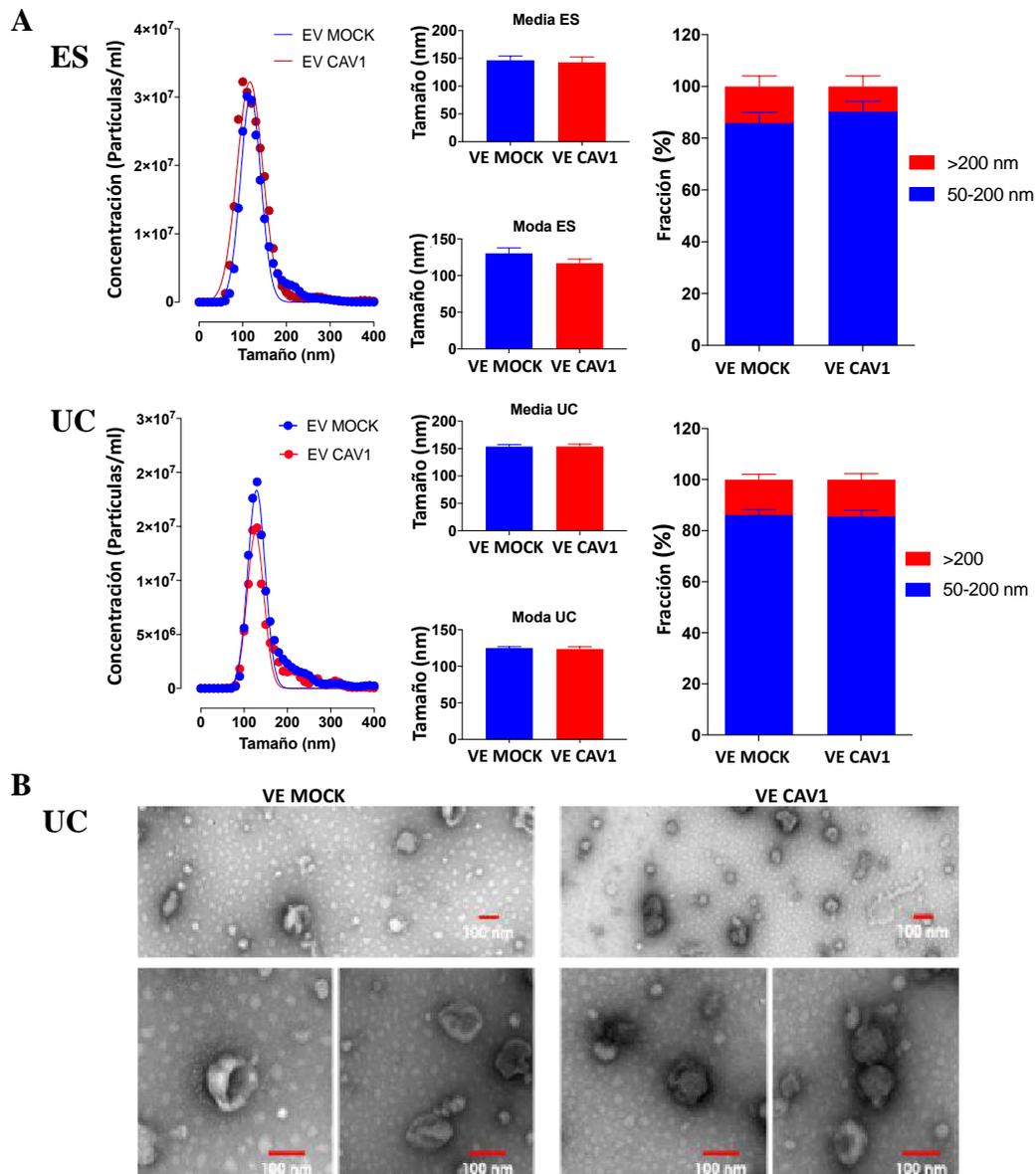
En la figura 2A se observa una distribución similar de las partículas detectadas, al comparar ambas metodologías. Las medidas estadísticas como la media de la VE obtenidas por Exo-spin (VE Mock: 146.5 nm; VE CAV1: 142.9 nm) son levemente menores que las VE por ultracentrifugación (VE Mock: 153.7 nm; VE CAV1: 153.9 nm) pero sin encontrar diferencias significativas. Lo mismo se observa en el caso de la moda, el cual es el valor con más frecuencia en la distribución de vesículas detectadas por Exo-spin (VE Mock: 130.0 nm; VE CAV1: 118.0 nm) y ultracentrifugación (VE Mock: 124.9 nm; VE CAV1: 123.5 nm). Sumado a lo anterior, como se indica a la derecha de la figura 2A, usando ambas metodologías de preparación de VE, más del 80% de éstas son de tamaños menores que 200 nm. Los análisis por TEM fueron hechos posteriormente con las VE obtenidas a partir de UC. Es posible observar mayoritariamente estructuras cóncavas con tamaño aproximado de 100 nm en ambas muestras, características correspondientes a VE de tamaños menores de 200 nm.

Gracias a los datos obtenidos mediante estas dos técnicas de medición de VE se concluye que ambas técnicas son adecuadas para la obtención y enriquecimiento de VE pequeñas (<200 nm) a partir de sobrenadantes de cultivo celular para la línea B16F10 de melanoma murino.

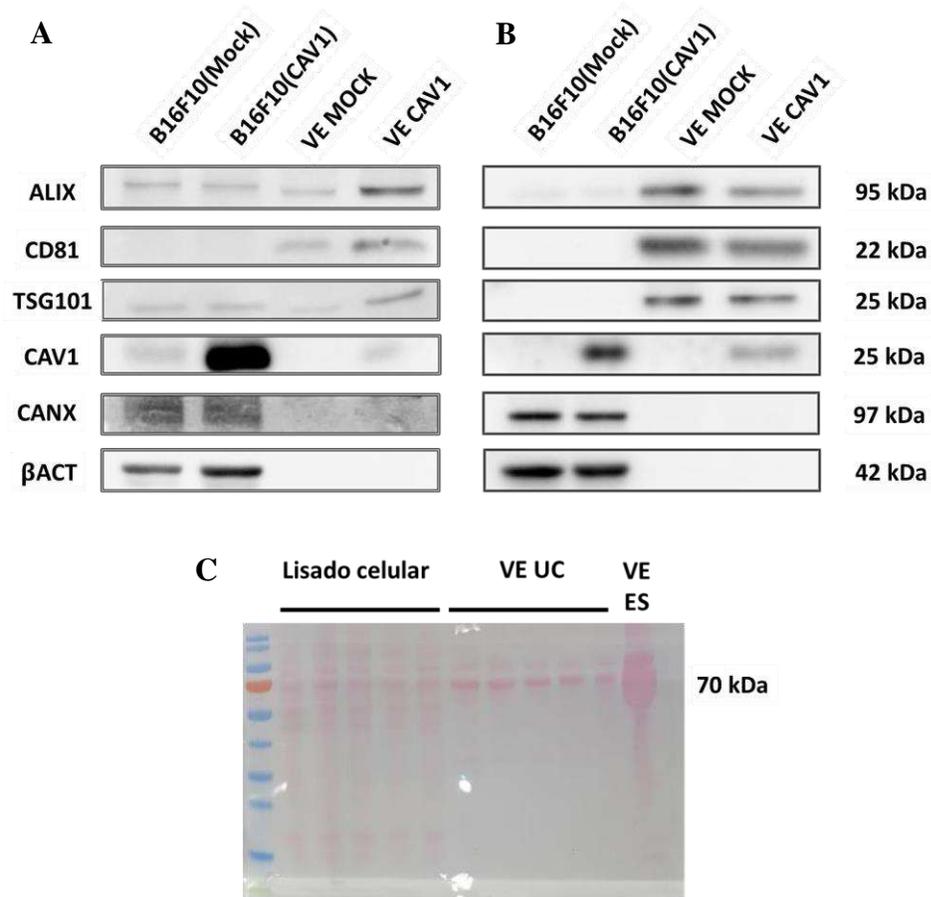
Sin embargo, el análisis mediante Western blot evidencia que las muestras obtenidas por Exo-spin tienen niveles bajos de marcadores proteicos de VE (figura 3A) en comparación con aquellas obtenidas por ultracentrifugación. Las VE obtenidas por ultracentrifugación muestran proteínas con mayor pureza, esto evidenciado por el enriquecimiento de proteínas asociadas a la génesis de VE de origen endosomal (figura 3B). Se comparó además las membranas usando Rojo Ponceau S (figura 3C) para observar las diversas bandas en cada muestra. Al comparar las bandas de muestras obtenidas por UC (líneas VE

UC) con muestras obtenidas usando ES (línea VE ES), es posible observar en esta última, una banda muy prevalente de 70 kDa, banda correspondiente a la proteína albúmina, indicativo de una gran presencia de SFB en la muestra.

Con el análisis de características físicas y bioquímicas de las VE obtenidas es posible concluir que las VE obtenidas a partir de UC cumplen las condiciones necesarias para ser posteriormente utilizadas para ensayos funcionales, considerando su pureza.



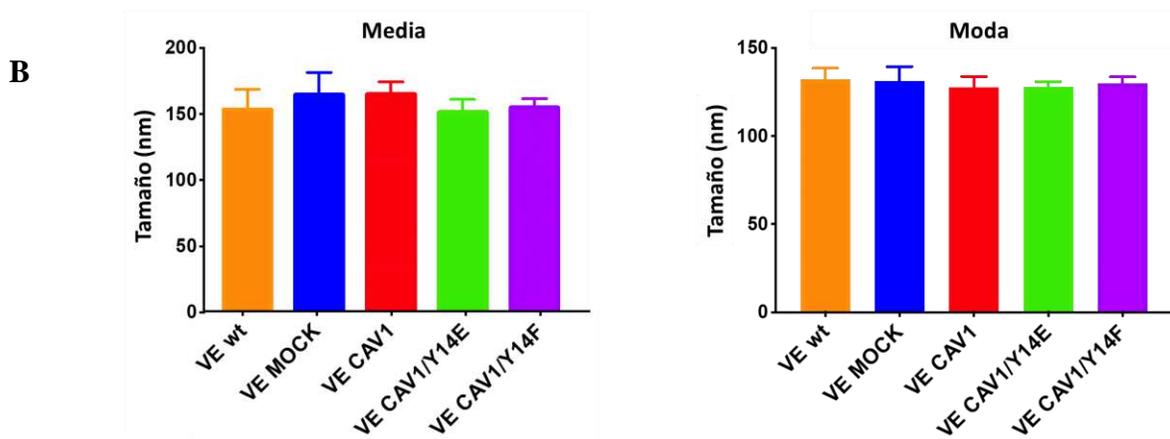
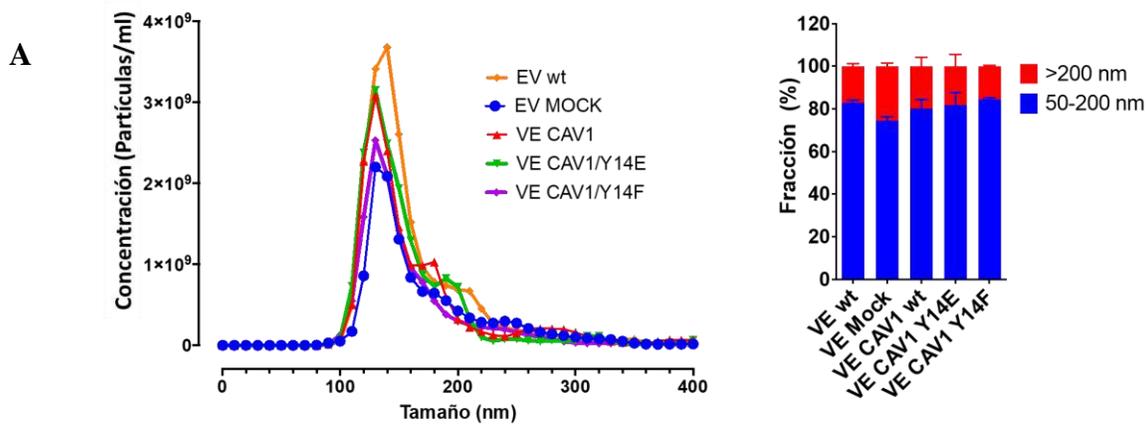
**Figura 2. Caracterización por NTA y MET de vesículas extracelulares obtenidas de las líneas celulares B16F10(Mock) y (CAV1) purificados por Exo-Spin (ES) y ultracentrifugación (UC). A) Datos obtenidos por NTA, mostrando distribución de tamaños de vesículas obtenidas, sus medidas estadísticas de media y moda, y fracciones de partículas por su tamaño obtenidas por Exo-spin, ES (A, Arriba) y Ultracentrifugación diferenciada, UC (A, Abajo). B) Imágenes microscopia electrónica de transmisión de VE obtenidas por Ultracentrifugación diferenciada, UC. Los resultados se analizaron estadísticamente con la prueba no paramétrica Mann-Whitney. No se encontraron diferencias significativas.**



**Figura 3. Caracterización por Western blot de vesículas extracelulares obtenidas de las líneas celulares B16F10(Mock) y (CAV1) purificados por Exo-Spin y ultracentrifugación diferenciada.** Se analizó mediante Western blot la presencia de ALIX, CD81, CAV1, calnexina (CANX) y β-actina. Se cargaron 50 µg (A) o 5 µg (B y C) de proteína total, de lisado celular o lisado de las VE indicadas, por pocillo. A) Membrana con muestras de lisado total o de VE obtenidas por Exo-Spin. B) Membrana con muestras obtenidas por ultracentrifugación diferenciada. C) Membrana teñida con Rojo Ponceau S. Las imágenes son representativas de resultados obtenidos en 3 experimentos independientes.

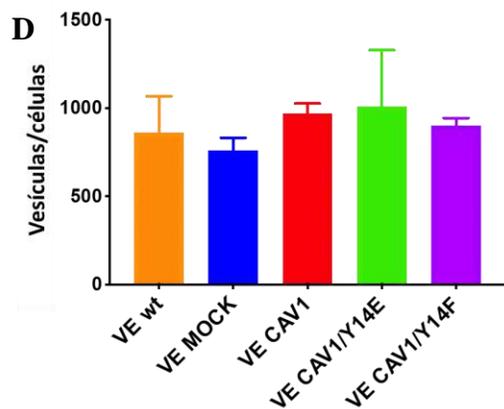
Con el punto anterior aclarado, se recolectó el sobrenadante de las líneas B16F10wt, B16F10(Mock), B16F10(CAV1), B16F10(CAV1/Y14E) y B16F10(CAV1/Y14F) usando las mismas condiciones anteriores. Por cada volumen de sobrenadante por línea, utilizando ultracentrifugación, se obtuvo un pellet de VE pequeñas que fue resuspendido a un volumen final de 100  $\mu$ l y luego almacenado a -80°C o utilizado inmediatamente. Cada muestra fue caracterizada por NTA y Western blotting.

El NTA muestra que la distribución entre las diferentes vesículas es similar y más del 75% de las vesículas son de un tamaño menor a 200 nanómetros (figura 4A), con una media de 150 nm y una moda de 130 nm (figura 4B). Se puede evidenciar que la transfección afecta en cierta medida, pero sin ser estadísticamente significativo, el número de vesículas (figura 4C). Tampoco se encuentran diferencias significativas entre la cantidad de proteínas detectadas en promedio por muestra (figura 4C), como tampoco en el número de vesículas obtenidas por línea celular (figura 4D), este dato obtenido mediante el cálculo entre el número final de vesículas obtenidas y el número de células totales del cual se obtuvo el sobrenadante.



**C**

Muestra	Partículas ± SEM ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )		Proteínas ± SEM ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	
VE wt	10,3E+08	14,0E+07	0,53	0,07
VE MOCK	8,6E+08	7,2E+07	0,52	0,09
VE CAV1	9,4E+08	3,2E+07	0,52	0,08
VE CAV1/Y14E	9,4E+08	17,0E+07	0,48	0,11
VE CAV1/Y14F	9,0E+08	2,5E+07	0,54	0,06

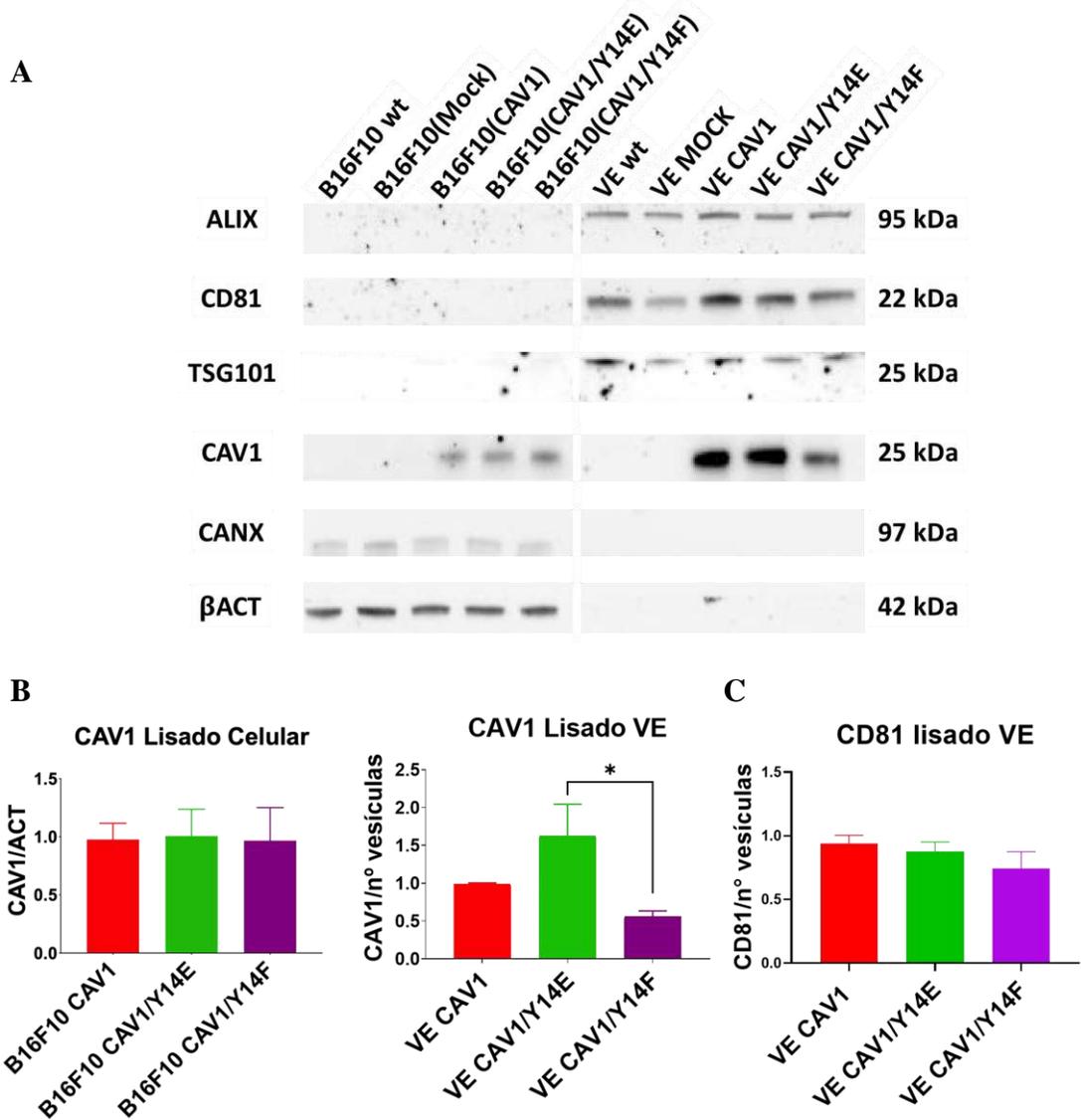


**Figura 4. Caracterización mediante análisis de seguimiento de nanopartículas de vesículas extracelulares purificadas de las líneas celulares B16F10(Mock) y (CAV1).** A) Distribución y fracciones por tamaño de partícula. B) Valores de Media y Moda de las VE obtenidas. C) Número de partículas y cuantificación de las proteínas medidas en cada extracto de VE. D) Cantidad de vesículas obtenidas por célula. Los gráficos muestran el promedio de 3 muestras de experimentos independientes (promedio  $\pm$  SEM). Los resultados se analizaron estadísticamente con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y un post test de Dunns. No se encontraron diferencias significativas.

Debido a los resultados anteriores donde se demostró la pureza de las muestras de VE obtenidas por ultracentrifugación mediante el enriquecimiento de marcadores positivos para VE pequeñas (figura 3), se continuó el trabajo de caracterización con los anticuerpos contra ALIX, CD81, CANX (calnexina),  $\beta$ ACT (beta-actina) y CAV1.

Se verificó que las vesículas obtenidas presentaban proteínas enriquecidas en VE de origen endosomal (ALIX, TSG101 y CD81), con muy bajos niveles o ausencia de proteínas del retículo endoplásmico (CANX) o del citoesqueleto ( $\beta$ ACT) demostrando la pureza de las vesículas obtenidas, y descartando la presencia de restos celulares apoptóticos o vesículas no clasificadas como exosomas (Figura 5A). Notable es la diferencia en la cantidad de CAV1 detectada en las muestras de VE obtenidas de las líneas que expresan CAV1 o CAV1/Y14E, observándose una mayor señal detectada de CAV1 en VE obtenidas a partir de células B16F10(CAV1) y B16F10(CAV1/Y14E) en comparación con la baja cantidad de CAV1 detectada en VE CAV1/Y14F (figura 5B, derecha). Esto es destacable, considerando que la cantidad detectada de CAV1 en las células de origen no muestra diferencias significativas (figura 5B, izquierda). En el caso de CD81, una tetraspanina involucrada en el cargo no dependiente de la maquinaria ESCRT, se ve una tendencia a la baja en el caso de las vesículas provenientes de las células B16F10(CAV1/Y14), aunque no hay diferencias significativas (figura 5C).

Por lo tanto, los resultados anteriores sugieren que la expresión de CAV1 en las células B16F10 no cambia las características cuantitativas de las vesículas (tamaño, número y distribución) (Figura 4). También se desprende de los resultados que las vesículas obtenidas tienen características que corresponden a las VE pequeñas con marcadores de biogénesis endosomal (Figura 5). Asimismo, se desprende la idea de que el impedimento de la fosforilación de CAV1 en Y14 reduce su incorporación a las VE (figura 5).



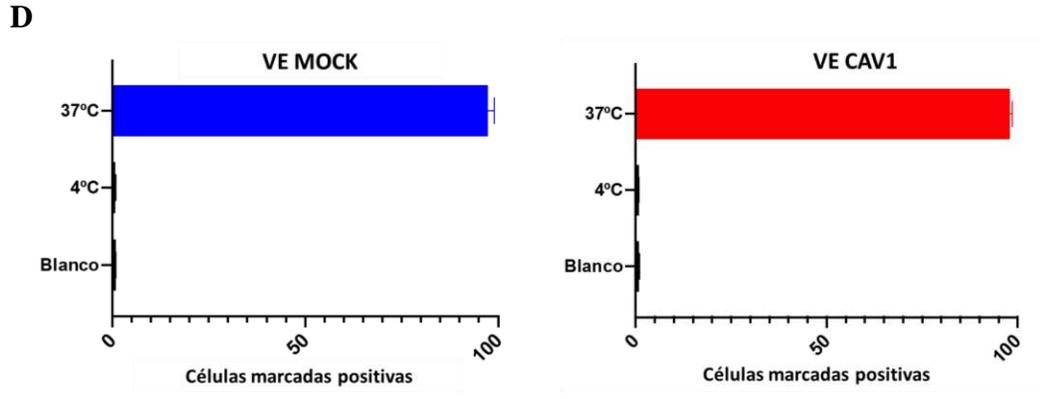
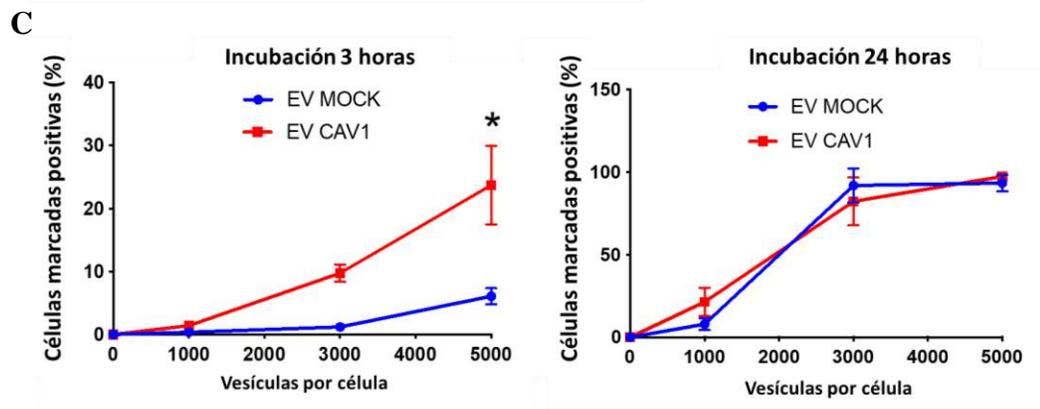
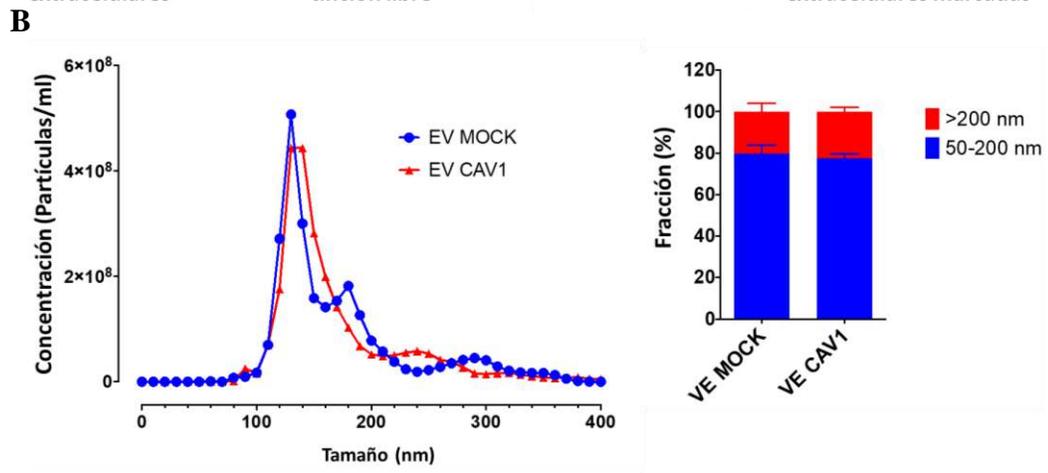
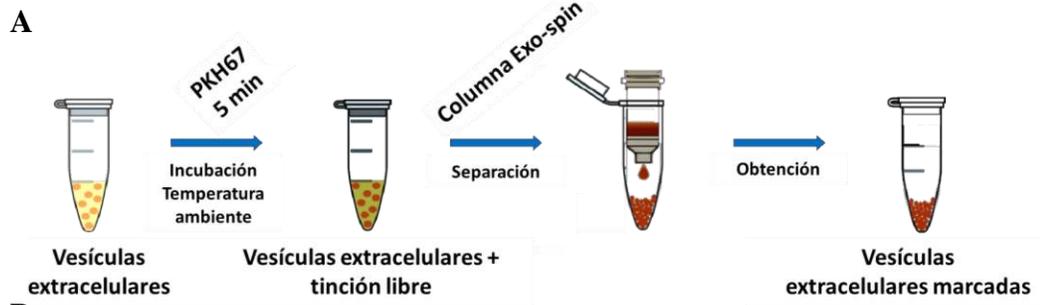
**Figura 5. Caracterización por Western blot de la línea celular B16F10 y las vesículas extracelulares que produce.** Se analizó mediante Western blot la presencia de ALIX, CD81, CAV1, calnexina (CANX) y  $\beta$ -actina. A) Imagen representativa de 3 muestras independientes. B) Cuantificación de densidad de bandas para CAV1 con relación a la actina del lisado celular (ACT) y a número de vesículas cargadas (promedio  $\pm$  SEM). C) Cuantificación de la densidad de las bandas de CD81 con relación al número de vesículas cargadas (promedio  $\pm$  SEM). Los resultados se analizaron estadísticamente con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y un post test de Dunns. Diferencias significativas están indicadas (\*  $p \leq 0.05$ ).

**11.2. OBJETIVO 2. Determinar si las vesículas extracelulares pequeñas provenientes de líneas tumorales que expresan CAV1 y mutantes de CAV1 en Y14 inducen respuestas biológicas en líneas celulares de melanoma murino B16F10 de menor capacidad metastásica que no expresa CAV1.**

En primer lugar, se evaluó la interacción entre las VE obtenidas de las diferentes líneas de B16F10 con las células receptoras. VE pequeñas provenientes de B16F10(Mock) y B16F10(CAV1) fueron tratadas previamente con un marcador lipofílico fluorescente verde PKH67 (Excitación  $_{\text{máx}}$ : 490nm. Emisión  $_{\text{máx}}$ : 502nm), el que se intercala en la membrana de la vesícula. Posteriormente, las vesículas marcadas se separaron del colorante no unido usando columnas de exclusión por tamaño (figura 6A). Se observó que las vesículas obtenidas mantienen sus características de distribución y tamaño (figura 6B).

Posterior a la caracterización, se realizó un experimento de adquisición donde las vesículas marcadas fueron agregadas a las células receptoras, B16F10(Mock). Se evaluaron dos tiempos diferentes de tratamiento (3 y 24 h) en condiciones de incubación normal a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células después del tratamiento fueron analizadas a través de un citómetro de flujo para determinar el porcentaje de células marcadas bajo el filtro correspondiente (figura 6C). Una muestra de células blanco con vesículas sin marcar se usó para establecer el *gate* negativo.

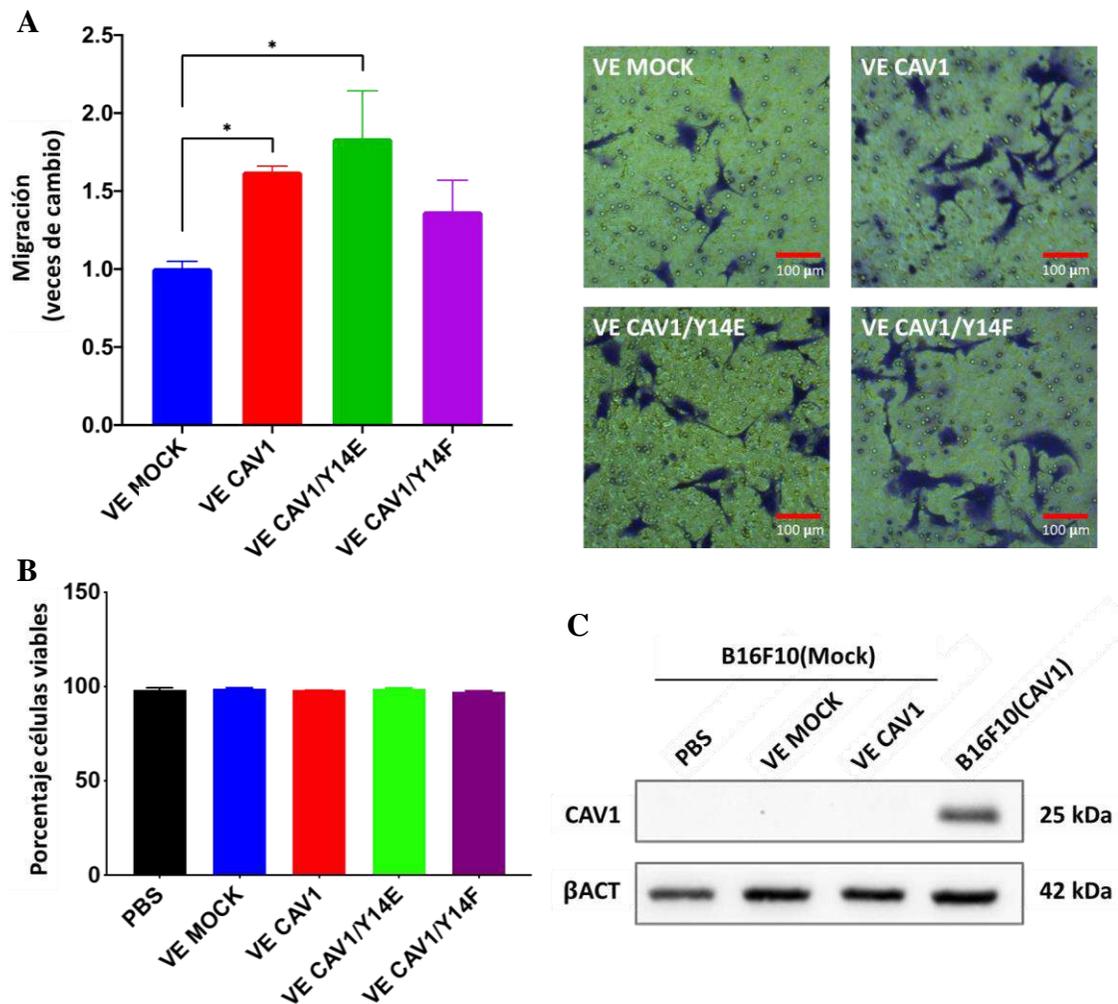
Después de 3 h de tratamiento hubo un mayor porcentaje de células marcadas con el tratamiento de VE CAV1, en comparación con VE Mock (figura 6C, 3 h). En cambio, a las 24 h de tratamiento hubo una saturación de la señal de fluorescencia en las células tratadas con las distintas vesículas. Esto es evidenciable a partir del tratamiento con 3000 y 5000 VE por célula (figura 6C, 24 h). También se usó como control incubando las células con las vesículas marcadas a bajas temperaturas, demostrando que a 4°C no ocurre adquisición de vesículas (figura 6D).



**Figura 6. Ensayo de internalización de vesículas extracelulares en células B16F10(Mock).** A) Protocolo de marcaje de las VE con PKH67 [Modificado de Salas-Huenuleo y colaboradores (2019)]. B) Caracterización de VE después de la tinción, mostrando la distribución y fracciones por tamaño de partícula. C) Ensayo de internalización. Se incubaron células B16F10(Mock) con VE marcadas a concentraciones de 1000, 3000 y 5000 VE por célula. Incubación por 3 h y 24 h, para después analizar las células por citometría de flujo. D) Comparación entre la incubación con VE marcadas a 4°C y 37°C. Se usó para este gráfico, el tratamiento con 5000 VE por célula. Los resultados se analizaron estadísticamente con la prueba no paramétrica Mann-Whitney. Diferencias significativas están indicadas (\*  $p \leq 0.05$ ).

Una vez verificada que la adquisición de VE a 24 h es similar en ambos casos, se evaluó si las VE pequeñas obtenidas por ultracentrifugación de las diferentes líneas usadas son capaces de modificar la motilidad de las células tratadas. Para esto, se incubó células B16F10(Mock) con VE provenientes de B16F10(Mock), B16F10(CAV1), B16F10(CAV1/Y14E) y B16F10(CAV1/Y14F). Después de 24 h de tratamiento se evaluó la migración de las células tratadas con VE. Se observa que después de exponer estas células durante 24 h a VE CAV1 y VE CAV1/Y14E, hubo un incremento significativo en la migración, en comparación a células no tratadas o tratadas con vesículas provenientes de la misma línea celular con otras transfecciones (figura 7A).

A continuación, se evaluó si el tratamiento por 24 h con vesículas afecta la viabilidad de las células tratadas. No se observó diferencias significativas en la cantidad de células viables después de la agregar VE de diferentes tipos (figura 7B) utilizando la técnica de azul de tripano, colorante que no se incorpora en células vivas. Para descartar que el tratamiento de las VE influya en la expresión de CAV1 en las células tratadas, se realizó un Western blot de las células B16F10(Mock) tratadas por 24 h con vesículas provenientes de células B16F10(CAV1), no observándose cambios en la expresión de CAV1 (figura 7C).



**Figura 7. Ensayos de migración y viabilidad de células B16F10(Mock) después del tratamiento con distintas vesículas extracelulares.** A) Ensayo de migración. Células B16F10(Mock) fueron tratadas 24 h con VE Mock, VE CAV1, VE CAV1/Y14E y VE CAV1/Y14F. Al término del tratamiento, se sembraron las células en transwell de 6.5 mm de diámetro, que poseen una membrana con poros de 8  $\mu$ m cubiertos con fibronectina en la cara inferior del inserto, y las células se dejaron migrar durante 2 h. Se contó el número total de células que fueron capaces de llegar hasta el lado inferior de la membrana. B) Ensayo de viabilidad celular mediante azul de tripano. Los gráficos muestran el promedio de 4 experimentos independientes (promedio  $\pm$  SEM). C) Western blot de células tratadas con EV MOCK y VE CAV1 por 24 h. Se cargaron 50  $\mu$ g de proteína de lisado celular. Los resultados se analizaron estadísticamente con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y un post test de Dunns. Se indican las diferencias significativas (\*  $p \leq 0.05$ ).

Considerando los efectos de las VE en migración, el siguiente paso fue evaluar un proceso biológico de mayor complejidad, el cual incorpore la migración celular y además la capacidad de atravesar un endotelio íntegro, proceso conocido como extravasación, mecanismo fundamental en la metástasis. Esto se evaluó mediante un ensayo de migración transendotelial que incluye los mismos elementos de la migración, además de un endotelio hecho a partir de células EAHy926, línea celular de endotelio de vena umbilical.

Las células B16F10(Mock) fueron tratadas por 24 h con las VE derivadas de las diferentes líneas B16F10. Antes de comenzar con el ensayo de migración transendotelial, se evaluó la permeabilidad de las monocapas formados por las EAHy926 después de las 72 horas usando azul dextrán (Tabla 2). Una vez comprobada la integridad de la monocapa, las células B16F10(Mock) tratadas fueron marcadas con un colorante vital (Cell tracker) para posteriormente incluirlas en la cámara de migración transendotelial por 24 h. Terminado el proceso se contaron en microscopio de fluorescencia bajo campo oscuro las células que pasaron a la parte inferior del inserto. Es posible observar que el tratamiento previo con las vesículas provenientes de las líneas que expresan CAV1 y mutantes, es capaz de aumentar la migración transendotelial de las células B16F10 en comparación de las células tratadas con las vesículas provenientes de B16F10(Mock) (figura 8A).

**Tabla 2. Absorbancias de ensayo de permeabilidad de la monocapa endotelial.** Mediciones de la absorbancia del medio de cultivo del compartimiento inferior al inserto transwell con la monocapa antes y 30 minutos después de agregar azul dextrano sobre la monocapa.

Experimento	Absorbancia Antes (620 nm)	Absorbancia Después (620 nm)	Diferencia
N 1	0,053300001	0,124300003	0,071000002
N 2	0,052299999	0,096100003	0,043800004

Se incluyó además otro ensayo de migración transendotelial en el cual las células B16F10(Mock) y endotelio de EAHy926 fueron tratadas al mismo tiempo con las distintas

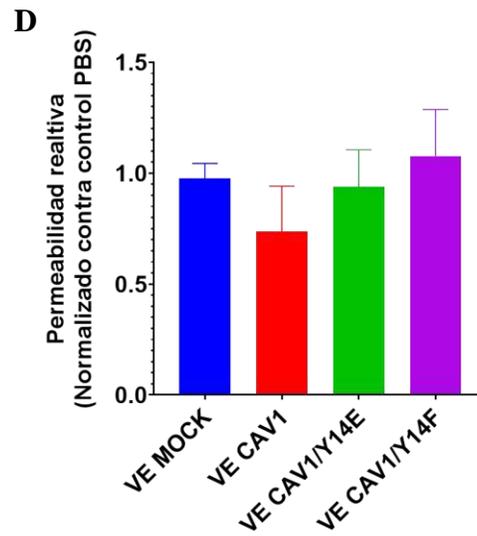
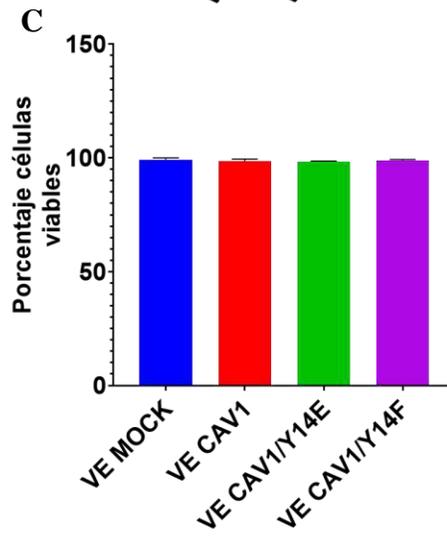
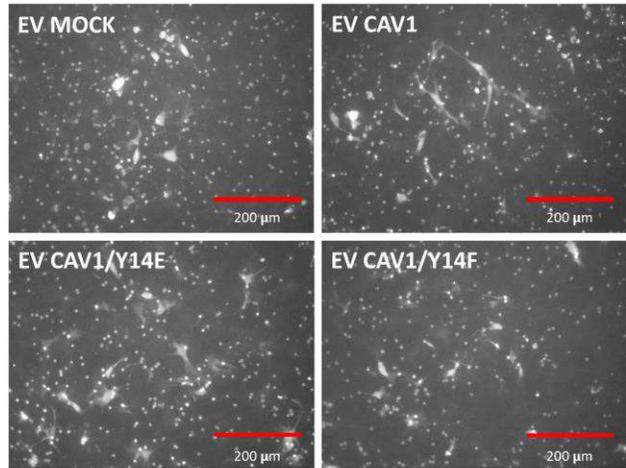
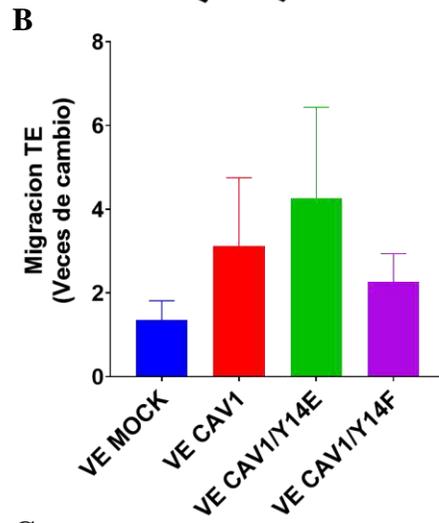
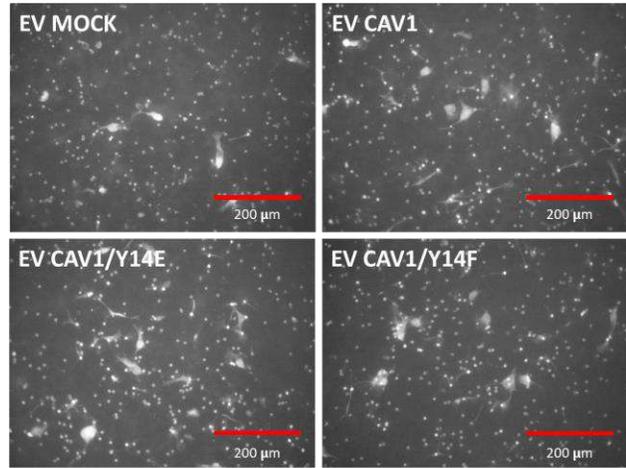
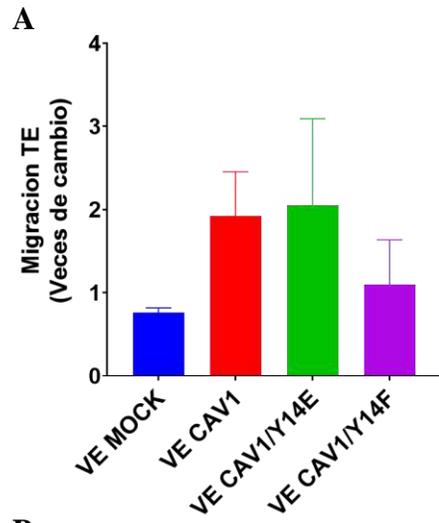
VE durante el tiempo de migración (24 h). Se observaron efectos similares sobre la tasa de migración de células tratadas con VE de células que expresan CAV1 y sus mutantes en comparación con las células tratadas con vesículas provenientes de células B16F10(Mock) aunque en mayores tasas de migración en comparación con el tratamiento sobre las células B16F10 solamente (figura 8B). Es importante ver que el efecto se acentúa en el caso de las células tratadas con VE provenientes de la línea B16F10(CAV1/Y14E).

Para verificar si el cambio en la migración no se debe a un efecto de las VE sobre la viabilidad o permeabilidad de las células EAHy296 y su endotelio, se ejecutaron ensayos de viabilidad mediante exclusión de azul de tripano. No se evidenció diferencias en viabilidad de las células EAHy926 tratadas por 24 h (figura 8C). La permeabilidad del endotelio bajo el tratamiento por 24 h de VE de las diferentes líneas B16F10 tampoco muestra diferencias (figura 8D).

En las fases tempranas de este trabajo de tesis, se evaluó el efecto sobre el metabolismo glucolítico de las células tumorales tratadas con VE. Esto se realizó considerando estudios previos de este laboratorio usando la línea B16F10(CAV1). En ese trabajo se analizó la influencia de la expresión de CAV1 sobre el metabolismo celular, determinando que CAV1 promueve el metabolismo glicolítico, definido por una mayor producción de lactato, mayor acidificación del medio de cultivo y menor consumo de oxígeno (Tesis Natalia Díaz, artículo no publicado). También se evaluó la expresión de PTEN después del tratamiento con VE considerando una hipótesis previa que consideraba que las VE inducen el cambio metabólico mediante la inhibición de la expresión de la fosfatasa PTEN, supresor de tumores y un regulador negativo del metabolismo glicolítico. Después de tratar la línea B16F10(Mock) con vesículas provenientes de B16F10(Mock) y B16F10(CAV1) se usó la medición de la producción de lactato extracelular (figura suplementaria 1) y la expresión de PTEN (figura suplementaria 2) de las células tratadas con VE para evaluar la función del metabolismo glicolítico, no encontrando diferencias significativas en ninguno de estos parámetros. Se concluye con estos resultados que esta

transformación metabólica y mecanismo molecular no se ven influidos por los tratamientos con VE.

Por lo tanto, los resultados anteriores sugieren que la expresión de CAV1 en las células B16F10 genera VE cuyo contenido es importante para promover interacciones tempranas con células receptoras, aunque a tiempos más prolongados hay saturación en la incorporación de vesículas, independiente de la presencia de CAV1. También es importante mencionar que las VE CAV1 y VE CAV1/Y14E favorecen migración y demuestran una tendencia a promover transmigración endotelial en células receptoras, mostrando una eventual importancia en los efectos biológicos que pueden producir dichas vesículas.



**Figura 8. Ensayos de migración transendotelial de B16F10(Mock) después del tratamiento con distintas vesículas extracelulares.** A) Ensayo de migración en el cual células B16F10(Mock) fueron pretratadas 24 h con VE Mock, VE CAV1, VE CAV1/Y14E y VE CAV1/Y14F. Al término del tratamiento, se sembraron las células en transwell, que poseen una membrana con poros de 8  $\mu\text{m}$  cubiertos con monocapa de células EAHy926, y las células se dejaron migrar durante 16 h. Se contó el número total de células que fueron capaces de llegar hasta el lado inferior de la membrana. B) Ensayo de migración en el cual las células B16F10(Mock) y la monocapa de células EAHy926 fueron tratadas simultáneamente con VE durante el tiempo de migración por 24 h. C) Ensayo de viabilidad de células EAHy926 tratadas con VE por 24 h. D) Ensayo de permeabilidad de monocapa de células EAHy926 tratadas con VE por 24 h, se normalizó con monocapa tratada con PBS. Los gráficos muestran el promedio de 2 experimentos independientes (promedio  $\pm$  SD).

### **11.3. OBJETIVO 3. Determinar el perfil proteómico de las VE pequeñas de las líneas celulares de melanoma murino B16F10 que expresan CAV1 y mutantes de CAV1 en Y14**

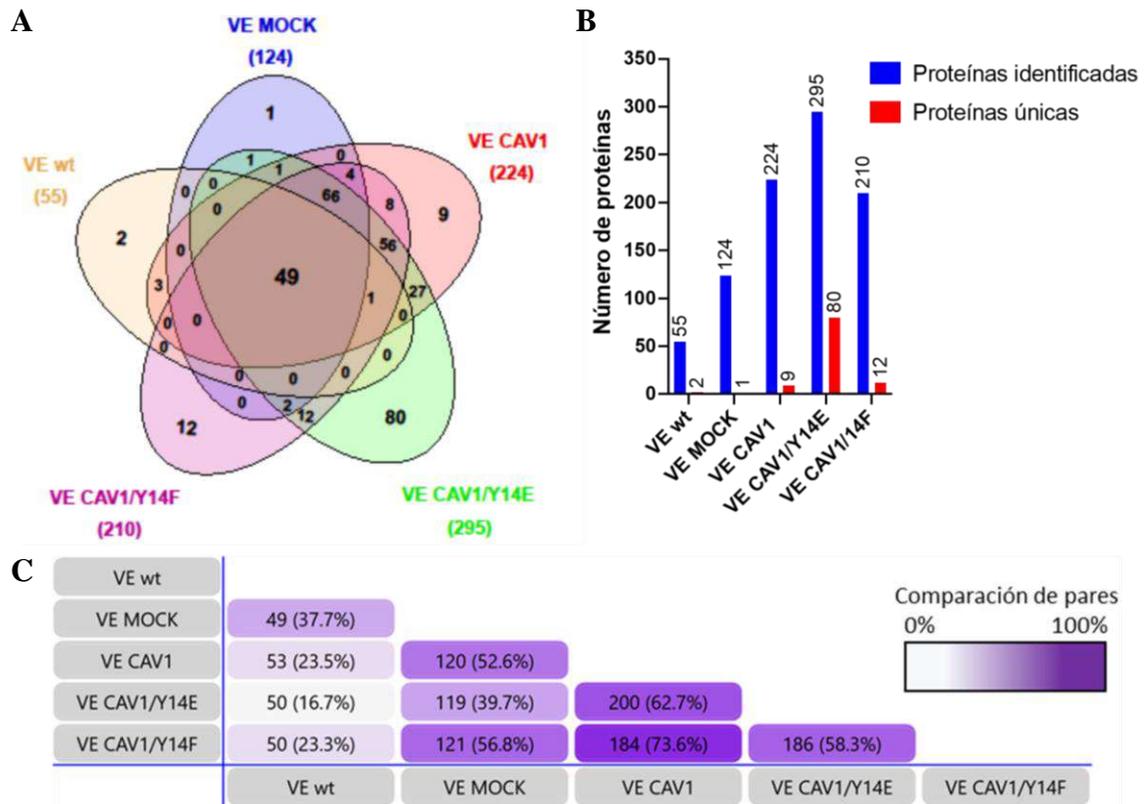
Las VE obtenidas a partir de las células B16F10 wt, Mock, CAV1 wt, CAV1/Y14E y CAV1/Y14F se caracterizaron usando Espectrometría de Masa para analizar las proteínas presentes. Se usó la técnica “*shotgun*” para los análisis proteómicos de las muestras usando cromatografía líquida combinada con Espectrometría de Masa. El análisis detecta péptidos y los enfrenta a bases de datos (UniProtKB mouse Database). El total de péptidos detectados se usó para comparar la abundancia de una proteína. Se analizaron muestras de VE obtenidas de 2 (VE wt) y 3 (VE Mock, CAV1, CAV1/Y14E y CAV1/Y14F) preparaciones distintas. Cada muestra se analizó por triplicado.

Obtenida las listas de proteínas encontradas por muestra de VE, en primer lugar, se consideraron sólo las proteínas incluidas en la base de datos UniProt Swiss-prot (sp). Esta base de datos se caracteriza por el grado de anotación de las proteínas incluidas, incluyendo las secuencias, estructura, funciones moleculares, localización celular, entre otras características.

La lista obtenida indica el código de acceso de la proteína según UniprotKB, nombre de la proteína/gen y la cantidad promedio de péptidos en 2 (VE wt) o 3 replicados biológicos (VE MOCK, VE CAV1, VE CAV1/Y14E y VE CAV1/Y14E) de cada obtención de VE. Se continuó el trabajo bioinformático sólo con las proteínas en las que se detectó a lo menos 2 péptidos en promedio por proteína. Se determinó que proteínas con menos de 2 péptidos fueran definidas como no presentes en la muestra.

Para las VE obtenidas de todas las líneas celulares, se detectó más de 300 proteínas únicas. Para cada una de las VE por línea de menor a mayor, en las VE wt se detectaron 55 proteínas (tabla suplementaria 1), en las VE Mock se detectaron 124 proteínas (tabla

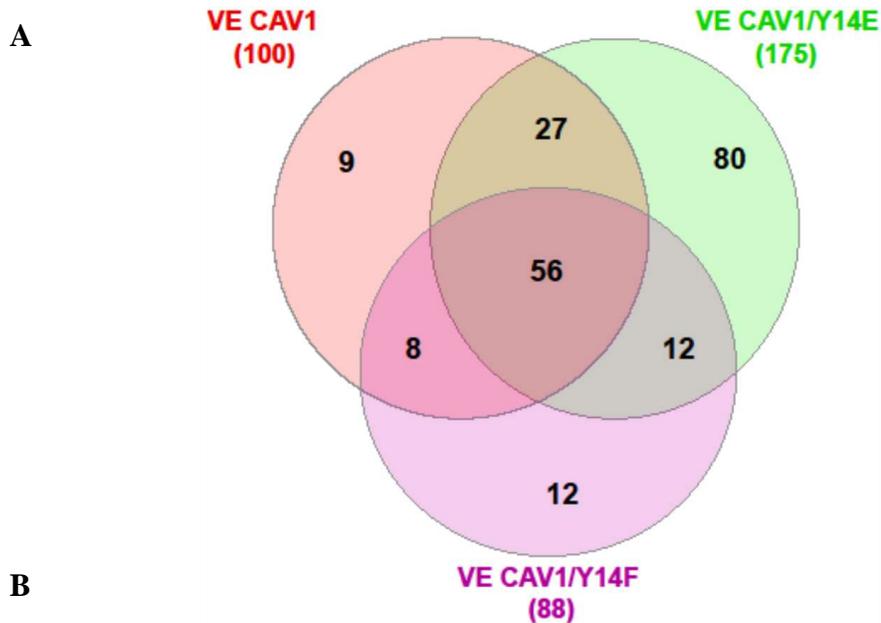
suplementaria 2), en las VE CAV1/Y14F se detectaron 210 (tabla suplementaria 3), en las VE CAV1 225 (tabla suplementaria 4) y finalmente en VE CAV1/Y14E se encontraron 296 proteínas (tabla suplementaria 5). Usando un diagrama de Venn (figura 9A) se muestra el número de proteínas compartidas y únicas de cada grupo cuyos números son graficados en la figura 9B, siendo notorio la gran cantidad de proteínas únicas presentes en las VE CAV1/Y14E. Al agrupar las proteínas detectadas es posible observar el porcentaje de proteínas compartidas entre los diferentes grupos de VE (figura 9C).



**Figura 9. Proteínas detectadas por proteómica en vesículas extracelulares provenientes de las líneas celulares B16F10wt, (Mock), (CAV1), (CAV1/Y14E) y (CAV1/Y14F).** A) Diagrama de Venn de proteínas detectadas en VE mostrando proteínas únicas y compartidas para las diferentes clases de vesículas B) Número de proteínas identificadas y únicas en las diferentes preparaciones. C) Porcentaje de proteínas compartidas entre las distintas preparaciones de VE.

Después se continuó analizando solo con las proteínas presentes en las VE CAV1, VE CAV1/Y14E y VE CAV1/Y14F, restando las proteínas en común y únicas de las VE wt y VE MOCK.

Se diseñó un nuevo diagrama de Venn el cual muestra la nueva distribución de proteínas mostradas en la figura 10A. Posteriormente se realizó un análisis de Ontología Génica (Huang et al., 2009) mostrando los 10 componentes celulares (GO) más enriquecidos por cada una de las VE (figura 10B). Para cada grupo de VE el mayor enriquecimiento de proteínas fue asociado con proteínas exosomales (sobre el 60 % de las proteínas presentes por lista). Este hallazgo refleja el mecanismo de la biogénesis de estas vesículas extracelulares. También hay un enriquecimiento importante de proteínas relacionadas con la membrana plasmática y citosol, que indica también la presencia de vesículas del tipo microvesícula. Otras clasificaciones de compartimiento celular GO en común son adhesiones focales, endosoma y melanosoma, lo cual refleja el origen melanocítico de las EV. Es de destacar el enriquecimiento del componente celular balsas lipídicas en las VE CAV1/Y14E.



**B**

	<b>Compartimiento celular (GO)</b>	<b>Nº proteínas</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>EASE Score</b>
VE CAV1	Exosoma	57	64,8	7,70E-28
	Membrana	68	77,3	3,30E-15
	Adhesión focal	19	21,6	8,80E-14
	Melanosoma	12	13,6	7,60E-13
	Endosoma	17	19,3	1,80E-09
	Membrana plasmática	48	54,5	4,80E-09
	Citosol	24	27,3	2,00E-06
	Complejo ribonucleico	10	11,4	1,20E-05
	Subunidad ribosomal grande	6	6,8	5,20E-05
	Intracelular	20	22,7	5,80E-05
VE CAV1/Y14E	<b>Compartimiento celular (GO)</b>	<b>Nº proteínas</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>EASE Score</b>
	Exosoma	110	62,9	1,30E-51
	Membrana	151	86,3	2,10E-44
	Adhesión focal	42	24	1,90E-32
	Membrana plasmática	108	61,7	3,30E-25
	Melanosoma	19	10,9	7,80E-19
	Endosoma	31	17,7	7,70E-16
	Componente integral de membrana plasmática	39	22,3	5,10E-13
	Uniones adherentes	22	12,6	6,70E-13
	Superficie celular	27	15,4	5,20E-11
Citosol	43	24,6	2,30E-09	
Balsas lipídicas	16	9,1	1,20E-08	
VE CAV1/Y14F	<b>Compartimiento celular (GO)</b>	<b>Nº proteínas</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>EASE Score</b>
	Exosoma	57	64,8	7,70E-28
	Membrana	68	77,3	3,30E-15
	Adhesión focal	19	21,6	8,80E-14
	Melanosoma	12	13,6	7,60E-13
	Endosoma	17	19,3	1,80E-09
	Membrana plasmática	48	54,5	4,80E-09
	Citosol	24	27,3	2,00E-06
	Complejo ribonucleico	10	11,4	1,20E-05
	Subunidad ribosomal grande	6	6,8	5,20E-05
Intracelular	20	22,7	5,80E-05	

**Figura 10. Proteínas detectadas por proteómica en vesículas extracelulares provenientes de (CAV1), (CAV1/Y14E), y (CAV1/Y14F).** A) Diagrama de Venn de proteínas detectadas. B) Análisis GO de proteínas de Componentes Celulares mayormente enriquecidos en las distintas VE por EASE Score.

Considerando los efectos biológicos de las vesículas, se procedió con el análisis de las proteínas presentes sólo en VE CAV1, sólo en VE CAV1/Y14E y proteínas compartidas entre VE CAV1 y VE CAV1/Y14E, lo que corresponde en total a 116 proteínas. Se analizó mediante GO para procesos biológicos, mostrando que el proceso más enriquecido de esta lista de proteínas corresponde a adhesión celular con 19 proteínas en total. De ellos se encontró 4 proteínas en común entre VE CAV1 y VE CAV1/Y14E relacionadas con el proceso de adhesión. Sin embargo, la mayoría corresponde a moléculas de adhesión celular. Estas proteínas pueden ser interesantes de estudiar a futuro tanto desde el punto de vista de los efectos biológicos que producen estas vesículas, así también como posibles marcadores en el diagnóstico.

Por lo tanto, los resultados anteriores sugieren que la expresión de CAV1, pero especialmente la mutante fosfomimética en las células B16F10, es importante para el enriquecimiento en las EV de proteínas relevantes en el proceso de adhesión celular, una actividad clave también para la migración celular (Tablas 3 y 4).

**Tabla 3. Procesos biológicos enriquecidos en proteínas comunes y únicas entre vesículas extracelulares provenientes de las líneas celulares B16F10(CAV1) y (CAV1/Y14E).** 116 proteínas entre VE CAV1 y VE CA1/Y14E de la figura 10A fueron agrupadas usando GO para procesos biológicos.

Procesos biológicos (GO)	Nº proteínas	Porcentaje	EASE Score
Adhesión celular	19	16,4	1,00E-09
Transporte	30	25,9	1,40E-06
Regulación negativa de proyecciones neuronales	6	5,2	4,70E-05
Ectodominios de proteólisis	4	3,4	2,40E-04
Aglutinación	5	4,3	3,00E-04
Transporte de proteínas	13	11,2	3,00E-04
Respuesta celular a indole-3-metanol	3	2,6	3,80E-04
Regulador negativo de biosíntesis de amiloide	3	2,6	5,60E-04
Traducción de señales mediadas por GTPasas pequeñas	8	6,9	6,70E-04
Angiogénesis	8	6,9	7,20E-04

**Tabla 4 Proteínas de procesos biológico de adhesión celular presentes en vesículas extracelulares provenientes de las líneas celulares B16F10(CAV1) y (CAV1/Y14E).** 19 proteínas en la categoría de adhesión celular de la tabla 3 fueron identificadas. En rojo están los péptidos más abundantes y en azul los menos abundantes.

Nombre proteína	Gen	Nº péptidos VE CAV1	Nº péptidos VE CAV1/Y14E
Integrina beta 5	<i>Itgb5</i>	3,7	3,0
Molécula de adhesión celular leucocitaria activada	<i>Alcam</i>	3,3	6,0
Miembro A de la familia de homólogos de Ras	<i>Rhoa</i>	3,0	3,3
Embigin	<i>Emb</i>	3,0	2,7
Placoblobina de union	<i>Jup</i>	3,0	0,0
Miembro B de la familia de homólogos de Ras	<i>Rhob</i>	2,3	0,0
Molécula de adhesión celular 1	<i>Cadm1</i>	2,0	0,0
Miosina, Cadena pesada 9 no muscular	<i>Myh9</i>	0,0	11,0
Talina 1	<i>Tln1</i>	0,0	5,3
Receptor proteína tirosina fosfatasa S	<i>Ptprs</i>	0,0	4,0
Catenina delta 1	<i>Ctnnd1</i>	0,0	3,7
Catenina alfa 1	<i>Ctnna1</i>	0,0	3,0
Receptor de adhesión G1 asociado a proteína G	<i>Adgrg1</i>	0,0	2,3
Molécula de adhesión celular 4	<i>Cadm4</i>	0,0	2,3
Integrina alfa 9	<i>Itga9</i>	0,0	2,3
Zyxina	<i>Zyx</i>	0,0	2,3
Catenina beta 1	<i>Ctnnb1</i>	0,0	2,0
Nectina 2	<i>Nectin2</i>	0,0	2,0
Presenilina 1	<i>Psen1</i>	0,0	2,0

## 12. DISCUSIÓN

El propósito de este trabajo fue determinar la importancia de CAV1 y su fosforilación en tirosina-14 sobre las propiedades de las VE generadas por líneas celulares metastásicas, además de evaluar los efectos biológicos que estas vesículas desencadenan en células receptoras con un grado de migración e invasión establecido, que además poseen muy bajos niveles de expresión de CAV1 [B16F10(Mock)].

En este estudio, VE pequeñas (<200 nm) fueron aisladas desde medios de cultivo condicionados de sublíneas de melanoma murino metastásico. La línea parenteral de B16F10 expresa bajos niveles de CAV1, por lo que, para evaluar el efecto de esta proteína en células metastásicas, se generaron líneas celulares estables que expresan CAV1. Para ello, las células fueron transfectadas con el plasmidio pLAC-IOP, el cual además de poseer el transgén de interés (en este caso la secuencia para la síntesis de CAV1), también contiene un marcador de selección que es la resistencia a higromicina B (Bender et al., 2000).

Así, junto a B16F10wt, se usaron las sublíneas B16F10(Mock), transfectada con el vector vacío, B16F10(CAV1), transfectada con el vector que expresa CAV1 sin mutaciones y B16F10(CAV1/Y14E) y B16F10(CAV1/Y14F), sublíneas que expresan CAV1 mutada en tirosina 14 en forma fosfomimética y en forma no fosforilable, respectivamente (Ortiz et al., 2016). Los estudios de estas líneas dan cuenta de la importancia de esta proteína en las propiedades agresivas que poseen las células metastásicas, pero más importante aún es el estado de fosforilación de esta proteína en tirosina14 (Ortiz et al., 2016). El siguiente paso fue evaluar las VE producidas por estas líneas.

Después de la comparación de 2 métodos de obtención de vesículas extracelulares usado, se decidió usar la ultracentrifugación diferencial indicada en la figura 1 (Théry et al., 2006). Esta metodología sigue siendo usada ampliamente (Gardiner et al., 2016), y en este

trabajo se corroboran buenos resultados de producción, considerando aspectos de importancia en la identificación de estas vesículas. Estos aspectos incluyen el rango de tamaños obtenidas, la caracterización de proteínas enriquecidas en los procesos de formación de cuerpos multivesiculares y vías de exportación de éstas, como es indicado en las figuras 4 y 5.

Otra metodología de purificación y concentración de vesículas extracelulares que fue utilizada en las primeras fases de este trabajo correspondió al kit comercial de Exo-spin (figura 1), método que usa la combinación de la precipitación de elementos membranosos usando PEG y que no requiere ultracentrifugación (van der Pol et al., 2014). El método incluye una filtración de vesículas precipitadas según tamaño por una columna de exclusión. Dicha metodología mostró buenos resultados en el caso de la distribución de tamaños, pero resultó limitante en el punto de las proteínas detectadas. Esto es claro al observar primero las bandas detectadas después de la transferencia y el uso del rojo Ponceau para teñir las proteínas, donde aparece una banda característica de la albúmina bovina. Segundo, al revelar las membranas tratadas con los anticuerpos, es posible observar la presencia de proteínas marcadores de VE, pero con menor intensidad en comparación a su contraparte obtenidas por ultracentrifugación (figura 3).

Los fabricantes de estas metodologías aseguran baja contaminación de elementos no relacionados con exosomas, como proteínas y RNAs solubles; sin embargo, a pesar de obtener números óptimos de vesículas, se detectan elementos considerados contaminación (albúmina, proteínas de origen bovino, fragmentos de membranas) (Oosthuyzen et al., 2013). Esto hace que al utilizar estas vesículas en ensayos biológicos y funcionales puedan observarse resultados que no dependan exclusivamente de VE, si no de otros elementos no vesiculares presentes. Es de importancia considerar esto antes de elegir una metodología para la purificación y concentración de estas vesículas.

Como se desprende de los resultados mostrados en la figura 4, a pesar de no encontrar diferencias significativas en el número de VE obtenidas para cada sublínea, se puede advertir un mayor número de vesículas en la preparación proveniente del sobrenadante de B16F10wt. Estos resultados sugieren que la transfección interfiere con la producción de las vesículas, ya sea por el método de integración del plasmidio, o por el método de selección con el antibiótico higromicina B, el cual aplica un estrés importante a las células. Todas las líneas fueron tratadas con IPTG, por lo que no consideramos esto como una variable a evaluar. Hay ejemplos que muestran el efecto de la transfección en la proporción y tamaño de estas vesículas (Campos et al., 2018). Es importante también destacar en este punto diferencias en la cantidad detectada de proteínas positivas de VE entre las VE wt y las VE mock. Ambas provienen de células metastásicas que expresan muy bajos niveles de CAV1, sin embargo, es posible observar el efecto de la transfección sobre el contenido proteico, con influencia en la tetraspanina CD81. Sería de importancia evaluar cómo la inclusión del plasmidio interviene en procesos endocíticos y así considerar otras metodologías de transfección o modulación de expresión génica, que permitan la expresión estable de CAV1 y sus mutantes en células metastásicas con menos interferencias.

Entre otras características físicas de las vesículas, podemos observar que aproximadamente un 75-80% de las vesículas obtenidas son de tamaños menores a 200 nm, independiente de la sublínea productora, rasgos acordes con los descritos en literatura tanto para demostrar la calidad de la preparación obtenida (van Niel et al., 2018), como para la clasificación por tamaño de las vesículas más abundantes según ISEV (Théry et al., 2018).

El uso de la técnica de Western blot ayudó a complementar los datos anteriores, mostrando cómo las vesículas obtenidas poseen proteínas involucradas en la génesis de éstas, siendo de importancia el enriquecimiento de proteínas ALIX y TSG101 (elementos del complejo ESCRT) y además de la tetraspanina CD81, enriquecido en regiones de la membrana

endoplásmica similares a las balsas lipídicas, el cual actúa independiente del mecanismo ESCRT (Perez-Hernandez et al., 2013). Hay que notar que en la figura 5 los niveles de CD81 detectados en las vesículas obtenidas no es igual en todas las preparaciones, mostrando más intensidad en las VE CAV1 y VE CAV1/Y14E en comparación con las VE CAV1/Y14E (figura 5C). Esto es interesante, considerando que CAV1 y CD81 corresponden a proteínas presentes en balsas lipídicas (Calzolari et al., 2006; Viswanathan et al., 2017) que son importantes en procesos endocíticos (Pelkmans et al., 2004). Esto indica la estrecha relación que hay entre estas proteínas y sugiere un papel preponderante de CAV1 en la génesis y cargo de VE originadas de la ruta endocítica.

#### **Relación entre la presencia de CAV1 en VE y su fosforilación en tirosina 14.**

El primer hallazgo de importancia encontrado en este estudio fue la detección de CAV1 en las vesículas de líneas metastásicas que expresan CAV1 y las mutantes (figura 5), mientras esta proteína no fue detectada en las vesículas provenientes de líneas con bajos niveles de CAV1, datos respaldados con aquellos obtenidos en la proteómica. Estudios anteriores en otras líneas metastásicas, así como en pacientes comprueban la presencia de CAV1 en VE pequeñas y grandes de origen tumoral (Campos et al., 2018; Dorai et al., 2018; He et al., 2015; Logozzi et al., 2009). Una pregunta relevante desde el punto de vista molecular es la ubicación de CAV1 en VE y su interacción, ya sea directa o indirecta, con otros componentes comprometidos en la biogénesis de estas vesículas, incluyendo elementos dependientes o independientes de la maquinaria ESCRT.

Los hallazgos demostrados por ensayos de Western blot y análisis del perfil proteómico de las distintas VE muestran un hecho interesante respecto a cómo el estado de fosforilación de CAV1 puede influir en la presencia de esta misma en las VE liberadas. A pesar de que CAV1 está presente en las vesículas de B16F10 que expresan CAV1 y sus mutantes, es interesante destacar la disminución de CAV1 detectada en las vesículas provenientes de las células B16F10 que expresan CAV1/Y14F, una proteína CAV1 incapaz de ser fosforilada en Y14. La CAV1 fosforilada en Y14, es un punto de control

de procesos relevantes en metástasis, siendo notable tanto en la migración e invasión de las células, mediante la activación de la vía CAV1-Rab5-Rac1 (Díaz et al., 2014a; Díaz et al., 2014b), así como también en metástasis (Lobos-González et al., 2013; Ortiz 2020). Por lo tanto, la fosforilación de CAV1 en Y14 les confiere a las células propiedades especiales como la agresividad, lo que se ve reflejado en el efecto biológico que tienen las VE provenientes de estas células.

Una forma de relacionar la presencia de CAV1 fosforilada en células metastásicas es mediante la localización que esta proteína tiene durante procesos de expansión celular o “*spreading*”. En estudios realizados en las mismas líneas celulares usadas es posible observar que en las células B16F10(CAV1) y B16F10(CAV1/Y14E) hay un aumento importante de CAV1 localizada perinuclearmente, en comparación con la CAV1 no fosforilable en Y14 de B16F10(CAV1/Y14F) (Ortiz et al., 2016), y que en otros modelos se relaciona la ubicación de CAV1 fosforilada en Y14 con elementos endocíticos destinados a CMV (Albacete-Albacete et al., 2018). Esto se suma a que la fosforilación descrita, junto a otros procesos postraduccionales en CAV1 como lo es la ubiquitinación, son capaces de distribuir CAV1 en CMV destinados a exosomas (Albacete-Albacete et al., 2018). Esto sugiere un posible mecanismo del cargo de CAV1 en las vesículas intraluminales y que el estado de fosforilación de CAV1 en tirosina 14 es un facilitador de este proceso. Sin embargo, es discutible el rol del proceso de ubiquitinación de CAV1, debido a que no se observó un cambio en el peso molecular de CAV1 presente en vesículas. Un punto para investigar a futuro sería definir la fracción de CMV que son destinados finalmente a exosomas o al lisosoma.

Otras preguntas que surgen en relación con otras modificaciones postraduccionales de CAV1 y su destino hacia VE es si otros residuos de fosforilación importantes que posee CAV1, como la Serina-80, participan en la formación de VE. Evidencias indican que la fosforilación de este sitio S80 está relacionada con la localización de esta proteína en la membrana del retículo endoplasmático (Schlegel et al., 2001). Por lo tanto, esta

fosforilación conectaría a CAV1 con la ruta secretora regulada, a diferencia de la mutante S80A (serina reemplazada por alanina, fosfonula) la cual es dirigida a membrana de caveolas (Schlegel et al., 2001).

### **Efectos biológicos de células metastásicas tratadas con vesículas extracelulares que poseen CAV1 en su estructura.**

Para poder evidenciar los efectos de las VE en células receptoras es importante, en primera instancia, la interacción entre ellas. En este trabajo se demuestra que las células tumorales son capaces de captar las VE. Además, que la cantidad de células marcadas depende de la cantidad de vesículas utilizadas, independientemente de si éstas tienen o no CAV1. Queda preguntarse sobre la localización de estas vesículas en las células receptoras, que en ensayos usando microscopía electrónica podría resolverse. Esto nos permitiría ver el destino de estas vesículas y la interacción con diferentes compartimientos celulares, haciendo ayudar a establecer posibles mecanismos de acción.

Un hallazgo interesante de este trabajo de tesis es la diferencia entre las cinéticas de internalización de VE, siendo más rápida en el caso de las VE con CAV1. En trabajos anteriores donde estudian internalización de VE y su mecanismo de internalización, se puede observar cómo la presencia de CAV1 en las células receptoras regulan negativamente la internalización de VE (Svensson et al., 2013). Sin embargo, no existe evidencia en la literatura que muestre la influencia de CAV1 presente en las vesículas para su internalización en células receptoras. En este caso sería adecuado relacionar la adquisición de estas vesículas en tiempos tempranos con proteínas de superficie presentes en estas vesículas. Las más importantes son las integrinas, proteínas de transmembrana relevantes en la adhesión celular con elementos de la matriz extracelular. Los datos de proteómica evidencian un perfil único de estas proteínas presentes exclusivamente en VE CAV1 y VE CAV1/Y14E, como es el caso de integrina beta-5. Esta proteína junto a su par, la integrina alfa-V tienen afinidad por componentes de la matriz extracelular del tipo fibronectina y vitronectina, ambos de relevancia en cáncer (Desgrosellier and Cheresch,

2010). Considerando lo anterior, en tiempos tempranos la interacción entre las integrinas de VE y fibronectina o vitronectina asociada a integrinas de células receptoras parece ser el punto inicial para la captación a las VE, evidenciando cómo la matriz extracelular juega un papel fundamental en el *homing* tanto de VE como de células tratadas con estas vesículas (Hoshino et al., 2015). Esto será importante de dilucidar usando péptidos RGD (péptido que bloquea interacciones entre integrinas y proteínas de matriz extracelular como fibronectina o vitronectina) u otros bloqueadores, como los anticuerpos neutralizantes de integrinas, sobre las VE o células receptoras y evaluar si hay cambios tanto en la cinética de adquisición de VE como en los efectos biológicos posteriores.

Será de importancia evaluar con mayor profundidad el proceso de adquisición de VE determinando mediante microscopía confocal junto con inmunofluorescencia, por ejemplo, la localización de las vesículas adquiridas a distintos tiempos. Esto ayudará a dilucidar el posible mecanismo de acción de las vesículas sobre las células receptoras. Sin embargo, deduciendo de los resultados obtenidos en los ensayos de captación, el contenido de las vesículas ya es parte de la célula receptora, hipotetizando que el tratamiento con tripsina antes de la citometría separaría por proteólisis a las vesículas ancladas en la superficie de las células receptoras. En este caso, ensayos posteriores deben incluir el uso de inhibidores de endocitosis, tanto para los dependientes como los independientes de clatrina. El próximo paso además será evaluar este proceso usando las VE provenientes de células CAV1/Y14E y CAV1/Y14F para determinar si la fosforilación de CAV1 y otros cargos influyen en esta internalización temprana.

Respecto a la respuesta biológica de las células receptoras, estudios anteriores de nuestro laboratorio demostraron que el tratamiento con VE de células altamente metastásicas es capaz de favorecer la motilidad e invasividad de células tumorales con baja capacidad metastásica que además poseen bajos niveles de CAV1 (Campos et al., 2018). En nuestro trabajo, además de confirmar dichos antecedentes, se demostró que la fosforilación de CAV1 en tirosina 14 juega un papel importante en los efectos biológicos (figuras 7 y 8)

de las VE, demostrando efectos más acentuados en ensayos de migración en *transwell* y presentándose una tendencia en la migración transendotelial considerando la necesidad de reproducir más veces este ensayo para dar una respuesta categórica. Este efecto sobre la migración según los resultados obtenidos no estaría relacionado con la aparente transferencia de CAV1 o algún mRNA que favorezca la traducción de esta proteína desde las VE hacia la célula receptora, indicado por la expresión de CAV1 (figura 7). Sin embargo, no excluye completamente el hecho que la CAV1 transferida *per se* pueda tener algún efecto biológico demostrable. Para evaluar esto es necesario realizar ensayos que muestren sí los mecanismos involucrados en migración e invasión bajo los efectos de VE son los mismos que los hechos por CAV1 de forma intrínseca. Por ejemplo, evaluar la actividad de Rac1 y Rab5 en células tumorales sin CAV1 tratadas con VE derivadas de células que contienen CAV1 y sus mutantes. Al observar la actividad de Rac-1 y Rab5 después del tratamiento de VE con CAV1 sería posible hipotetizar respecto al papel que tiene CAV1 presente en las vesículas extracelulares. Aunque esto podría llevar también a nuevas preguntas sobre cómo se ve la misma respuesta molecular sin la presencia aparente de CAV1 en la célula que actúa como receptora de estas VE.

Falta por investigar, la duración del efecto que tienen las VE sobre los procesos biológicos de migración e invasión en células tratadas, así como el tiempo necesario de exposición con las vesículas para que las células receptoras adquieran los rasgos de mayor agresividad evidenciados. Es decir, ¿qué tan temprano se manifiestan los efectos después del tratamiento con vesículas? O ¿son estos efectos permanentes o solo se mantienen por un tiempo limitado? La primera pregunta está en estrecha relación con la cinética de la captación de VE y para su respuesta se requiere que las células tumorales a estudiar sean tratadas por diversos tiempos con las diferentes VE. Para la segunda pregunta, el enfoque se centra en el tiempo después del tratamiento, durante el cual es posible evidenciar los efectos biológicos de las VE sobre estas células.

En el caso de los cambios metabólicos producidos por el tratamiento con VE (figura suplementaria 1), no se observó cambios en los niveles de lactato producido; sin embargo, no se puede descartar que existan limitantes del método que no estuvieron bien manejadas. Por ejemplo, sería necesario considerar la estabilidad del lactato en el medio de cultivo, conservación y almacenamiento del sobrenadante e inmediatez de la medición. Una forma de medir este parámetro y otros para determinar la función del metabolismo glicolítico es usando instrumentos que midan en tiempo real estos cambios, como el caso del equipo *Seahorse*. Con estos factores a considerar, sería recomendable volver a hacer estas determinaciones evitando eventos que puedan interferir con los resultados.

Otro punto es respecto al mecanismo propuesto en las primeras etapas de esta tesis, de que una de las proteínas afectadas en la célula receptora podría haber sido la fosfatasa PTEN. PTEN es una fosfatasa desfosforila el carbono 3 del anillo inositol del lípido fosfatidil inositol-3,4,5-trifosfato, antagonizando de esta manera la vía de señalización PI3K-AKT. El mecanismo propuesto para la disminución de PTEN era mediante microRNA exosomal. Los miR son RNA pequeños no codificantes (19-25 bases) que son capaces de unirse a la región no-traducida 3' (3'-UTR) o en el marco de lectura abierta (ORF) de varios RNA mensajeros, bloqueando su traducción o disminuyendo su estabilidad (Lin and Gregory, 2015). Hay documentación respecto al silenciamiento de PTEN vía miRNA, y que este evento promueve la metástasis en el cerebro además de favorecer la glicólisis por sobre el metabolismo mitocondrial (Rabinowitz and Coller, 2016). Al observar que en esta línea celular se detectaban bajos niveles de PTEN, sumando además que las diferencias entre la expresión de PTEN, bajo los distintos tratamientos, no eran estadísticamente significativas (figura suplementaria 2), no se continuó con este acercamiento. En cambio, se decidió continuar con una aproximación basada en el estudio del contenido proteico de estas vesículas usando proteómica.

**Proteínas presentes en vesículas extracelulares provenientes de células metastásicas que expresan CAV1 y CAV1/Y14E.**

Sumados a los efectos que tienen las vesículas provenientes de B16F10 CAV1 y CAV1/Y14E en la migración e invasión de células metastásicas receptoras, el contenido de estas vesículas se ve alterado, demostrable primero por el perfil de proteínas enriquecidas en estas vesículas, las cuales favorecen procesos de adhesión celular (Tabla 3). Entre las los principales componentes comunes entre estas vesículas encontramos moléculas de adhesión celular (CAM): Integrina beta 5, ALCAM y Embigin (Tabla 4).

Integrina beta 5 actúa primariamente como receptor de fibronectina, pero ha sido de interés su presencia en VE y posibles efectos. En un trabajo de Hoshino y colaboradores, se demostró que el perfil de ciertas integrinas presentes en VE proveniente de células tumorales es capaz de preparar el nicho a invadir otros tejidos. Específicamente, en el caso de la integrina beta 5 se mostró su incorporación a células de Kupffer en hígado, desencadenando en éstas el aumento de expresión de la proteína S100, perteneciente a una familia de moléculas proinflamatorias y promigratorias (Hoshino et al., 2015) (figura 11). Esto es de relevancia, como fue descrito en la parte de adquisición de VE. Por lo tanto, sería interesante poder demostrar una respuesta similar en las mismas células tumorales.

ALCAM es una molécula transmembrana perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas con 5 dominios extracelulares y una corta porción citoplasmática de 32 aminoácidos (Bowen et al., 1995). La interacción de esta proteína generalmente es del tipo homodimérica. En melanoma primario, niveles altos de esta proteína están relacionados con un peor pronóstico (Donizy et al., 2015). La adhesión celular mediada por homodímeros de ALCAM promueven la activación de metaloproteasa MMP-2 (Lunter et al., 2005). Se puede sugerir que la interacción entre ALCAM de las vesículas con ALCAM de las células receptoras favorezcan metástasis y angiogénesis, dependiendo del tipo de célula con la que interaccionan. Para demostrar lo anterior sería necesario

comprobar el aumento de expresión o actividad de MMP-2 en células tumorales tratadas con VE de células expresando CAV1 o CAV1/Y14E (figura 11).

Embigin pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y es importante en el desarrollo neuronal (Lain et al., 2009). En melanoma toma importancia por su interacción con otras glicoproteínas como Galectina-3, unión que facilita el *spreading* de las células que expresan o tienen bloqueada la proteína Embigin (Dange et al., 2017). También se encuentra sobreexpresada en adenocarcinoma pancreático, regulando la transición epitelio-mesénquima (Jung et al., 2016). De las CAM descritas anteriormente Embigin muestra menos evidencia de efectos extrínsecos sobre células metastásicas.

Es importante señalar las diferencias entre las proteínas presentes en las vesículas provenientes de las líneas metastásicas que expresan altos niveles de CAV1, en comparación con las proteínas encontradas por Campos y colaboradores en las VE obtenidas de la línea MDA-MB-231, una línea celular de cáncer mamario que expresa altos niveles de CAV1. En el caso del trabajo de América Campos y colaboradores, se evidenció enriquecimiento de proteínas que permiten interacción célula-matriz como Cyr-61 y Tenascina (Campos et al., 2018), mientras en este trabajo de tesis se encontró principalmente moléculas de adhesión que median la interacción célula-célula. Este es un hallazgo fascinante ya que, a pesar de las diferencias proteicas presentes en las vesículas de ambas líneas metastásicas, los efectos sobre la migración e invasión de células tratadas son similares. En este caso, un punto no desarrollado en este estudio con respecto al contenido de las VE es la presencia de miRNA. Los miRNA son moléculas capaces de modular la expresión de proteínas, interfiriendo en la traducción, lo que lo hacen un tópico de mucha importancia actualmente. Ensayos posteriores deberían enfocarse en identificar miRNA enriquecidos en estas vesículas los cuales, en este caso también podrían favorecer la metástasis de las células tumorales tratadas.

Otro punto para destacar es el evidente aumento de proteínas presentes en VE CAV1/Y14E (figura 10A). Esto abre interrogantes sobre la interacción de CAV1 fosforilada en tirosina 14 con otras proteínas durante su tránsito por la ruta endocítica. Es apreciable que un grupo de estas proteínas sean parte estructural de balsas lipídicas (figura 10 B), pero hay también otra gran variedad de proteínas asociadas a otras estructuras celulares y procesos biológicos de relevancia en el desarrollo de un tumor que deberían ser estudiadas en más detalle.

Es de interés que al revisar la lista de proteínas presentes en VE CAV1 y VE CAV1/Y14E encontramos enriquecimiento de proteínas implicadas en otros procesos biológicos, como la angiogénesis, importante en el desarrollo tumoral y la metástasis, por lo que puede considerarse una importante diana terapéutica (Viallard and Larrivé, 2017). Entre algunas proteínas dentro de este proceso podemos destacar la metaloproteína 14 (MMP-14), presente sólo en VE CAV1/Y14E. El papel de MMP-14 es fundamental en la angiogénesis tumoral (Yosef et al., 2018). También hay que enfatizar la presencia de otras proteínas involucradas en procesos de angiogénesis, como AICAM descrita anteriormente.

Entre otros grupos enriquecidos en VE provenientes de células CAV1/Y14E y de relevancia en el desarrollo del cáncer podemos encontrar proteínas involucradas en respuesta inmune, específicamente moléculas que permitirían la polarización de monocitos hacia macrófagos proinflamatorios. Podemos encontrar por ejemplo, la ya descrita integrina beta 5, presente en VE de células CAV1 y CAV1/Y14E (Yao et al., 2018). Otros ejemplos a destacar en VE de células CAV1/Y14E involucrados en esta respuesta son galectina-1 (Ababayehu et al., 2017), metaloproteasa-14 (Hohensinner et al., 2018) ya destacada anteriormente, y beta-catenina (Menck et al., 2013).

Sin lugar a duda, este enriquecimiento notable de proteínas no fue esperado y confiere un grado de dificultad mayor sobre la complejidad de las respuestas biológicas que otorgan

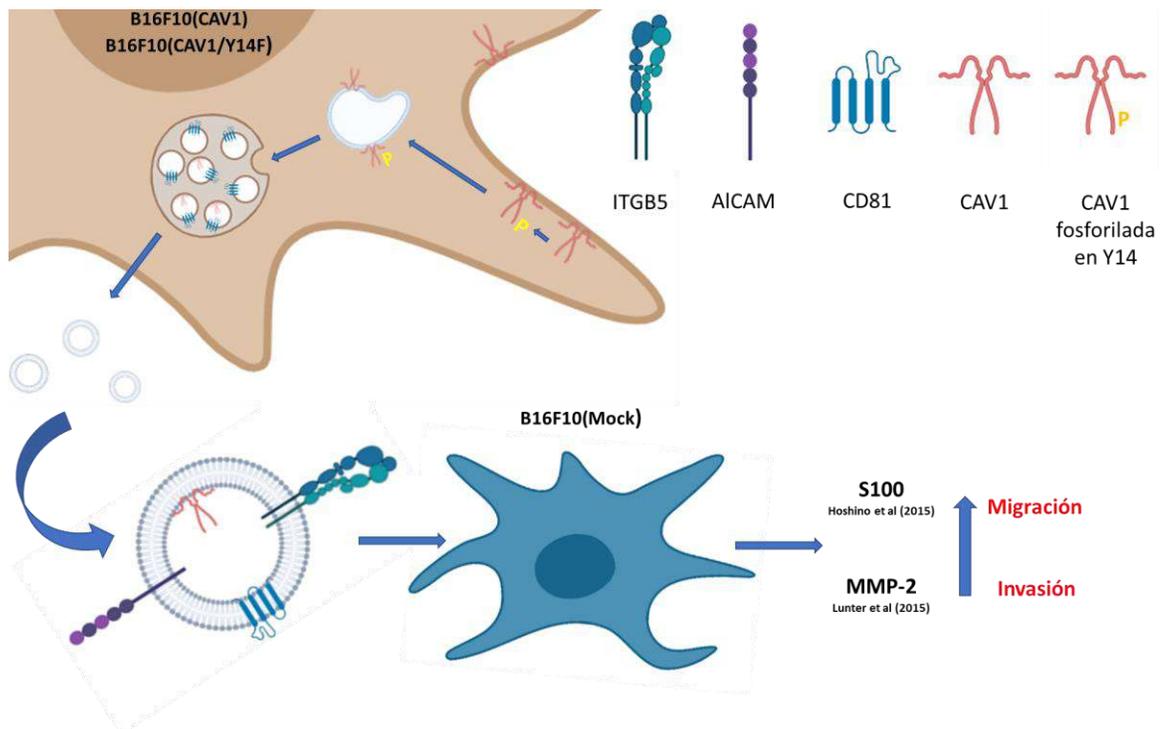
estas vesículas sobre las células receptoras. Una posibilidad de porqué se produce este efecto sería debido a la interacción descrita anteriormente entre CAV1 y CD81 en estructuras membranosas similares a balsas lipídicas. Los datos de proteómica muestran en el caso de VE CAV1/Y14E un enriquecimiento importante en proteínas localizadas en balsas lipídicas (figura 10B). Sería importante evaluar con más detalle el efecto de CAV1 fosforilado en Y14 en el proceso de cargo de proteínas a los CMV, en específico el mecanismo independiente de la maquinaria ESCRT, en el cual toma mayor relevancia la participación de tetraspaninas como CD81 y microdominios de membrana. Una hipótesis derivada de estos datos es que la gran parte de las proteínas enriquecidas en las CAV1/Y14E son cargadas a las VE por mecanismos dependientes de tetraspaninas. Para asegurar eso, es necesario intervenir este mecanismo primero silenciando a CD81 y continuar posteriormente con otras tetraspaninas.

Es importante el efecto de las VE sobre las mismas células tumorales, sirviendo como educadoras, pero la complejidad de un tumor hace imperante evaluar cómo estas vesículas desencadenan otras respuestas biológicas en otros tipos celulares involucrados íntimamente en el ambiente tumoral. Pruebas como polarización *in vitro* de monocitos hacia una subclase de macrófagos y ensayos de formación de tubos por parte de células endoteliales son necesarios para determinar las respuestas de otras células del estroma al recibir VE de las células de cáncer. Esto requiere finalmente de modelos animales que permiten evaluar en totalidad los diversos efectos que las VE desencadenen para el desarrollo de metástasis. También es necesario evaluar cómo la fosforilación en CAV1 en células metastásicas productoras influye en la gravedad de la metástasis mediadas por VE. Pasos posteriores deberían incluir el validar la presencia de estas proteínas en la VE mediante Western blot y luego, silenciar estas proteínas para evaluar el efecto de las vesículas obtenidas.

En resumen (ver figura 11), el presente estudio demuestra la presencia de CAV1 en VE provenientes de líneas altamente metastásicas como las B16F10. También se muestra que

la fosforilación de esta proteína en Y14 es un paso importante para la incorporación de esta proteína en VE, ya que al imposibilitar esta modificación mediante la mutación Y14F de CAV1, disminuye significativamente la detección de CAV1 en las vesículas. Los resultados indican, además, que las VE que contienen CAV1 difieren significativamente de las VE provenientes de células B16F10(Mock) y, que las VE de las células que expresan CAV1/Y14E, contienen mayor cantidad de proteínas únicas, sugiriendo que CAV1 y particularmente la fosforilación en tirosina 14 podrían ser críticos para su localización endosomal y posterior interacción con dominios ricos en CD81 en los CMV y así ser determinante sobre el contenido de proteínas cargadas en las VE. Es importante en este contexto confirmar este evento mediante ensayos que detecten la co-localización de ambas proteínas comparando la forma fosfomimética contra la fosfonula de CAV1/Y14. Los hallazgos presentados se relacionan también con el efecto que tienen estas vesículas sobre células metastásicas, aumentando más su migración e invasión (figura 11). Este efecto probablemente se deba a la transferencia o interacción de proteínas implicadas en procesos de adhesión celular que desencadene en las células receptoras procesos biológicos importantes en la metástasis (S100 y MMP-2), que están enriquecidas en las VE, así como otras moléculas biológicamente activas.

Estudios futuros buscarán identificar los mecanismos por los cuales CAV1 y particularmente la fosforilación en Y14 modulan el contenido de las VE.



**Figura 11. Propuesta de la actividad y respuestas de células tumorales bajo el estímulo con vesículas extracelulares provenientes de las líneas celulares B16F10(CAV1) o (CAV1/Y14F).** CAV1 en células altamente metastásicas es fosforilada en Y14, e ingresa a la ruta endocítica pasando a los CMV. Estas células altamente metastásicas como B16F10(CAV1) Y B16F10(CAV1/Y14E) liberan VE cargadas con CAV1 y moléculas de adhesión celular (ITGB5 y AICAM) que en contacto con células sin CAV1 con menor capacidad metastásica desencadenaría en las células receptoras mayor migración e invasión debido a la secreción de proteínas como metaloproteasa MMP-2 y S100 como posible respuesta al tratamiento con VE.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

Abebayehu, D., Spence, A., Boyan, B.D., Schwartz, Z., Ryan, J.J., and McClure, M.J. (2017). Galectin-1 promotes an M2 macrophage response to polydioxanone scaffolds. *J Biomed Mater Res A* *105*, 2562-2571.

Albacete-Albacete, L., Navarro-Lérida, I., Lopez, J.A., Martín-Padura, I., Astudillo, A.M., Van-Der-Heyden, M., Balsinde, J., Orend, G., Vazquez, J., and Ángel del Pozo, M. (2018). ECM deposition is driven by caveolin1-dependent regulation of exosomal biogenesis and cargo sorting. *bioRxiv*, 405506.

Bender, F.C., Reymond, M.A., Bron, C., and Quest, A.F. (2000). Caveolin-1 levels are down-regulated in human colon tumors, and ectopic expression of caveolin-1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity. *Cancer Res* *60*, 5870-5878.

Bowen, M.A., Patel, D.D., Li, X., Modrell, B., Malacko, A.R., Wang, W.C., Marquardt, H., Neubauer, M., Pesando, J.M., and Francke, U. (1995). Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. *J Exp Med* *181*, 2213-2220.

Brown, D.A., and London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* *14*, 111-136.

Buschow, S.I., Nolte-'t Hoen, E.N., van Niel, G., Pols, M.S., ten Broeke, T., Lauwen, M., Ossendorp, F., Melief, C.J., Raposo, G., Wubbolts, R., *et al.* (2009). MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic* *10*, 1528-1542.

Campos, A., Salomon, C., Bustos, R., Diaz, J., Martinez, S., Silva, V., Reyes, C., Diaz-Valdivia, N., Varas-Godoy, M., Lobos-Gonzalez, L., *et al.* (2018). Caveolin-1-containing extracellular vesicles transport adhesion proteins and promote malignancy in breast cancer cell lines. *Nanomedicine (Lond)* *13*, 2597-2609.

Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L.F., Thery, C., and Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome

biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci* 126, 5553-5565.

Colombo, M., Raposo, G., and Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30, 255-289.

Czernek, L., and Duchler, M. (2017). Functions of Cancer-Derived Extracellular Vesicles in Immunosuppression. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 65, 311-323.

Dange, M.C., Bhonsle, H.S., Godbole, R.K., More, S.K., Bane, S.M., Kulkarni, M.J., and Kalraiya, R.D. (2017). Mass spectrometry based identification of galectin-3 interacting proteins potentially involved in lung melanoma metastasis. *Mol Biosyst* 13, 2303-2309.

Desgrosellier, J.S., and Cheresch, D.A. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 10, 9-22.

Donizy, P., Zietek, M., Halon, A., Leskiewicz, M., Kozyra, C., and Matkowski, R. (2015). Prognostic significance of ALCAM (CD166/MEMD) expression in cutaneous melanoma patients. *Diagn Pathol* 10, 86.

Dorai, T., Shah, A., Summers, F., Mathew, R., Huang, J., Hsieh, T.C., and Wu, J.M. (2018). NRH:quinone oxidoreductase 2 (NQO2) and glutaminase (GLS) both play a role in large extracellular vesicles (LEV) formation in preclinical LNCaP-C4-2B prostate cancer model of progressive metastasis. *Prostate* 78, 1181-1195.

Díaz, J., Mendoza, P., Ortiz, R., Díaz, N., Leyton, L., Stupack, D., Quest, A.F., and Torres, V.A. (2014a). Rab5 is required in metastatic cancer cells for Caveolin-1-enhanced Rac1 activation, migration and invasion. *J Cell Sci* 127, 2401-2406.

Díaz, J., Mendoza, P., Silva, P., Quest, A.F., and Torres, V.A. (2014b). A novel caveolin-1/p85 $\alpha$ /Rab5/Tiam1/Rac1 signaling axis in tumor cell migration and invasion. *Commun Integr Biol* 7.

Gardiner, C., Di Vizio, D., Sahoo, S., Théry, C., Witwer, K.W., Wauben, M., and Hill, A.F. (2016). Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *J Extracell Vesicles* 5, 32945.

Goetz, J.G., Lajoie, P., Wiseman, S.M., and Nabi, I.R. (2008). Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. *Cancer Metastasis Rev* 27, 715-735.

Gould, G.W., and Lippincott-Schwartz, J. (2009). New roles for endosomes: from vesicular carriers to multi-purpose platforms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 287-292.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Harlozinska, A. (2005). Progress in molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Anticancer Res* 25, 3327-3333.

He, M., Qin, H., Poon, T.C., Sze, S.C., Ding, X., Co, N.N., Ngai, S.M., Chan, T.F., and Wong, N. (2015). Hepatocellular carcinoma-derived exosomes promote motility of immortalized hepatocyte through transfer of oncogenic proteins and RNAs. *Carcinogenesis* 36, 1008-1018.

Hohensinner, P.J., Baumgartner, J., Ebenbauer, B., Thaler, B., Fischer, M.B., Huber, K., Speidl, W.S., and Wojta, J. (2018). Statin treatment reduces matrix degradation capacity of proinflammatory polarized macrophages. *Vascul Pharmacol* 110, 49-54.

Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., *et al.* (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527, 329-335.

Huang, d.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4, 44-57.

Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L., and Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* 262, 9412-9420.

Jung, D.E., Kim, J.M., Kim, C., and Song, S.Y. (2016). Embigin is overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma and regulates cell motility through epithelial to mesenchymal transition via the TGF- $\beta$  pathway. *Mol Carcinog* 55, 633-645.

Kahlert, C., and Kalluri, R. (2013). Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med (Berl)* 91, 431-437.

Klumperman, J., and Raposo, G. (2014). The complex ultrastructure of the endolysosomal system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6, a016857.

La Shu, S., Yang, Y., Allen, C.L., Maguire, O., Minderman, H., Sen, A., Ciesielski, M.J., Collins, K.A., Bush, P.J., Singh, P., *et al.* (2018). Metabolic reprogramming of stromal fibroblasts by melanoma exosome microRNA favours a pre-metastatic microenvironment. *Sci Rep* 8, 12905.

Lain, E., Carnejac, S., Escher, P., Wilson, M.C., Lømo, T., Gajendran, N., and Brenner, H.R. (2009). A novel role for embigin to promote sprouting of motor nerve terminals at the neuromuscular junction. *J Biol Chem* 284, 8930-8939.

Lee, H., Groot, M., Pinilla-Vera, M., Fredenburgh, L.E., and Jin, Y. (2019a). Identification of miRNA-rich vesicles in bronchoalveolar lavage fluid: Insights into the function and heterogeneity of extracellular vesicles. *J Control Release* 294, 43-52.

Lee, H., Li, C., Zhang, Y., Zhang, D., Otterbein, L.E., and Jin, Y. (2019b). Caveolin-1 selectively regulates microRNA sorting into microvesicles after noxious stimuli. *J Exp Med* 216, 2202-2220.

Li, S., Seitz, R., and Lisanti, M.P. (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.

Llorente, A., de Marco, M.C., and Alonso, M.A. (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-Guzmán, L., Fernandez, J.G., Muñoz, N., Hossain, M., Bieneck, S., Silva, V., Burzio, V., Sviderskaya, E.V., Bennett, D.C., *et al.* (2014). Caveolin-1 is a risk factor for postsurgery metastasis in preclinical melanoma models. *Melanoma Res* 24, 108-119.

Lobos-González, L., Aguilar, L., Diaz, J., Diaz, N., Urra, H., Torres, V.A., Silva, V., Fitzpatrick, C., Lladser, A., Hoek, K.S., *et al.* (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., Borghi, M., Calabrò, L., Spada, M., Perdicchio, M., Marino, M.L., Federici, C., Iessi, E., *et al.* (2009). High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One* 4, e5219.

Lunter, P.C., van Kilsdonk, J.W., van Beek, H., Cornelissen, I.M., Bergers, M., Willems, P.H., van Muijen, G.N., and Swart, G.W. (2005). Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166/MEMD), a novel actor in invasive growth, controls matrix metalloproteinase activity. *Cancer Res* 65, 8801-8808.

Menck, K., Klemm, F., Gross, J.C., Pukrop, T., Wenzel, D., and Binder, C. (2013). Induction and transport of Wnt 5a during macrophage-induced malignant invasion is mediated by two types of extracellular vesicles. *Oncotarget* 4, 2057-2066.

Nguyen, D.X., Bos, P.D., and Massagué, J. (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* 9, 274-284.

Núñez-Wehinger, S., Ortiz, R.J., Díaz, N., Díaz, J., Lobos-González, L., and Quest, A.F. (2014). Caveolin-1 in cell migration and metastasis. *Curr Mol Med* 14, 255-274.

Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P.E., and Lisanti, M.P. (1998). Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem* 273, 5419-5422.

Oosthuyzen, W., Sime, N.E., Ivy, J.R., Turtle, E.J., Street, J.M., Pound, J., Bath, L.E., Webb, D.J., Gregory, C.D., Bailey, M.A., *et al.* (2013). Quantification of human urinary exosomes by nanoparticle tracking analysis. *J Physiol* 591, 5833-5842.

Ortiz, R., Díaz, J., Díaz, N., Lobos-Gonzalez, L., Cárdenas, A., Contreras, P., Díaz, M.I., Otte, E., Cooper-White, J., Torres, V., *et al.* (2016). Extracellular matrix-specific Caveolin-1 phosphorylation on tyrosine 14 is linked to augmented melanoma metastasis but not tumorigenesis. *Oncotarget* 7, 40571-40593.

Ortiz, R., Díaz, J., Díaz-Valdivia, N., Martínez, S., Simón, L., Contreras, P., Lobos-González, L., Guerrero, S., Leyton, L., and Quest, A.F.G. (2020). Src-family kinase inhibitors block early steps of caveolin-1-enhanced lung metastasis by melanoma cells. *Biochem Pharmacol* 177, 113941.

Perez-Hernandez, D., Gutiérrez-Vázquez, C., Jorge, I., López-Martín, S., Ursa, A., Sánchez-Madrid, F., Vázquez, J., and Yáñez-Mó, M. (2013). The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J Biol Chem* 288, 11649-11661.

Pfeiler, S., Thakur, M., Grunauer, P., Megens, R.T.A., Joshi, U., Coletti, R., Samara, V., Muller-Stoy, G., Ishikawa-Ankerhold, H., Stark, K., *et al.* (2019). CD36-triggered cell invasion and persistent tissue colonization by tumor microvesicles during metastasis. *Faseb j* 33, 1860-1872.

Phuyal, S., Hessvik, N.P., Skotland, T., Sandvig, K., and Llorente, A. (2014). Regulation of exosome release by glycosphingolipids and flotillins. *Febs j* 281, 2214-2227.

Quest, A.F., Gutierrez-Pajares, J.L., and Torres, V.A. (2008). Caveolin-1: an ambiguous partner in cell signalling and cancer. *J Cell Mol Med* 12, 1130-1150.

Raiborg, C., Rusten, T.E., and Stenmark, H. (2003). Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr Opin Cell Biol* 15, 446-455.

Rappa, G., Mercapide, J., Anzanello, F., Pope, R.M., and Lorico, A. (2013). Biochemical and biological characterization of exosomes containing prominin-1/CD133. *Mol Cancer* 12, 62.

Sanguinetti, A.R., and Mastick, C.C. (2003). c-Abl is required for oxidative stress-induced phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14. *Cell Signal* 15, 289-298.

Savage, K., Lambros, M.B., Robertson, D., Jones, R.L., Jones, C., Mackay, A., James, M., Hornick, J.L., Pereira, E.M., Milanezi, F., *et al.* (2007). Caveolin 1 is overexpressed and amplified in a subset of basal-like and metaplastic breast carcinomas: a morphologic, ultrastructural, immunohistochemical, and in situ hybridization analysis. *Clin Cancer Res* 13, 90-101.

Schlegel, A., Arvan, P., and Lisanti, M.P. (2001). Caveolin-1 binding to endoplasmic reticulum membranes and entry into the regulated secretory pathway are regulated by serine phosphorylation. Protein sorting at the level of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 276, 4398-4408.

Senetta, R., Stella, G., Pozzi, E., Sturli, N., Massi, D., and Cassoni, P. (2013). Caveolin-1 as a promoter of tumour spreading: when, how, where and why. *J Cell Mol Med* 17, 325-336.

Svensson, K.J., Christianson, H.C., Wittrup, A., Bourseau-Guilmain, E., Lindqvist, E., Svensson, L.M., Mörgelin, M., and Belting, M. (2013). Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid Raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *J Biol Chem* 288, 17713-17724.

Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol Chapter 3*, Unit 3.22.

Théry, C., Witwer, K.W., Aikawa, E., Alcaraz, M.J., Anderson, J.D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G.K., *et al.* (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 7, 1535750.

Urra, H., Torres, V.A., Ortiz, R.J., Lobos, L., Diaz, M.I., Diaz, N., Hartel, S., Leyton, L., and Quest, A.F. (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.

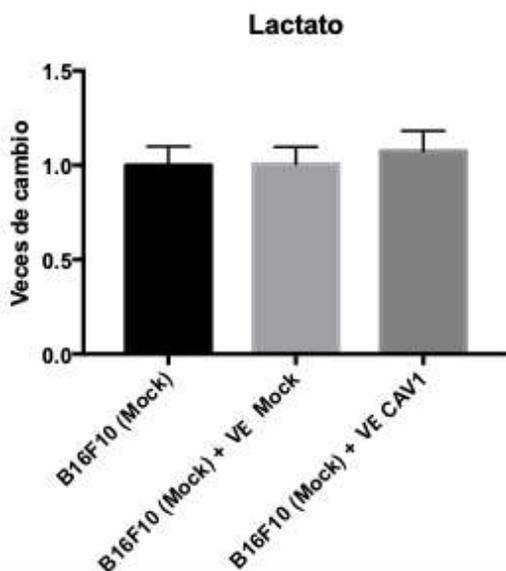
van der Pol, E., Coumans, F.A., Grootemaat, A.E., Gardiner, C., Sargent, I.L., Harrison, P., Sturk, A., van Leeuwen, T.G., and Nieuwland, R. (2014). Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *J Thromb Haemost* 12, 1182-1192.

van Niel, G., D'Angelo, G., and Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 213-228.

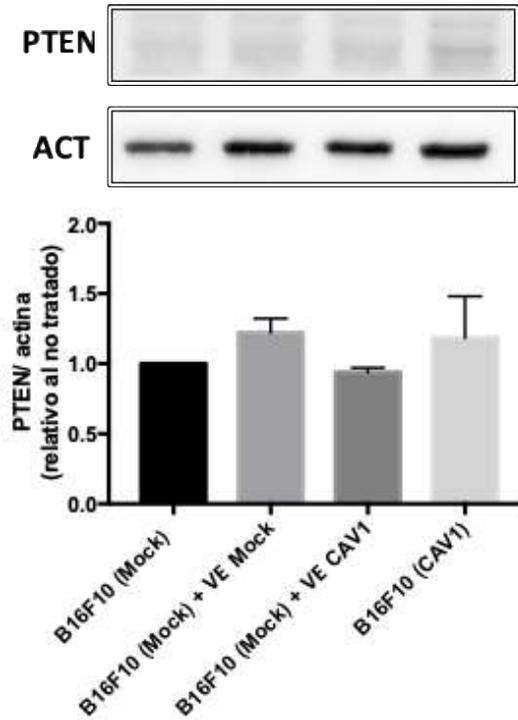
Viallard, C., and Larrivé, B. (2017). Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis* 20, 409-426.

- Yang, N., Li, S., Li, G., Zhang, S., Tang, X., Ni, S., Jian, X., Xu, C., Zhu, J., and Lu, M. (2017). The role of extracellular vesicles in mediating progression, metastasis and potential treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 8, 3683-3695.
- Yao, Q., Liu, J., Zhang, Z., Li, F., Zhang, C., Lai, B., Xiao, L., and Wang, N. (2018). Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) induces the gene expression of integrin  $\alpha$ . *J Biol Chem* 293, 16572-16582.
- Yosef, G., Arkadash, V., and Papo, N. (2018). Targeting the MMP-14/MMP-2/integrin  $\alpha$ . *J Biol Chem* 293, 13310-13326.
- Zhang, X., Yuan, X., Shi, H., Wu, L., Qian, H., and Xu, W. (2015). Exosomes in cancer: small particle, big player. *J Hematol Oncol* 8, 83.

#### 14. MATERIAL COMPLEMENTARIO.



**Figura suplementaria 1. Cuantificación de lactato en el sobrenadante de células B16F10(Mock) después del tratamiento con vesículas extracelulares provenientes de las líneas celulares B16F10(Mock) y (CAV1).** Se sembró  $3 \times 10^5$  células B16F10(Mock) en placas de 6 cm. Luego de 24 h, las células se trataron con 10  $\mu\text{g}$  de VE de B16F10(Mock) y B16F10(CAV1) por 24 h más. Al término del tratamiento, el sobrenadante fue separado para realizar la medición de lactato producido mediante ensayo colorimétrico. El gráfico muestra el promedio de 3 experimentos independientes (promedio  $\pm$  SEM) de la cantidad de lactato medido en cada condición normalizado por el lactato medido en las células B16F10(Mock). Los resultados se analizaron estadísticamente con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y un post test de Dunns. No se encontró diferencias significativas entre las distintas condiciones.



**Figura suplementaria 2. Western blot de la expresión de PTEN en células B16F10(Mock) tratadas con vesículas extracelulares provenientes de las líneas celulares B16F10(Mock) y (CAV1).** Se sembró  $3 \times 10^5$  células B16F10(Mock) y (CAV1) en placas de 6 cm, 24 h. Luego, las células B16F10(Mock) fueron tratadas con  $10 \mu\text{g}$  de vesículas extracelulares de B16F10(Mock) y B16F10(CAV1). Después de 24 h, se obtuvo los extractos celulares y se realizó una electroforesis. Se cargó  $50 \mu\text{g}$  de proteína total y las proteínas se separaron por SDS-PAGE en geles al 10% y se analizaron mediante Western blot los niveles de PTEN y  $\beta$ -actina. Los gráficos muestran el promedio (promedio  $\pm$  SEM) de 2 experimentos independientes de los niveles de PTEN activo normalizado respecto a las células B16F10(Mock) sin tratar.

**Tabla suplementaria 1. Proteínas detectadas en vesículas extracelulares provenientes de la línea celular B16F10wt**

Uniprot accession	Nombre	Gen	Péptidos
P63017	Heat shock cognate 71 kDa protein	Hspa8	67.0
O08992	Syntenin-1	Sdcbp	24.0
P11276	Fibronectin	Fn1	23.0
Q9WU78	Programmed cell death 6-interacting protein	Pdcd6ip	19.0
Q05793	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	Hspg2	17.5
Q8R366	Immunoglobulin superfamily member 8	Igsf8	16.0
P35762	CD81 antigen	Cd81	15.5
P09055	Integrin beta-1	Itgb1	15.0
E9Q557	Desmoplakin	Dsp	12.5
P17156	Heat shock-related 70 kDa protein 2	Hspa2	12.5
P10404	MLV-related proviral Env polyprotein	unassigned	11.0
P17742	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	Ppia	11.0
P21956	Lactadherin	Mfge8	11.0
Q9QWL7	Keratin, type I cytoskeletal 17	Krt17	10.0
P48036	Annexin A5	Anxa5	9.5
Q62419	Endophilin-A2	Sh3gl1	8.5
Q68FD5	Clathrin heavy chain 1	Cltc	8.5
Q00651	Integrin alpha-4	Itga4	8.0
P16627	Heat shock 70 kDa protein 1-like	Hspa11	7.5
P63037	DnaJ homolog subfamily A member 1	Dnaja1	7.0
P10852	4F2 cell-surface antigen heavy chain	Slc3a2	6.0
P26041	Moesin	Msn	6.0
P40240	CD9 antigen	Cd9	6.0
Q6PIC6	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	Atp1a3	5.5
P61226	Ras-related protein Rap-2b	Rap2b	5.0
P63101	14-3-3 protein zeta/delta	Ywhaz	5.0
Q8VDN2	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	Atp1a1	5.0
Q8K2Y3	Protein eva-1 homolog B	Eva1b	4.5
P29341	Polyadenylate-binding protein 1	Pabpc1	4.0
P17879	Heat shock 70 kDa protein 1B	Hspa1b	3.5
P19001	Keratin, type I cytoskeletal 19	Krt19	3.5
P41731	CD63 antigen	Cd63	3.5

<b>P62737</b>	Actin, aortic smooth muscle	Acta2	3.5
<b>Q9D8B3</b>	Charged multivesicular body protein 4b	Chmp4b	3.5
<b>P07356</b>	Annexin A2	Anxa2	3.0
<b>P10853</b>	Histone H2B type 1-F/J/L	Hist1h2bn	3.0
<b>P18572</b>	Basigin	Bsg	3.0
<b>P62874</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	Gnb1	3.0
<b>Q63961</b>	Endoglin	Eng	3.0
<b>Q9WVT6</b>	Carbonic anhydrase 14	Ca14	3.0
<b>P11370</b>	Retrovirus-related Env polyprotein from Fv-4 locus	Fv4	2.5
<b>P15379</b>	CD44 antigen	Cd44	2.5
<b>P18760</b>	Cofilin-1	Cfl1	2.5
<b>P26040</b>	Ezrin	Ezr	2.5
<b>P62960</b>	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	Ybx1	2.5
<b>P97370</b>	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	Atp1b3	2.5
<b>Q8R2Y2</b>	Cell surface glycoprotein MUC18	Mcam	2.5
<b>Q9QYJ0</b>	DnaJ homolog subfamily A member 2	Dnaja2	2.5
<b>O70456</b>	14-3-3 protein sigma	Sfn	2.0
<b>P08905</b>	Lysozyme C-2	Lyz2	2.0
<b>P11679</b>	Keratin, type II cytoskeletal 8	Krt8	2.0
<b>P17047</b>	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	Lamp2	2.0
<b>P51150</b>	Ras-related protein Rab-7a	Rab7a	2.0
<b>P62835</b>	Ras-related protein Rap-1A	Rap1a	2.0
<b>Q9WVE8</b>	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2	Pacsin2	2.0

**Tabla suplementaria 2. Proteínas detectadas en vesículas extracelulares provenientes de la línea celular B16F10(Mock)**

Uniprot accession	Nombre	Gen	Péptidos
P63017	Heat shock cognate 71 kDa protein	Hspa8	119.0
O08992	Syntenin-1	Sdcbp	53.0
Q05793	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	Hspg2	47.3
P11276	Fibronectin	Fn1	46.7
Q9WU78	Programmed cell death 6-interacting protein	Pdcd6ip	40.7
Q68FD5	Clathrin heavy chain 1	Cltc	27.3
P09055	Integrin beta-1	Itgb1	25.7
P17742	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	Ppia	25.3
P35762	CD81 antigen	Cd81	25.3
Q00651	Integrin alpha-4	Itga4	25.0
Q8R366	Immunoglobulin superfamily member 8	Igsf8	22.7
P29341	Polyadenylate-binding protein 1	Pabpc1	21.3
Q62419	Endophilin-A2	Sh3gl1	20.0
P10404	MLV-related proviral Env polyprotein	unassigned	19.7
P26041	Moesin	Msn	18.3
P63037	DnaJ homolog subfamily A member 1	Dnaja1	18.3
P17156	Heat shock-related 70 kDa protein 2	Hspa2	16.0
P16627	Heat shock 70 kDa protein 1-like	Hspa11	12.3
P18760	Cofilin-1	Cfl1	11.7
P21956	Lactadherin	Mfge8	11.7
Q6PIC6	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	Atp1a3	11.7
P10852	4F2 cell-surface antigen heavy chain	Slc3a2	11.3
Q61739	Integrin alpha-6	Itga6	11.3
P61226	Ras-related protein Rap-2b	Rap2b	11.0
P48036	Annexin A5	Anxa5	10.0
P17879	Heat shock 70 kDa protein 1B	Hspa1b	9.7
P63101	14-3-3 protein zeta/delta	Ywhaz	9.3
Q8VDN2	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	Atp1a1	8.7

<b>P11370</b>	Retrovirus-related Env polyprotein from Fv-4 locus	Fv4	8.3
<b>Q8R2Y2</b>	Cell surface glycoprotein MUC18	Mcam	8.0
<b>P15379</b>	CD44 antigen	Cd44	7.7
<b>Q63961</b>	Endoglin	Eng	7.7
<b>P62960</b>	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	Ybx1	7.3
<b>Q9WVE8</b>	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2	Pacsin2	7.0
<b>Q61187</b>	Tumor susceptibility gene 101 protein	TSG101	6.7
<b>Q9QYJ0</b>	DnaJ homolog subfamily A member 2	Dnaja2	6.7
<b>P10107</b>	Annexin A1	Anxa1	6.3
<b>P40240</b>	CD9 antigen	Cd9	6.0
<b>P62874</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	Gnb1	6.0
<b>Q9D8B3</b>	Charged multivesicular body protein 4b	Chmp4b	5.7
<b>P26040</b>	Ezrin	Ezr	5.3
<b>Q99PT1</b>	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Arhgdia	5.3
<b>P07901</b>	Heat shock protein HSP 90-alpha	Hsp90aa1	5.0
<b>P10853</b>	Histone H2B type 1-F/J/L	Hist1h2bn	5.0
<b>P62259</b>	14-3-3 protein epsilon	Ywhae	5.0
<b>P97370</b>	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	Atp1b3	5.0
<b>Q8K2Y3</b>	Protein eva-1 homolog B	Eva1b	5.0
<b>P49962</b>	Signal recognition particle 9 kDa protein	Srp9	4.7
<b>Q80W68</b>	Kin of IRRE-like protein 1	Kirrel1	4.7
<b>P05213</b>	Tubulin alpha-1B chain	Tuba1b	4.3
<b>P23249</b>	Putative helicase MOV-10	Mov10	4.3
<b>P51150</b>	Ras-related protein Rab-7a	Rab7a	4.3
<b>Q9WVT6</b>	Carbonic anhydrase 14	Ca14	4.3
<b>O08585</b>	Clathrin light chain A	Clta	4.0
<b>P07356</b>	Annexin A2	Anxa2	4.0
<b>P08752</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	Gnai2	4.0
<b>P35278</b>	Ras-related protein Rab-5C	Rab5c	4.0
<b>P41731</b>	CD63 antigen	Cd63	4.0
<b>P60766</b>	Cell division control protein 42 homolog	Cdc42	4.0
<b>Q8BT07</b>	Centrosomal protein of 55 kDa	Cep55	4.0
<b>P35700</b>	Peroxiredoxin-1	Prdx1	3.7

<b>Q3UH60</b>	Disco-interacting protein 2 homolog B	Dip2b	3.7
<b>Q61072</b>	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 9	Adam9	3.7
<b>Q8K2Q7</b>	BRO1 domain-containing protein BROX	Brox	3.7
<b>Q99L47</b>	Hsc70-interacting protein	St13	3.7
<b>Q9JLQ0</b>	CD2-associated protein	Cd2ap	3.7
<b>Q9QYI3</b>	DnaJ homolog subfamily C member 7	Dnajc7	3.7
<b>O54962</b>	Barrier-to-autointegration factor	Banf1	3.3
<b>P46638</b>	Ras-related protein Rab-11B	Rab11b	3.3
<b>P62242</b>	40S ribosomal protein S8	Rps8	3.3
<b>Q04447</b>	Creatine kinase B-type	Ckb	3.3
<b>Q810U5</b>	Coiled-coil domain-containing protein 50	Ccdc50	3.3
<b>Q9CX00</b>	IST1 homolog	Ist1	3.3
<b>Q9DBJ1</b>	Phosphoglycerate mutase 1	Pgam1	3.3
<b>Q9QUP5</b>	Hyaluronan and proteoglycan link protein 1	Hapln1	3.3
<b>O35682</b>	Myeloid-associated differentiation marker	Myadm	3.0
<b>P09411</b>	Phosphoglycerate kinase 1	Pgk1	3.0
<b>P19157</b>	Glutathione S-transferase P 1	Gstp1	3.0
<b>P26043</b>	Radixin	Rdx	3.0
<b>P29812</b>	L-dopachrome tautomerase	Dct	3.0
<b>Q61599</b>	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	Arhgdib	3.0
<b>O89086</b>	RNA-binding protein 3	Rbm3	2.7
<b>P26645</b>	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	Marcks	2.7
<b>Q09143</b>	High affinity cationic amino acid transporter 1	Slc7a1	2.7
<b>Q61598</b>	Rab GDP dissociation inhibitor beta	Gdi2	2.7
<b>Q62351</b>	Transferrin receptor protein 1	Tfrc	2.7
<b>Q62465</b>	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	Vat1	2.7
<b>Q8R0J7</b>	Vacuolar protein sorting-associated protein 37B	Vps37b	2.7
<b>Q9EQP2</b>	EH domain-containing protein 4	Ehd4	2.7
<b>Q9JKB3</b>	Y-box-binding protein 3	Ybx3	2.7
<b>Q9QZI9</b>	Serine incorporator 3	Serinc3	2.7
<b>B2RSH2</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1	Gnai1	2.3
<b>O35566</b>	CD151 antigen	Cd151	2.3
<b>P12815</b>	Programmed cell death protein 6	Pdcd6	2.3

<b>P17047</b>	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	Lamp2	2.3
<b>P18572</b>	Basigin	Bsg	2.3
<b>P43406</b>	Integrin alpha-V	Itgav	2.3
<b>P46467</b>	Vacuolar protein sorting-associated protein 4B	Vps4b	2.3
<b>P60764</b>	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3	Rac3	2.3
<b>P61982</b>	14-3-3 protein gamma	Ywhag	2.3
<b>Q61990</b>	Poly(rC)-binding protein 2	Pcbp2	2.3
<b>Q64337</b>	Sequestosome-1	Sqstm1	2.3
<b>Q6R0H7</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas	Gnas	2.3
<b>Q78HU3</b>	Multivesicular body subunit 12A	Mvb12a	2.3
<b>Q9D7S9</b>	Charged multivesicular body protein 5	Chmp5	2.3
<b>Q9D8E6</b>	60S ribosomal protein L4	Rpl4	2.3
<b>Q9JIZ9</b>	Phospholipid scramblase 3	Plscr3	2.3
<b>E9Q557</b>	Desmoplakin	Dsp	2.0
<b>P08228</b>	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	Sod1	2.0
<b>P14824</b>	Annexin A6	Anxa6	2.0
<b>P17751</b>	Triosephosphate isomerase	Tpi1	2.0
<b>P29387</b>	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4	Gnb4	2.0
<b>P61205</b>	ADP-ribosylation factor 3	Arf3	2.0
<b>P62835</b>	Ras-related protein Rap-1A	Rap1a	2.0
<b>P68254</b>	14-3-3 protein theta	Ywhaq	2.0
<b>P97429</b>	Annexin A4	Anxa4	2.0
<b>P99024</b>	Tubulin beta-5 chain	Tubb5	2.0
<b>Q60605</b>	Myosin light polypeptide 6	Myl6	2.0
<b>Q8R550</b>	SH3 domain-containing kinase-binding protein 1	Sh3kbp1	2.0
<b>Q99JB8</b>	Protein kinase C and casein kinase II substrate protein 3	Pacsin3	2.0
<b>Q99JR5</b>	Tubulointerstitial nephritis antigen-like	Tinag11	2.0
<b>Q9DC51</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha	Gnai3	2.0
<b>Q9QXY6</b>	EH domain-containing protein 3	Ehd3	2.0
<b>Q9WVM1</b>	Rac GTPase-activating protein 1	Racgap1	2.0



**Tabla suplementaria 3. Proteínas detectadas en vesículas extracelulares provenientes de la línea celular B16F10(CAV1)**

Uniprot accession	Nombre	Gen	Peptidos
P63017	Heat shock cognate 71 kDa protein	Hspa8	199.3
Q05793	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	Hspg2	100.7
O08992	Syntenin-1	Sdcbp	99.3
Q9WU78	Programmed cell death 6-interacting protein	Pdcd6ip	84.3
P11276	Fibronectin	Fn1	61.3
P35762	CD81 antigen	Cd81	51.7
P63037	DnaJ homolog subfamily A member 1	Dnaja1	42.7
Q68FD5	Clathrin heavy chain 1	Cltc	40.3
P17742	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	Ppia	33.3
P26041	Moesin	Msn	30.7
Q00651	Integrin alpha-4	Itga4	28.7
P09055	Integrin beta-1	Itgb1	28.0
Q8R366	Immunoglobulin superfamily member 8	Igsf8	27.0
Q62419	Endophilin-A2	Sh3gl1	25.3
Q8R2Y2	Cell surface glycoprotein MUC18	Mcam	23.3
P10404	MLV-related proviral Env polyprotein	unassigned	22.3
P17156	Heat shock-related 70 kDa protein 2	Hspa2	22.3
P16627	Heat shock 70 kDa protein 1-like	Hspa11	22.0
P17879	Heat shock 70 kDa protein 1B	Hspa1b	22.0
P21956	Lactadherin	Mfge8	22.0
P29341	Polyadenylate-binding protein 1	Pabpc1	21.7
Q9QYJ0	DnaJ homolog subfamily A member 2	Dnaja2	20.3
P48036	Annexin A5	Anxa5	19.7
Q8VDN2	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	Atp1a1	19.3
P61226	Ras-related protein Rap-2b	Rap2b	18.3
P10852	4F2 cell-surface antigen heavy chain	Slc3a2	18.0
P10853	Histone H2B type 1-F/J/L	Hist1h2bn	18.0
Q6PIC6	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	Atp1a3	17.7

<b>Q61739</b>	Integrin alpha-6	Itga6	16.7
<b>Q3UH60</b>	Disco-interacting protein 2 homolog B	Dip2b	16.3
<b>Q63961</b>	Endoglin	Eng	16.3
<b>P63101</b>	14-3-3 protein zeta/delta	Ywhaz	15.0
<b>P40240</b>	CD9 antigen	Cd9	14.7
<b>P18760</b>	Cofilin-1	Cfl1	14.0
<b>P23249</b>	Putative helicase MOV-10	Mov10	12.7
<b>Q61187</b>	Tumor susceptibility gene 101 protein	TSG101	12.7
<b>B2RXS4</b>	Plexin-B2	Plxnb2	12.3
<b>P08752</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	Gnai2	12.3
<b>P29812</b>	L-dopachrome tautomerase	Dct	12.3
<b>P07356</b>	Annexin A2	Anxa2	12.0
<b>P62874</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	Gnb1	12.0
<b>Q80W68</b>	Kin of IRRE-like protein 1	Kirrel1	11.7
<b>P62259</b>	14-3-3 protein epsilon	Ywhae	11.3
<b>P07901</b>	Heat shock protein HSP 90-alpha	Hsp90aa1	11.0
<b>P41731</b>	CD63 antigen	Cd63	10.3
<b>P43406</b>	Integrin alpha-V	Itgav	10.3
<b>P62960</b>	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	Ybx1	10.3
<b>Q62351</b>	Transferrin receptor protein 1	Tfrc	10.0
<b>Q9QYI3</b>	DnaJ homolog subfamily C member 7	Dnajc7	10.0
<b>P10107</b>	Annexin A1	Anxa1	9.7
<b>P26040</b>	Ezrin	Ezr	9.3
<b>Q8K2Y3</b>	Protein eva-1 homolog B	Eva1b	9.3
<b>P15379</b>	CD44 antigen	Cd44	9.0
<b>P97370</b>	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	Atp1b3	9.0
<b>Q99L47</b>	Hsc70-interacting protein	St13	8.7
<b>P61982</b>	14-3-3 protein gamma	Ywhag	8.3
<b>P35700</b>	Peroxiredoxin-1	Prdx1	7.7
<b>P51150</b>	Ras-related protein Rab-7a	Rab7a	7.7
<b>Q60696</b>	Melanocyte protein PMEL	Pmel	7.7
<b>Q9JIZ9</b>	Phospholipid scramblase 3	Plscr3	7.7
<b>Q9WVT6</b>	Carbonic anhydrase 14	Ca14	7.7

<b>P62242</b>	40S ribosomal protein S8	Rps8	7.3
<b>Q9D8E6</b>	60S ribosomal protein L4	Rpl4	7.3
<b>Q9WVE8</b>	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2	Paccin2	7.3
<b>P11370</b>	Retrovirus-related Env polyprotein from Fv-4 locus	Fv4	7.0
<b>P17751</b>	Triosephosphate isomerase	Tpi1	7.0
<b>P26645</b>	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	Marcks	7.0
<b>Q64337</b>	Sequestosome-1	Sqstm1	7.0
<b>Q8CFE6</b>	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2	Slc38a2	7.0
<b>E9Q557</b>	Desmoplakin	Dsp	6.7
<b>P09411</b>	Phosphoglycerate kinase 1	Pgk1	6.7
<b>P60766</b>	Cell division control protein 42 homolog	Cdc42	6.7
<b>Q61072</b>	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 9	Adam9	6.7
<b>Q62465</b>	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	Vat1	6.7
<b>Q8CI32</b>	BAG family molecular chaperone regulator 5	Bag5	6.7
<b>Q9JKB3</b>	Y-box-binding protein 3	Ybx3	6.7
<b>Q9QZI9</b>	Serine incorporator 3	Serinc3	6.7
<b>Q9WTI7</b>	Unconventional myosin-Ic	Myo1c	6.7
<b>P35278</b>	Ras-related protein Rab-5C	Rab5c	6.3
<b>P49817</b>	Caveolin-1	Cav1	6.3
<b>Q8R0J7</b>	Vacuolar protein sorting-associated protein 37B	Vps37b	6.3
<b>Q9DC51</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha	Gnai3	6.3
<b>Q9JLQ0</b>	CD2-associated protein	Cd2ap	6.3
<b>O35682</b>	Myeloid-associated differentiation marker	Myadm	6.0
<b>P14824</b>	Annexin A6	Anxa6	6.0
<b>P17047</b>	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	Lamp2	6.0
<b>P18572</b>	Basigin	Bsg	6.0
<b>Q8K2Q7</b>	BRO1 domain-containing protein BROX	Brox	6.0
<b>O09044</b>	Synaptosomal-associated protein 23	Snap23	5.7
<b>P46467</b>	Vacuolar protein sorting-associated protein 4B	Vps4b	5.7
<b>Q8BT07</b>	Centrosomal protein of 55 kDa	Cep55	5.7
<b>Q9D8B3</b>	Charged multivesicular body protein 4b	Chmp4b	5.7
<b>Q9WVL3</b>	Solute carrier family 12 member 7	Slc12a7	5.7
<b>P61205</b>	ADP-ribosylation factor 3	Arf3	5.3

<b>P62835</b>	Ras-related protein Rap-1A	Rap1a	5.3
<b>Q61937</b>	Nucleophosmin	Npm1	5.3
<b>P05213</b>	Tubulin alpha-1B chain	Tuba1b	5.0
<b>P11438</b>	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	Lamp1	5.0
<b>P11688</b>	Integrin alpha-5	Itga5	5.0
<b>P26043</b>	Radixin	Rdx	5.0
<b>P28667</b>	MARCKS-related protein	Marcks11	5.0
<b>P68254</b>	14-3-3 protein theta	Ywhaq	5.0
<b>P97351</b>	40S ribosomal protein S3a	Rps3a	5.0
<b>Q05816</b>	Fatty acid-binding protein 5	Fabp5	5.0
<b>Q09143</b>	High affinity cationic amino acid transporter 1	Slc7a1	5.0
<b>Q61598</b>	Rab GDP dissociation inhibitor beta	Gdi2	5.0
<b>Q99JR5</b>	Tubulointerstitial nephritis antigen-like	Tinag11	5.0
<b>Q9DCK3</b>	Tetraspanin-4	Tspan4	5.0
<b>B2RSH2</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1	Gnai1	4.7
<b>P02301</b>	Histone H3.3C	H3f3c	4.7
<b>P53986</b>	Monocarboxylate transporter 1	Slc16a1	4.7
<b>Q99PT1</b>	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Arhgdia	4.7
<b>O35566</b>	CD151 antigen	Cd151	4.3
<b>O35874</b>	Neutral amino acid transporter A	Slc1a4	4.3
<b>O54890</b>	Integrin beta-3	Itgb3	4.3
<b>P29319</b>	Ephrin type-A receptor 3	Epha3	4.3
<b>P35802</b>	Neuronal membrane glycoprotein M6-a	Gpm6a	4.3
<b>P62880</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	Gnb2	4.3
<b>P70206</b>	Plexin-A1	Plxna1	4.3
<b>Q04447</b>	Creatine kinase B-type	Ckb	4.3
<b>Q61599</b>	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	Arhgdib	4.3
<b>Q9CQW9</b>	Interferon-induced transmembrane protein 3	Ifitm3	4.3
<b>Q9D7S9</b>	Charged multivesicular body protein 5	Chmp5	4.3
<b>Q9DBJ1</b>	Phosphoglycerate mutase 1	Pgam1	4.3
<b>G5E829</b>	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	Atp2b1	4.0
<b>O35598</b>	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	Adam10	4.0
<b>P08228</b>	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	Sod1	4.0

<b>P11344</b>	Tyrosinase	Tyr	4.0
<b>P31786</b>	Acyl-CoA-binding protein	Dbi	4.0
<b>P42669</b>	Transcriptional activator protein Pur-alpha	Pura	4.0
<b>P58252</b>	Elongation factor 2	Eef2	4.0
<b>P63028</b>	Translationally-controlled tumor protein	Tpt1	4.0
<b>P97429</b>	Annexin A4	Anxa4	4.0
<b>Q8JZZ7</b>	Adhesion G protein-coupled receptor L2	Adgrl2	4.0
<b>Q99JB8</b>	Protein kinase C and casein kinase II substrate protein 3	Pacsin3	4.0
<b>Q9D1C8</b>	Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog	Vps28	4.0
<b>Q9DAS9</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12	Gng12	4.0
<b>Q9WVM1</b>	Rac GTPase-activating protein 1	Racgap1	4.0
<b>F8VQB6</b>	Unconventional myosin-X	Myo10	3.7
<b>O70309</b>	Integrin beta-5	Itgb5	3.7
<b>P24668</b>	Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor	M6pr	3.7
<b>P55258</b>	Ras-related protein Rab-8A	Rab8a	3.7
<b>P57722</b>	Poly(rC)-binding protein 3	Pcbp3	3.7
<b>P68510</b>	14-3-3 protein eta	Ywhah	3.7
<b>P99024</b>	Tubulin beta-5 chain	Tubb5	3.7
<b>Q61990</b>	Poly(rC)-binding protein 2	Pcbp2	3.7
<b>Q6KAU4</b>	Multivesicular body subunit 12B	Mvb12b	3.7
<b>Q9DB34</b>	Charged multivesicular body protein 2a	Chmp2a	3.7
<b>Q9EQP2</b>	EH domain-containing protein 4	Ehd4	3.7
<b>P12815</b>	Programmed cell death protein 6	Pdcd6	3.3
<b>P60764</b>	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3	Rac3	3.3
<b>P62702</b>	40S ribosomal protein S4, X isoform	Rps4x	3.3
<b>Q61490</b>	CD166 antigen	Alcam	3.3
<b>Q6R0H7</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas	Gnas	3.3
<b>Q9Z127</b>	Large neutral amino acids transporter small subunit 1	Slc7a5	3.3
<b>O70456</b>	14-3-3 protein sigma	Sfn	3.0
<b>O89086</b>	RNA-binding protein 3	Rbm3	3.0
<b>P21995</b>	Embigin	Emb	3.0

<b>P27661</b>	Histone H2AX	H2afx	3.0
<b>P46638</b>	Ras-related protein Rab-11B	Rab11b	3.0
<b>P49962</b>	Signal recognition particle 9 kDa protein	Srp9	3.0
<b>P62331</b>	ADP-ribosylation factor 6	Arf6	3.0
<b>P62821</b>	Ras-related protein Rab-1A	Rab1A	3.0
<b>P63321</b>	Ras-related protein Ral-A	Rala	3.0
<b>Q02257</b>	Junction plakoglobin	Jup	3.0
<b>Q61090</b>	Frizzled-7	Fzd7	3.0
<b>Q78HU3</b>	Multivesicular body subunit 12A	Mvb12a	3.0
<b>Q99J93</b>	Interferon-induced transmembrane protein 2	Ifitm2	3.0
<b>Q9QUI0</b>	Transforming protein RhoA	Rhoa	3.0
<b>Q9QXY6</b>	EH domain-containing protein 3	Ehd3	3.0
<b>Q9QZC7</b>	Pleckstrin homology domain-containing family B member 2	Plekhb2	3.0
<b>O35316</b>	Sodium- and chloride-dependent taurine transporter	Slc6a6	2.7
<b>O54962</b>	Barrier-to-autointegration factor	Banf1	2.7
<b>O70318</b>	Band 4.1-like protein 2	Epb41l2	2.7
<b>P19157</b>	Glutathione S-transferase P 1	Gstp1	2.7
<b>P35980</b>	60S ribosomal protein L18	Rpl18	2.7
<b>P47962</b>	60S ribosomal protein L5	Rpl5	2.7
<b>P57716</b>	Nicastrin	Nestn	2.7
<b>P97384</b>	Annexin A11	Anxa11	2.7
<b>Q6P5F7</b>	Protein tweety homolog 3	Ttyh3	2.7
<b>Q6PHN9</b>	Ras-related protein Rab-35	Rab35	2.7
<b>Q6ZQA6</b>	Immunoglobulin superfamily member 3	Igsf3	2.7
<b>Q99JI6</b>	Ras-related protein Rap-1b	Rap1b	2.7
<b>Q99JY9</b>	Actin-related protein 3	Actr3	2.7
<b>Q9CR57</b>	60S ribosomal protein L14	Rpl14	2.7
<b>Q9CZM2</b>	60S ribosomal protein L15	Rpl15	2.7
<b>Q9JJ00</b>	Phospholipid scramblase 1	Plscr1	2.7
<b>F8VPU2</b>	FERM, ARHGEF and pleckstrin domain-containing protein 1	Farp1	2.3
<b>O88342</b>	WD repeat-containing protein 1	Wdr1	2.3
<b>P16254</b>	Signal recognition particle 14 kDa protein	Srp14	2.3
<b>P28229</b>	Gap junction gamma-1 protein	Gjc1	2.3

<b>P30412</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	Ppic	2.3
<b>P62717</b>	60S ribosomal protein L18a	Rpl18a	2.3
<b>P62746</b>	Rho-related GTP-binding protein RhoB	Rhob	2.3
<b>Q01853</b>	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	Vcp	2.3
<b>Q62159</b>	Rho-related GTP-binding protein RhoC	Rhoc	2.3
<b>Q6P1B3</b>	PILR alpha-associated neural protein	Pianp	2.3
<b>Q810U5</b>	Coiled-coil domain-containing protein 50	Ccdc50	2.3
<b>Q8BJU2</b>	Tetraspanin-9	Tspan9	2.3
<b>Q8R550</b>	SH3 domain-containing kinase-binding protein 1	Sh3kbp1	2.3
<b>Q9CPR4</b>	60S ribosomal protein L17	Rpl17	2.3
<b>Q9CX00</b>	IST1 homolog	Ist1	2.3
<b>Q9QWL7</b>	Keratin, type I cytoskeletal 17	Krt17	2.3
<b>O35295</b>	Transcriptional activator protein Pur-beta	Purb	2.0
<b>P11679</b>	Keratin, type II cytoskeletal 8	Krt8	2.0
<b>P16045</b>	Galectin-1	Lgals1	2.0
<b>P16381</b>	Putative ATP-dependent RNA helicase P110	D1Pas1	2.0
<b>P28656</b>	Nucleosome assembly protein 1-like 1	Nap111	2.0
<b>P47911</b>	60S ribosomal protein L6	Rpl6	2.0
<b>P47963</b>	60S ribosomal protein L13	Rpl13	2.0
<b>P60335</b>	Poly(rC)-binding protein 1	Pcbp1	2.0
<b>P61021</b>	Ras-related protein Rab-5B	Rab5b	2.0
<b>P61079</b>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D3	Ube2d3	2.0
<b>P62737</b>	Actin, aortic smooth muscle	Acta2	2.0
<b>P63001</b>	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	Rac1	2.0
<b>P63242</b>	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	Eif5a	2.0
<b>P86048</b>	60S ribosomal protein L10-like	Rpl10l	2.0
<b>Q60932</b>	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	Vdac1	2.0
<b>Q64735</b>	Complement component receptor 1-like protein	Cr11	2.0
<b>Q80ZJ1</b>	Ras-related protein Rap-2a	Rap2a	2.0
<b>Q8QZZ8</b>	Ras-related protein Rab-38	Rab38	2.0
<b>Q8R5M8</b>	Cell adhesion molecule 1	Cadm1	2.0
<b>Q9CZR2</b>	N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase 2	Naalad2	2.0
<b>Q9DCT8</b>	Cysteine-rich protein 2	Crip2	2.0



**Proteínas detectadas en vesículas provenientes de la línea celular B16F10(CAV1/Y14F).**

<b>Uniprot accession</b>	<b>Nombre</b>	<b>Gen</b>	<b>Péptidos</b>
<b>P63017</b>	Heat shock cognate 71 kDa protein	Hspa8	172.3
<b>O08992</b>	Syntenin-1	Sdcbp	97.0
<b>Q05793</b>	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	Hspg2	97.0
<b>Q9WU78</b>	Programmed cell death 6-interacting protein	Pdcd6ip	92.3
<b>P11276</b>	Fibronectin	Fn1	61.7
<b>P35762</b>	CD81 antigen	Cd81	39.3
<b>Q00651</b>	Integrin alpha-4	Itga4	34.3
<b>P17742</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	Ppia	33.0
<b>Q68FD5</b>	Clathrin heavy chain 1	Cltc	33.0
<b>P26041</b>	Moesin	Msn	32.7
<b>P63037</b>	DnaJ homolog subfamily A member 1	Dnaja1	30.0
<b>P09055</b>	Integrin beta-1	Itgb1	29.3
<b>P21956</b>	Lactadherin	Mfge8	28.7
<b>Q8R366</b>	Immunoglobulin superfamily member 8	Igsf8	28.7
<b>Q62419</b>	Endophilin-A2	Sh3gl1	24.3
<b>P29341</b>	Polyadenylate-binding protein 1	Pabpc1	21.0
<b>P48036</b>	Annexin A5	Anxa5	20.3
<b>P10404</b>	MLV-related proviral Env polyprotein	unassigned	20.0
<b>P17156</b>	Heat shock-related 70 kDa protein 2	Hspa2	18.0
<b>Q8VDN2</b>	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	Atp1a1	17.7
<b>Q6PIC6</b>	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	Atp1a3	17.0
<b>Q8R2Y2</b>	Cell surface glycoprotein MUC18	Mcam	17.0
<b>Q9QYJ0</b>	DnaJ homolog subfamily A member 2	Dnaja2	16.7
<b>P61226</b>	Ras-related protein Rap-2b	Rap2b	16.0
<b>P10853</b>	Histone H2B type 1-F/J/L	Hist1h2bn	15.7
<b>P16627</b>	Heat shock 70 kDa protein 1-like	Hspa11	15.7
<b>P10852</b>	4F2 cell-surface antigen heavy chain	Slc3a2	14.7
<b>P18760</b>	Cofilin-1	Cfl1	14.0

<b>P63101</b>	14-3-3 protein zeta/delta	Ywhaz	14.0
<b>Q3UH60</b>	Disco-interacting protein 2 homolog B	Dip2b	14.0
<b>P29812</b>	L-dopachrome tautomerase	Dct	13.0
<b>P62259</b>	14-3-3 protein epsilon	Ywhae	12.3
<b>P41731</b>	CD63 antigen	Cd63	12.0
<b>P17751</b>	Triosephosphate isomerase	Tpi1	11.7
<b>Q61739</b>	Integrin alpha-6	Itga6	11.7
<b>P17879</b>	Heat shock 70 kDa protein 1B	Hspa1b	11.0
<b>P26040</b>	Ezrin	Ezr	11.0
<b>Q99JR5</b>	Tubulointerstitial nephritis antigen-like	Tinagl1	11.0
<b>Q6ZQA6</b>	Immunoglobulin superfamily member 3	Igsf3	10.7
<b>P10107</b>	Annexin A1	Anxa1	10.3
<b>P08752</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	Gnai2	10.0
<b>P62874</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	Gnb1	10.0
<b>Q62351</b>	Transferrin receptor protein 1	Tfrc	10.0
<b>Q61187</b>	Tumor susceptibility gene 101 protein	TSG101	9.7
<b>Q63961</b>	Endoglin	Eng	9.7
<b>P09411</b>	Phosphoglycerate kinase 1	Pgk1	9.3
<b>P51150</b>	Ras-related protein Rab-7a	Rab7a	9.3
<b>Q9QYI3</b>	DnaJ homolog subfamily C member 7	Dnajc7	9.3
<b>Q80W68</b>	Kin of IRRE-like protein 1	Kirrel1	9.0
<b>Q8K2Y3</b>	Protein eva-1 homolog B	Eva1b	9.0
<b>P15379</b>	CD44 antigen	Cd44	8.7
<b>Q9WVE8</b>	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2	Pacsin2	8.7
<b>B2RXS4</b>	Plexin-B2	Plxnb2	8.3
<b>P07356</b>	Annexin A2	Anxa2	8.3
<b>P23249</b>	Putative helicase MOV-10	Mov10	8.0
<b>Q9WVT6</b>	Carbonic anhydrase 14	Ca14	8.0
<b>P07901</b>	Heat shock protein HSP 90-alpha	Hsp90aa1	7.3
<b>P40240</b>	CD9 antigen	Cd9	7.3
<b>Q8JZZ7</b>	Adhesion G protein-coupled receptor L2	Adgrl2	7.3
<b>Q9JLQ0</b>	CD2-associated protein	Cd2ap	7.3

<b>E9Q5G3</b>	Kinesin-like protein KIF23	Kif23	7.0
<b>P62960</b>	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	Ybx1	7.0
<b>Q9D8E6</b>	60S ribosomal protein L4	Rpl4	7.0
<b>P05213</b>	Tubulin alpha-1B chain	Tuba1b	6.7
<b>P62835</b>	Ras-related protein Rap-1A	Rap1a	6.7
<b>Q04447</b>	Creatine kinase B-type	Ckb	6.7
<b>Q8R0J7</b>	Vacuolar protein sorting-associated protein 37B	Vps37b	6.7
<b>Q99L47</b>	Hsc70-interacting protein	St13	6.7
<b>Q9D8B3</b>	Charged multivesicular body protein 4b	Chmp4b	6.7
<b>Q9WVM1</b>	Rac GTPase-activating protein 1	Racgap1	6.7
<b>B2RSH2</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1	Gnai1	6.3
<b>P14824</b>	Annexin A6	Anxa6	6.3
<b>P97370</b>	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	Atp1b3	6.3
<b>P11370</b>	Retrovirus-related Env polyprotein from Fv-4 locus	Fv4	5.7
<b>P18572</b>	Basigin	Bsg	5.7
<b>P26645</b>	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	Marcks	5.7
<b>P60766</b>	Cell division control protein 42 homolog	Cdc42	5.7
<b>P19157</b>	Glutathione S-transferase P 1	Gstp1	5.3
<b>P35278</b>	Ras-related protein Rab-5C	Rab5c	5.3
<b>P35700</b>	Peroxiredoxin-1	Prdx1	5.3
<b>P62242</b>	40S ribosomal protein S8	Rps8	5.3
<b>Q8CFE6</b>	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2	Slc38a2	5.3
<b>Q9DCK3</b>	Tetraspanin-4	Tspan4	5.3
<b>O35598</b>	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	Adam10	5.0
<b>O35682</b>	Myeloid-associated differentiation marker	Myadm	5.0
<b>P12815</b>	Programmed cell death protein 6	Pdcd6	5.0
<b>P61982</b>	14-3-3 protein gamma	Ywhag	5.0
<b>P62821</b>	Ras-related protein Rab-1A	Rab1A	5.0
<b>P99024</b>	Tubulin beta-5 chain	Tubb5	5.0
<b>Q8BT07</b>	Centrosomal protein of 55 kDa	Cep55	5.0
<b>Q8CI32</b>	BAG family molecular chaperone regulator 5	Bag5	5.0
<b>Q9CX00</b>	IST1 homolog	Ist1	5.0
<b>Q9DC51</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha	Gnai3	5.0

<b>P02301</b>	Histone H3.3C	H3f3c	4.7
<b>P46467</b>	Vacuolar protein sorting-associated protein 4B	Vps4b	4.7
<b>P61205</b>	ADP-ribosylation factor 3	Arf3	4.7
<b>Q61937</b>	Nucleophosmin	Npm1	4.7
<b>Q810U5</b>	Coiled-coil domain-containing protein 50	Ccdc50	4.7
<b>Q9JIZ9</b>	Phospholipid scramblase 3	Plscr3	4.7
<b>E9Q557</b>	Desmoplakin	Dsp	4.3
<b>P17047</b>	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	Lamp2	4.3
<b>P26043</b>	Radixin	Rdx	4.3
<b>Q09143</b>	High affinity cationic amino acid transporter 1	Slc7a1	4.3
<b>Q61072</b>	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 9	Adam9	4.3
<b>Q61598</b>	Rab GDP dissociation inhibitor beta	Gdi2	4.3
<b>Q9QZC7</b>	Pleckstrin homology domain-containing family B member 2	Plekhb2	4.3
<b>O08585</b>	Clathrin light chain A	Clta	4.0
<b>O88792</b>	Junctional adhesion molecule A	F11r	4.0
<b>P29319</b>	Ephrin type-A receptor 3	Epha3	4.0
<b>P42669</b>	Transcriptional activator protein Pur-alpha	Pura	4.0
<b>P46638</b>	Ras-related protein Rab-11B	Rab11b	4.0
<b>P53986</b>	Monocarboxylate transporter 1	Slc16a1	4.0
<b>P58252</b>	Elongation factor 2	Eef2	4.0
<b>P62880</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	Gnb2	4.0
<b>P63028</b>	Translationally-controlled tumor protein	Tpt1	4.0
<b>P63321</b>	Ras-related protein Ral-A	Rala	4.0
<b>P68254</b>	14-3-3 protein theta	Ywhaq	4.0
<b>Q9CQW9</b>	Interferon-induced transmembrane protein 3	Ifitm3	4.0
<b>Q9EQP2</b>	EH domain-containing protein 4	Ehd4	4.0
<b>P08228</b>	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	Sod1	3.7
<b>P28229</b>	Gap junction gamma-1 protein	Gjc1	3.7
<b>P68510</b>	14-3-3 protein eta	Ywhah	3.7
<b>P97384</b>	Annexin A11	Anxa11	3.7
<b>Q05816</b>	Fatty acid-binding protein 5	Fabp5	3.7
<b>Q8BJU2</b>	Tetraspanin-9	Tspan9	3.7

<b>Q99J93</b>	Interferon-induced transmembrane protein 2	Ifitm2	3.7
<b>Q99PT1</b>	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Arhgdia	3.7
<b>Q9D7S9</b>	Charged multivesicular body protein 5	Chmp5	3.7
<b>Q9WVL3</b>	Solute carrier family 12 member 7	Slc12a7	3.7
<b>O54962</b>	Barrier-to-autointegration factor	Banf1	3.3
<b>P47963</b>	60S ribosomal protein L13	Rpl13	3.3
<b>P49817</b>	Caveolin-1	Cav1	3.3
<b>P57722</b>	Poly(rC)-binding protein 3	Pcbp3	3.3
<b>P62331</b>	ADP-ribosylation factor 6	Arf6	3.3
<b>Q60696</b>	Melanocyte protein PMEL	Pmel	3.3
<b>Q61090</b>	Frizzled-7	Fzd7	3.3
<b>Q62465</b>	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	Vat1	3.3
<b>Q64337</b>	Sequestosome-1	Sqstm1	3.3
<b>Q6R0H7</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas	Gnas	3.3
<b>Q9D1C8</b>	Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog	Vps28	3.3
<b>Q9DB34</b>	Charged multivesicular body protein 2a	Chmp2a	3.3
<b>Q9DBJ1</b>	Phosphoglycerate mutase 1	Pgam1	3.3
<b>O35375</b>	Neuropilin-2	Nrp2	3.0
<b>O70401</b>	Tetraspanin-6	Tspan6	3.0
<b>P10639</b>	Thioredoxin	Txn	3.0
<b>P11438</b>	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	Lamp1	3.0
<b>P45591</b>	Cofilin-2	Cfl2	3.0
<b>P57716</b>	Nicastrin	Ncstn	3.0
<b>P62737</b>	Actin, aortic smooth muscle	Acta2	3.0
<b>Q3UDW8</b>	Heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase	Hgsnat	3.0
<b>Q78HU3</b>	Multivesicular body subunit 12A	Mvb12a	3.0
<b>Q99JB8</b>	Protein kinase C and casein kinase II substrate protein 3	Pacsin3	3.0
<b>O35474</b>	EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3	Edil3	2.7
<b>O35566</b>	CD151 antigen	Cd151	2.7
<b>P06745</b>	Glucose-6-phosphate isomerase	Gpi	2.7
<b>P09041</b>	Phosphoglycerate kinase 2	Pgk2	2.7
<b>P24668</b>	Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor	M6pr	2.7

<b>P43406</b>	Integrin alpha-V	Itgav	2.7
<b>P53026</b>	60S ribosomal protein L10a	Rpl10a	2.7
<b>P60764</b>	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3	Rac3	2.7
<b>P63001</b>	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	Rac1	2.7
<b>P97429</b>	Annexin A4	Anxa4	2.7
<b>P97797</b>	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type substrate 1	Sirpa	2.7
<b>Q9CQI6</b>	Coactosin-like protein	Cotl1	2.7
<b>Q9CR26</b>	Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog	Vta1	2.7
<b>Q9CR57</b>	60S ribosomal protein L14	Rpl14	2.7
<b>Q9Z127</b>	Large neutral amino acids transporter small subunit 1	Slc7a5	2.7
<b>F8VPU2</b>	FERM, ARHGEF and pleckstrin domain-containing protein 1	Farp1	2.3
<b>O35874</b>	Neutral amino acid transporter A	Slc1a4	2.3
<b>O70318</b>	Band 4.1-like protein 2	Epb41l2	2.3
<b>O88342</b>	WD repeat-containing protein 1	Wdr1	2.3
<b>P05064</b>	Fructose-bisphosphate aldolase A	Aldoa	2.3
<b>P29387</b>	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4	Gnb4	2.3
<b>P31786</b>	Acyl-CoA-binding protein	Dbi	2.3
<b>P47911</b>	60S ribosomal protein L6	Rpl6	2.3
<b>P49962</b>	Signal recognition particle 9 kDa protein	Srp9	2.3
<b>P55258</b>	Ras-related protein Rab-8A	Rab8a	2.3
<b>Q61599</b>	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	Arhgdib	2.3
<b>Q61990</b>	Poly(rC)-binding protein 2	Pcbp2	2.3
<b>Q62159</b>	Rho-related GTP-binding protein RhoC	Rhoc	2.3
<b>Q6KAU4</b>	Multivesicular body subunit 12B	Mvb12b	2.3
<b>Q6P5F7</b>	Protein tweety homolog 3	Ttyh3	2.3
<b>Q8R1B4</b>	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	Eif3c	2.3
<b>Q99JI6</b>	Ras-related protein Rap-1b	Rap1b	2.3
<b>Q9CZM2</b>	60S ribosomal protein L15	Rpl15	2.3
<b>Q9DCT8</b>	Cysteine-rich protein 2	Crip2	2.3
<b>Q9JKB3</b>	Y-box-binding protein 3	Ybx3	2.3
<b>Q9QZI9</b>	Serine incorporator 3	Serinc3	2.3
<b>Q9WTI7</b>	Unconventional myosin-Ic	Myo1c	2.3
<b>Q9Z1Q5</b>	Chloride intracellular channel protein 1	Clic1	2.3

<b>O54890</b>	Integrin beta-3	Itgb3	2.0
<b>O70250</b>	Phosphoglycerate mutase 2	Pgam2	2.0
<b>O89086</b>	RNA-binding protein 3	Rbm3	2.0
<b>P11688</b>	Integrin alpha-5	Itga5	2.0
<b>P28656</b>	Nucleosome assembly protein 1-like 1	Nap111	2.0
<b>P28667</b>	MARCKS-related protein	Marcks11	2.0
<b>P47754</b>	F-actin-capping protein subunit alpha-2	Capza2	2.0
<b>P47962</b>	60S ribosomal protein L5	Rpl5	2.0
<b>P61021</b>	Ras-related protein Rab-5B	Rab5b	2.0
<b>P70206</b>	Plexin-A1	Plxna1	2.0
<b>P83510</b>	Traf2 and NCK-interacting protein kinase	Tnik	2.0
<b>P97333</b>	Neuropilin-1	Nrp1	2.0
<b>P97351</b>	40S ribosomal protein S3a	Rps3a	2.0
<b>Q3TH73</b>	Protein tweety homolog 2	Ttyh2	2.0
<b>Q6PHN9</b>	Ras-related protein Rab-35	Rab35	2.0
<b>Q8K2Q7</b>	BRO1 domain-containing protein BROX	Brox	2.0
<b>Q8QZZ8</b>	Ras-related protein Rab-38	Rab38	2.0
<b>Q9JIW9</b>	Ras-related protein Ral-B	Ralb	2.0
<b>Q9QXY6</b>	EH domain-containing protein 3	Ehd3	2.0
<b>Q9QY73</b>	Transmembrane protein 59	Tmem59	2.0

**Tabla suplementaria 5. Proteínas detectadas en vesículas extracelulares provenientes de la línea celular B16F10(CAV1/Y14E).**

Uniprot accession	Nombre	Gen	Péptidos
P63017	Heat shock cognate 71 kDa protein	Hspa8	174.7
P11276	Fibronectin	Fn1	113.0
Q05793	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	Hspg2	110.3
O08992	Syntenin-1	Sdcbp	98.3
Q68FD5	Clathrin heavy chain 1	Cltc	81.0
Q9WU78	Programmed cell death 6-interacting protein	Pdcd6ip	78.3
P35762	CD81 antigen	Cd81	56.0
P09055	Integrin beta-1	Itgb1	41.3
Q00651	Integrin alpha-4	Itga4	41.3
Q8R2Y2	Cell surface glycoprotein MUC18	Mcam	41.0
P63037	DnaJ homolog subfamily A member 1	Dnaja1	37.7
P29812	L-dopachrome tautomerase	Dct	33.7
P17742	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	Ppia	33.0
Q8R366	Immunoglobulin superfamily member 8	Igsf8	29.7
P10404	MLV-related proviral Env polyprotein	unassigned	28.0
P11344	Tyrosinase	Tyr	25.3
P48036	Annexin A5	Anxa5	25.3
B2RXS4	Plexin-B2	Plxnb2	25.0
Q62419	Endophilin-A2	Sh3gl1	24.7
P26041	Moesin	Msn	24.3
Q8VDN2	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	Atp1a1	24.3
P29341	Polyadenylate-binding protein 1	Pabpc1	24.0
P10852	4F2 cell-surface antigen heavy chain	Slc3a2	22.0
P21956	Lactadherin	Mfge8	21.0
Q6PIC6	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	Atp1a3	20.3
P61226	Ras-related protein Rap-2b	Rap2b	20.0
Q61739	Integrin alpha-6	Itga6	19.7
P17879	Heat shock 70 kDa protein 1B	Hspa1b	19.3
Q64337	Sequestosome-1	Sqstm1	19.0
P23249	Putative helicase MOV-10	Mov10	18.3
Q63961	Endoglin	Eng	18.3
P17156	Heat shock-related 70 kDa protein 2	Hspa2	18.0

<b>P62874</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	Gnb1	18.0
<b>E9Q5G3</b>	Kinesin-like protein KIF23	Kif23	17.3
<b>Q9QYJ0</b>	DnaJ homolog subfamily A member 2	Dnaja2	17.3
<b>P08752</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	Gnai2	17.0
<b>P16627</b>	Heat shock 70 kDa protein 1-like	Hspa11	17.0
<b>Q62351</b>	Transferrin receptor protein 1	Tfrc	16.7
<b>Q3UH60</b>	Disco-interacting protein 2 homolog B	Dip2b	16.3
<b>Q80W68</b>	Kin of IRRE-like protein 1	Kirrel1	15.0
<b>P07356</b>	Annexin A2	Anxa2	14.7
<b>P18760</b>	Cofilin-1	Cfl1	14.3
<b>P41731</b>	CD63 antigen	Cd63	14.3
<b>P11688</b>	Integrin alpha-5	Itga5	13.0
<b>P43406</b>	Integrin alpha-V	Itgav	13.0
<b>P51150</b>	Ras-related protein Rab-7a	Rab7a	13.0
<b>P10107</b>	Annexin A1	Anxa1	12.7
<b>P40240</b>	CD9 antigen	Cd9	12.7
<b>P15379</b>	CD44 antigen	Cd44	12.3
<b>P35278</b>	Ras-related protein Rab-5C	Rab5c	12.3
<b>Q9WVM1</b>	Rac GTPase-activating protein 1	Racgap1	12.3
<b>P97370</b>	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	Atp1b3	12.0
<b>Q60696</b>	Melanocyte protein PMEL	Pmel	12.0
<b>Q61187</b>	Tumor susceptibility gene 101 protein	TSG101	11.7
<b>Q8CFE6</b>	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2	Slc38a2	11.0
<b>Q8VDD5</b>	Myosin-9	Myh9	11.0
<b>P07901</b>	Heat shock protein HSP 90-alpha	Hsp90aa1	10.7
<b>P63101</b>	14-3-3 protein zeta/delta	Ywhaz	10.7
<b>Q8K2Y3</b>	Protein eva-1 homolog B	Eva1b	10.3
<b>Q9WTI7</b>	Unconventional myosin-Ic	Myo1c	10.3
<b>O35682</b>	Myeloid-associated differentiation marker	Myadm	10.0
<b>P11370</b>	Retrovirus-related Env polyprotein from Fv-4 locus	Fv4	10.0
<b>P40749</b>	Synaptotagmin-4	Syt4	10.0
<b>P14824</b>	Annexin A6	Anxa6	9.7
<b>Q99JR5</b>	Tubulointerstitial nephritis antigen-like	Tinagl1	9.7
<b>Q9D8E6</b>	60S ribosomal protein L4	Rpl4	9.7
<b>Q9WVE8</b>	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2	Pacsin2	9.7
<b>P26040</b>	Ezrin	Ezr	9.3
<b>P35700</b>	Peroxiredoxin-1	Prdx1	9.3

<b>Q61072</b>	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 9	Adam9	9.3
<b>Q9R1Q6</b>	Transmembrane protein 176B	Tmem176b	9.3
<b>P58252</b>	Elongation factor 2	Eef2	9.0
<b>Q8CI32</b>	BAG family molecular chaperone regulator 5	Bag5	8.7
<b>Q9DC51</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha	Gnai3	8.3
<b>G5E829</b>	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	Atp2b1	8.0
<b>P11438</b>	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	Lamp1	8.0
<b>Q3TH73</b>	Protein tweety homolog 2	Ttyh2	8.0
<b>Q8BT07</b>	Centrosomal protein of 55 kDa	Cep55	8.0
<b>O54890</b>	Integrin beta-3	Itgb3	7.7
<b>P17751</b>	Triosephosphate isomerase	Tpi1	7.7
<b>P62835</b>	Ras-related protein Rap-1A	Rap1a	7.7
<b>Q6R0H7</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas	Gnas	7.7
<b>Q9QYI3</b>	DnaJ homolog subfamily C member 7	Dnajc7	7.7
<b>P61205</b>	ADP-ribosylation factor 3	Arf3	7.3
<b>P62242</b>	40S ribosomal protein S8	Rps8	7.3
<b>P62259</b>	14-3-3 protein epsilon	Ywhae	7.3
<b>Q8K2Q7</b>	BRO1 domain-containing protein BROX	Brox	7.3
<b>Q8QZZ8</b>	Ras-related protein Rab-38	Rab38	7.3
<b>P05213</b>	Tubulin alpha-1B chain	Tuba1b	7.0
<b>P10853</b>	Histone H2B type 1-F/J/L	Hist1h2bn	7.0
<b>P17047</b>	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	Lamp2	7.0
<b>P35951</b>	Low-density lipoprotein receptor	Ldlr	7.0
<b>P49817</b>	Caveolin-1	Cav1	7.0
<b>Q09143</b>	High affinity cationic amino acid transporter 1	Slc7a1	7.0
<b>Q8R0J7</b>	Vacuolar protein sorting-associated protein 37B	Vps37b	7.0
<b>Q99JB8</b>	Protein kinase C and casein kinase II substrate protein 3	Pacsin3	7.0
<b>Q9WVT6</b>	Carbonic anhydrase 14	Ca14	7.0
<b>P09411</b>	Phosphoglycerate kinase 1	Pgk1	6.7
<b>P70206</b>	Plexin-A1	Plxna1	6.7
<b>P99024</b>	Tubulin beta-5 chain	Tubb5	6.7
<b>Q9D1C8</b>	Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog	Vps28	6.7
<b>B2RSH2</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1	Gnai1	6.3
<b>P16254</b>	Signal recognition particle 14 kDa protein	Srp14	6.3
<b>P60766</b>	Cell division control protein 42 homolog	Cdc42	6.3
<b>Q04447</b>	Creatine kinase B-type	Ckb	6.3
<b>Q62465</b>	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	Vat1	6.3

<b>O08585</b>	Clathrin light chain A	Clta	6.0
<b>O35566</b>	CD151 antigen	Cd151	6.0
<b>O88342</b>	WD repeat-containing protein 1	Wdr1	6.0
<b>O89051</b>	Integral membrane protein 2B	Itm2b	6.0
<b>P46638</b>	Ras-related protein Rab-11B	Rab11b	6.0
<b>P57716</b>	Nicastrin	Ncstn	6.0
<b>Q61490</b>	CD166 antigen	Alcam	6.0
<b>Q9D8B3</b>	Charged multivesicular body protein 4b	Chmp4b	6.0
<b>Q9QZI9</b>	Serine incorporator 3	Serinc3	6.0
<b>P18572</b>	Basigin	Bsg	5.7
<b>P46935</b>	E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4	Nedd4	5.7
<b>P62960</b>	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	Ybx1	5.7
<b>P97351</b>	40S ribosomal protein S3a	Rps3a	5.7
<b>Q99J93</b>	Interferon-induced transmembrane protein 2	Ifitm2	5.7
<b>Q9DCK3</b>	Tetraspanin-4	Tspan4	5.7
<b>Q9QY73</b>	Transmembrane protein 59	Tmem59	5.7
<b>Q9Z1G4</b>	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1	Atp6v0a1	5.7
<b>O35598</b>	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	Adam10	5.3
<b>O35874</b>	Neutral amino acid transporter A	Slc1a4	5.3
<b>O70318</b>	Band 4.1-like protein 2	Epb41l2	5.3
<b>P26039</b>	Talin-1	Tln1	5.3
<b>P49962</b>	Signal recognition particle 9 kDa protein	Srp9	5.3
<b>P51912</b>	Neutral amino acid transporter B(0)	Slc1a5	5.3
<b>P62702</b>	40S ribosomal protein S4, X isoform	Rps4x	5.3
<b>P62737</b>	Actin, aortic smooth muscle	Acta2	5.3
<b>P63321</b>	Ras-related protein Ral-A	Rala	5.3
<b>Q8BTM8</b>	Filamin-A	Flna	5.3
<b>Q8VCF5</b>	Tetraspanin-10	Tspan10	5.3
<b>Q9D7S9</b>	Charged multivesicular body protein 5	Chmp5	5.3
<b>Q9JIZ9</b>	Phospholipid scramblase 3	Plscr3	5.3
<b>O09044</b>	Synaptosomal-associated protein 23	Snap23	5.0
<b>P29319</b>	Ephrin type-A receptor 3	Epha3	5.0
<b>P46467</b>	Vacuolar protein sorting-associated protein 4B	Vps4b	5.0
<b>P61982</b>	14-3-3 protein gamma	Ywhag	5.0
<b>P62821</b>	Ras-related protein Rab-1A	Rab1A	5.0
<b>P62880</b>	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	Gnb2	5.0
<b>P63028</b>	Translationally-controlled tumor protein	Tpt1	5.0

<b>Q60932</b>	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	Vdac1	5.0
<b>Q8JZZ7</b>	Adhesion G protein-coupled receptor L2	Adgrl2	5.0
<b>Q9WVL3</b>	Solute carrier family 12 member 7	Slc12a7	5.0
<b>P24668</b>	Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor	M6pr	4.7
<b>P84096</b>	Rho-related GTP-binding protein RhoG	Rhog	4.7
<b>Q91VK4</b>	Integral membrane protein 2C	Itm2c	4.7
<b>Q99L47</b>	Hsc70-interacting protein	St13	4.7
<b>Q99PT1</b>	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Arhgdia	4.7
<b>Q9DBJ1</b>	Phosphoglycerate mutase 1	Pgam1	4.7
<b>P12815</b>	Programmed cell death protein 6	Pdcd6	4.3
<b>P53986</b>	Monocarboxylate transporter 1	Slc16a1	4.3
<b>P57722</b>	Poly(rC)-binding protein 3	Pcbp3	4.3
<b>Q6KAU4</b>	Multivesicular body subunit 12B	Mvb12b	4.3
<b>Q6P5F7</b>	Protein tweety homolog 3	Ttyh3	4.3
<b>Q9CQW9</b>	Interferon-induced transmembrane protein 3	Ifitm3	4.3
<b>B0V2N1</b>	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S	Ptprs	4.0
<b>O54962</b>	Barrier-to-autointegration factor	Banf1	4.0
<b>O70401</b>	Tetraspanin-6	Tspan6	4.0
<b>P26043</b>	Radixin	Rdx	4.0
<b>P26645</b>	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	Marcks	4.0
<b>P68254</b>	14-3-3 protein theta	Ywhaq	4.0
<b>P97797</b>	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type substrate 1	Sirpa	4.0
<b>Q05816</b>	Fatty acid-binding protein 5	Fabp5	4.0
<b>Q3UDW8</b>	Heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase	Hgsnat	4.0
<b>Q810U5</b>	Coiled-coil domain-containing protein 50	Ccdc50	4.0
<b>Q91V41</b>	Ras-related protein Rab-14	Rab14	4.0
<b>Q9EQP2</b>	EH domain-containing protein 4	Ehd4	4.0
<b>Q9JKF1</b>	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	Iqgap1	4.0
<b>Q9JL18</b>	Beta-secretase 2	Bace2	4.0
<b>Q9QY33</b>	Tetraspanin-3	Tspan3	4.0
<b>P27659</b>	60S ribosomal protein L3	Rpl3	3.7
<b>P30999</b>	Catenin delta-1	Ctnnd1	3.7
<b>P40237</b>	CD82 antigen	Cd82	3.7
<b>P97820</b>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	Map4k4	3.7
<b>Q61990</b>	Poly(rC)-binding protein 2	Pcbp2	3.7
<b>Q64735</b>	Complement component receptor 1-like protein	Cr11	3.7
<b>Q78HU3</b>	Multivesicular body subunit 12A	Mvb12a	3.7

<b>Q9JJ00</b>	Phospholipid scramblase 1	Plscr1	3.7
<b>Q9WVK4</b>	EH domain-containing protein 1	Ehd1	3.7
<b>F8VQB6</b>	Unconventional myosin-X	Myo10	3.3
<b>P08556</b>	GTPase NRas	Nras	3.3
<b>P21278</b>	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11	Gna11	3.3
<b>P28660</b>	Nck-associated protein 1	Nckap1	3.3
<b>P61027</b>	Ras-related protein Rab-10	Rab10	3.3
<b>P62331</b>	ADP-ribosylation factor 6	Arf6	3.3
<b>P62717</b>	60S ribosomal protein L18a	Rpl18a	3.3
<b>P97384</b>	Annexin A11	Anxa11	3.3
<b>Q61599</b>	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	Arhgdib	3.3
<b>Q62371</b>	Discoidin domain-containing receptor 2	Ddr2	3.3
<b>Q6P1B3</b>	PILR alpha-associated neural protein	Pianp	3.3
<b>Q6ZQA6</b>	Immunoglobulin superfamily member 3	Igsf3	3.3
<b>Q8BJU2</b>	Tetraspanin-9	Tspan9	3.3
<b>Q99P72</b>	Reticulon-4	Rtn4	3.3
<b>Q9CX00</b>	IST1 homolog	Ist1	3.3
<b>Q9DB34</b>	Charged multivesicular body protein 2a	Chmp2a	3.3
<b>Q9JJX6</b>	P2X purinoceptor 4	P2rx4	3.3
<b>Q9QUI0</b>	Transforming protein RhoA	Rhoa	3.3
<b>Q9Z127</b>	Large neutral amino acids transporter small subunit 1	Slc7a5	3.3
<b>F8VPU2</b>	FERM, ARHGEF and pleckstrin domain-containing protein 1	Farp1	3.0
<b>O55026</b>	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2	Entpd2	3.0
<b>O70309</b>	Integrin beta-5	Itgb5	3.0
<b>O70404</b>	Vesicle-associated membrane protein 8	Vamp8	3.0
<b>P14869</b>	60S acidic ribosomal protein P0	Rplp0	3.0
<b>P16381</b>	Putative ATP-dependent RNA helicase P110	D1Pas1	3.0
<b>P26231</b>	Catenin alpha-1	Ctnna1	3.0
<b>P47911</b>	60S ribosomal protein L6	Rpl6	3.0
<b>P55258</b>	Ras-related protein Rab-8A	Rab8a	3.0
<b>P56480</b>	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Atp5f1b	3.0
<b>P97429</b>	Annexin A4	Anxa4	3.0
<b>Q5FWI3</b>	Cell surface hyaluronidase	Cemip2	3.0
<b>Q60928</b>	Glutathione hydrolase 1 proenzyme	Ggt1	3.0
<b>Q6PHN9</b>	Ras-related protein Rab-35	Rab35	3.0
<b>Q8QZY6</b>	Tetraspanin-14	Tspan14	3.0
<b>Q8R550</b>	SH3 domain-containing kinase-binding protein 1	Sh3kbp1	3.0

<b>Q99JY9</b>	Actin-related protein 3	Actr3	3.0
<b>Q9CZM2</b>	60S ribosomal protein L15	Rpl15	3.0
<b>Q9DCS1</b>	Transmembrane protein 176A	Tmem176a	3.0
<b>Q9WTR6</b>	Cystine/glutamate transporter	Slc7a11	3.0
<b>E9Q414</b>	Apolipoprotein B-100	Apob	2.7
<b>E9Q557</b>	Desmoplakin	Dsp	2.7
<b>O08709</b>	Peroxiredoxin-6	Prdx6	2.7
<b>O35316</b>	Sodium- and chloride-dependent taurine transporter	Slc6a6	2.7
<b>O35375</b>	Neuropilin-2	Nrp2	2.7
<b>O70439</b>	Syntaxin-7	Stx7	2.7
<b>P09041</b>	Phosphoglycerate kinase 2	Pgk2	2.7
<b>P21995</b>	Embigin	Emb	2.7
<b>P28229</b>	Gap junction gamma-1 protein	Gjc1	2.7
<b>P29387</b>	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4	Gnb4	2.7
<b>P30412</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	Ppic	2.7
<b>P31786</b>	Acyl-CoA-binding protein	Dbi	2.7
<b>P35980</b>	60S ribosomal protein L18	Rpl18	2.7
<b>P47963</b>	60S ribosomal protein L13	Rpl13	2.7
<b>P53690</b>	Matrix metalloproteinase-14	Mmp14	2.7
<b>P58355</b>	Membrane-associated transporter protein	Slc45a2	2.7
<b>P63001</b>	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	Rac1	2.7
<b>P63024</b>	Vesicle-associated membrane protein 3	Vamp3	2.7
<b>P63038</b>	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Hspd1	2.7
<b>Q06335</b>	Amyloid-like protein 2	Aplp2	2.7
<b>Q3UPF5</b>	Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1	Zc3hav1	2.7
<b>Q60605</b>	Myosin light polypeptide 6	Myl6	2.7
<b>Q60961</b>	Lysosomal-associated transmembrane protein 4A	Laptm4a	2.7
<b>Q61090</b>	Frizzled-7	Fzd7	2.7
<b>Q64436</b>	Potassium-transporting ATPase alpha chain 1	Atp4a	2.7
<b>Q9JLQ0</b>	CD2-associated protein	Cd2ap	2.7
<b>B8JK39</b>	Integrin alpha-9	Itga9	2.3
<b>O88746</b>	Target of Myb protein 1	Tom1	2.3
<b>P08228</b>	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	Sod1	2.3
<b>P19157</b>	Glutathione S-transferase P 1	Gstp1	2.3
<b>P60764</b>	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3	Rac3	2.3
<b>P80314</b>	T-complex protein 1 subunit beta	Cct2	2.3
<b>Q01853</b>	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	Vcp	2.3

<b>Q07076</b>	Annexin A7	Anxa7	2.3
<b>Q3TEW6</b>	Myelin protein zero-like protein 1	Mpzl1	2.3
<b>Q3U2S8</b>	Voltage-gated hydrogen channel 1	Hvcn1	2.3
<b>Q62159</b>	Rho-related GTP-binding protein RhoC	Rhoc	2.3
<b>Q62165</b>	Dystroglycan	Dag1	2.3
<b>Q62523</b>	Zyxin	Zyx	2.3
<b>Q64430</b>	Copper-transporting ATPase 1	Atp7a	2.3
<b>Q80X71</b>	Transmembrane protein 106B	Tmem106b	2.3
<b>Q80ZJ1</b>	Ras-related protein Rap-2a	Rap2a	2.3
<b>Q8BPM0</b>	Disheveled-associated activator of morphogenesis 1	Daam1	2.3
<b>Q8C261</b>	Sodium/potassium/calcium exchanger 5	Slc24a5	2.3
<b>Q8K209</b>	Adhesion G-protein coupled receptor G1	Adgrg1	2.3
<b>Q8R464</b>	Cell adhesion molecule 4	Cadm4	2.3
<b>Q99JI6</b>	Ras-related protein Rap-1b	Rap1b	2.3
<b>Q9CZX7</b>	Type 2 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 4-phosphatase	Pip4p2	2.3
<b>Q9D2Q3</b>	Uncharacterized protein C10orf88 homolog	unassigned	2.3
<b>Q9QZI8</b>	Serine incorporator 1	Serinc1	2.3
<b>Q9Z1Q5</b>	Chloride intracellular channel protein 1	Clic1	2.3
<b>O35474</b>	EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3	Edil3	2.0
<b>O35516</b>	Neurogenic locus notch homolog protein 2	Notch2	2.0
<b>P0C0A3</b>	Charged multivesicular body protein 6	Chmp6	2.0
<b>P10639</b>	Thioredoxin	Txn	2.0
<b>P16045</b>	Galectin-1	Lgals1	2.0
<b>P17809</b>	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	Slc2a1	2.0
<b>P28656</b>	Nucleosome assembly protein 1-like 1	Nap1l1	2.0
<b>P32507</b>	Nectin-2	Nectin2	2.0
<b>P35282</b>	Ras-related protein Rab-21	Rab21	2.0
<b>P35802</b>	Neuronal membrane glycoprotein M6-a	Gpm6a	2.0
<b>P49769</b>	Presenilin-1	Psen1	2.0
<b>P54116</b>	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	Stom	2.0
<b>P60335</b>	Poly(rC)-binding protein 1	Pcbp1	2.0
<b>P61021</b>	Ras-related protein Rab-5B	Rab5b	2.0
<b>P62301</b>	40S ribosomal protein S13	Rps13	2.0
<b>P83510</b>	Traf2 and NCK-interacting protein kinase	Tnik	2.0
<b>P86048</b>	60S ribosomal protein L10-like	Rpl10l	2.0
<b>Q02248</b>	Catenin beta-1	Ctnnb1	2.0
<b>Q3UH93</b>	Plexin-D1	Plxnd1	2.0

<b>Q9CZR2</b>	N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase 2	Naalad2	2.0
<b>Q9QZC7</b>	Pleckstrin homology domain-containing family B member 2	Plekhb2	2.0
<b>Q9WVC3</b>	Caveolin-2	Cav2	2.0
<b>Q9Z2M6</b>	Ubiquitin-like protein 3	Ubl3	2.0